

อุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ในสถาบันบาราศนราดูล ระหว่างเดือนกรกฎาคม-กันยายน พ.ศ. 2550

อัญชนา ถาวรวัน, ปวีณา ก้องสนั่น,
สว่าง ไชยศักดิ์, บุญช่วย เอี่ยมโกลลาภ
สถาบันบาราศนราดูล กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข

บทคัดย่อ

ด้วยกลไกการดื้อยาของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ซึ่งคล้ายคลึงกับฤทธิ์ของเอนไซม์ ESBLs (extended-spectrum β -lactamases) ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่มเพนิซิลลิน, cephalosporin และ monobactam แต่เอนไซม์ AmpC β -lactamase สามารถทำลายฤทธิ์ของยา cephamycin ได้และไม่ถูกยับยั้งด้วยยาในกลุ่มยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase จึงทำให้เชื้อดื้อยาหลายขนาน เป็นผลให้ยาที่ใช้ในการรักษามีไม่มากนัก ทั้ง *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* ที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลก็สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้แม้จะมีรายงานการพบการดื้อยาโดยกลไกการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ตั้งแต่คริสต์ทศวรรษ 1980 แต่บุคลากรที่เกี่ยวข้องทางด้านโรคติดเชื้อก็ยังไม่คำนึงถึงความสำคัญของปัญหานี้ด้วยวิธีการทดสอบยังยุ่งยาก ไม่สะดวก ต้องการสารเคมีพิเศษที่หาไม่ได้ในงานประจำ รวมถึงยังมีความไว และความจำเพาะที่ต่ำ ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงยังไม่มีการหาผลของเอนไซม์นี้อีกทั้งไม่มีวิธีมาตรฐานที่ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) แนะนำ ความสำคัญที่ต้องตรวจหาเอนไซม์ AmpC β -lactamase คือเชื้อกลุ่มแกรมลบ เช่น *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, และ *Salmonella spp.* ที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ให้ผลไวปลอมในหลอดทดลองกับยา cephalosporins จากผลไวต่อยาปลอม ทำให้การรักษาผู้ป่วยไม่ได้ผล อาจทำให้เสียชีวิตด้วย ในการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อแกรมลบที่สร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ในสถาบันบาราศนราดูล ผู้วิจัยได้เลือกใช้วิธี AmpC Disk test ซึ่งเป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย ศึกษาจากเชื้อแกรมลบที่แยกได้จากผู้ป่วยระหว่าง เดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน 2550 จากเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์จากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายจำนวน 117 สายพันธุ์ พบเชื้อสามารถสร้าง AmpC β -lactamase จำนวน 18 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 15.8 นำเชื้อที่สร้างเอนไซม์ได้มาจำแนกตามสิ่งส่งตรวจพบว่า 7 สายพันธุ์แยกได้จากเสมหะทั้งหมด 40 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 17.5 จากหนองทั้งหมด 26 ตัวอย่างพบ 4 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 15.4 จากปัสสาวะทั้งหมด 41 ตัวอย่างพบ 7 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 14.6 จากเลือดทั้งหมด 7 ตัวอย่างพบ 1 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 14.3 แม้ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ง่าย และให้ผลที่น่าเชื่อถือที่สุด แต่การทำ AmpC Disk test เพื่อเป็นรายงานเบื้องต้นให้แพทย์ได้ใช้ประกอบการวางแผนการรักษาคนไข้เพื่อลดอัตราการตายก็น่าจะประยุกต์ใช้ได้ในงานประจำวัน เพื่อเป็นประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วย

คำสำคัญ: AmpC β -lactamase, plasmid-mediated AmpC β -lactamases

Incidence of AmpC β -lactamase producing bacteria isolated in Bamrasnaradura Infectious Disease Institute during July–September 2007

**Unchana Thawornwan, Paveena Kongsanan,
Sawang Chaisukda, Boonchuay Eampokalap**
*Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute,
Department of Disease Control, Ministry of Public Health*

ABSTRACT

Like extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), AmpC β -lactamase has a broad substrate profile that includes penicillins, cephalosporins, and monobactam. In contrast to ESBLs, they hydrolyze cephamycin and are not inhibited by commercial available β -lactamase inhibitors. These enzymes are typically associated with multiple antibiotic resistances, leaving few therapeutic options. Bacteria, mostly *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, producing AmpC β -lactamases have been responsible for nosocomial outbreaks of infection and colonization. Although AmpC β -lactamases were first reported in the late 1980s, many infectious disease personnel remain unaware of their clinical importance. These enzymes are typically produced by isolates of *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella spp.*. AmpC β -lactamases have been associated with false in vitro susceptibility to cephalosporins. Many laboratories do not test for this resistance mechanism because current tests are inconvenient, subjective, lack sensitivity and/ or specific, or require reagents that are not readily available. In this study the AmpC disk test was applied as a study tool for study the incidence of AmpC β -lactamase producing bacteria isolated from July–September 2007 in Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute. Among 117 strains of nonduplicated clinical isolates of gram negative bacteria, 18 isolates have been produced the AmpC β -lactamase (15.8%). Beyond source of specimens, 7 strains of AmpC β -lactamase producing bacteria has been isolated from 40 sputums (17.5 %), 4 strains have been isolated from 26 pus samples (15.4%), 6 strains have been isolated from 41 urine samples (14.6%), and 1 strain has been isolated from 7 hemoculture samples (4.3%), respectively.

Key words: AmpC β -lactamase, plasmid-mediated AmpC β -lactamases

บทนำ

เอนไซม์ AmpC เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในโครโมโซมของแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ เช่น *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, และ *Pseudomonas* ทำให้เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพกลุ่ม oxyimino และ 7- α -methoxy-cephalosporin เมื่อทศวรรษที่ผ่านมาพบเอนไซม์ชนิดนี้บน plasmid จึงทำให้พบการดื้อยาต้านจุลชีพมากขึ้นในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Klebsiella spp.*¹ มีรายงานการพบ plasmid-mediated AmpC β -lactamase ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1980 เชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้จะดื้อต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มเพนิซิลิน กลุ่ม cephalosporin รวมถึง monobactams แต่เชื้อยังสามารถทำลายฤทธิ์ยาในกลุ่ม cephamycin และไม่ถูกยับยั้งด้วยยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ β -lactamase แต่ยี่ห้อ cefepime, cefpirome และ carbapenem เชื้อที่สร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้จะดื้อยาต้านจุลชีพหลายขนานโดยเฉพาะเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* และ *E. coli* ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อในโรงพยาบาล² จากรายงานของ Pai และคณะ พบความล้มเหลวต่อการรักษาด้วยยา cefotaxime และ ceftazidime ของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่แยกเชื้อได้จากกระแสเลือดที่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ซึ่งเป็นผลจากการรายงานผลความไวต่อสารต้านจุลชีพที่ผิดพลาดโดยเชื้อนี้ให้ผลไวต่อยาในหลอดทดลอง ผู้ป่วยอาจเสียชีวิตถ้าเปลี่ยนไปใช้ยาในกลุ่ม carbapenem ไม่ทันเวลา อัตราการตายที่สูงถึงร้อยละ 46 มีความสัมพันธ์กับการพบเอนไซม์ DHA-1 และยังพบว่าการสร้างเอนไซม์ CMY-1-like มีอัตราการตายสูงถึงร้อยละ 14.3 อย่างไรก็ตามก็ยังคงเป็นการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างจำนวนน้อยแต่ห้องปฏิบัติการทางคลินิกควรมีวิธีที่ถูกต้องที่จะตรวจหาและรายงานผลการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase³

การทดสอบหาเอนไซม์ AmpC β -lactamase ในห้องปฏิบัติการคลินิกยังไม่มีมาตรฐานตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, (ชื่อเดิม NCCLS)) วิธีการในปัจจุบันที่มียุ่งยาก ไม่สะดวก ต้องการสารเคมีพิเศษที่ทำไม่ได้ในงานประจำ ทั้งยังมีความไว และความจำเพาะที่ต่ำ² มีนักวิจัยหลายกลุ่มที่

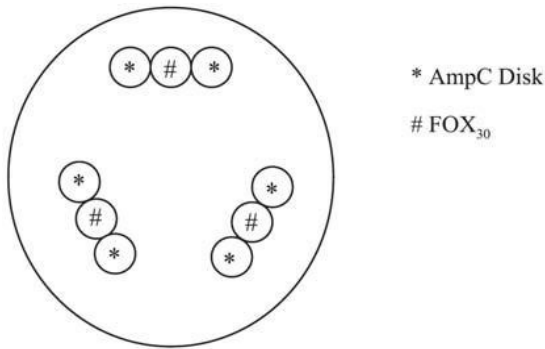
ทดลองหาวิธีที่ง่าย⁴⁻⁸ และสามารถจะปฏิบัติเป็นงานประจำได้ในการหาอุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้จากผู้ป่วยที่มารักษาสถาบันบำราศนราดูรระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน ปี 2550 ได้ทำตามแนวทางของ Jennifer และคณะ^{2,9} เพื่อใช้ประโยชน์ในการทำนาย และวางแผนการรักษาของแพทย์แก่ผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย และนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาอุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ที่แยกได้จากผู้ป่วยในสถาบันบำราศนราดูร ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน 2550
2. เพื่อนำวิธีการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ของเชื้อแบคทีเรียไปใช้ในงานประจำ

วัสดุและวิธีการ

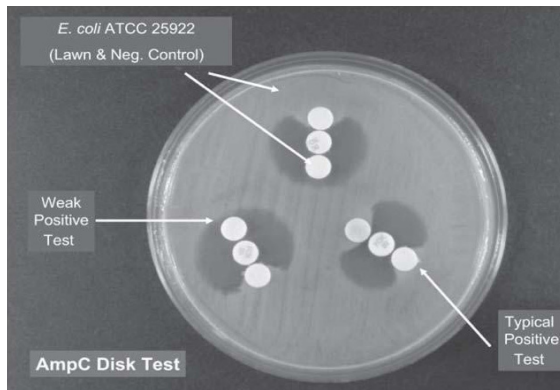
วิธีการทำ AmpC Disk Test^{2,9} ใช้เชื้อที่ sub culture ขำคินที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (°C) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar สำหรับทดสอบ AmpC disk test ดังนั้นนำเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ไปปรับความขุ่นด้วยน้ำเกลือ (0.85% Normal Saline, NSS) ให้ได้ความขุ่นมาตรฐาน McFarland No. 0.5 ป้ายเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่ปรับความขุ่นแล้วบน Mueller Hinton Agar ให้ได้ 3 ระบายตามวิธี disk diffusion เพื่อใช้เป็นพื้น นำ cefoxitin disk 30 μ g (FOX₃₀) วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 3 แผ่น จากนั้นนำ AmpC disk ที่หยอดน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 20 μ l วางข้าง FOX₃₀ disk 2 ข้าง ดังภาพที่ 1 เชื้อเชื้อที่ต้องการทดสอบมาหลายชนิดมาให้ได้ 1 loopful วางบน AmpC disk ระวังอย่าให้เชื้อออกนอก disk โดยใช้เชื้อ 1 สายพันธุ์/disk คว้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C นาน 16-18 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 สายพันธุ์มาตรฐานสำหรับเป็นเชื้อควบคุมลบใช้เชื้อ *Escherichia coli* WHO 21/2006 สายพันธุ์ที่สร้าง AmpC β -lactamase สำหรับเป็นเชื้อควบคุมบวก จากนั้นอ่านผลบันทึก และแปลผล



ภาพที่ 1 แสดงการวาง cefoxitin disk (FOX30) และ AmpC disk

การแปลผล

EDTA ที่อยู่บน AmpC disk ไปทำลายผนังเซลล์ของเชื้อเป็นผลให้เชื้อที่มีเอนไซม์ AmpC β -lactamase สามารถหลั่งเอนไซม์มาทำลายฤทธิ์ของยา cefoxiti (FOX₃₀) ทำให้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่ใช้เป็นพื้นสามารถเจริญได้ จึงเกิดการเว้าของ inhibition zone เกิดผลบวก ถ้าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase จะไม่เกิดการเว้าของ inhibition zone เกิดผลลบ ถ้าพบการเว้าของ inhibition zone บ้าง เกิดผลบวกเล็กน้อย (weak positive) ดังแสดงใน ภาพที่ 2



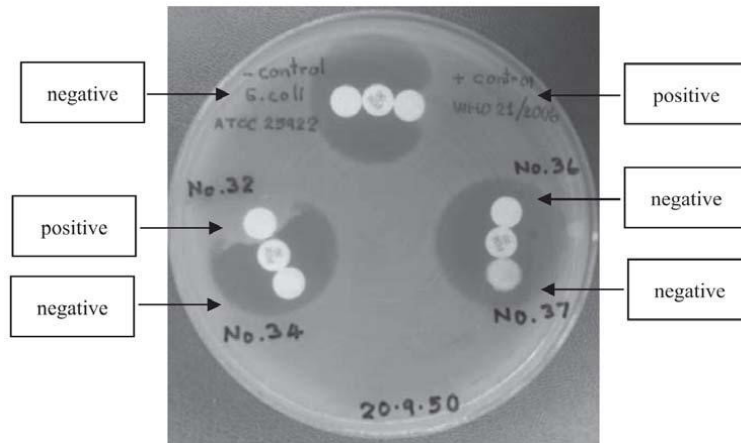
ภาพที่ 2 แสดงผลบวก ผลลบ และผลบวกเล็กน้อย ของการทดสอบการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase โดยการทดสอบ AmpC disk test กับเชื้อแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์บนจานเพาะเชื้อขนาด 90 มิลลิเมตร ด้วยการป้ายเชื้อแต่ละสายพันธุ์บนแต่ละด้านของแผ่นยา cefoxitin disks (FOX30) ทั้ง 3 แผ่นยา²

ผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบทั้งหมด 117 สายพันธุ์ แยกได้จาก สิ่งส่งตรวจเลือด 7 ตัวอย่างหนอง 26 ตัวอย่าง เสมหะ 40 ตัวอย่าง ปัสสาวะ 41 ตัวอย่าง และอื่น ๆ 3 ตัวอย่าง พบเชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase 18 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 15.8 เมื่อแยกตามชนิดสิ่งส่งตรวจตัวอย่างเลือดพบเชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase 1 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 14.3 ตัวอย่างหนองพบเชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase 4 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 15.4 ตัวอย่างเสมหะพบเชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase 7 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 17.5 ตัวอย่างปัสสาวะพบเชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase 6 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 14.6

เมื่อแยกตามชนิดของเชื้อจากทั้ง 18 สายพันธุ์ ที่ตรวจ พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase พบเชื้อ *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae* คิดเป็นร้อยละ 38.9, 27.8, 16.7, 11.1 และ 5.6 ตามลำดับ

ผลของการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase ด้วยวิธี AmpC disk test ผลบวกของเชื้อควบคุมบวก *E. coli* WHO 21/2006 และ เชื้อสายพันธุ์หมายเลข 32 เกิดการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่ใช้เป็นพื้นผลลบของเชื้อควบคุมลบ *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อสายพันธุ์หมายเลข 34, 36 และ 37 ไม่มีการส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่ใช้เป็นพื้น ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างการทดสอบการสร้าง AmpC β -lactamase ด้วยวิธี AmpC Disk Test

สรุปและอภิปรายผล

เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่แยกได้จากผู้ป่วยในสถาบันบำราศนราดูร ระยะเวลา 3 เดือน ระหว่างกรกฎาคม-กันยายน 2550 นั้นพบอุบัติการณ์ของเชื้อกลุ่มนี้ในการสร้างเอนไซม์ AmpC β -lactamase สูงถึงร้อยละ 15.8 ด้วยวิธีการทดสอบด้วย AmpC Disk test มีข้อระวัง และข้อจำกัดถ้าเชื้อที่นำมาทดสอบคือ carbapenem ต้องระวังการแปลผลเพราะอาจเกิดจากเอนไซม์ carbapenemase ไม่ใช่ AmpC β -lactamase ซึ่งในการศึกษครั้งนี้ยังไม่ได้ดำเนินการทดสอบหาเอนไซม์ที่อาจให้ผลบวกปลอมดังกล่าว⁹ วิธีการทดสอบด้วย AmpC Disk test ยังไม่สามารถแยก chromosomal mediated AmpC type β -lactamases ออกจาก plasmid mediated AmpC type β -lactamases ได้ ดังนั้นถ้าทำการทดสอบในเชื้อที่มี chromosomal mediated AmpC type β -lactamases ได้เช่น *E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* และ *Acinetobacter* ถ้าได้ผลบวกต้องยืนยันด้วย genetic testing เพื่อแยกว่าเป็น chromosomal หรือ plasmid mediated AmpC β -lactamase วิธีการตรวจหา AmpC β -lactamase ยังเป็นเทคนิคที่ค่อนข้างยุ่งยาก ทั้งยังไม่สามารถแยกระหว่าง chromosomal mediated AmpC type β -lactamases ออกจาก plasmid mediated AmpC type β -lactamases ได้โดยการทำ AmpC Disk test แม้ปัจจุบันจะยังไม่มีวิธีมาตรฐานที่ง่ายและให้ผลที่น่าเชื่อถือที่สุด แต่การทำ AmpC Disk test เพื่อเป็น

รายงานเบื้องต้นให้แพทย์ได้ใช้ประกอบการวางแผนการรักษาคนไข้เพื่อลดอัตราการตาย ก็น่าจะประยุกต์ใช้ได้ในงานประจำวัน เพื่อเป็นประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วย³ ผู้วิจัยจะทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธี AmpC Disk test กับวิธีมาตรฐาน Three-dimensional Extract Test (TDET) เพื่อหาความจำเพาะ ความไว และความน่าเชื่อถือของวิธี AmpC Disk test ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Tse Hsien Koh, Grace Chee Yeng Wang, Li Hwei Sng, et al. CTX-M, plasmid mediated AmpC producing Enterobacteriaceae, Singapore. Emerging Infectious Diseases [Internet]. 2004; 10(6): 1172-74. Available from: www.cdc.gov/eid
2. Jennifer AB, Ellen SM, Kenneth ST. AmpC Disk Test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC β -lactamase. J Clin Micro 2005; 43(7): 3110-13.
3. Hyunjoo P, Cheol-In K, Jeong-Hum B, Ki-Deok L, et al. Epidemiology of clinical features of Blood stream infectious caused by AmpC-type β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. Anti agents hemoculture 2004; 48(10): 3720-28.

4. Philip EC, Ellen SM, Kenneth ST. Occurrence and detection of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolate at a Veterans Medical Center. *J Clin Micro* 2000; 38(5): 1791–96.
5. George AJ, Kelly EW, Victoria JW. Identification of extended-spectrum, AmpC, and carbapenem-hydrolysing β -lactamase in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests. *J Clin Micro* 2006; 44(6): 1971–76.
6. Suranjana A, Manjusri. AmpC β -lactamase producing bacterial isolates from Kolkata Hospital. *Indian J med Res* 2005;122:224–33.
7. M Shahid, Abida M, Mithlesh et al. Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC β -lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test. *J Antimicro Chemoculture* 2004; 54: 684–87.
8. F Javier PP, Nancy DH. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in Clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Micro* 2002; 40 (6): 2153–62.
9. ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.มาลัย วรจิตร. การทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลชีพ. โครงการฝึกอบรม คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยมหิดล 2549: 69–74.