วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

การดื้อต่อสารต้านจุลชีพที่ถ่ายทอดร่วมกับการผลิตเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamases ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae*

อรุณลักษณ์ ลุลิตานนท์[1,2] * อรุณวดี ชนะวงศ์[1,2] พิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์[1,2] นิภาดา คลังจัตุรัส[3] กมลเนตร ประดุจชนม์[3]

บทคัดย่อ

ปัจจุบันแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยมีอุบัติการณ์สร้างเอนไซม์ extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) เพิ่มมากขึ้น การสร้างเอนไซม์นี้ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยา cephalosporins รุ่นแรกๆ รวมถึง third-generation cephalosporins และ monobactams ชนิดของ ESBLs ที่พบใน *Enterobacteriaceae* มีทั้งชนิด TEM, SHV, VEB และ CTX-M ในรายงานนี้ได้ศึกษาการถ่ายทอด ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs จากแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง ESBLs ชนิดต่างๆ จำนวน 42 ตัวอย่าง (แบคทีเรียตัวให้หรือ donor) ไปยัง *E.coli* UB 1637 (แบคทีเรียตัวรับหรือ recipient) แล้วนำแบคทีเรียตัวให้ และตัวรับที่ได้รับถ่ายทอดการสร้างเอนไซม์ ESBLs (transconjugants) มาทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ 21 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียตัวให้สามารถถ่ายทอดการสร้าง ESBLs ให้ตัวรับได้ 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30.9) ผลการทดสอบความไวต่อยาพบว่าแบคทีเรียตัวให้ที่สร้างเอนไซม์ ESBL ชนิดต่างๆ ทั้ง 13 ตัวอย่างมีความไวต่อยา imipenem และ meropenem และส่วนใหญ่ไวต่อยา cefepime, cefoxitin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, sulperazone และ colistin ส่วน transconjugants เมื่อได้รับการถ่ายทอดจีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs แล้วทำให้ดื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่ม β-lactams และยา β-lactams ที่ผสมกับ β-lactamase-inhibitor โดยยาที่ transconjugants ส่วนมากดื้อคือ cefpodoxime และ ceftazidime การดื้อยาชนิดอื่นที่พบการถ่ายทอดร่วมกับการสร้าง ESBLs ที่แสดงออกใน transconjugants ที่พบมากคือยา gentamicin, amikacin, netilmicin และ cotrimoxazole ส่วนการดื้อยาที่ไม่พบการถ่ายทอดเลย ได้แก่ ยา norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, cefoxitin, colistin และ sulfoperazone การถ่ายทอดจีนดื้อยาหลายชนิดร่วมกันเช่นนี้ ทำให้แบคทีเรียตัวรับกลายเป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multi-drug resistance)

คำสำคัญ : การถ่ายทอด, การดื้อยา, β-lactamases, ESBLs

[1] สายวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
[3] นักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ ชั้นปีที่ 4 คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
* ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Antimicrobial resistance co-transferred with extended-spectrum β-lactamase production in bacteria of family *Enterobacteriaceae*

Aroonlug Lulitanond[1,2]*, Aroonwadee Chanawong[1,2], Pipat Sribenjalux[1,2], Nipada Klangjatturat[3], Kamonnate Pradudchon[3]

Abstract

Extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* have emerged worldwide and caused life threatening infections which are serious concerns in the current situation. The enzymes affected bacteria to resist both the early and the third generation cephalosporins together with monobactams. Various types of ESBLs have been found in members of the family *Enterobacteriaceae* namely: TEM, SHV, CTX-M and VEB-1. We reported antimicrobial resistance that was transferred with ESBL production when mating each of 42 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* donors to *Escherichia coli* UB 1637, a non- ESBL- producing recipient. Susceptibility to 21 antimicrobial agents of the ESBL-producing donors and transconjugants was tested by disk diffusion method. It was found that 13 of the 42 (30.9%) donors could transfer the ability to produce ESBLs. The susceptibility test showed that all ESBL-producing donors were susceptible to imipenem and meropenem whereas the majority of isolates were susceptible to cefepime, cefoxitin, norfloxacin, ofloxacin, sulperazone and colistin. All transconjugants could produce ESBLs and became resistant to various β-lactams and β-lactamase-inhibitor. It was also found that antimicrobial resistance properties which were often co-transferred with the ESBLs production were resistance determinant to gentamicin, amikacin, netilmicin and cotrimoxazole, whereas resistance to norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and cefoxitin were rarely or not transferred to the recipient. Transfer of several resistance determinants rendered the recipient to be multi-drug resistant strain.

Key words : transfer, antimicrobial resistance, β-lactamases, ESBLs

[1] Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University
[2] Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories, Khon Kaen University
[3] The 4th year students, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University
* Corresponding author (e-mail : arolul@kku.ac.th)

บทนำ

ยากลุ่ม third-generation cephalosporins ถูกผลิตขึ้นเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ดื้อยาจากการสร้างเอนไซม์ narrow spectrum β-lactamase แต่ในระยะเวลาเพียง 2-3 ปีหลังจากเริ่มใช้ยากลุ่มนี้ พบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ดื้อต่อยา third-generation cephalosporins และ monobactams การดื้อยาเหล่านี้เกิดจากการสร้างเอนไซม์ β-lactamase ชนิดใหม่ เรียกกลุ่มเอนไซม์ชนิดใหม่นี้ว่า extended-spectrum β-lactamases (ESBLs) โดยพบเอนไซม์นี้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983[1] แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่พบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะ *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli*[2] เอนไซม์นี้สามารถสลายยากลุ่ม β-lactams ชนิดต่างๆ ได้แก่ penicillins, narrow-spectrum และ extended-spectrum cephalosporins รวมถึง monobactams ESBLs หลายชนิดเป็นเอนไซม์ที่วิวัฒนาการมาจาก class A β-lactamases[3] ได้แก่ TEM-1, TEM-2, และ SHV-1 ซึ่งเป็น narrow-spectrum β-lactamase พบมากในแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่ดื้อต่อยา ampicillin, amoxicillin และ penicillin อื่นๆ รวมถึง cephalosporins รุ่นแรกๆ การกลายพันธุ์ของจีนที่กำกับเอนไซม์ TEM-1, TEM-2, และ SHV-1 ทำให้เกิด β-lactamase ชนิดใหม่ที่สามารถสลายยา third-generation cephalosporins และ aztreonam[4] แต่ไม่สามารถสลายยา cephamycins (ได้แก่ cefotetan, cefoxitin, cefmetazole) และ carbapenems (ได้แก่ imipenem, ertapenem, meropenem) ฤทธิ์ของเอนไซม์ ESBLs ถูกยับยั้งด้วยสารกลุ่ม β-lactamase inhibitor ได้แก่ clavulanate, sulbactam และ tazobactam แบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* บางชนิดสร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิดอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับ TEM และ SHV เช่น ชนิด CTX-M, VEB, PER และ OXA เป็นต้น นอกจากเอนไซม์ ESBLs แล้วยังมีเอนไซม์ β-lactamase ชนิดอื่นๆ ที่สามารถสลายยากลุ่ม extended-spectrum cephalo- sporins ได้เช่นกัน ได้แก่ ชนิด AmpC และ carbapenemase เอนไซม์ AmpC มีฤทธิ์คล้าย ESBLs คือสลายยา third-generation หรือ extended-spectrum cephalosporins ได้ แต่ต่างจาก ESBLs คือ สามารถสลายยา cephamycins และทนต่อสารยับยั้ง β-lactamase เช่น clavulanic acid[5] ส่วนเอนไซม์ carbapenemase มีฤทธิ์สลายยาได้หลายชนิดทั้ง carbapenems และ extended-spectrum cephalosporins ปัจจุบัน *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง carbapenemase พบน้อยมากแต่ก็ควรมีการติดตามเฝ้าระวังเพื่อป้องกันไม่ให้เพิ่มจำนวนหรือแพร่กระจายมากขึ้น ปัญหาหลักในปัจจุบันคือการดื้อยาหลายชนิดของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อต่างๆ โดยเฉพาะโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล[2] เช่นโรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ ในระบบหายใจ ในกระแสเลือดและอวัยวะภายในต่างๆ เป็นต้น *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs นอกจากจะดื้อยากลุ่ม extended-spectrum cephalosporins ยังดื้อยากลุ่มอื่นๆร่วมด้วย เช่น aminoglycosides, sulfonamides และอาจดื้อยากลุ่ม quinolones ทั้งนี้เนื่องจากการสร้าง ESBLs ส่วนใหญ่ถูกกำกับโดยจีนบนพลาสมิดซึ่งอาจมีจีนที่กำกับการดื้อยาชนิดอื่นร่วมด้วย และมีโอกาสที่จะถ่ายทอดจีนดื้อยาจากแบคทีเรียตัวหนึ่งไปยังแบคทีเรียอีกตัวหนึ่ง ทำให้มีเชื้อที่ดื้อยาหลายชนิดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและแพร่กระจายเป็นวงกว้าง[6] ผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อจาก *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง ESBLs จึงจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยยาที่เหมาะสมและเพียงพอ[7]

ในประเทศไทยมีรายงานจากโรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่า *E. coli* และ *Klebsiella* ที่แยกได้จากผู้ป่วยระหว่างปีค.ศ. 1994-1996 สร้าง ESBLs ร้อยละ 3.5 และ 13.5 ตามลำดับ[8] หลังจากนั้นมีการศึกษาชนิดของ ESBLs พบว่ามีหลายชนิดได้แก่ SHV-12, SHV-5, SHV-2a และ VEB-1[9] นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสร้าง ESBLs มากกว่า 1 ชนิด[10] ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 ได้มีการศึกษาความชุกและชนิดของเอนไซม์ ESBLs ที่โรงพยาบาล

เดิมพบว่า แบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง ESBLs มีจำนวนมากขึ้น (ร้อยละ 17)[10]

ในรายงานนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาการดื้อต่อยาชนิดต่างๆที่ถ่ายทอดร่วมกับการสร้างเอนไซม์ ESBLs ของแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เพื่อเป็นข้อมูลให้ทราบว่านอกจากการสร้างเอนไซม์ ESBLs ที่สามารถถ่ายทอดจากแบคทีเรียตัวหนึ่งสู่แบคทีเรียตัวอื่นได้แล้ว ยังมีการถ่ายทอดการดื้อยาชนิดอื่นๆควบคู่ไปด้วย

วัสดุและวิธีการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ได้แก่แบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งได้ศึกษามาแล้วว่ามีจีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์ ระหว่างปี ค.ศ. 1998-2003[10] รวมจำนวน 42 ตัวอย่าง (donor), *E. coli* UB1637 ซึ่งไวต่อยากลุ่ม β-lactams และดื้อยา streptomycin เป็นตัวรับ (recipient) ในการถ่ายทอดการสร้าง ESBLs, *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมในการทดสอบความไวต่อยา เชื้อเหล่านี้เก็บรักษาใน skimmed milk ที่มี glycerol ร้อยละ 10 และไว้ที่อุณหภูมิ -20 ºC

แบคทีเรียตัวให้ทุกตัวอย่างได้ทดสอบแล้ว พบว่าถูกยับยั้งได้ด้วย streptomycin 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารต้านจุลชีพ

ได้แก่ Mueller Hinton agar (MERCK, Darmstadt, Germany), MacConkey agar (Oxiod, Hampshire, England), Brain heart infusion broth (BHI) (MERCK), triple sugar iron agar (TSI) (MERCK), citrate (MERCK), lysine iron agar (LIA) (Laboratories Conda, S.A., Spain), urea agar base (BBL, Becton Dickinson, France), motility test (BBL), skimmed milk (Scharlau Chemie S.A., Spain)

สารต้านจุลชีพได้แก่ streptomycin (M&H Manufacturing, Thailand), ceftazidime (Sigma, St Louis, USA)

แผ่นยาต้านจุลชีพ (Oxiod) จำนวน 21 ชนิดได้แก่ amikacin (AK 30), amoxycillin/clavulanic acid (AMC 20/10), cefepime (FEP 30), cefotaxime (CTX 30), cefoperazone (CFP 75), cefoxitin (FOX 30), cefpirome (CPO 30), cefpodoxime (CPD 10), ceftazidime (CAZ 30), ceftriaxone (CRO 30), ciprofloxacin (CIP 5), colistin (CT 10), cotrimoxazole (SXT 1.25/23.75), gentamicin (GN 10), imipenem (IPM 10), meropenem (MEM 10), netilmicin (NET 30), norfloxacin (NOR 10), ofloxacin (OFX 5), piperacillin/tazobactam (TZP 100/10), sulfoperazone (cefoperazone/sulbactam SCF 75/30)

การพิสูจน์สปีชีส์ของเชื้อ

เพาะเชื้อบน MacConkey agar และอบที่ 35-37 ºC เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีของเชื้อ มาทดสอบทางชีวเคมีต่างๆ ได้แก่ TSI, LIA, urea, citrate, motile, indole อ่านและแปลผลตามวิธีการทดสอบมาตรฐาน[11]

การถ่ายทอดจีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs และการดื้อยาชนิดต่างๆ

ทำการถ่ายทอดจีนจากแบคทีเรียตัวให้ไปสู่แบคทีเรียตัวรับ ด้วยวิธี broth culture conjugation[12] โดยนำโคโลนีของแบคทีเรียตัวให้ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs และ *E. coli* UB 1637 ที่เพาะบน MacConkey agar นาน 18-24 ชั่วโมง มาเลี้ยงใน BHI broth นาน 4-6 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียตัวให้ใส่ในหลอดเชื้อตัวรับในอัตราส่วนตัวให้ต่อตัวรับ เท่ากับ 1:2 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37ºC นาน 4-6 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจากหลอดที่ผสมมา 100 ไมโครลิตร spread บน MacConkey agar ที่มียา streptomycin และ ceftazidime ความเข้มข้น 400 และ 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ นำไปอบที่ 37 ºC นาน 18-24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เป็น non-lactose fermenter ซึ่งเป็นลักษณะของ *E. coli* UB 1637 ไปทำการทดสอบยืนยันการได้รับจีนที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี

double-disc diffusion โดยใช้ยา amoxycillin / clavulanic acid (AMC), ceftazidime (CAZ) และ cefotaxime (CTX)[13]

นำ transconjugants มาทำการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพทั้ง 21 ชนิด โดยวิธี disc diffusion (Kirby-Bauer)[14] เปรียบเทียบกับความไวต่อยาของ แบคทีเรียตัวให้

ผลการศึกษา

จากการศึกษาความสามารถ ในการถ่ายทอดจีนที่กำกับการดื้อยา ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ ESBLs โดยวิธี conjugation พบแบคทีเรียตัวให้ที่ถ่ายทอดจีนดื้อยาไปให้ตัวรับจำนวน 13 ตัวอย่าง (ร้อยละ 30.9) จากแบคทีเรียตัวให้ทั้งหมด 42 ตัวอย่าง เชื้อที่พบการถ่ายทอดได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* 8 ตัวอย่าง, *Proteus mirabilis* 2 ตัวอย่าง, *Serratia* spp. 2 ตัวอย่าง, *Providencia* spp. 1 ตัวอย่าง โดย transconjugants ทั้ง 13 ตัวอย่างสามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ได้ และพบว่าแบคทีเรียตัวให้ที่มีจีนกำกับการสร้าง ESBLs ที่สามารถถ่ายทอดสู่เชื้ออื่นนั้น มีหลากหลายชนิด ทั้ง SHV, CTX-M, และ VEB-1 ชนิดของแบคทีเรียตัวให้, ชนิดของ ESBLs, จำนวนของแบคทีเรียตัวให้และจำนวน transconjugants ดังแสดงไว้ใน **ตารางที่ 1**

ตารางที่ 1 ชนิดของแบคทีเรียตัวให้ซึ่งผลิตเอนไซม์ ESBLs ชนิดต่างๆและจำนวน transconjugants ที่ได้

ชนิดของ ESBLs ใน Donor (n)	Organism (n)	จำนวน transconjugants ที่ได้
VEB-1 (5)	*Proteus mirabilis* (3)	2
	Providencia spp. (1)	1
	Klebsiella pneumoniae (1)	1
VEB-1, TEM (3)	*Escherichea coli* (3)	-
SHV-12 (12)	*Klebsiella pneumoniae* (12)	7
SHV-12, TEM (2)	*Klebsiella pneumoniae* (2)	-
SHV-2a (1)	*Klebsiella pneumoniae* (1)	-
CTX-M-9 (2)	*Serratia* spp. (2)	2
CTX-M15 (1)	*Escherichea coli* (1)	-
CTX-M9, SHV-12 (4)	*Klebsiella pneumoniae* (4)	-
CTX-M-15, TEM (4)	*Klebsiella pneumoniae* (2)	-
	Escherichea coli (2)	-
CTX-M9, SHV-12, TEM (4)	*Klebsiella pneumoniae* (4)	-
CTX-M9, SHV-12, VEB-1 (1)	*Klebsiella pneumoniae* (1)	-
CTX-M15, SHV-12, TEM (3)	*Klebsiella pneumoniae* (2)	-
	Escherichea coli (1)	-
รวม	42	13

ผลการศึกษาแบบแผนความไวต่อสารต้านจุลชีพของแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ต่อสารต้านจุลชีพจำนวน 21 ชนิด โดยทดสอบแบคทีเรียตัวให้ และ transconjugants ทั้ง 13 ตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียตัวให้ทุกตัวอย่างไวต่อยา IPM และ MEM และยาที่แบคทีเรียตัวให้ทุกตัวอย่างให้ผลดื้อได้แก่ CTX, CAZ, CPD, และ SXT ส่วนยาที่แบคทีเรียตัวให้มากกว่าร้อยละ 50 ให้ผลดื้อได้แก่ AK, AMC,CFP, CPO, CRO, GN และ NET โดยมีความดื้อร้อยละ 76.9, 84.6, 92.3, 53.8, 92.3, 76.9 และ 69.2 ตามลำดับ โดยแบคทีเรียตัวให้ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด SHV-12 จำนวน 7 ตัวอย่าง ส่วนใหญ่มีความไวต่อยา FEP, FOX, CT, IPM, MEM, NOR, OFX และ SCF แบคทีเรียตัวให้ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด CTX-M-9 จำนวน 2 ตัวอย่างมีความไวต่อยา IPM, MEM, NOR, OFX, CIP, TZP และ CT แบคทีเรียตัวให้ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ชนิด VEB-1 จำนวน 4 ตัวอย่างมีความไวต่อยา FOX, IPM, MEM, NOR, TZP และ SCF ส่วนแบคทีเรียตัวให้ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปมีความไวต่อยา IPM, MEM และ CT (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ผลการทดสอบความไวต่อยาของ E. coli UB 1637 ซึ่งเป็นแบคทีเรียตัวรับ พบว่าไวต่อสารต้านจุลชีพทั้ง 21 ชนิด ส่วน transconjugants ที่ได้รับการถ่ายทอดการสร้างเอนไซม์ ESBLs พบว่า มีแบบแผนความไวหลากหลาย โดยพบว่ามากกว่าร้อยละ 50 ของ transconjugants ดื้อต่อยา AK, AMC, CPD, CAZ, SXT, GN และ NET อัตราการดื้อต่อยาชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียตัวให้ และ transconjugant ดังแสดงใน **ตารางที่ 2** ชนิดของสารต้านจุลชีพที่พบถ่ายทอดจากแบคทีเรียตัวให้แต่ละตัวอย่างแสดงใน **ตารางที่ 3**

ตารางที่ 2 อัตราการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของ transconjugant จำนวน 13 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับกลุ่ม donor

สารต้านจุลชีพ	จำนวน donors (%)	จำนวน transconjugants (%)
Amikacin (AK)	10 (76.9)	9 (69.2)
Amoxycillin/clavulanic acid (AMC)	11 (84.6)	9 (69.2)
Cefepime (FEP)	5 (38.5)	2 (15.4)
Cefotaxime (CTX)	13 (100)	4 (30.8)
Cefoperazone (CFP)	12 (92.3)	6 (46.2)
Cefoxitin (FOX)	1 (7.6)	0 (0)
Cefpirome (CPO)	7 (53.8)	2 (15.4)
Cefpodoxime (CPD)	13 (100)	12 (92.3)
Ceftazidime (CAZ)	13 (100)	12 (92.3)
Ceftriaxone (CRO)	12 (92.3)	5 (38.5)
Ciprofloxacin CIP)	5 (38.5)	0 (0)
Colistin (CT)	3 (23.1)	0 (0)
Cotrimoxazole (SXT)	13 (100)	10 (76.9)
Gentamicin (GN)	10 (76.9)	7 (53.8)
Imipenem (IPM)	0 (0)	0 (0)
Meropenem (MEM)	0 (0)	0 (0)
Netilmicin (NET)	9 (69.2)	8 (61.5)
Norfloxacin (NOR)	3 (23.1)	0 (0)
Ofloxacin (OFX)	2 (15.3)	0 (0)
Piperacillin/tazobactam (TZP)	4 (30.8)	3 (23.1)
Sulfoperazone (SCF)	5 (38.5)	0 (0)

ตารางที่ 3 รูปแบบการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของ donor และที่ถ่ายทอดไปยัง transconjugants

Organism	ชนิดของ ESBLs	รูปแบบการดื้อต่อสารต้านจุลชีพ	การดื้อที่ถ่ายทอดไปยัง transconjugant
Proteus mirabilis 1	VEB-1	AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, CT, FEP, SXT	AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, FEP, SXT
Proteus mirabilis 2	VEB-1	AK, CTX, CAZ, CPD, CT, GN, SXT	AK, CAZ, CPD, GN, SXT
Providencia spp.	VEB-1	AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, CT, FEP, GN, OFX, CIP, SXT	CPD, GN, SXT
Klebsiella pneumoniae	VEB-1	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, NET, SXT	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, NET, SXT
Klebsiella pneumoniae 1	SHV-12	AK, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CIP, GN, NET, SXT	CAZ
Klebsiella pneumoniae 2	SHV-12	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CIP, GN, NET, SCF, SXT, TZP	AK, AMC, CAZ, CRO, CFP, CPD, GN, NET, SXT, TZP
Klebsiella pneumoniae 3	SHV-12	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, GN, NET, NOR, SCF, SXT, TZP	AK, AMC, CAZ, CFP, CPD, GN, NET, SXT, TZP
Klebsiella pneumoniae 4	SHV-12	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, CIP, FEP, GN, NET, NOR, SCF, SXT, TZP	AK, AMC, CAZ, CFP, CPD, GN, NET, SXT, TZP
Klebsiella pneumoniae 5	SHV-12	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, GN, NET, SXT	AK, AMC, CAZ, CPD, GN, NET, SXT
Klebsiella pneumoniae 6	SHV-12	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CIP, GN, NET, NOR, OFX, SCF, SXT	AK, AMC, CAZ, CPD, NET, SXT
Klebsiella pneumoniae 7	SHV-12	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, CIP, GN, NET, SXT, TZP	AK, AMC, CAZ, CPD, NET, SXT
Serratia spp. 1	CTX-M-9	AK, AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, FEP, FOX, GN, NET, SCF, SXT	AK, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, FEP, GN, NET,
Serratia spp. 2	CTX-M-9	AMC, CTX, CAZ, CRO, CFP, CPD, CPO, FEP, SXT	AMC, CTX, CAZ, CRO, CPD

การดื้อยาที่ถ่ายทอดร่วมกับการสร้าง ESBLs มีหลายชนิดพบว่า transconjugants มีคุณสมบัติดื้อยาชนิดต่างๆ หลากหลาย หลังจากได้รับการถ่ายทอดจีนกำกับการสร้าง ESBLs เช่น ยาในกลุ่ม β-lactam พบว่า transconjugants เกือบทุกตัวอย่างดื้อต่อยา CPD และ CAZ หลายตัวอย่างดื้อต่อยา CTX, CFP, CRO และ AMC (ร้อยละ 30.8, 46.2, 38.5 และ 69.2 ตามลำดับ) มีเพียงส่วนน้อยที่ดื้อต่อยา FEP, CPO (ร้อยละ 15.4 ทั้งสองชนิด) สำหรับยากลุ่มอื่นๆ พบว่ามีการถ่ายทอดร่วมด้วยเช่นกัน ได้แก่ กลุ่ม aminoglycosides พบว่ามี transconjugant ดื้อต่อยา AK, GN และ NET ร้อยละ 69.2, 53.8 และ 61.5 ตามลำดับ สำหรับยากลุ่ม sulfonamides ได้แก่ SXT พบว่ามี transconjugant ร้อยละ 76.9 มีการดื้อต่อยา SXT และยาที่ไม่พบการถ่ายทอดร่วมกับ ESBLs คือยา CT, FOX, SCF และยากลุ่ม quinolones ได้แก่ NOR, OFX, CIP

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียวงศ์ E*nterobacteriaceae* สามารถถ่ายทอดจีนที่กำกับการสร้างเอนไซม์ ESBLs และสามารถถ่ายทอดระหว่างเชื้อต่างจีนัสกันได้ โดยมีอัตราการถ่ายทอดร้อยละ 30.9 ซึ่งต่ำกว่ารายงานของ Franiczek และคณะ ซึ่งพบว่า เชื้อที่สร้าง ESBLs สามารถถ่ายทอดการดื้อยาได้ 11 ใน 20 ตัวอย่าง[15] ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการใช้ยา CAZ ในการคัดเลือก transconjugant ซึ่งแบคทีเรียตัวให้ที่สร้าง ESBLs ชนิด CTX-M บางตัวอย่างอาจดื้อต่อยา CAZ ในระดับต่ำๆ ทำให้ transconjugant ที่ได้ไม่สามารถเจริญในอาหารที่ใช้คัดเลือก

ผลการถ่ายทอดทำให้แบคทีเรียตัวรับสามารถสร้าง ESBLs และเกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม β-lactam หลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการดื้อต่อยาชนิดอื่นๆ ถ่ายทอดร่วมไปด้วย โดยเฉพาะยา cotrimoxazole และยาในกลุ่ม aminoglycosides เมื่อแบคทีเรียตัวรับได้รับถ่ายทอดการดื้อยาเหล่านี้ร่วมกับการสร้าง ESBLs จะทำให้กลายเป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multi-drug resistance) ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อเหล่านี้ มีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตและมีอัตราตายสูง หากได้รับการรักษาด้วยยาที่ไม่เหมาะสม หรือไม่เพียงพอ[7]

ความสามารถในการถ่ายทอดการดื้อต่อยา cotrimoxazole และยากลุ่ม aminoglycosides ร่วมกับการสร้าง ESBLs ในการศึกษานี้คาดว่าเกิดจากจีนที่กำกับการดื้อต่อยาเหล่านี้ อยู่ร่วมกันบน พลาสมิด หรือสารพันธุกรรมชนิดอื่นที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (mobile genetic element) ซึ่งมีรายงานจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับพลาสมิดของแบคทีเรีย และพบว่าจีนที่กำกับการดื้อต่อยาหลายชนิดอยู่ร่วมกันบนพลาสมิดเดียวกัน การดื้อยาเหล่านี้จึงถูกถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียอื่นและแพร่กระจายร่วมกัน[16] ทำให้มีแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิดเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นปัญหาสำคัญในการควบคุมและรักษาโรคติดเชื้อในปัจจุบัน

จากการศึกษานี้การดื้อยาที่ไม่พบการถ่ายทอดเลย ได้แก่ cefoxitin และยากลุ่ม quinolones โดยแบคทีเรียตัวให้มีอัตราการดื้อต่อยาเหล่านี้ค่อนข้างต่ำด้วย (ตารางที่ 2) สำหรับการดื้อต่อ cefoxitin นั้น โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สร้าง ESBLs ปกติจะไวต่อยา cefoxitin แต่อาจมีแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสร้าง β-lactamase ชนิด AmpC ได้ ทำให้เชื้อดื้อต่อยา cefoxitin และ β-lactamase inhibitor ได้ การสร้าง β-lactamase ชนิด AmpC เดิมพบว่ากำกับโดยจีนบนโครโมโซมซึ่งมีอยู่ตามธรรมชาติในแบคทีเรียบางชนิด เมื่อเกิดการแสดงออกแบบ overexpression[17] จะทำให้เชื้อดื้อต่อยา cefoxitin และต่อมามีรายงานพบจีนที่กำกับการสร้าง AmpC บนพลาสมิด[18] นอกจากนี้การดื้อต่อยา cefoxitin และ β-lactamase inhibitor ยังอาจเกิดจากแบคทีเรียมีการกลายพันธุ์ของจีนบนโครโมโซมทำให้ porin หายไป[19] อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์เช่นนี้รวมถึง AmpC ชนิดที่จีนกำกับอยู่บนพลาสมิด ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ยังพบน้อยในปัจจุบัน ส่วนการดื้อต่อยากลุ่ม quinolones ในแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* นั้น โดยทั่วไปเกิดจากแบคทีเรียมีการกลายพันธุ์ของจีนบนโครโมโซม โดยมีการ

เปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เป็นเป้าหมายของยา คือเอนไซม์ DNA gyrase และ/หรือ topoisomerase IV หรือแบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลง porin ทำให้การนำยาเข้าสู่เซลล์ลดลง[20] แต่เมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานพบจีนที่กำกับการดื้อ quinolones อยู่บน พลาสมิดในเชื้อ *K pneumoniae*[21] และต่อมาพบการระบาดของเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา quinolones โดยจีนที่อยู่บนพลาสมิด[22] ในการศึกษานี้แม้พบแบคทีเรียตัวให้ที่ดื้อต่อ quinolones และ cefoxitin จำนวนไม่มาก แต่ควรมีการติดตามผลการทดสอบความไวต่อยาจากห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอ เพื่อเฝ้าระวังแบคทีเรียที่ดื้อยาเหล่านี้ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ตามปริมาณยาต้านจุลชีพที่ใช้มากขึ้น และหากจีนที่กำกับการดื้อยานั้นอยู่บนพลาสมิดหรือสามารถถ่ายทอดสู่แบคทีเรียอื่นได้ จะทำให้เกิดการแพร่กระจายของจีนดื้อยาเหล่านี้อย่างรวดเร็ว

การทดสอบความไวต่อยา cephalosporins สำหรับแบคทีเรียที่สร้าง ESBLs ผู้ปฏิบัติการควรทำและรายงานด้วยความระมัดระวัง เพราะอาจได้ผลไวลวง คือแบคทีเรียบางตัวอย่างที่สร้างเอนไซม์ ESBL เมื่อทดสอบพบว่าไวต่อยา β-lactam บางชนิด แต่กลับใช้รักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อนั้นไม่ได้ผล[23] เหตุการณ์เช่นนี้เรียกว่าการดื้อยาแอบแฝง (hidden resistance)[24] ซึ่ง Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (ชื่อเดิมคือ National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)) ได้กำหนดให้ห้องปฏิบัติการรายงานผลการทดสอบความไวต่อยากลุ่ม penicillins, cephalosporins ทุกชนิด และ aztreonam เป็น “ดื้อ” หากตรวจพบว่าเชื้อ *Enterobacteriaceae* นั้น สร้าง ESBLs ได้ แม้ว่าผลการทดสอบจะปรากฏเป็น “ไว” ต่อยาเหล่านี้ก็ตาม เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการรักษาที่ล้มเหลวจากการใช้ยาดังกล่าว และมีรายงานการศึกษาเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่สร้าง ESBLs ที่นำมาทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ต่อยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 และ 4 โดยใช้จำนวนเชื้อมากกว่าที่มาตรฐานกำหนด พบว่าได้ค่า MIC สูงมากขึ้นหลายเท่า[25] สะท้อนให้เห็นว่าการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อที่สร้าง ESBLs ด้วยยา cephalosporins อาจไม่ได้ผล

การเพิ่มมากขึ้นของแบคทีเรียในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งส่วนใหญ่จะดื้อต่อยาชนิดอื่นๆ ร่วมด้วย เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญที่ทำให้การรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อประสบปัญหา ดังนั้นห้องปฏิบัติการจึงควรทดสอบการสร้าง ESBLs ของแบคทีเรียร่วมกับการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพเพื่อประโยชน์ต่อการเลือกยาสำหรับการรักษาที่เหมาะสมต่อไป และควรมีการเฝ้าระวังและควบคุมไม่ให้มีแบคทีเรียที่ดื้อยาเพิ่มจำนวนมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะเทคนิคการแพทย์ ตลอดจนศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้การสนับสนุนการศึกษานี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยาคลินิกโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาเอื้อเฟื้อให้เก็บแบคทีเรียสำหรับการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

1. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens.* Infection 1983; 11: 315-7.
2. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control 2004: 32; 470-85.
3. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structures. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-33.

4. Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum β-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention, and drug treatment. Drugs 2003; 63: 353-65.
5. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β-lactamases. N Engl J Med 2005; 352: 380-91.
6. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Neutzling RM, Weidermann B. Evolution of plasmid coded resistance to broad spectrum cephalosporins. Antimicrob Agent Chemother 1985; 28: 302-5.
7. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. Chest 1999; 115 : 462-74.
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. 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 university hospital in Thailand . J Antimicrob Chemother 2001; 46: 839-52.
10. Chanawong A, Lulitanond A, Kaewkes W, Lulitanond V, Srigulbutr S, Homchampa PCTX-M extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in a Thai university hospital. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38: 493-500
11. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.
12. Provence DL, Curtiss III R. Gene transfer in Gram negative bacteria. In: Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, eds. Methods for general and molecular bacteriology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994; 317-347.
13. Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR. Special tests for detecting antibacterial resistance. In: Murrey PR, Baren EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, *et al*. Manual of Clinical Microbiology , 6th ed. Washington DC.: AMS Press, 1995: 1356-67.
14. National committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility Testing; Fifteenth informational supplement. CLSI document M100-S15. Wayne, PA : Clinical Laboratory Standards institute, 2005.
15. Franiczek R, Kizyzanowska B, Dolna I, Mokracka G, Szufnarowski K. Extended-spectrum β-lactamase-conferring transferable resistance to different antimicrobial agents in Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections. Folia Microbiol (Praha) 2005; 50: 119-24.
16. Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN, the SENTRY APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum β-lactamases (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Microbial Surveillance Program (1998-99). Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 42: 193-8.
17. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β-lactamases in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 533-7.
18. Tracz DM, Boyd DA, Bryden L, Hizon R, Giercke S, Van Caeseele P, et al.. Increase in AmpC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical

isolate of cefoxitin-resistant Escherichia coli as determined by RT-PCR. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 768-72.

19. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, Tomas JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 342-8.
20. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. Drug Resist Update 1999; 2: 38-55.
21 Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 1998; 351: 797-9.
22. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 71-6.
23. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, *et al.* Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2001; 39: 2206-12.
24. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae.* From the Antibiotic Management Program, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA Pittsburgh, Pennsylvania 2006: S20-8.
25. Thomson KS, Moland ES. Cefepime, piperacillin-tazobactam, and the inoculum effect in tests with extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae.* Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3548-54.