การตรวจหาเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ทางฟีโนไทป์

(The Detection of AmpC β-lactamase by Phenotypic Methods)

พจมาน ผู้มีสัตย์*

*สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทนำ

อุบัติการณ์เชื้อดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์กลุ่มบีตา-แล็กทาเมส (β-lactamase) ต่อต้านยาปฏิชีวนะ พบได้มากขึ้นในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง รวมทั้งพบการสร้างเอนไซม์บีตา-แล็กทาเมส ชนิดใหม่ๆ เกิดขึ้นด้วย เช่น แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (AmpC β-lactamase) ซึ่งจัดอยู่ในคลาส ซี (class C) หรือเอนไซม์เซฟาโลสปอริเนส กลุ่มที่ 1 (group I cephalosporinase) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น เซฟาไมซิน (cephamycin) แอลฟา-เมทอกซี บีตา-แล็กแทม (α-methoxy β-lactam) กลุ่มยาเซฟาโลสปอรินส์ (cephalosporins) ทั้งชนิดฤทธิ์แคบและขยาย (narrow and broad spectrum cephalosporins) เอซทรีโอแนม (aztreonam) และโมโนแบคแทม (monobactam) (Arora, 2005) เอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ถูกยับยั้งโดยกรดคลาวูลานิก (clavulanic acid) ได้ไม่ดี ซึ่งต่างจากเอนไซม์บีตา-แล็กทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (extended-spectrum β-lactamase, ESBL) ที่ถูกยับยั้งได้ด้วยกรดคลาวูลานิก ดังนั้นจึงนำกรดคลาวูลานิกมาใช้ในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสไม่ได้ ปัจจุบันพบยีนบนโครโมโซม (chromosomal-mediated AmpC β-lactamase) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ในแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งหลายชนิด เช่น *Pseudomonas aeruginosa Enterobacter* spp. *Citrobacter freundii Hafnia alvei Escherichia coli* และ *Serratia marcescens* (Upadhyay, et al., 2010; Livermore, D.M., 1995; Philippon, et al., 2002) สำหรับยีนที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ที่พบบนพลาสมิด (plasmid-mediated AmpC β-lactamase) เช่น ซีเอ็มวายไทป์ บีตา-แล็กทาเมส (CMY-type β-lactamase) เกิดจากการได้รับการถ่ายโอนยีน (gene transfer) ทำให้เชื้อเหล่านี้สร้างเอนไซม์นี้ได้ ตัวอย่างเชื้อที่พบยีนการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสบนพลาสมิด เช่น *Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น (Thomas, 2001) มีการศึกษาพบว่าการแสดงออกของแอมพ์ซี ยีนที่อยู่บนโครโมโซม (chromosomal *ampC* gene) ในแบคทีเรีย เช่น *Citrobacter freundii Enterobacter cloacae Morganella morganii*

Hafnia alvei และ *Serratia marcescens* ซึ่งถูกเหนี่ยวนำได้โดยยาเซโฟซิทิน (cefoxitin) และอิมิพิเนม (imipenem) แต่ถูกเหนี่ยวนำได้ไม่ดีโดยยาเซฟาโลสปอรินส์รุ่นที่ 3 หรือ 4 (3^{rd} or 4^{th} generation cephalosporins) (Hemalatha, et al., 2007; Philippon, et al., 2002)

วิธีการตรวจหาแอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสทางฟีโนไทป์

ปัจจุบันพบอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส มากขึ้น ทำให้ผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาในโรงพยาบาลต้องอยู่โรงพยาบาลนานขึ้น สำหรับประเทศไทยพบการดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส เช่นกัน (ศิริลักษณ์ และคณะ, 2553) ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจหาเอนไซม์นี้ รวมทั้งบางวิธีค่อนข้างยุ่งยาก ซับซ้อน และใช้เวลานาน ดังนั้นจึงทำให้การตรวจหาเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ยังคงถูกมองข้ามไป แต่ก็มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาพัฒนาหาวิธีการตรวจการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาให้แก่ผู้ป่วย และหามาตรการป้องกันหรือลดการดื้อยาของเชื้อ วิธีการตรวจการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ทางฟีโนไทป์ (phenotype) ที่มีการศึกษาได้แก่

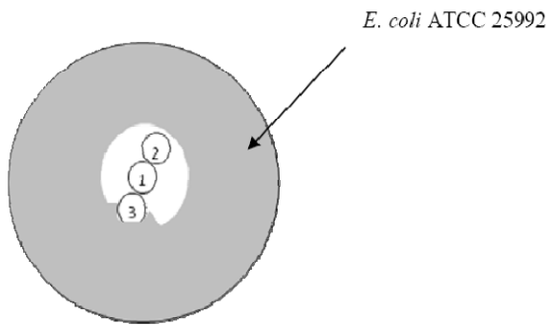
1. การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส โดยใช้ยาเซโฟซิทิน

เนื่องจากเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสดื้อต่อยาเซโฟซิทิน ขณะเดียวกันเชื้อที่สร้างเอนไซม์บีตา-แล็กทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (ESBL) ไวต่อยานี้ จึงมีผู้นำยาเซโฟซิทินมาใช้ในการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (Hemalatha, 2007; Thomas, 2001; Sinha, et al., 2009) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการตรวจคัดกรองโดยวิธีนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อที่ดื้อยาเซโฟซิทินโดยการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (cefoxitin-resistant AmpC producer) กับเชื้อที่ดื้อยาเซโฟซิทินโดยวิธีอื่นที่ไม่ได้สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (cefoxitin-resistant non-AmpC producer) ได้ จึงต้องมีการตรวจเพื่อยืนยันว่าเชื้อนั้นดื้อต่อยาเซโฟซิทินโดยการสร้างเอนไซม์ แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส จริงหรือไม่ เนื่องจากจะมีผลต่อการให้ยารักษาผู้ป่วย โดยอาจมีการเปลี่ยนมาใช้ยากลุ่มคาร์บาพีเนมส์ (carbapenems) ในการรักษาผู้ป่วยที่มีเชื้อดื้อยาเซโฟซิทินแบบที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (Hanson, 2003)

2. การใช้แผ่นทดสอบแอมพ์ซี (AmpC disc test)

เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีความถูกต้องในการตรวจหาเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสชนิดที่มียีนอยู่บนพลาสมิด และทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ดื้อยาเซโฟซิทินโดยการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ออกจากกลุ่มที่ดื้อโดยกลไกอื่นได้ การทดสอบทำโดยป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบจำนวนหลายๆ โคโลนีลงบนแผ่นยาเปล่าที่ปราศจากเชื้อ (sterile paper disc) ที่มีทริส-อีดีทีเอ (Tris-EDTA) อยู่ ซึ่งทริส-อีดีทีเอ จะทำให้เอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส หลั่งออกมานอกเซลล์ (Black et al., 2005) การทดสอบใช้เชื้อ *E. coli* ATCC 25922 (ไวต่อยาเซโฟซิทิน) ที่ปรับความขุ่นเท่ากับ 0.5 แมคฟาร์แลนด์ (0.5 McFarland standard) ป้าย

ลงจานอาหารเอ็มเอชเอ (MHA, Mueller-Hinton agar) ให้ทั่วจาน วางแผ่นยาเซโฟ ซิทิน ขนาด 30 ไมโครกรัม ลงไป จากนั้นวางแผ่นทดสอบแอมพ์ซีให้ใกล้จนเกือบชิดแผ่นยาเซโฟซิทิน อ่านผลหลังจากบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยดูลักษณะของวงใสที่ถูกยับยั้ง (inhibition zone) คือ หากพบลักษณะการเจริญของเชื้อใกล้แผ่นยาเซโฟซิทินที่วางไว้เกือบชิดกับแผ่นทดสอบแอมพ์ซี แปลผลว่า บวก คือเชื้อสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสมาทำลายยาเซโฟซิทิน ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แสดงการตรวจหาการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส โดยวิธีใช้แผ่นทดสอบแอมพ์ซี โดยที่

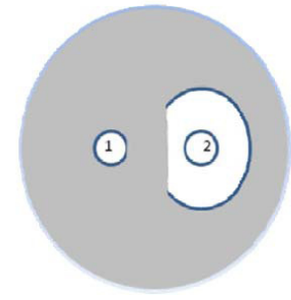
หมายเลข 1 คือ แผ่นยาเซโฟซิทิน ขนาด 30 ไมโครกรัม

หมายเลข 2 คือ แผ่นทดสอบแอมพ์ซี ที่มีเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส

หมายเลข 3 คือ แผ่นแอมพ์ซี ที่มีเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส

3. การตรวจสอบการต้านฤทธิ์ โดยใช้แผ่นยา (Disc antagonism test, DAT)

เป็นวิธีสำหรับตรวจหาแอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสชนิดเหนี่ยวนำ (inducible AmpC ß-lactamase) ยาที่ใช้ทดสอบคือเซฟทาซิดิม (ceftazidime, CAZ) หรือเซโฟทาซิม (cefotaxime, CTX) หรือเซฟไทรอะโซน (ceftriazone, CRO) และเซโฟซิทิน วางลงบนจานอาหารเอ็มเอชเอ ที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยวางแผ่นยาเซฟทาซิดิม เซฟไทรอะโซน และ(หรือ)เซโฟทาซิม ให้ห่างจากแผ่นยาเซโฟซิทิน ประมาณ 15 มิลลิเมตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดย หากพบวงใสที่ถูกยายับยั้ง ลักษณะเป็นเส้นตรง (blunting) คือวงใสรอบแผ่นยาเซฟทาซิดิม เซฟไทรอะโซนและ(หรือ)เซโฟทาซิม จะไม่เต็มวง ด้านที่ใกล้แผ่นยาเซโฟซิทินจะเป็นเส้นตรง แปลผลว่าเชื้อที่นำมาทดสอบสร้างเอนไซม์ แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (Arora and Bal, 2005) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงผลการทดสอบหาเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสชนิดเหนี่ยวนำ พบลักษณะเป็นเส้นตรง ด้านที่ติดกับแผ่นยาเซโฟซิทิน โดยที่

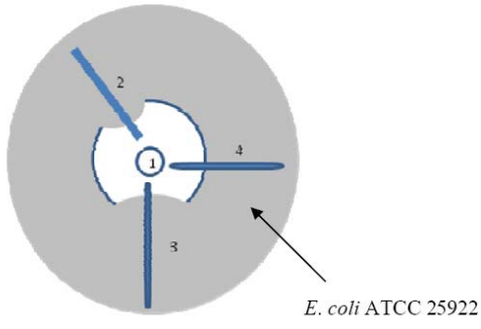
หมายเลข 1 คือแผ่นยาเซโฟซิทิน ขนาด 30 ไมโครกรัม

หมายเลข 2 คือ แผ่นยาเซฟทาซิดิมเซฟ-ไทรอะโซน และ(หรือ) เซโฟทาซิม

4. วิธีมาตรฐานทีดีอีที (TDET, Modified three-dimensional extract test)

เป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) เพื่อยืนยันการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทา

เมส โดยการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์แบคทีเรีย (Coudron, et al., 2000; Nasim et al., 2004) และใช้การแช่แข็งสลับกับการละลาย (freeze and thaw) สลับกันไปมา หรือสกัดเอนไซม์โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) จากนั้นทดสอบหาเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส โดยเพาะเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ลงบนอาหารเอ็มเอชเอ วางแผ่นยาเซโฟซิทิน ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ กรีดอาหารเลี้ยงเชื้อยาว 3 เซนติเมตร ออกจากแผ่นยาเซโฟซิทิน ดูดเอนไซม์ที่สกัดได้ปริมาตร 25-30 ไมโครลิตรเติมลงไปในช่องที่กรีดไว้โดยเริ่มจากบริเวณใกล้ยาเซโฟซิทิน เรื่อยออกไปจนถึงที่ปลายรอยกรีด ระวังไม่ให้ล้นออกมา บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยหากพบเชื้อเจริญเข้าหาแผ่นยาเซโฟซิทิน แสดงว่าเชื้อนั้นสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ดังภาพที่ 3อย่างไรก็ตามวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก บางทีอ่านผลได้ไม่ชัดเจน ทำให้ยากต่อการแปลผล



ภาพที่ 3 การทดสอบหาการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส โดยวิธีมาตรฐานทีดีอีที โดยที่

หมายเลข 1 คือ แผ่นยาเซโฟซิทินขนาด 30 ไมโครกรัม

หมายเลข 2-3 คือ เชื้อที่นำมาทดสอบและมีการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส

หมายเลข 4 คือ เชื้อที่ให้ผลการทดสอบการสร้างแอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส เป็นลบ

5. การใช้สารยับยั้งเอนไซม์ (inhibitor-based method)

การใช้สารยับยั้งเอนไซม์โดยใช้กรดคลาวูลานิกนั้นใช้ได้เฉพาะการตรวจหาการสร้างอีเอสบีแอล (ESBL,extended-spectrum β-lactamase) เท่านั้น ไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสได้ เนื่องจากกรดคลาวูลานิกไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดคลาวูลานิกสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสได้ อีกทั้งการที่มีเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมสปริมาณมาก จะส่งผลทำให้การตรวจหาเอนไซม์อีเอสบีแอลไม่พบ จึงได้มีการศึกษาหาสารยับยั้งเอนไซม์อื่น เพื่อที่จะใช้ทดสอบการดื้อยา เช่น กรดโบโรนิก (boronic acid) ซึ่งได้ถูกนำมาทดสอบหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส โดยนำมาใช้ร่วมกับยาเซโฟซิทิน ใช้วิธีเดียวกับการทดสอบหาการสร้างเอนไซม์อีเอสบีแอล เช่น คอมไบเนชันดิสก์ (combination disc) หรือ การทดสอบดับเบิลดิสก์ซิเนอจี (double-disc synergy test) (Yagi et al., 2005; Su et al., 2011; Coudron, 2005; Hemalatha, et al., 2007) การดื้อยาของเชื้อโดยการสร้างเอนไซม์ แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส นอกจากจะเพิ่มปัญหาในการรักษาแล้ว ยังบดบังการตรวจหาการดื้อยาโดยการสร้างเอนไซม์อีเอสบีแอล อีกด้วย ซึ่งนักวิทยาศาสตร์หลายคณะได้ทำการทดลองเพื่อตรวจหาการดื้อยาในกรณีที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ เช่น การใช้สารยับยั้งชนิดอื่นแทนกรดคลาวูลานิกและ กรดโบโรนิก เช่น ทาโซแบคแทม (tazobactam) และซัลแบคแทม (sulbactam) การใช้วิธีเอ็มดีดีเอสที (MDDST,

modified double-disc synergy test) โดยใช้ยาซิฟีพีม (cefepime) กับยาไพเพอ-ราซิลลิน-ทาโซแบคแทม (piperacillintazobac-tam) สำหรับการตรวจหาเอนไซม์อีเอสบีแอลร่วมกับแอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส (Khan et al., 2009)

บทสรุป

ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการศึกษาหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์แอมพ์ซี บีตา-แล็กทาเมส ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องและจำเพาะ แต่เนื่องจากต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ผู้ทดสอบต้องได้รับการฝึกฝน และไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจตัวอย่างจำนวนมากได้ ดังนั้นการตรวจหาเชื้อดื้อยาทางฟีโนไทป์ยังคงมีความจำเป็นสำหรับทำเป็นงานประจำ (routine) จึงต้องมีการพัฒนาการตรวจให้มีความสะดวก รวดเร็ว ราคาไม่แพง และผลที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา ลดระยะเวลาในการรักษาตัวของผู้ป่วยในโรงพยาบาลและลดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา

เอกสารอ้างอิง

ศิริลักษณ์ ธีระภูธร สุรกิจ หน่อคำหล้า ศรัญญา สถาน และ สุนีย์นุช บัวติ๊บ. (2553). การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL และ AmpC β-lactamase ด้วยวิธี Inhibitor based. **พุทธชินราชเวชสาร** 27 (2): 212-218.

Arora, S., and Bal, M. (2005). AmpC β-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata hospital. **Indian Journal of Medical Resources**, 122: 224-233.

Black, J.A., Moland, E.S., and Thomson, K.S. (2005). AmpC disk test for detection of Plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β-lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(7): 3110-3113.

Coudron, P.E. (2005). Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* **Journal of Clinical Microbiology**, 43(8): 4163-4167.

Coudron, P.E., Moland, E.S., and Thomson, K.S. (2000). Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(5): 1791-1796.

Hanson, N.D. (2003). AmpC β-lactamases: what do we need to know for the future. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52: 2-4**.**

Hemalatha, V., Padma, M., Sekar, U., Vinodh, V.M., and Arunkumar, A.S. (2007). Detection of Amp C beta lactamases production in *Escherichia coli* & *Klebsiella* by an inhibitor based method.

Indian Journal of Medical Resources, 126: 220-223.

Khan, M.K.R., Thukral, S.S., and Gaind, R. (2009). Evaluation of a modified double-disc synergy test for detection of extended spectrum β-lactamases in AmpC β-lactamases-producint *Proteus mirabilis*. **Indian Journal of Medical Microbiology,** 26(1): 58-61.

Livermore, D.M. (1995). β-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 8(4):557-84.

Nasim, K., Elsayed, S., Pitout, J.D.D., Conly, J., Church, D.L., and Gregson, D.B. (2004). New method for laboratory detection of AmpC β-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology,** 42(10): 4799-4802.

Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby G.A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(1): 1-11.

Sinha, P., Sharma, R., Rishi, S., Sharma, R., Sood, S., and Pathak, D. (2008). Prevalence of extended spectrum beta lactamase and AmpC beta lactamase producers among *Escherichia coli* isolates in a tertiary care hospital in Jaipur. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, 51(3): 367-369.

Su, W.Y., Gottlieb, T., and Merlino, J. (2011). Optimal phenotypic testing of AmpC beta-lactamases using boronic acid solutions. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Epub ahead of print.

Thomas, K.S. (2001). Controversies about Extended-Spectrum and AmpC Beta-lactamases. **Emerging Infectious Diseases**, 7(2): 333-36.

Upadhyay, S., Sen, M.R., and Bhattacharjee, A. (2010). Presence of different beta-lactamase classes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* expressing AmpC beta-lactamase enzyme. **Journal of Infection in Developing Countries**, 4(4): 239-242.

Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., and Arakawa, Y. (2005). Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli.* **Journal of Clinical Microbiology**, 43(6): 2551-2558.