การตรวจหาเอ็นซัยม์ เบต้า แลคทาเมส ชนิดฤทธิ์ขยาย

(Extended-spectrum Beta–lactamase, ESBL)

สุรภี เทียนกริม
สาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน
ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

เอ็นซัยม์ ESBL เป็นเอ็นซัยม์ที่พบในแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ มีฤทธิ์ย่อยสลายยากลุ่มเบต้า-แลคแทมได้มากชนิด ได้แก่ penicillin, oxyimino cephalosporin (3rd generation cephalosporin) และ aztreonam ทำให้มีการดื้อยาเบต้า-แลคแทมเกือบทุกกลุ่ม เอ็นซัยม์นี้เป็นเอ็นซัยม์เบต้า-แลคทาเมสชนิดใหม่ที่มีการค้นพบได้มากที่สุดในปัจจุบันและพบได้ทั่วโลก จึงมีความสำคัญทางคลินิกมาก

การตรวจหา ESBL มีความยุ่งยากเนื่องจากมีความหลากหลายของชนิด มีระดับการทำลายยาในกลุ่มเศฟาโลสสปอรินส์ แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน และความแรงของ promoters ใน gene นอกจากนี้ยังไม่สามารถดูจากผลการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี disc diffusion หรือวิธี dilution ในงานประจำ เพราะเชื้อที่สร้าง ESBL ส่วนใหญ่ จะมี MIC อยู่ในช่วง 0.5-2.0 มคก./มล. ซึ่งวิธี disc diffusion จะให้ inhibition zone กว้างจนแปลผลเป็น “ไว” ต่อยานั้นๆ

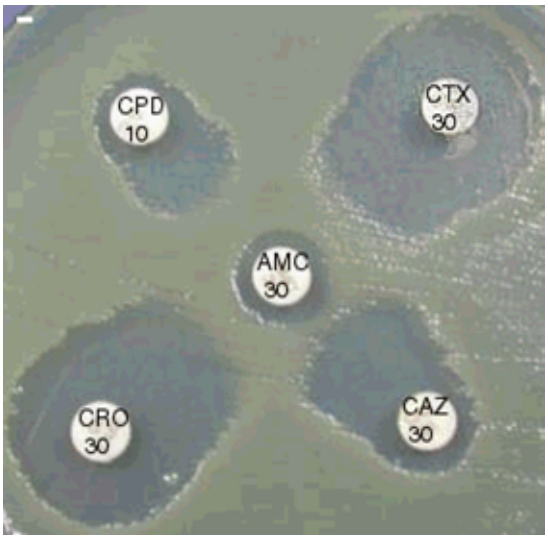
ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจหา ESBL มากมายหลายวิธี ส่วนใหญ่เป็นการตรวจหา ESBL ที่สร้างจาก *Klebsiella* ซึ่งเป็น genus ที่พบ ESBL มากที่สุด และสามารถที่จะนำมาใช้ตรวจ ESBL จากเชื้ออื่นๆ ใน Family *Enterobacteriaceae* ที่ไม่สร้าง chromosomal beta-lactamase หรือสร้างได้น้อยมาก เช่น *Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* ในที่นี้จะขอกล่าวโดยละเอียดเฉพาะเทคนิคทางจุลชีววิทยาคลินิคซึ่งสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไปและเป็นระดับการตรวจยืนยัน (phenotypic confirmatory tests) มีดังนี้

1. <u>วิธี Double disc</u> เป็นวิธีแรกที่ Jarlier V. และคณะพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักว่า ESBL ถูกยับยั้งด้วยสารต้านเบต้าแลคทาเมส จึงใช้กรด clavulanic ใน amoxicillin/clavulanate (AMX/cla) ซึ่งมีในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียทั่วไปและดัดแปลงจากวิธี disc diffusion โดยวางแผ่นยา (disc) AMX/cla (20/10 มคก.) บนศูนย์กลางของผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้ Mueller-Hinton agar (MHA) แล้ววางแผ่นยา cefpodoxime (10 มคก.), ceftazidime (30 มคก.), ceftriaxone (30 มคก.),cefotaxime (30 มคก.) หรือ aztreonam (30 มคก.) ให้ห่างจากจุดศูนย์กลางของแผ่นยา AMX/cla ถึงจุดศูนย์กลางของยาอื่นๆ 30 มม. ดังแสดงในรูปที่ 1

inhibition zone ของ oxyimino beta–lactam ด้านที่ใกล้กับ AMX/cla ขยายออกไปจากวงปกติ ซึ่งเกิดจากการเสริมฤทธิ์ (synergy) ของกรด clavulanic อ่านผลว่า “บวก” แสดงว่า เชื้อมีการสร้าง ESBL

ข้อดีของวิธีนี้คือ เป็นวิธีง่าย ราคาถูก พบว่าถ้าวางแผ่นยาห่างกัน 20 มม. จะทำให้ผลชัดเจนขึ้น แผ่นยาที่แนะนำให้ใช้คือ cefpodoxime 10 มคก. การใช้แผ่นยามากชนิดช่วยให้ตรวจพบ ESBL ประเภทอื่นๆ นอกจาก ESBLที่เปลี่ยนแปลงไปจาก TEM และ SMV เช่น ESBL ประเภท CTX-M จะให้ผลบวกต่อ cefotaxime และ cefpodoxime แต่ให้ผลลบต่อ ceftazidime

ข้อเสียของวิธีนี้คือ ระยะห่างระหว่างแผ่นยาที่เหมาะสมยังไม่เป็นที่ตกลง มีความแตกต่างกันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ประเภทของESBLมีหลายประเภทจนอาจทำให้การวินิจฉัย ESBL ไม่ครบทุกประเภทถ้าใช้แผ่นยาไม่ครบทุกชนิด การใช้แผ่นยาที่มีสารต้านเบต้าแลคทาเมสอื่น เช่น sulbactam หรือ



tazobactam ให้ผลไม่ดีเท่ากรด clavalanic

รูปที่1. การตรวจ ESBL ด้วยวิธี double disc แสดงผลการเสริมฤทธิ์ (synergy) ของ amoxicillin/clavulanate (AMC) กับ cefpodoxime (CPD), ceftazidime (CAZ), ceftriazone (CRO) และ cefotaxime (CTX)

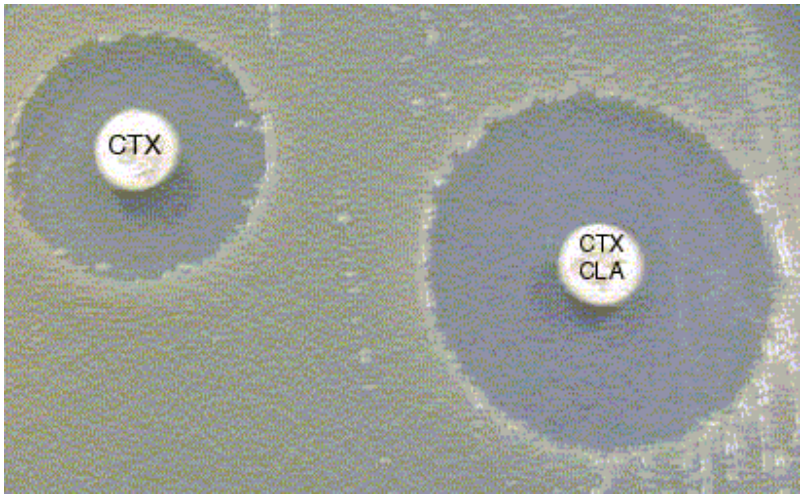
2. <u>วิธี Combination disc</u> ใช้หลักการเดียวกับวิธี disc diffusion โดยเปรียบเทียบ inhibition zone ของแผ่นยาที่มี extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียว กับแผ่นยาที่มีESC ร่วมกับกรด clavulanic National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ของสหรัฐอเมริกา ได้แนะนำให้เปรียบเทียบระหว่าง

1. cefotaxime (30 มคก.) กับ cefotaxime + clavulanate (30+10 มคก.)
2. ceftazidime (30 มคก.) กับ ceftazidime + clavulanate (30+10 มคก.)

3. cefpodoxime (10 มคก.) กับ cefpodoxime+ clavulanate (10+1 มคก.)

โดย inhibition zone ของแผ่นยาที่มีกรด clavalanic กว้างกว่า ที่ไม่มีกรด clavulanic ≥ 5 มม. ตามรูปที่ 2 แสดงว่า เชื้อสร้าง ESBL แผ่นยาที่มีกรด clavulanic เหล่านี้สามารถหาซื้อได้จากบริษัทที่ผลิตแผ่นยาทดสอบความไวที่ใช้กันอยู่

การใช้คู่เปรียบเทียบของ cefotaxime หรือ ceftazidime เพียงคู่เดียว จะให้ความไวเป็นร้อยละ 66 หรือ 86 ตามลำดับ การใช้ทั้งสองคู่รวมกันพบความไวเพิ่มเป็นร้อยละ 93 ของเชื้อที่สร้าง ESBL การใช้คู่เปรียบเทียบของ cefpodoxime ร่วมด้วยจะให้ความไวและความเฉพาะ(specificity) ถึงร้อยละ 100 ของเชื้อ *Klebsiellae* ที่สร้าง ESBL การลดขนาดยาในแผ่นยาจาก 30 มคก. เป็น 10 มคก. และลด clavulanate จาก เป็น 1 มคก. ทำให้ตรวจหา ESBL ได้ถูกต้อง (accurate) ขึ้น



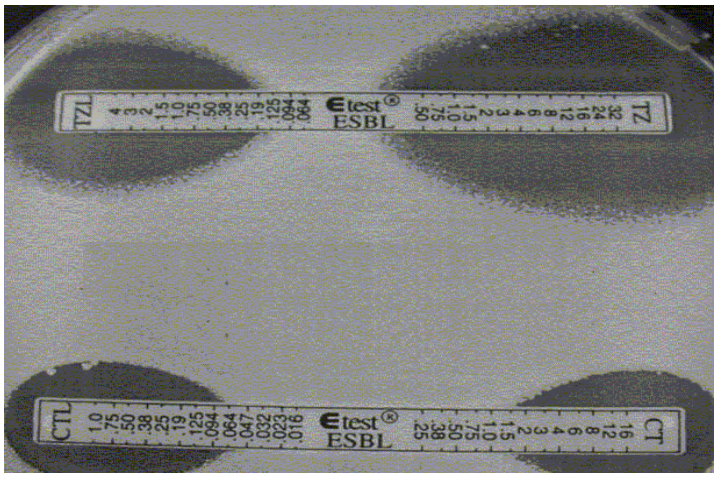
รูปที่2. การตรวจ ESBL ด้วยวิธี combination disc แสดงความแตกต่างของ inhibition zone ระหว่าง cefotaxime (CTX) และ cefotaxime+clavulanate (CTX CLA)

3.<u>วิธี dilution</u> ตามวิธีมาตรฐาน broth dilution ของ NCCLS โดยเปรียบเทียบ MICระหว่างหลอดที่ใส่ extended-spectrum cephalosporin (ESC) เพียงอย่างเดียว กับMIC ของหลอดที่ใส่ ESC ร่วมกับกรด clavulanic โดยหลักการเช่นเดียวกับวิธี combination disc สำหรับการวัดMIC ทำโดยการเจือจางสารต้านจุลชีพจากมากไปน้อยแล้วใส่กรดclavulanicให้ได้ 4 มคก./มล. ลงในทุกหลอด ค่า MIC ที่ลดลงจากการใส่กรด clavalanic ≥ 3 twofold dilution แสดงว่าเชื้อสร้าง ESBL

วิธีการนี้ไม่ยุ่งยาก แต่จะต้องมีผงยามาตรฐาน (standard power) การใช้สารต้านเบต้าแลคทาเมสอื่น พบว่า sulbactam หรือ tazobactam ไม่สามารถตรวจเชื้อที่สร้าง ESBL บางสายพันธุ์และเชื้อที่สร้าง Amp C beta-lactamase บางสายพันธุ์ก็ให้ผลบวกด้วยวิธีนี้ได้เช่นกัน

4. <u>วิธี E-test ESBL</u> บริษัทผู้ผลิต E-test ได้นำวิธี combination disc มาผสมผสานกับวิธี dilution โดยทำให้มีสารต้านจุลชีพทั้งสองด้านของแถบยา (double-ended strips) ด้านหนึ่งจะมีระดับความเข้มข้นของ cefotaxime ร่วมกับกรด clavulanic ตามรูปที่ 3 อัตราส่วนระหว่าง MIC ที่มีและไม่มีกรด clavulanic (ซึ่งอยู่คนละด้านของแถบ E-test) ≥ 8 หรือ ≥ 3 twofold dilution แสดงว่า เชื้อสร้าง ESBL

วิธีนี้ทำได้ง่าย และมีความไวพอๆ กับวิธี double disc แต่ราคาแพงและการอ่านผลอาจมีปัญหาเมื่อ MIC ต่อ cefotaxime หรือ cefotaxime มีค่าต่ำจนอ่านค่า MIC ไม่ได้ เพราะต่ำกว่าระดับที่มีค่าให้อ่าน หรือเนื่องจากมีการกระจายของกรด clavulanic จากด้านหนึ่งซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อไปรบกวนของการอ่านผลของอีกด้านหนึ่ง เนื่องจากแถบ E-test สั้นเกินไป



รูปที่3. การตรวจ ESBL ด้วยวิธี Etest ESBL แสดงความแตกต่างของค่า MIC ระหว่าง ceftazidime (TZ) และ ceftazidime+clavulanate (TZL) cefotaxime (CT) และ cefotaxime+ clavulanate (CTL)

<u>การรายงานผล</u>

เชื้อ *Klebsiella* และ *E.coli* ที่ตรวจพบว่าสร้างESBL ด้วยวิธีดังที่กล่าวมาแล้วนี้ ถือว่าเชื้อดื้อต่อ extended-spectrum cephalosporins โดยไม่ต้องคำนึงถึงผลที่ได้รับจากการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพ

การตรวจหา ESBL นี้ อาจพบบวกลวง(false-positive) ในเชื้อ *K.pneumoniae* ที่สร้าง SHV-1ในปริมาณที่สูงมาก จนทำให้ MIC ต่อ ceftazidimeสูงด้วย MIC ที่สูงอาจเกิดจากผลของปริมาณเชื้อที่มากเกิน (inoculum effect) เชื้อ *K.pneumoniae* ที่สร้าง SHV-1 และขาด outer membrane poin protein ทำให้มีความแตกต่างของ MIC ระหว่าง oxymino beta-lactam ที่ใส่และไม่ใส่กรด clavulanic ส่วนผลลบลวง

(false-negative) ก็พบได้ในเชื้อที่สร้างเบต้าแลคทาเมสมากกว่า 1 ชนิด ในเชื้อตัวเดียวกัน เช่น ไม่สามารถตรวจพบ ESBL จาก *K.pneumoniae* ที่สร้าง Amp-C-beta-lactamase ด้วย นอกจากนี้ Steward และคณะพบว่ากรด clavulanic ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นซัยม์ ESBL ที่สร้างโดย *K.pneumoniae* ประมาณร้อยละ 5

เชื้อ *Enterobacteriaceae* อื่นๆ นอกจาก *Klebsiellae* และ *E.coli* ตรวจพบ ESBL น้อยมาก และตรวจได้ยากมาก โดยเฉพาะเชื้อ *Enterobacter* spp.,*Citrobacter freundii, Morganella morganii, Providencia* spp. และ *Serratia* spp., มักจะมี inducible Amp C chromosomal enzyme ซึ่งจะถูกชักนำ (induce) ให้สร้างเอ็นซัยม์นี้ด้วยกรด clavulanic ออกมาจับกับสารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบหา ESBL ทำให้ไม่สามารถเห็นผลการเสริมฤทธิ์ (synergy) จากการยับยั้ง ESBL ด้วยฤทธิ์ของกรด clavulanic และการดื้อยา ceftazidime และ cefpodoxime มักจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงการสร้างเอ็นซัยม์ chromosomal Amp C ในปริมาณมากๆ มากกว่าการสร้าง ESBL การตรวจหา ESBL ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* (OXA-type ESBL) ยิ่งยุ่งยาก เนื่องจาก นอกจากการสร้างเอ็นซัยม์ inducible Amp C แล้วยังมีกลไกการดื้อยาอื่นๆ เข้าร่วมด้วย เช่น impermeability และ efflux

Refferences

1. Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamase in the 21st Century : characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14:933-51.
2. Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother 2001;48(Suppl S1) :59-64
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. Performance Standard for Antimicrobial disk Susceptibility Tests. 7th ed. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pa.
5. M'Zail FH, Chanawong A, Kerr KG, *et al*. Detection of extended-spectrum β-lactamase in numbers of the family Enterobacteriaceae : a comparison of the Mast DD method, the double disc and E test ESBL. J Antimicrob Chemother 2000;42:881-5.

6. Caster MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM. Detection of extended-spectrum β-lactamase in Klebsiellae with the oxoid combination disc method. J Clin Microbiol 2000;38:4228-32.