อุบัติการณ์ของเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายในตัวอย่างเชื้อ อี. โคไล ที่แยกได้จากสุนัขและแมว

นายวิริทธิ์พล จันทร์วาววาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

THE INCIDENCE OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBLs) IN *E. COLI* ISOLATES FROM DOGS AND CATS

Mr. Wiritpol Chanwaowam

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology
Department of Veterinary Pharmacology
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2013
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	อุบัติการณ์ของเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายในตัวอย่างเชื้อ อี. โคไล ที่แยกได้จากสุนัขและแมว
โดย	นายวิริทธิ์พล จันทร์วาววาม
สาขาวิชา	เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นิภัทรา สวนไพรินทร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นิภัทรา สวนไพรินทร์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร้อยโทหญิง สัตวแพทย์หญิง ดร. เนาวรัตน์ สุธัมนารถพงษ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. กาญจนา อิ่มศิลป์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิริทธิ์พล จันทร์วาววาม : อุบัติการณ์ของเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายในตัวอย่างเชื้อ อี. โคไล ที่แยกได้จากสุนัขและแมว. (THE INCIDENCE OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBLs) IN *E. COLI* ISOLATES FROM DOGS AND CATS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. สพ.ญ. ดร. นิภัทรา สวนไพรินทร์ , 49 หน้า.

เอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (extended-spectrum beta-lactamases; ESBLs) สร้างมาจากยีนบนพลาสมิดของแบคทีเรียแฟมิลี่ *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะเชื้อ *Escherichia coli (E. coli)* เอนไซม์นี้สามารถไฮโดรไลซิสยาต้านแบคทีเรียกลุ่มเบตาแลคแทมได้เกือบทั้งกลุ่ม และมักก่อให้เกิดการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (multidrug resistance; MDR) ปัจจุบันมีรายงานทางระบาดวิทยาทั่วโลกมากขึ้น แต่ข้อมูลการศึกษาในสัตว์เลี้ยงยังมีไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของ ESBLs ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากสุนัขและแมวป่วย จำนวน 250 ตัวอย่าง และความสัมพันธ์ระหว่าง ESBLs และการเกิด MDR ผลการศึกษาพบว่า อุบัติการณ์ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ในสุนัขและแมวป่วย เท่ากับ 32.80% (82 ตัวอย่าง) ซึ่ง 79.27% มาจากสุนัข (65 ตัวอย่าง) และ 20.73% มาจากแมว (17 ตัวอย่าง) นอกจากนี้ยังพบว่า 100% ของเชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs เกิด MDR ซึ่งพบการดื้อต่อยา 3, 4, 5, 6 และ 7 กลุ่มพร้อมกันเท่ากับ 3.7%, 14.6%, 17.1%, 39.0% และ 25.6% ตามลำดับ โดยกลุ่มยาที่เชื้อมักดื้อยา ได้แก่ beta-latams (100%), fluoroquinolones (96.34%), tetracyclines (90.24%), aminoglycosides (84.15%), phenicols (84.15%) และ potentiated sulfonamides (78.05%) แต่ดื้อต่อยากลุ่ม furans ในระดับปานกลาง (34.15%) จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า ในสุนัขและแมว พบอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายมากกว่าที่มีรายงานในสัตว์เลี้ยงทั่วโลก และเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน โดยเชื้อส่วนใหญ่ดื้อต่อยากลุ่มหลักที่ใช้ในการรักษาสุนัขและแมว ข้อมูลจากการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยา เพื่อวางแผนเฝ้าระวังเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ในประเทศไทยต่อไป

Chulalongkorn University

ภาควิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2556

5475322231 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY
KEYWORDS: CATS/ DOGS/ E. COLI/ EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBLS)/ MULTIDRUG RESISTANCE (MDR)

WIRITPOL CHANWAOWAM: THE INCIDENCE OF EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASES (ESBLs) IN *E. COLI* ISOLATES FROM DOGS AND CATS. ADVISOR: DR. NIPATTRA SUANPAIRINTR, 49 pp.

Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are enzymes produced from genes on plasmids of bacteria in *Enterobacteriaceae* family, especially *Escherichia coli (E. coli)*. These enzymes not only hydrolyze almost all beta-lactam drugs, but also lead to multidrug resistance (MDR). Although there are several epidemiologic reports regarding MDR worldwide, but a few are from companion animals. Thus the objectives of this study were to evaluate the incidence of ESBLs-producing *E. coli* from 250 samples from dogs and cats, and the relationships between ESBLs and MDR. This study demonstrated that the incidence of ESBLs-producing *E. coli* from dogs and cats was 32.80% (82 samples); 79.27% from dogs (65 samples) and 20.73% from cats (17 samples). Interestingly 100% of ESBLs-producing *E. coli* in this study were multiple resistant to 3, 4, 5, 6, and 7 groups of antibacterial drugs (3.7%, 14.6%, 17.1%, 39.0% and 25.6% respectively). The antibiograms of *E. coli* in this study demonstrated marked resistance to beta-lactams (100%), fluoroquinolones (96.34%), tetracyclines (90.24%), aminoglycosides (84.15%), phenicols (84.15%) and potentiated sulfonamides (78.05%), with moderate resistance to furans (34.15%). In conclusion, this study has demonstrated the incidence of ESBLs-producing *E. coli* from dogs and cats in Thailand, which are greater than those reported worldwide. These ESBLs-producing *E. coli* are significantly related to MDR, indicating resistance to major antibacterials used in dogs and cats. The outcomes from this study can be utilized as epidemiologic data for surveillance study of ESBLs-producing *E. coli* in Thailand.

Department: Veterinary Pharmacology Student's Signature .....

Field of Study: Veterinary Pharmacology Advisor's Signature .....

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อ.สพ.ญ.ดร. นิภัทรา สวนไพรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่คอยให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้ แม้ในช่วงต้นของการวิจัยอาจมีอุปสรรคที่ทำให้เกิดความล่าช้าในการทำงานวิจัยไปบ้าง แต่สุดท้ายก็ผ่านมาได้ด้วยดีจนงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จในที่สุด แม้ข้าพเจ้าจะเป็นนิสิตระดับปริญญาโทคนแรกที่อาจารย์รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา แต่อาจารย์กลับทำให้รู้สึกว่าอาจารย์ทำหน้าที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ได้อย่างดีเยี่ยม ไม่ขาดตกบกพร่อง เพราะนอกจากคำปรึกษาที่เกี่ยวกับการวิจัยที่ข้าพเจ้าได้รับ ข้าพเจ้ายังได้รับความเอาใจใส่ กำลังใจ เมื่อเจอกับปัญหาหรืออุปสรรคในขณะที่กำลังศึกษา สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าสัญญาว่าจะนำความรู้ในสาขาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทย์ มาใช้ให้เกิดประโยชน์แก่สังคมต่อไปในอนาคต

ขอขอบพระคุณ รศ.สพ.ญ.ดร. ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย ผศ.ร้อยโทหญิง สพ.ญ.ดร. เนาวรัตน์ สุธัมนารถพงษ์ และ รศ.สพ.ญ.ดร.กาญจนา อิ่มศิลป์ คณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลาและให้คำแนะนำเพิ่มเติม ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน ที่กรุณาให้ทั้งคำแนะนำ และข้อคิดเห็นเพิ่มเติม ตลอดจนอำนวยความสะดวกที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานวิจัย และการศึกษาในระดับปริญญาโทมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ น.สพ. รชฎ ตันติเลิศเจริญ หัวหน้าหน่วยและเจ้าหน้าที่ประจำหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัวและขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้การสนับสนุน เป็นกำลังใจในการทำวิจัยเรื่อยมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ในที่สุด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญภาพ ..... ญ
สารบัญตาราง ..... ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2
คำสำคัญ 2
คำถามสำหรับการวิจัย 3
สมมติฐานการวิจัย 3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
ยาต้านแบคทีเรียกลุ่มเบตาแลคแทม 4
กลไกการดื้อยาต้านแบคทีเรียและปัจจัยที่มีผลต่อการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรีย 5
กลไกการดื้อต่อยากลุ่มเบตาแลคแทม 6
การจำแนกกลุ่มเอนไซม์เบตาแลคทาเมส 7
เอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (Extended-spectrum beta-lactamases; ESBLs) ... 11
ความสำคัญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs 12
Escherichia coli ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ในสัตว์เลี้ยง 13
วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs 18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินวิจัย 20
วัสดุและอุปกรณ์ 20
วิธีดำเนินการวิจัย 22
การเก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli* 22

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

การทดลองที่ 1 : การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ E. coli ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test และการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ด้วยวิธี combination disk test 22
การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย 22
1.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ E. coli ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test 22
1.2 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ E. coli ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk 25
การวิเคราะห์ทางสถิติ 25
การทดลองที่ 2 : การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ และการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance; MDR) 27
การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการศึกษา 27
การวิเคราะห์ทางสถิติ 28
บทที่ 4 ผลการทดลอง 29
ผลการทดลองที่ 1 : การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test และการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ด้วยวิธี combination disk test 29
1.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test 29
1.2 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk test 29
ผลการทดลองที่ 2 : การตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ และการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance; MDR) 30
2.1 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ 30
2.2 การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance) 30
2.2.1 การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในตัวอย่างเชื้อ E. coli 30
2.2.2 การเกิด MDR ในตัวอย่างเชื้อ E. coli 33

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย 35
การตรวจคัดกรองตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs 35
การตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs 35
การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli* 37
ความสัมพันธ์ระหว่าง ESBLs และการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน 38
สรุปผลการวิจัย 40
ข้อเสนอแนะ 40
รายการอ้างอิง 41
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 49

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 : แสดงสัดส่วนอุบัติการณ์การค้นพบเอนไซม์ ESBLs ชนิดต่างๆ
ที่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง.....17
ภาพที่ 3-1 : แสดงผลการตรวจคัดกรอง (screening test) ความสามารถ
ในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli*.....24
ภาพที่ 3-2 : แสดงผลการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli*
ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk test.....26
ภาพที่ 4-1 : เปอร์เซนต์การดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli*
ที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs (ESBLs) เทียบกับตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลลบ
ต่อการสร้าง ESBLs (non-ESBLs).....32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2-1 : แสดงการจำแนกเอนไซม์เบตาแลคทาแมส.....9
ตารางที่ 2-2 : ตารางแสดงข้อมูลอุบัติการณ์การค้นพบ ESBLs ในสัตว์เลี้ยง.....14
ตารางที่ 3-1 : แสดงขนาด inhibition zones สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถ ในการสร้างเอนไซม์ ESBLs เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานจากเชื้อ *E. coli* ATCC® 25922.....23
ตารางที่ 4-1 : แสดงจำนวนตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง.....29
ตารางที่ 4-2 : แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจยืนยันด้วยวิธี combination disk test และเครื่องตรวจอัตโนมัติ.....30
ตารางที่ 4-3 : แสดงผลการดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs.....31
ตารางที่ 4-4 : แสดงผลการดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ไม่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs.....31
ตารางที่ 4-5 : แสดงการเกิด multidrug resistant (MDR) ในตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวก และผลลบต่อการสร้าง ESBLs.....33
ตารางที่ 4-6 : แสดงจำนวนตัวอย่างและเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่พบ MDR แยกตาม จำนวนกลุ่มยาที่เกิดการดื้อยาในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อ การสร้างเอนไซม์ ESBLs.....33
ตารางที่ 4-7 : กลุ่มยาที่เกิดการดื้อยาพร้อมกันในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวก ต่อการสร้าง ESBLs.....34

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	=	American type culture selection
ATM	=	aztreonam
CAZ	=	ceftazidime
CLA	=	clavulanic acid
CRO	=	ceftriaxone
CTX	=	cefotaxime
CTX-M	=	cefotaximase
D-ala-D-ala	=	D-alanyl-D-alanine
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
E. coli	=	*Escherichia coli*
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
ESBLs	=	extended-spectrum beta-lactamases
MDR	=	multidrug resistance
MHA	=	mueller-hinton agar
MRSA	=	methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
NaCl	=	normal saline
NAG	=	N-acetylglucosamine
NAM	=	N-acetylmuramic acid
OXA	=	oxacillinase
PBPs	=	penicillin binding proteins
L-DAP	=	L-diaminopimelic acid
L-lys	=	L-lysine
SHV	=	sulfhydryl variable
TEM	=	Temoneira
TSA	=	tryptic soy agar
TSB	=	tryptic soy broth
v/v	=	volume by volume
VRE	=	vancomycin resistant *Enterococcus* spp.
XDR	=	extremely drug resistant

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันทั่วโลกกำลังเผชิญปัญหาแบคทีเรียดื้อยากลุ่มเบตาแลคแทม ซึ่งเป็นกลุ่มยาต้านแบคทีเรียที่สำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งในทางการแพทย์และสัตวแพทย์เพิ่มมากขึ้น กลไกหลักในการดื้อยา ได้แก่ การสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมส (beta-lactamase enzymes) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ที่บริเวณวงแหวนเบตาแลคแทม (beta-lactams ring) ทำให้ยาในกลุ่มนี้ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ penicillin binding proteins (transpeptidase enzyme) ได้ (Livermore 1995) โดยปกติแล้วเอนไซม์เบตาแลคทาเมสแต่ละชนิดจะยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาเบตาแลคแทมเฉพาะกลุ่ม โดยไม่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยาข้ามกลุ่ม เช่น เอนไซม์เพนิซิลินเนส (penicillinases) จะยับยั้งการทำงานเฉพาะยากลุ่มเพนิซิลิน (penicillins) หรือเอนไซม์เซฟาโลสปอริเนส (cephalosporinases) จะยับยั้งการทำงานเฉพาะกลุ่มยาเซฟาโลสปอริน (cephalosporins) เป็นต้น (Perez, Endimiani et al. 2007) อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ.1987 มีรายงานว่าแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบในกลุ่ม Enterobacteriaceae มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (Extended-spectrum beta-lactamases : ESBLs) ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์ยากลุ่มเบตาแลคแทมได้หลายกลุ่ม เช่น penicillins, cephalosporins และแอสทรีโอแนม (aztreonam) จึงทำให้แบคทีเรียเหล่านี้สามารถดื้อต่อยาในกลุ่มเบตาแลคแทมเกือบทั้งกลุ่ม (Perez, Endimiani et al. 2007)

ESBLs ถูกสร้างโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ของแบคทีเรีย ซึ่งพลาสมิดเหล่านี้มักพบยีนดื้อยากลุ่มอื่นรวมอยู่ด้วย เช่น อะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides), เททราไซคลิน (tetracyclines), ฟลูออโรควินโนโลน (fluoroquinolones) เป็นต้น ดังนั้นแบคทีเรียที่สร้าง ESBLs มักเกิดการดื้อยาหลายกลุ่มพร้อมกัน (multidrug resistance; MDR) ทำให้การรักษาด้วยยาต้านแบคทีเรียไม่ได้ผล จนเป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขทั่วโลก (Bonnet 2004) โดยเฉพาะเชื้อ *Escherichia coli (E. coli)* ที่มีรายงานว่า มีอุบัติการณ์ในการสร้าง ESBLs มากที่สุด

จากข้อมูลการศึกษาในมนุษย์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 พบปัญหาการระบาดและการดื้อยาจากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Hunter, Dawson et al. 2010) ในขณะเดียวกันก็พบข้อมูลทางระบาดวิทยาในสัตว์เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นกัน โดยข้อมูลส่วนใหญ่เป็นข้อมูลที่ศึกษาในสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร ในขณะที่ข้อมูลในสัตว์เลี้ยงยังมีไม่มากนัก (Wieler, Ewers et al. 2011) ในปี 2010 Ewers และคณะได้รายงานการค้นพบการถ่ายทอดโคลน (clone) ของเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ระหว่างสัตว์เลี้ยงและมนุษย์ และตั้งสมมติฐาน

ว่า สัตว์เลี้ยงอาจเป็นแหล่งรังโรคของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวและถ่ายทอดสู่มนุษย์ เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์เลี้ยงที่มีความใกล้ชิดมากขึ้น และมีการถ่ายทอดเชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ดังกล่าวผ่านทางสิ่งแวดล้อมระหว่างมนุษย์และสัตว์เลี้ยง (Ewers, Grobbel et al. 2010) จึงเป็นเหตุให้ในปัจจุบันประเทศต่างๆ โดยเฉพาะในแถบทวีปยุโรปและอเมริกา เริ่มตื่นตัวและพยายามจัดทำโปรแกรมการเฝ้าระวังการระบาดของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในสัตว์เลี้ยงอย่างต่อเนื่อง (Teshager, Dominguez et al. 2000, Feria, Ferreira et al. 2002, Costa, Poeta et al. 2004, Carattoli, Lovari et al. 2005, Frye and Fedorka-Cray 2007, Steen and Webb 2007, Costa, Poeta et al. 2008, Pomba, da Fonseca et al. 2009, Ewers, Grobbel et al. 2010, O'Keefe, Hutton et al. 2010)

สำหรับกลุ่มประเทศแถบเอเชียยังมีการศึกษาเรื่อง ESBLs ในสัตว์เลี้ยงไม่มากนัก (Matsumoto, Ikeda et al. 1988, Ma, Zeng et al. 2009, Sun, Zeng et al. 2010, Ho, Chow et al. 2011, Tamang, Nam et al. 2012) จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาอุบัติการณ์ของเอนไซม์ ESBLs จากเชื้อ *E. coli* ในสุนัขและแมว ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลทางระบาดวิทยาที่มีการค้นพบเอนไซม์ ESBLs จากตัวอย่างสุนัขและแมวในประเทศไทย และสามารถนำไปใช้ในการวางแผนจัดทำโปรแกรมเฝ้าระวังการระบาดของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อ *E. coli* ในสุนัขและแมว ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (ESBLs)
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยายต่อการเกิดการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (multidrug resistance : MDR)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

คำสำคัญ : แมว สุนัข เชื้อ *E. coli* เอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย การดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน

Keywords : cats, dogs, *E. coli*, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), multidrug-resistance (MDR)

คำถามสำหรับการวิจัย

- มีการพบเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากสุนัขและแมวในประเทศไทย หรือไม่
- เชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs นี้จะก่อให้เกิดการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกันหรือไม่

สมมติฐานการวิจัย

- พบเอนไซม์ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* ที่ได้จากสุนัขและแมวในประเทศไทย
- เชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs จะก่อให้เกิดการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาของเชื้อ *E. coli* จากสุนัขและแมวป่วยในประเทศไทย ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs
2. ทราบความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs และการเกิด MDR

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยาต้านแบคทีเรียกลุ่มเบตาแลคแทม

ยาต้านแบคทีเรียในกลุ่มเบตาแลคแทม (beta-lactams) เป็นกลุ่มยาต้านแบคทีเรียที่มีความสำคัญกลุ่มหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียทั้งในมนุษย์และสัตว์ ซึ่งยาหลายชนิดในกลุ่มนี้เป็นยาที่ใช้ทั้งในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง และเป็นกลุ่มยาที่มีการสั่งจ่ายในสัตว์เลี้ยงมากที่สุด (DANMAP 2005) ยาในกลุ่มเบตาแลคแทม นี้ประกอบด้วยยา 4 กลุ่มชนิดด้วยกัน ได้แก่ penicillins, cephalosporins, carbapenems และ monobactams ซึ่งทั้งหมดจะมีโครงสร้างทางเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการออกฤทธิ์เหมือนกัน นั่นคือ วงแหวนเบตาแลคแทม (beta-lactams ring) (Mascaretti 2003, Boothe 2012)

ยากลุ่มนี้จัดเป็นยาต้านแบคทีเรียที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal antimicrobials) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ในขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์เปปติโด-ไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย peptidoglycan เรียงต่อกันเป็นชั้น โครงสร้างของ peptidoglycan เกิดจากสายโมเลกุลไกลแคน (linear glycan chains) ที่มีหน่วยย่อยของ amino sugars 2 ชนิดเรียงต่อสลับกัน คือ *N*-acetylglucosamine (NAG) และ *N*-acetylmuramic acid (NAM) ที่มีโมเลกุลเปปไทด์ 5 โมเลกุล (pentapeptides) เชื่อมต่อ และเกิดการเชื่อมต่อระหว่างสายไกลแคน (cross linked) ในแต่ละชั้นที่บริเวณ D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala) ของ NAM กับ L-lysine (L-lys) หรือ L-diaminopimelic acid (L-DAP) ของ NAM อีกโมเลกุลหนึ่งด้วยเอนไซม์ทรานสเปปติเดส (transpeptidase enzyme) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า penicillin binding proteins (PBPs) (Kong, Schneper et al. 2010) แบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของ peptidoglycan ที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ แม้จะมีชั้นของ peptidoglycan ที่บางกว่า แต่มีชั้นของ outer membrane ซึ่งประกอบด้วย lipopolysaccharides ล้อมรอบผนังเซลล์อีกชั้นหนึ่ง และมีโปรตีน porin ที่ชั้น outer membrane ทำหน้าที่ในการควบคุมการเข้าเซลล์ของยาและ/หรือสารต่างๆ (Walsh 2003, Guardabassi and Courvalin 2006)

ยาในกลุ่มเบตาแลคแทม มีวงแหวนเบตาแลคแทมเป็นส่วนประกอบที่จำเป็นในการออกฤทธิ์ของยา เนื่องจากวงแหวนเบตาแลคแทมมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับส่วน D-ala-D-ala ของปลายสาย pentapeptides ทำให้วงแหวนเบตาแลคแทมสามารถจับกับเอนไซม์ transpeptidase ได้เช่นเดียวกับ D-ala-D-ala ทำให้กระบวนการ cross-linked ของสายไกลแคนเปลี่ยนไป (van Heijenoort 2001, Walsh 2003, Boothe 2012) เกิดความไม่เสถียรของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

(loss of rigidity) สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเข้าออกสารของผนังเซลล์ (loss of permeability) เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของผนังเซลล์แบคทีเรีย (osmotic lysis) และทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด (Livermore 1995, Smet, Martel et al. 2010)

กลไกการดื้อยาต้านแบคทีเรียและปัจจัยที่มีผลต่อการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรีย

การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียสามารถจำแนกได้เป็น 2 ลักษณะ (Hawkey 2000) คือ

1. การดื้อยาต้านแบคทีเรียที่มีมาแต่กำเนิด (innate resistance) ยาต้านแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถใช้ได้ในเชื้อบางกลุ่มตามธรรมชาติ เช่น เชื้อ *Mycoplasma spp.* ดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มเบตาแลคแทม เนื่องจากเชื้อ *Mycoplasma spp.* ไม่มีผนังเซลล์ หรือเชื้อ anaerobic bacteria มักดื้อต่อยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ เนื่องจากยากลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ได้ต้องอาศัยออกซิเจน เป็นต้น

2. การดื้อยาต้านแบคทีเรียที่เกิดขึ้นภายหลัง (acquired resistance) เป็นกลไกที่แบคทีเรียพัฒนาขึ้นมาเพื่อจะขจัดหรือลดประสิทธิภาพของยาต้านแบคทีเรียโดยทั่วไป แบ่งได้เป็น 4 กลไกใหญ่ ซึ่งในเชื้อแต่ละชนิดอาจจะใช้หลายๆ กลไกร่วมกัน

2.1) Drug inactivation / modification เป็นกลไกที่พบมากที่สุด เกิดจากแบคทีเรียสร้าง เอนไซม์มาทำลายหรือเปลี่ยนแปลงยาต้านแบคทีเรีย ตัวอย่างที่เราพบได้บ่อย ได้แก่ เอนไซม์ beta-lactamases, erythromycin ribosomal methylase เป็นต้น

2.2) Alteration of target site การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตำแหน่งที่ยาจะไปออกฤทธิ์ (target site) ทำให้ยาไม่สามารถจับกับ target site ได้ เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ DNA gyrase และ topoisomerase IV ต่อการดื้อยากลุ่มฟลูออโรควินโนโลน เป็นต้น

2.3) Bypass pathways เชื้อที่ดื้อยาสร้าง alternative target ขึ้นมาใหม่ แล้วยาต้านแบคทีเรียจะมาจับกับ target อันใหม่แทน เช่น ในกรณี MRSA สร้าง PBP2a ทำให้แบคทีเรียยังคงสร้างผนังเซลล์โดยใช้ PBPs เดิมได้ปกติ เป็นต้น

2.4) Decreased uptake แบคทีเรียมีกลไกป้องกันไม่ให้ยาเข้าไปในเซลล์หรือนำยาออกไปภายนอกเซลล์ ตัวอย่างเช่น การลดการแสดงออกของยีนที่สร้าง porins หรือการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่สร้าง efflux pump เป็นต้น

สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการดื้อยาต้านแบคทีเรียอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย สรุปพอสังเขป ดังต่อไปนี้

1. การใช้ยาต้านแบคทีเรียเกินความจำเป็น เช่น ใช้ยาในขณะที่ไม่มีการติดเชื้อ ใช้ยาต้านแบคทีเรีย generation ใหม่ๆ โดยไม่ตรวจหาความไวรับของยาก่อนเลือกใช้
2. การเลือกใช้ยาต้านแบคทีเรียที่ไม่เหมาะสมกับเชื้อชนิดของแบคทีเรีย เช่น เลือกใช้ยาต้านแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์ได้เฉพาะเชื้อแกรมบวกกับการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ

3. การใช้ยาต้านแบคทีเรียไม่ถูกต้องตามหลักการ เช่น ใช้ขนาดยาหรือความถี่ไม่เพียงพอต่อการรักษา หรือหยุดการให้ยาต้านแบคทีเรียก่อนกำหนด เป็นต้น
4. การใช้ยาต้านแบคทีเรียที่ไม่ได้มาตรฐาน เช่น ใช้ยาเลียนแบบที่ไม่ได้มาตรฐาน ใช้ยาที่เสื่อมสภาพ เป็นต้น

กลไกการดื้อต่อยากลุ่มเบตาแลคแทม

แบคทีเรียหลายชนิดมีความสามารถในการพัฒนากลไกในการดื้อต่อยากลุ่มเบตาแลคแทม ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลไก คือ

(1) การสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมส จากยีนที่แสดงออกบนโครโมโซมหรือบนพลาสมิดของแบคทีเรีย มักเป็นกลไกหลักที่ก่อให้เกิดการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มเบตาแลคแทมในแบคทีเรียแกรมลบ โดยเอนไซม์เบตาแลคทาเมสนั้นจะมีโครงสร้างและกลไกคล้ายคลึงกับ PBPs ถูกสร้างและปล่อยออกมาสู่บริเวณผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียแกรมบวกหรือบริเวณที่ว่างระหว่างผนังเซลล์ชั้นนอกและผนังเซลล์ชั้นใน (periplasmic space) ของแบคทีเรียแกรมลบ (Drawz and Bonomo 2010, Boothe 2012) เอนไซม์เบตาแลคทาเมสมีคุณสมบัติทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสของพันธะที่วงแหวนเบตาแลคแทม ทำให้โครงสร้างของวงแหวนเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ยาไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Livermore 1995)

(2) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ PBPs ซึ่งเป็น binding site ของยาในกลุ่มนี้ จากการกลายพันธุ์ของยีนบน DNA ที่ใช้ในการสร้าง PBPs ทำให้ยาในกลุ่มเบตาแลคแทมไม่สามารถเข้ามาจับและยับยั้งการทำงานของ PBPs ได้ (Gold and Moellering 1996) เช่น การแสดงออกของ PBP2a โดยยีน *mecA* ที่เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือในเชื้อ Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ทำให้ความสามารถในการจับกับ PBPs ของยาเบตาแลคแทม ลดลง (Boothe 2012)

(3) การลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย กลไกนี้พบในแบคทีเรียแกรมลบ โดยการลดการแสดงออกของยีน (gene expression) หรือการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของโปรตีน porins บนผนังเซลล์ เช่น การลดการแสดงออกของยีน porin OprD ในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณ porins ตามธรรมชาติในจำนวนน้อยอยู่แล้ว ทำให้ยา imipenem ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้(Schwarz and Chaslus-Dancla 2001, Drawz and Bonomo 2010, Petri 2011)

(4) การเพิ่มการกำจัดออกของยาผ่านทาง efflux pumps ก่อนที่ยาจะออกฤทธิ์ โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการสร้าง pumps เช่น AcrAB-TolC transporter ในเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. อย่างไรก็ตาม efflux pumps ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่มเบตาแลคแทมนั้นไม่ได้มีความจำเพาะต่อการขับออกของยาในกลุ่มนี้เพียงกลุ่มเดียว แต่ยัง

สามารถขับยาต้านแบคทีเรียกลุ่มอื่นออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วย จึงมักทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (multidrug resistance : MDR) (Li and Nikaido 2009)

การจำแนกกลุ่มเอนไซม์เบตาแลคทาเมส

ปัจจุบันเอนไซม์เบตาแลทาเมสถูกจำแนกได้มากกว่า 400 ชนิด ตามระบบการจำแนก 2 ระบบ คือ ระบบ Ambler system ซึ่งเป็นระบบที่นิยมใช้ในการจำแนกเอนไซม์เบตาแลคทาเมส โดยจำแนกจากความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เบตาแลคทาเมส ระบบ Ambler นี้สามารถจำแนกเอนไซม์เบตาแลคทาเมสได้เป็น 4 class คือ A, B, C และ D (Ambler 1980) โดย class A, C และ D สามารถไฮโดรไลซ์ยากลุ่มเบตาแลคแทมผ่านทาง serine active site ได้เลย แต่ใน class B จำเป็นต้องอาศัยซิงค์ไอออนอย่างน้อย 1 ไอออน เพื่อช่วยไฮโดรไลซ์ยากลุ่มเบตาแลคแทม (Bush, Jacoby et al. 1995) โดยทั่วไปแล้ว class A จะออกฤทธิ์ต่อยาในกลุ่ม benzylpenicillins ในขณะที่ class B ออกฤทธิ์ต่อทั้ง penicillins และ cephalosporins เอนไซม์บางชนิดในกลุ่มนี้ยังได้ผลต่อยาในกลุ่ม carbapenems ด้วย class C ออกฤทธิ์ได้ดีต่อ cephalosporins และ class D ประกอบด้วยเอนไซม์ OXA-type enzymes ซึ่งมีความสามารถในการไฮโดรไลซ์ยา oxacillin และอนุพันธุ์ของ oxacillin (Fluit, Visser et al. 2001)

ระบบการจำแนกอีกระบบคือ Bush-Jacoby-Medeiros system ซึ่งจำแนกตามความสามารถของเอนไซม์ในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มเบตาแลคแทมที่แตกต่างกัน และการถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitors (Bush, Jacoby et al. 1995, Schwarz and Chaslus-Dancla 2001) โดยในปัจจุบันการจำแนกเอนไซม์เบตาแลทาเมสได้มีการปรับปรุงข้อมูลการจำแนกเพื่อให้สอดคล้องกับการดื้อยาที่พบมากขึ้น โดยยังอาศัยคุณสมบัติในการจำแนกตามความสามารถในการยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาเบตาแลคแทมและความไวรับต่อ beta-lactamase inhibitors เช่นเดิม (Bush and Jacoby 2010) (ตารางที่ 2-1) ซึ่งจำแนกออกได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่ม 1 : cephalosporinases ยับยั้งการทำงานของยากลุ่ม cephalosporins รวมถึง cephamycins และไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitors แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยคือ กลุ่ม 1 และกลุ่ม 1e ซึ่งกลุ่ม 1e เพิ่งถูกจำแนกออกจากกลุ่ม 1 เนื่องจากสามารถไฮโดรไลซ์ ceftazidime และ oxyimino-beta-lactams อื่นๆ ได้ดี

กลุ่ม 2 : จัดเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุด แบ่งออกเป็น 12 กลุ่มย่อย ได้แก่ 2a, 2b, 2be, 2br, 2br, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e, 2f ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems และถูกยับยั้งได้ด้วย beta-lactamase inhibitors (ยกเว้นกลุ่มย่อย 2br, 2ber)

กลุ่ม 3 : metallo-beta-lactamases สามารถยับยั้งการทำงานของยากลุ่ม carbapenems โดยอาศัยซิงค์ไอออน (zinc-dependent carbapenemases) แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของยา

กลุ่ม monobactams ได้ และไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitors แต่ถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA (แบ่งออกเป็น 3a และ 3b)

กลุ่ม 4 : ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ จัดเป็นพวก miscellaneous enzymes (Bush and Jacoby, 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2-1 : แสดงการจำแนกเอนไซม์เบตาแลคทาแมส (Bush and Jacoby, 2010)

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Ambler class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Representative enzyme(s)	Defining characteristic(s)
				CA or TZB[a]	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillins; hydrolysis cephamycins	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI[b]	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino-β-lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillins than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillins and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis oxyimino-β-lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis oxyimino-β-lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, tazobactam	TEM-50

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Ambler class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Representative enzyme(s)	Defining characteristic(s)
				CA or TZB[a]	EDTA		
2c	2c	A	Carbenicilin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Varaible	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino-ß-lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins, but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino-ß-lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenems	No	Yes	Hydrolyzes cabapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	unknown					

[a] CA = clavulanic acid; TZB = tazobactam. [b] NI = not included.

10

เอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดฤทธิ์ขยาย (Extended-spectrum beta-lactamases; ESBLs)

ปกติแล้วเอนไซม์ beta-lactamases จะยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มเบตาแลคแทมแบบจำเพาะ จนกระทั่งเริ่มมีการค้นพบว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของยากลุ่มเบตาแลคแทมได้มากชนิดกว่าเอนไซม์ beta-lactamases ที่เคยค้นพบมาในอดีตเมื่อปี ค.ศ.1987 และเรียกกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้ว่า Extended-spectrum beta-lactamases หรือ ESBLs โดยพบว่า ESBLs สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins ซึ่งรวมถึงยาในกลุ่ม expanded spectrum cephalosporins ได้แก่ third และ fourth generation cephalosporins ได้ (เช่น cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime) นอกจากนี้ยังออกฤทธิ์ยับยั้งยาในกลุ่ม monobactams (เช่น aztreonam) แต่ไม่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม cephamycins (เช่น cefoxitin, cefotetan) และ carbapenems (เช่น imipenem, meropenem, and ertapenem) ESBLs ถูกยับยั้งได้ด้วย beta-lactamase inhibitors (เช่น clavulanic acid, tazobactam และ sulbactam) (Pitout 2010) ทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ดื้อต่อยาในกลุ่มเบตาแลคแทมเกือบทั้งกลุ่ม แต่ไวรับต่อยาเบตาแลคแทมที่มี beta-lactamase inhibitors เป็นองค์ประกอบ

เอนไซม์ในกลุ่ม ESBLs ประกอบด้วย 4 แฟมิลี่ คือ TEM (Temoneira)- family, SHV (Sulfhydryl variable)-family, CTX-M (Cefotaximase)-family และ OXA (oxacillinase)-family โดย ESBLs ในแฟมิลี่ CTX-M เป็นแฟมิลี่ที่มีอุบัติการณ์รายงานการค้นพบมากที่สุด แยกได้มากกว่า 110 ชนิด โดยทั่วไปแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, CTX-M-8 และ CTX-M-25 ส่วน ESBLs ในแฟมิลี่ OXA ส่วนใหญ่ไม่จัดเป็น ESBLs ยกเว้น OXA-10, -13, -14, -15, -16, -17, -18 และ OXA-19 (Pitout 2010) ESBLs เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ถูกจัดอยู่ใน Ambler class A และ Bush-Jacoby-Medeiros group 2be (Perez, Endimiani et al. 2007)

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs มักเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งในแฟมิลี่ *Enterobacteriaceae* ได้แก่ *E. coli, Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. โดยเชื้อ *E. coli* มีอุบัติการณ์ในการสร้างเอนไซม์ ESBLs มากที่สุด เอนไซม์ ESBLs จะถูกสร้างโดยยีน bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} ที่อยู่บนพลาสมิดของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถถูกส่งผ่านระหว่างแบคทีเรียได้ ทำให้เกิดการแพร่กระจายของยีนดื้อยาเหล่านี้ได้อย่างรวดเร็วและเป็นวงกว้าง (Pitout 2010) จากข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าอุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs จะอยู่ระหว่าง 2.6 % -5.6 % (Ewers, Grobbel et al. 2011) และอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs อยู่ระหว่าง 1.4 – 14.1 % (Smet, Martel et al. 2010)

ความสำคัญของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs

ปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs กลายเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข นอกเหนือไปจากปัญหาการติดเชื้อ methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) หรือ vancomycin resistant *Enterococcus* spp. (VRE) (Hunter, Dawson et al. 2010) จากข้อมูลการรายงานของเครือข่ายการเฝ้าระวังและติดตามการดื้อยาต้านจุลชีพในทวีปยุโรป (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network; EARS-Net) ในปี 2009 พบว่า สัดส่วนของจำนวน MRSA ที่พบค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000-2009 ขณะที่แบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs กลับมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (EARS-Net 2009)

ESBLs มักถูกสร้างโดยยีน *bla*-gene ที่อยู่บนพลาสมิดขนาดใหญ่ (50–200 kb) ของแบคทีเรีย ซึ่งนอกจาก *bla*-gene แล้วมักพบยีนดื้อยากลุ่มอื่นรวมอยู่ด้วย ดังนั้นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs จึงมีแนวโน้มในการเกิด MDR โดยกลุ่มยาที่มีรายงานการดื้อยาในเชื้อที่สามารถสร้าง ESBLs ได้แก่ ยากลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides), เททราไซคลิน (tetracyclines), ฟลูออโรควินโนโลน (fluoroquinolones), เฟนิคอล (phenicols), ซัลโฟนาไมด์ (sulphonamides) เป็นต้น ซึ่งมีรายงานทั้งในมนุษย์ (Jacoby and Medeiros 1991, Bonnet 2004, Carattoli 2013) และในสัตว์ ถึงแม้จะไม่มากเท่ากับรายงานที่พบในมนุษย์ก็ตาม (Li, Mehrotra et al. 2007, Ho, Chow et al. 2011, Dierikx, van Duijkeren et al. 2012, Szmolka and Nagy 2013) ปัญหาที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ทำให้เกิดข้อจำกัดในการเลือกใช้ยาต้านแบคทีเรีย และเกิดความล้มเหลวในการรักษาตามมา นอกจากนี้การส่งผ่านพลาสมิดที่มียีน *bla*-gene และยีนดื้อยาอื่นร่วมกันระหว่างแบคทีเรีย (horizontal transmission) อาจนำไปสู่การแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาที่ทำให้เกิด MDR เป็นวงกว้าง จนทำให้เป็นปัญหาที่สำคัญทางด้านการแพทย์และสาธารณสุขทั่วโลก การเริ่มศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในประเทศไทย จะเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยให้สัตวแพทย์เริ่มตระหนักถึงบทบาทของตนเองนอกเหนือจากการเป็นผู้ใช้ยาต้านแบคทีเรียในการรักษาการติดเชื้อแล้ว ยังต้องป้องกันการเกิดการดื้อยาและการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Escherichia coli ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ในสัตว์เลี้ยง

ในทางสัตวแพทย์มีรายงานการตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs มากขึ้นโดยเฉพาะในสัตว์ปศุสัตว์ ซึ่งคาดว่าเป็นแหล่งรังโรคและแพร่กระจายเชื้อผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (Guardabassi, Schwarz et al. 2004, Bertrand, Weill et al. 2006, Li, Mehrotra et al. 2007, Carattoli 2008, Smet, Martel et al. 2010) รวมทั้งในสัตว์ป่า นก และสัตว์ฟันแทะ (Li, Mehrotra et al. 2007, Poeta, Radhouani et al. 2008, Bonnedahl, Drobni et al. 2009, Simoes, Poirel et al. 2010, Smet, Martel et al. 2010, Ho, Chow et al. 2011) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเรื่อง ESBLs ในสัตว์เลี้ยง โดยเฉพาะในประเทศแถบเอเชียและในประเทศไทย ยังมีไม่มากนัก (ตารางที่ 2-2) ทั้งที่ในปัจจุบันสัตว์เลี้ยงมีลักษณะการเลี้ยงดูและความใกล้ชิดกับมนุษย์มากขึ้น และอาจเกิดการแพร่กระจายของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ระหว่างมนุษย์และสัตว์ได้ (Carattoli 2008) จากการรวบรวมข้อมูลอุบัติการณ์การค้นพบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ทั่วโลกเปรียบเทียบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง พบว่า เอนไซม์ ESBLs ที่พบมากที่สุดในแบคทีเรียแกรมลบที่ได้จากมนุษย์ คือ CTX-M-15 และที่ได้จากสัตว์เลี้ยง คือ CTX-M-1 (Smet, Martel et al. 2010) (ภาพที่ 2-1) นอกจากนี้ยังมีรายงานยืนยันการพบ *E. coli* clone B2-O25b:H4-ST131 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ CTX-M-15 จากสุนัขป่วย โดยเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับ clone ที่พบในมนุษย์มากถึง 87 % ซึ่งปกติเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ CTX-M-15 clone นี้มักเป็น clone ที่มีการแพร่ระบาดในมนุษย์ จึงเป็นการยืนยันสมมติฐานถึงความเป็นไปได้ว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ระหว่างสปีชีส์ คือ จากมนุษย์ไปสัตว์เลี้ยง หรือจากสัตว์เลี้ยงไปมนุษย์ (Ewers, Grobbel et al. 2010)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2-2 : ตารางแสดงข้อมูลอุบัติการณ์การค้นพบ ESBLs ในสัตว์เลี้ยง (Ewers, Grobbel et al. 2011)

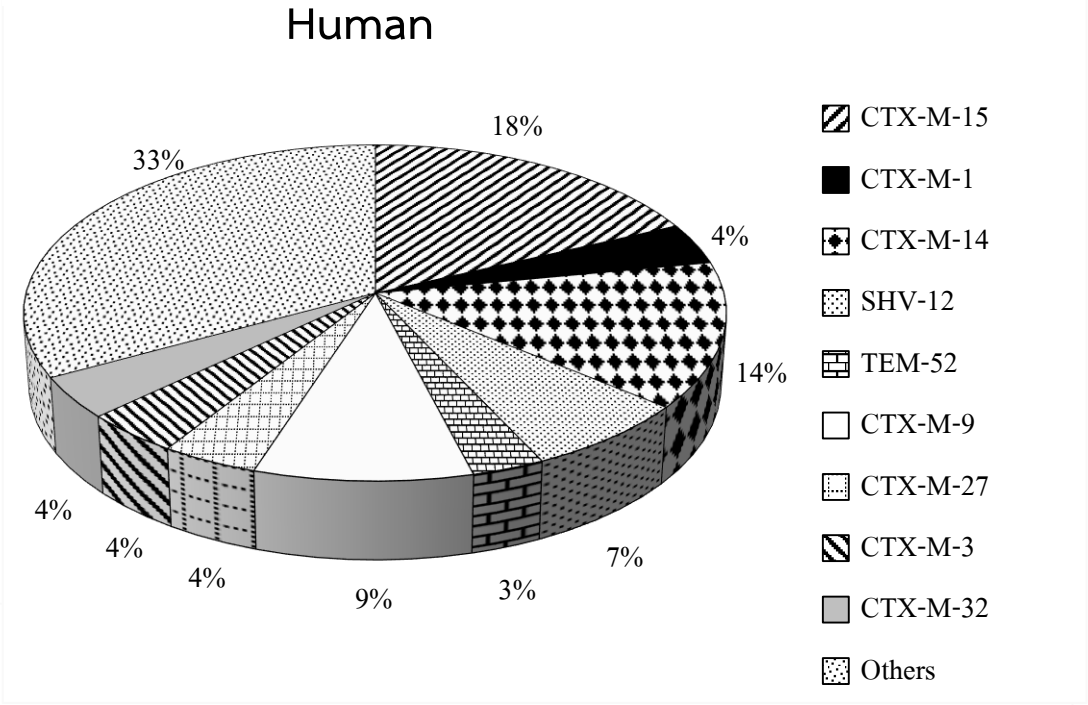
Animal	Sick / healthy / Not specified (NS)	ESBL-producing isolates per total isolates (%)	ESBL types (% of total β-lactamase isolates)	Bacterial species	Country	Year
Dog	Healthy	NS	CTX-M-1	*E. coli*	Japan	1986
Dog	UTI	1/1 (case report)	SHV-12	*E. coli*	Spain	1998
Dog	UTI	33/72 (4.2)	SHV; AmpC	*E. coli*	Portugal	NS
Dog	UTI, WI	11/11 (select)	TEM (100); CMY-7 (100)	*E. coli*	Australia	1999-2001
Dog	Healthy	4/39 (10.3)	TEM-52 (75); CTX-M-1 (25)	*E. coli*	Portugal	2003
Dog Cat	NS NS	15/226 (7.5) 3/72 (4.2)	CTX-M-1 (76.5); SHV-12 (23.5); CMY-2 (11.8) CTX-M-1 (66.6); TEM (33.3)	*E. coli* *E. coli*	Italy	2001-2003
Horse	sick	Outbreak isolate	SHV-12; TEM-1; CMY-2	*S. newport*	USA	2003
Cat Dog Horse	NS NS NS	87/418 (20.8) 13/133 (9.8) 249/1300 (19)	CTX-M gr.3; SHV; TEM; CMY-2 CTX-M gr.3; SHV; TEM; CMY-2 CTX-M gr.3; SHV; TEM; CMY-2	*S. enteritica* *S. enteritica* *S. enteritica*	USA USA USA	1999-2003

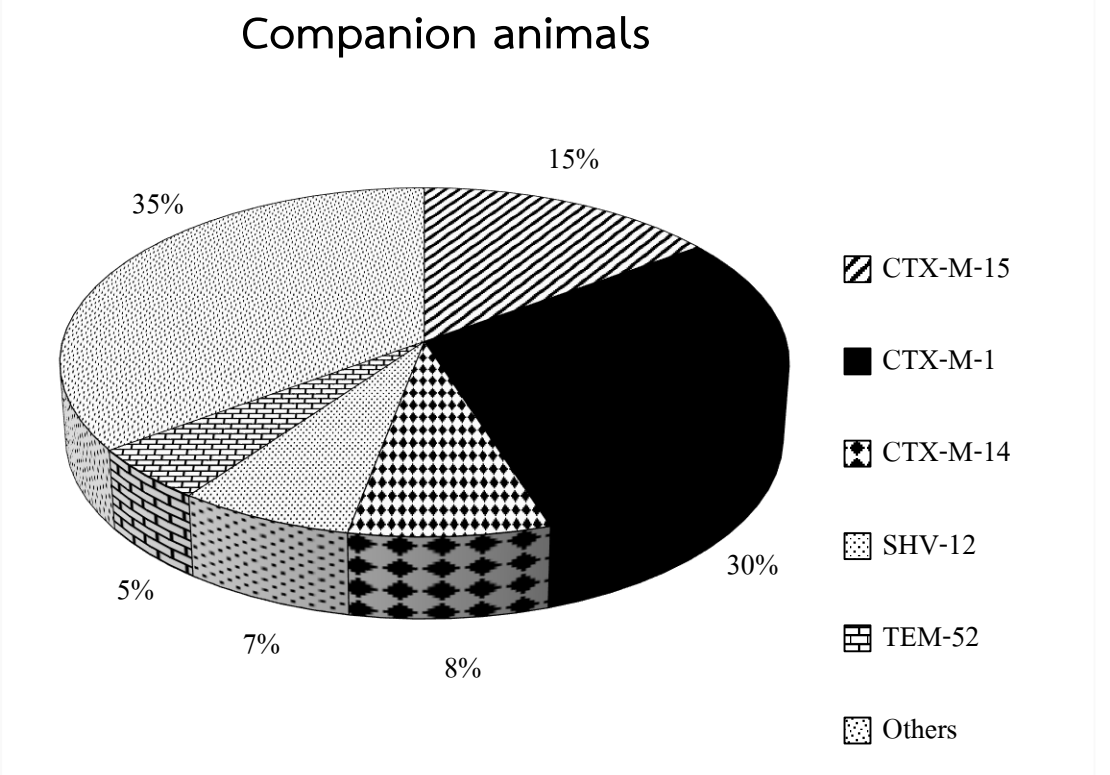
Animal	Sick / healthy / Not specified	ESBL-producing isolates per total isolates (%)	ESBL types (% of total β-lactamase isolates)	Bacterial species	Country	Year
Dog Cat	Sick Sick	10/not spec. 4/not spec.	CTX-M-1 (40); CTX-M-14 (60) CTX-M-1 (100)	*E. coli* *E. coli*	Chile Chile	2006 2006
Dog	WI (2); UTI (1)	3/3 (100)	CTX-M-type (100)	*E. coli*	UK	2007
Dog	UTI, WI, abscess, OT	10/10 preselected	SHV-12 (90); OXA-10 (10); CMY-2 (10)	*Enterobacter spp.*	Australia	2001-2005
Horse	NS	3/not specified 3/not specified	CTX-M-1 (50); CMY (25) Unidentified (25)	*E. coli* *K. pneumoniae*	Nether-lands	2003-2005
Dog Cat	Healthy Healthy	6/78 (7.8) 8/66 (12.1)	CTX-M-1 (33); TEM (66) TEM (100)	*E. coli* *E. coli*	Portugal	2003
Dog	UTI	1/41 (2.4)	CTX-M-15 (100)	*E. coli*	Portugal	2004-2006
Dog & cat	GTI, RTI	36/NS	CTX-M-9 group; CTX-M-1; CMY-2; DHA-1	*E. coli, E. cloacae, C. freundii, K. pneumoniae*	China	2006-2007

Animal	Sick / healthy / Not specified	ESBL-producing isolates per total isolates (%)	ESBL types (% of total β-lactamase isolates)	Bacterial species	Country	Year
Dog & Cat	Sick & healthy	97/240 (40.4)	CTX-M-14 (46.4); -55 (24.7); -27 (8.2); -15(6.2); -65 (6.2); -3 (5.2); -64 (3.1); -9 (2.1); SHV-12 (1)	*E. coli*	China	2007-2008
Dog Cat Horse	WI UTI WI, UTI, GTI	3/NS 1/NS 10/NS	CTX-M-1; SHV CTX-M-1 CTX-M-1; SHV	*E. coli, Klebsiella* spp. *E. coli* *E.coli, Klebsiella* spp.	Sweden	2007-2009
Dog Horse	WI (2); UTI (1)	UTI; WI; GTI UTI; WI; GTI	CTX-M-15 (10.7); SHV-12 (1.2) CTX-M-15 (2)	*E. coli*	Europe	2008-2009
Dog, Cat	UTI	11/150 (7.3)	CTX-M-14 (9.1); CTX-M-15 (81.8); SHV-12 (9.1)	*E. coli*	USA	2004-2007
Dog, Cat	Sick	12/47 (selected)	CTX-M-14 (41.67); CTX-M-24 (25); CTX-M-3,-55,-27,-65 (each 8.33)	*E. coli*	Korean	2006-2007
Dog Cat	sick	50/202 (24.7) 47/213 (22.06)	CTX-M-1 (40.0); -9 (50.9); negative (9.1) CTX-M-1(5.6); -9 (79.6); -1&-9 (1.9); negative (13)	*E. coli*	Hong Kong	2008-2010

GTI = gastrointestinal tract infection, OT = osteoarthritis, RTI = respiratory tract infection, UTI = urinary tract infection, WI = wound infection

ภาพที่ 2-1 : แสดงสัดส่วนอุบัติการณ์การค้นพบเอนไซม์ ESBLs ชนิดต่างๆ ที่พบในมนุษย์และสัตว์เลี้ยง (Smet, Martel et al. 2010)





วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs

วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในแบคทีเรียแกรมลบ นิยมปฏิบัติตามวิธีของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) โดยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้

1) การตรวจคัดกรองตัวอย่างเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs (screening test) มี 2 วิธี ได้แก่

1.1) Disk diffusion screening test โดยทำการเปรียบเทียบขนาด inhibition zone ของเชื้อแบคทีเรียต่อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) และ aztreonam ต่อขนาด inhibition zone มาตรฐานของยาดังกล่าว หากเชื้อใดมีค่า inhibition zone น้อยกว่าค่า inhibition zone มาตรฐานของยาที่ทดสอบตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไป จัดว่าเชื้อนั้นมีแนวโน้มในการสร้าง ESBLs

1.2) Minimum inhibitory concentration (MIC) screening test โดยเปรียบเทียบค่า MIC ของเชื้อแบคทีเรียต่อยาในกลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) และ aztreonam ต่อค่า MIC มาตรฐานของยาดังกล่าว หากเชื้อใดมีค่า MIC มากกว่าค่า MIC มาตรฐาน ตั้งแต่หนึ่งชนิดขึ้นไป จัดว่าเชื้อนั้นมีแนวโน้มในการสร้าง ESBLs

ทั้งนี้ CLSI ได้แนะนำเพิ่มเติมว่า หากเพิ่มจำนวนยาในการทดสอบ จะยิ่งช่วยเพิ่มความไว (sensitivity) ของการตรวจคัดกรองมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเชื้อแบคทีเรียให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง จะต้องทำการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ความสามารถในการสร้าง ESBLs ต่อไป (CLSI 2008)

2) การตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs (confirmatory test) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนหลักๆ คือ

2.1) การตรวจยืนยันโดยอาศัยการแสดงออกทางกายภาพ (phenotypic confirmatory test) ซึ่งมีหลายวิธี เช่น

ก. Combination disk test โดยดูจากขนาด inhibition zone หากขนาด inhibition zone ของเชื้อที่ทดสอบต่อยา cephalosporins รุ่นที่ 3 ที่ให้ร่วมกับ beta-lactamase inhibitors (เช่น cefotaxime/clavulanic acid, ceftazidime/clavulanic acid) แตกต่างจาก inhibition zone ต่อยา cephalosporins รุ่นที่ 3 (cefotaxime, ceftazidime) มากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร จัดว่าเชื้อนั้นมีความสามารถในการสร้าง ESBLs

ข. MIC confirmatory test โดยดูจากค่า MIC หากค่า MIC ของเชื้อที่ทดสอบต่อ cephalosporins รุ่นที่ 3 มากกว่าค่า MIC ของ cephalosporins รุ่นที่ 3 ที่ให้ร่วมกับกับ beta-lactamase inhibitors อย่างน้อย 3 ระดับความเข้มข้น (2^3 เท่า) จัดว่าเชื้อนั้นมีความสามารถในการสร้าง ESBLs (CLSI 2008)

อย่างไรก็ตาม วิธี combination disk test มีโอกาสเกิดความคลาดเคลื่อนจากการวัดขนาด inhibition zones ในขณะที่การตรวจหาค่า MIC ด้วยวิธี manual dilution test นั้นก็มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อนและใช้เวลานานกว่าจะได้ผลการทดสอบ ทำให้ในปัจจุบันได้มีการผลิตชุดทดสอบและเครื่องตรวจอัตโนมัติในการตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ที่มีความสะดวกและใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่า รวมทั้งมีความไวและความจำเพาะต่อการตรวจสอบสูงและ CLSI ให้การยอมรับ เช่น

ก. เครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2 (bioMérieux Vitek Inc., USA) ซึ่งได้รับการยอมรับจาก CLSI ว่าสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือเพื่อตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งประมวลผลโดยการเปรียบเทียบสัดส่วนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ระหว่าง cefepime และ cefepime/clavulanic acid, cefotaxime และ cefotaxime/clavulanic acid และ ceftazidime และ ceftazidime/clavulanic acid ที่บรรจุในแผ่นการ์ดตรวจความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแกรมลบทางสัตวแพทย์ (AST-GN38, bioMérieux Vitek Inc., USA) และรายงานผลเป็นบวกหรือลบ (positive or negative ESBLs) มีความไว 74-98 % ความจำเพาะ 85-99 % ใช้เวลาทดสอบเพียง 6-13 ชั่วโมงในการระบุชนิดเชื้อและทดสอบความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรียได้หลายชนิดพร้อมกัน (Sorlozano, Gutierrez et al. 2005, Spanu, Sanguinetti et al. 2006)

ข. เครื่องตรวจอัตโนมัติ BD Phoenix™ (Becton Dickinson Biosciences , Sparks, Md) มีความไว 92 % ความจำเพาะ 82 % ใช้เวลาในการทดสอบเพียง 6 ชั่วโมง ซึ่งทั้ง VITEK®2 และ BD Phoenix™ สามารถให้ผลการตรวจที่มีความแม่นยำใกล้เคียงกัน โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Leverstein-van Hall, Fluit et al. 2002)

นอกจากนี้ ยังมีเครื่อง MicroScan® panels (Dade Behring Microscan, Sacramento, Canada) ซึ่งมีความไว 84% ความจำเพาะ 78 % และ Etest® strip ที่มีความไว 94%, ความจำเพาะ 85% (Wiegand, Geiss et al. 2007) ซึ่งเริ่มเข้ามามีบทบาทในการตรวจหาเชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs มากขึ้น

2.2) การตรวจยืนยันโดยการตรวจหายีนที่ใช้ในการแสดงออกของเอนไซม์ ESBLs (genotypic confirmatory test) ซึ่งอยู่บนพลาสมิด ของเชื้อแบคทีเรีย เช่น bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} นิยมตรวจด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยอาศัย primers ที่จำเพาะต่อ *bla*-gene ชนิดต่างๆ วิธีนี้มีความไว 99-100% และความจำเพาะ 98-100% (Perez, Endimiani et al. 2007)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ สำหรับการศึกษาแบคทีเรียวิทยา

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1.1.1 Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid Ltd., England)

1.1.2 Tryptic soy agar (TSA) (Oxoid Ltd., England)

1.1.3 Tryptic soy broth (TSB) (Oxoid Ltd., England)

1.2 เชื้อแบคทีเรีย *E. col* ATCC® 25922

1.3 วัสดุอุปกรณ์

1.3.1 จานเพาะเชื้อพลาสติกปราศจากเชื้อ

1.3.2 ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

1.3.3 กระบอกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร

1.3.4 ปิเปตแก้ว ขนาด 5, 10 มิลลิลิตร

1.3.5 หลอดทดลองปราศจากเชื้อ

1.3.6 หลอดเก็บตัวอย่างแช่แข็ง (cryovials) ขนาด 2 มิลลิลิตร

1.3.7 กล่องเก็บหลอดตัวอย่างแช่แข็ง (cryovial boxes)

1.3.8 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.3.9 ก้านพันสำลีปราศจากเชื้อ (sterile cotton swabs)

1.3.10 ขวดแก้วปราศจากเชื้อมีฝาปิด

1.3.11 Vortex mixer

1.4 สารเคมี

1.4.1 0.45% และ 0.9% Normal saline (NaCl)

1.4.2 Glycerol

1.5 เครื่องมือ

1.5.1 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) (Labnet®; Vortemp56, USA)

1.5.2 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำและความร้อน (autoclave)

1.5.3 ตู้แช่แข็งเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ สำหรับวิเคราะห์ความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรีย

2.1 เครื่อง automated VITEK® 2 (BioMérieux Vitek Inc., USA)

2.2 แผ่นการ์ดตรวจความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแกรมลบทางสัตวแพทย์ (AST-GN38; BioMérieux Vitek Inc., USA)

2.3 แผ่นยาทดสอบความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรีย

2.3.1 แผ่นยา ceftriaxone 30 ไมโครกรัม (CRO) (Oxoid Ltd.,England)

2.3.2 แผ่นยา ceftazidime 30 ไมโครกรัม (CTX) (Oxoid Ltd.,England)

2.3.4 แผ่นยา cefotaxime 30 ไมโครกรัม (CAZ) (Oxoid Ltd.,England)

2.3.5 แผ่นยา aztreonam 30 ไมโครกรัม (ATM) (Oxoid Ltd.,England)

2.3.6 แผ่นยา cefotaxime /clavulanic acid 30/10 ไมโครกรัม (CAZ-CLA) (Becton and Dickinson Co., USA)

2.3.7 แผ่นยา ceftazidime/clavulanic acid 30/10 ไมโครกรัม (CTX-CLA) (Becton and Dickinson Co., USA)

2.4 อุปกรณ์วางแผ่นยา (disk dispensing apparatus) (Oxoid Ltd.,England)

2.5 ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)

2.6 Pipette tips ขนาด 200 ไมโครลิตร

2.7 เครื่องวัดความขุ่นอัตโนมัติ (DensiCheck™; BioMérieux Inc., USA)

2.8 Vernier caliper

2.9 สารละลายความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland standard

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างเชื้อ *E. coli*

ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รวบรวมมาจากตัวอย่าง *E. coli* จากสุนัขและแมวป่วย ที่สัตวแพทย์ผู้ปฏิบัติงานในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่งตรวจเพื่อระบุชนิดของเชื้อและตรวจหาความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรีย (bacterial identification and susceptibility test) ด้วยวิธี disk diffusion ในหน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตว-แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ระหว่างเดือนกันยายน 2555 ถึงเดือนตุลาคม 2556 จำนวน 250 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดถูกเก็บในหลอดเก็บตัวอย่างแช่แข็ง (cryovials) ที่มีส่วนผสมของ TSB 70% และ glycerol 30% v/v หลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่างๆ ต่อไป

การทดลองที่ 1 : การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ E. coli ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test และการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ด้วยวิธี combination disk test

การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างเชื้อ *E. coli* จากตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส มาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วย vortex mixer เพื่อให้ตะกอนเชื้อที่ตกอยู่บริเวณก้นหลอดกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้น streak ลงบน TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำตัวอย่างโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland โดยใช้ 0.9% normal saline ปราศจากเชื้อ ให้มีปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

Chulalongkorn University

1.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ E. coli ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test

วิธีการตรวจคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test เป็นไปตามที่ระบุใน Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, M31-A3 (CLSI 2008) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุป ดังนี้

1.1.1 นำตัวอย่างเชื้อที่เตรียมไว้มา spread ลงบนผิวหน้า MHA ให้ทั่ว

1.1.2 วางแผ่นยาทดสอบบน MHA ที่มีเชื้อ spread อยู่ด้วยอุปกรณ์วางแผ่นยา ให้มีระยะห่างของแผ่นยาวัดจากจุดศูนย์กลางแผ่นยาทั้ง 2 แผ่น ไม่น้อยกว่า 24 มิลลิเมตร โดยใช้แผ่นยาทดสอบ 4 ชนิดต่อ 1 จานเพาะเชื้อตัวอย่าง ดังนี้

1.1.2.1 ceftazidime 30 ไมโครกรัม

1.1.2.2 cefotaxime 30 ไมโครกรัม

1.1.2.3 ceftriaxone 30 ไมโครกรัม

1.1.2.4 aztreonam 30 ไมโครกรัม

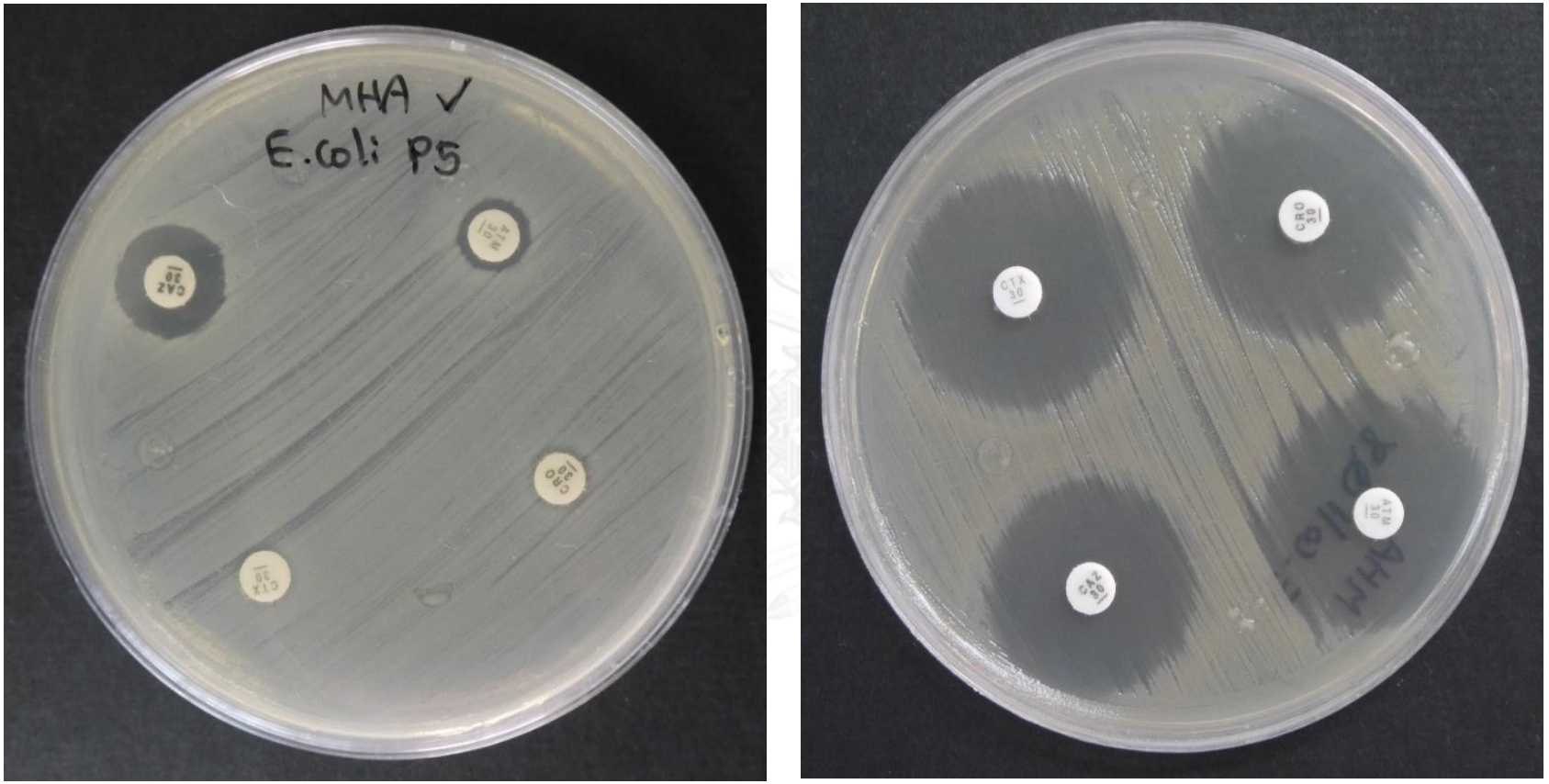
1.1.3 นำจานเพาะเชื้อ ที่วางแผ่นยาแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง

1.1.4 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณรอบแผ่นยาที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* (inhibition zones) ของแผ่นยาทั้ง 4 ชนิด และแปรผลความไวรับ โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานในตารางที่ 3-1 และภาพที่ 4-1 โดยใช้ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 3-1 : แสดงขนาด inhibition zones สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานจากเชื้อ *E. coli* ATCC® 25922 (CLSI 2008)

ชนิดแผ่นยาทดสอบ	**ขนาด inhibition Zones (มิลลิเมตร)**	
	เชื้อ *E. coli* ที่ทดสอบ	*E. coli* ATCC® 25922
ceftazidime 30 µg	≤ 22	25-32
cefotaxime 30 µg	≤ 27	29-35
ceftriaxone 30 µg	≤ 25	29-35
aztreonam 30 µg	≤ 27	28-36

(ก) (ข)



ภาพที่ 3-1 : แสดงผลการตรวจคัดกรอง (screening test) ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli*

ก) เชื้อที่ให้ผลลบต่อการตรวจคัดกรอง ข) เชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง

1.2 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ E. coli ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk

วิธีการตรวจยืนยัน เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk เป็นไปตามที่ระบุใน Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, M31-A3 (CLSI 2008) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุป ดังนี้

1.1.5 spread ตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองในการทดลองที่ 1.1 ลงบนผิวหน้า MHA

1.1.6 วางแผ่นยาทดสอบบน MHA ที่มีเชื้อ spread อยู่ด้วยอุปกรณ์วางแผ่นยาให้มีระยะห่างของแผ่นยาวัดจากจุดศูนย์กลางแผ่นยาทั้ง 2 แผ่น ไม่น้อยกว่า 24 มิลลิเมตร โดยใช้แผ่นยาทดสอบ 4 ชนิดต่อ 1 จานเพาะเชื้อตัวอย่าง ดังนี้

1.1.6.1 ceftazidime 30 ไมโครกรัม

1.1.6.2 ceftazidime/clavulanic acid 30/10 ไมโครกรัม

1.1.6.3 cefotaxime 30 ไมโครกรัม

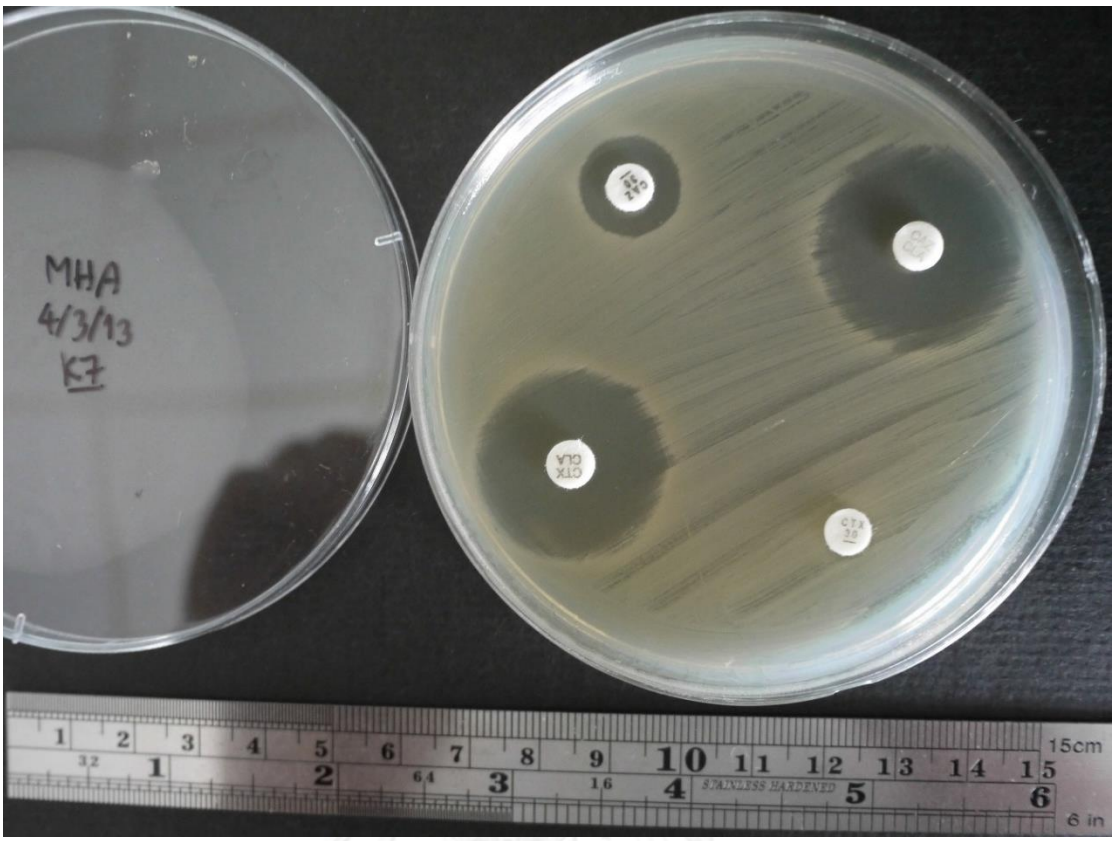
1.1.6.4 cefotaxime/clavulanic acid 30/10 ไมโครกรัม

1.1.7 นำจานเพาะเชื้อที่วางแผ่นยาแล้ว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.1.8 แปรผลการตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs จากผลต่างระหว่างขนาด inhibition zone ของแผ่นยา ceftazidime และ ceftazidime/clavulanic acid และ/หรือ cefotaxime และ cefotaxime/clavulanic acid เมื่อมีผลต่างมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-2) โดยใช้เชื้อ *E. coli* ATCC® 25922 เป็นตัวอย่างควบคุม ซึ่งจะให้ผลต่างระหว่างขนาด inhibition zone ของแผ่นยา ceftazidime และ ceftazidime/clavulanic acid และ/หรือ cefotaxime และ cefotaxime/clavulanic acid น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานอุบัติการณ์ผลการทดสอบตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองด้วยวิธี disk diffusion test และผลบวกต่อการตรวจยืนยันด้วยวิธี combination disk test ในรูปแบบ percentage



ภาพที่ 3-2 : แสดงผลการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk test

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดลองที่ 2 : การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ และการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance; MDR)

การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการศึกษา

นำตัวอย่างเชื้อ *E. coli* จากตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสมาละลาย (thaw) ที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วย vortex mixer เพื่อให้ตะกอนเชื้อที่ตกอยู่บริเวณก้นหลอดกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากนั้น streak ลงบน TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำตัวอย่างโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ด้วย 0.45 % NaCl ปราศจากเชื้อ จนมีปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยใช้ densicheck ในการวัดความขุ่นของเชื้อ จากนั้นเตรียมสารละลายของเชื้อตามที่ระบุไว้ในคู่มือการใช้เครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2 (Pincus 2013) ซึ่งมีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้

2.1 ใช้ auto pipette ดูดตัวอย่างที่เตรียมไว้จำนวน 145 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.45 % NaCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2 นำสารละลายเชื้อที่ได้จากข้อ 2.1 มาเข้าเครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK®2 (BioMérieux Vitek Inc., USA) โดยเครื่องตรวจอัตโนมัติจะทำการดูดสารละลายเชื้อด้วยระบบสูญญากาศ เข้าแผ่นการ์ดตรวจความไวรับสำหรับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบทางสัตวแพทย์ (AST-GN38) เพื่อตรวจความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* และความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรีย 7 กลุ่มยาที่ไม่เกี่ยวข้องกันดังนี้ (1) กลุ่ม beta-lactams [ประกอบด้วย กลุ่ม penicillins (amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, piperacillin), กลุ่ม cephalosporins (cephalexin, ceftiofur, cefpirome, cefpodoxime) และกลุ่ม carbapenems (imipenem) (2) กลุ่ม Aminoglycosides (amikacin, gentamicin, tobramycin) (3) กลุ่ม fluoroquinolones (enrofloxacin, marbofloxacin) (4) กลุ่ม tetracyclines (tetracycline) (5) กลุ่ม potentiated sulfonamides (trimethoprim/ sulfamethoxazole) (6) กลุ่ม phenicols (chloramphenicol) และ (7) กลุ่ม furans (nitrofurantoin)

2.3 รายงานผลการตรวจยืนยันความสามารถในการสร้าง ESBLs ของเชื้อ โดยเปรียบเทียบระหว่างค่า MIC ของ cefepime ต่อ cefepime/clavulanic acid, cefotaxime ต่อ cefotaxime/clavulanic acid และ ceftazidime ต่อ ceftazidime/clavulanic acid ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 3 ระดับความเข้มข้น (8 เท่า) เป็นผลบวก (positive ESBLs) และรายงานผลการเกิดการดื้อต่อยาต้าน

แบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน เมื่อเชื้อนั้นดื้อต่อกลุ่มยาที่ไม่เกี่ยวข้องกันตั้งแต่ 3 กลุ่มขึ้นไป (Livermore 1995)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานอุบัติการณ์ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs ในรูป percentage และเปรียบเทียบกับอุบัติการณ์ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ด้วย chi-square test โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0

รายงานอุบัติการณ์การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกและลบต่อการสร้าง ESBLs ในรูปแบบ percentage และเปรียบเทียบอุบัติการณ์การดื้อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ระหว่างตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการสร้าง ESBLs ด้วย chi-square test โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0

รายงานอุบัติการณ์การเกิดการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (MDR) ในเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในรูปแบบ percentage และหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการสร้างเอนไซม์ ESBLs กับการเกิด MDR ในตัวอย่างที่ได้จากสุนัขและแมว ด้วย chi-square test โดยใช้โปรแกรม SPSS statistics 17.0

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 : การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test และการตรวจยืนยัน (confirmatory test) ด้วยวิธี combination disk test

1.1 การตรวจคัดกรอง (screening test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test

จากตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 250 อย่าง เป็นตัวอย่างที่ได้จากสุนัข 195 ตัวอย่าง และแมว 55 ตัวอย่าง พบว่า 146 ตัวอย่าง (58.4 % ของตัวอย่างทั้งหมด) ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง โดยเป็นตัวอย่างที่ได้จากสุนัข 117 ตัวอย่าง (60.0 % ของตัวอย่างที่ได้จากสุนัข) และแมว 29 ตัวอย่าง (52.7 % ของตัวอย่างที่ได้จากแมวทั้งหมด) (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 : แสดงจำนวนตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง

จำนวนตัวอย่าง (%) ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง		
สุนัข	**แมว**	**รวม**
117/195 (60.0%)	29/55 (52.7%)	146/250 (58.4%)

1.2 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk test

จากตัวอย่างเชื้อ *E. coli* 146 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs พบว่า 85 ตัวอย่าง (58.22 % คิดเป็น 34.0 % ของตัวอย่างทั้งหมด 250 ตัวอย่าง) ให้ผลบวกต่อการทดสอบยืนยันด้วยวิธี combination disk test โดยเป็นตัวอย่างที่ได้จากสุนัข 69 ตัวอย่าง (คิดเป็น 35.38 % ของตัวอย่างที่ได้จากสุนัขทั้งหมด) และแมว 16 ตัวอย่าง (คิดเป็น 29.09 % ของตัวอย่างที่ได้จากแมวทั้งหมด)

ผลการทดลองที่ 2 : การตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ และการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance; MDR)

2.1 การตรวจยืนยัน (confirmatory test) ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ

จากตัวอย่างเชื้อ *E. coli* 250 ตัวอย่าง พบว่า 82 ตัวอย่าง (32.80 % ของตัวอย่างทั้งหมด) ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs โดยเป็นตัวอย่างที่ได้จากสุนัข 65 ตัวอย่าง (คิดเป็น 33.33 % ของตัวอย่างที่ได้จากสุนัข) และแมว 17 ตัวอย่าง (คิดเป็น 30.91 % ของตัวอย่างได้จากแมว) โดยพบว่าผลบวกต่อการสร้าง ESBLs จากการตรวจยืนยันด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติและด้วยวิธี combination disk test ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$; chi-square)

ตารางที่ 4-2 : แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการตรวจยืนยันด้วยวิธี combination disk test และเครื่องตรวจอัตโนมัติ

วิธี combination disk test			เครื่องตรวจอัตโนมัติ		
สุนัข	**แมว**	**รวม**	**สุนัข**	**แมว**	**รวม**
69/195 (35.38%)	16/55 (29.09%)	85/250 (34.0%)	65/195 (33.33%)	17/55 (30.91%)	82/250 (32.80%)

2.2 การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน (Multidrug resistance)

2.2.1 การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli*

ผลการดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการสร้าง ESBLs แสดงในตารางที่ 4-3 และ 4-4 และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-latams, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, potentiated sulfonamides และ phenicols มากกว่าเชื้อที่ให้ผลลบต่อการสร้าง ESBLs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; chi-square) (แผนภูมิที่ 4.1)

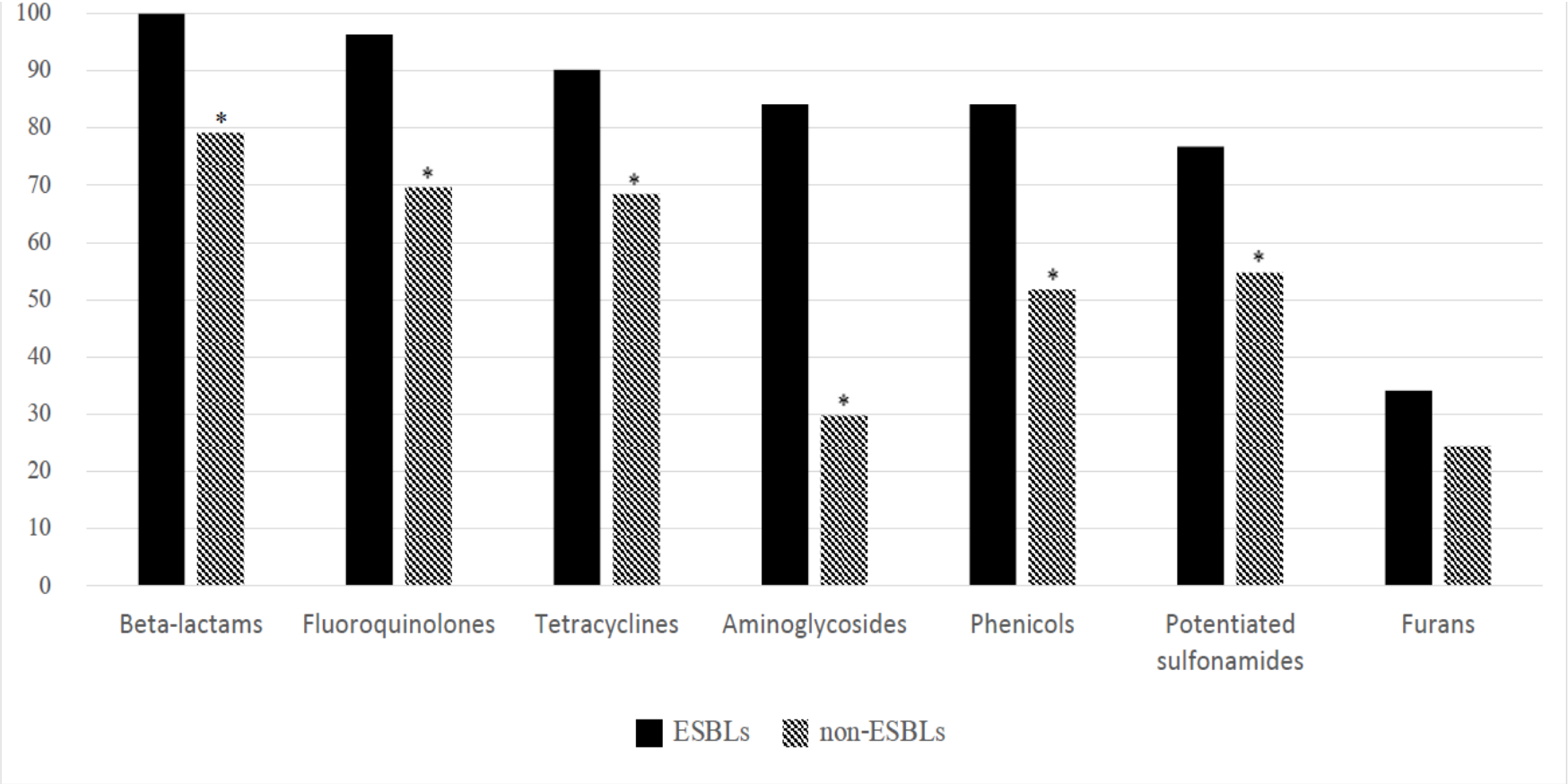
ตารางที่ 4-3 : แสดงผลการดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs

กลุ่มยาต้านแบคทีเรีย	จำนวนตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่**สามารถสร้าง**เอนไซม์ ESBLs		
	สุนัข	แมว	รวม
Beta-lactams	65/65 (100%)	17/17 (100%)	82/82 (100%)
Fluoroquinolones	63/65 (96.92%)	16/17 (94.12%)	79/82 (96.34%)
Tetracyclines	59/65 (90.77%)	15/17 (88.24%)	74/82 (90.24%)
Aminoglycosides	52/65 (80%)	17/17 (100%)	69/82 (84.15%)
Phenicols	54/65 (83.08%)	15/17 (88.24%)	69/82 (84.15%)
Potentiated sulfonamides	48/65 (73.85%)	16/17 (94.12%)	64/82 (78.05%)
Furans	26/65 (40%)	2/17 (11.76%)	28/82 (34.15%)

ตารางที่ 4-4 : แสดงผลการดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ไม่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ ESBLs

กลุ่มยาต้านแบคทีเรีย	จำนวนตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่**ไม่สามารถสร้าง**เอนไซม์ ESBLs		
	สุนัข	แมว	รวม
Beta-lactams	104/130 (80%)	29/38 (76.32%)	133/168 (79.17%)
Fluoroquinolones	94/130 (72.31%)	23/38 (60.53%)	117/168 (69.64%)
Tetracyclines	92/130 (70.77%)	23/38 (60.53%)	115/168 (68.45%)
Aminoglycosides	39/130 (30%)	11/38 (28.95%)	50/168 (29.76%)
Phenicols	71/130 (54.62%)	16/38 (42.11%)	87/168 (51.76%)
Potentiated sulfonamides	70/130 (53.85%)	22/38 (57.89%)	92/168 (54.76%)
Furans	29/130 (22.31%)	12/38 (31.58%)	41/168 (24.24%)

ภาพที่ 4-1 : เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การดื้อต่อยาต้านเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs (ESBLs) เทียบกับตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลลบต่อการสร้าง ESBLs (non-ESBLs)



* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการดื้อต่อยาในแต่ละกลุ่มระหว่าง ESBLs และ non-ESBLs

2.2.2 การเกิด MDR ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli*

จากตัวอย่างเชื้อ *E. coli* 250 ตัวอย่าง พบการเกิด MDR 206 ตัวอย่าง (82.40 %) มาจากตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs 82 ตัวอย่าง (100 % ของตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs) และตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลลบต่อการสร้าง ESBLs 124 ตัวอย่าง (73.81 % ของตัวอย่างทั้งหมดที่ให้ผลลบต่อการสร้าง ESBLs) โดยพบว่าตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs ทั้งในสุนัขและแมว จะพบการเกิด MDR อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$; chi-square) (ตารางที่ 4-5)

ตารางที่ 4-5 : แสดงการเกิด multidrug resistant (MDR) ในตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกและผลลบต่อการสร้าง ESBLs

ตัวอย่าง	Multidrug resistant (MDR)		
	ESBLs	non-ESBLS	*p*-value
สุนัข	65/65 (100 %)[a]	99/130 (76.15 %)[a]	< 0.05
แมว	17/17 (100 %)[b]	25/38 (65.79 %)[b]	< 0.05

a, b = แสดงเปอร์เซ็นต์ที่คิดมาจากตัวอย่างที่ได้จากสุนัขและ แมว ตามลำดับ

ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs 82 ตัวอย่าง มี 3.7 % ดื้อต่อยาต้านแบคทีเรีย 3 กลุ่ม, 14.6 % ดื้อต่อยา 4 กลุ่ม, 17.1 % ดื้อต่อยา 5 กลุ่ม, 39.0 % ดื้อต่อยา 6 กลุ่ม, 25.6 % ดื้อต่อยา 7 กลุ่ม (ตารางที่ 4-6) และพบว่าการเกิด MDR ในการศึกษาครั้งนี้ มักมีการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรีย 6 กลุ่ม และ 7 กลุ่ม โดยกลุ่มยาหลักที่เกิดการดื้อยาร่วมกันในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ beta-lactams, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, potentiated sulfonamides, phenicols เป็น (ตารางที่ 4-7)

ตารางที่ 4-6 : แสดงจำนวนตัวอย่างและเปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่พบ MDR แยกตามจำนวนกลุ่มยาที่เกิดการดื้อยาในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์ ESBLs

จำนวนกลุ่มยา MDR	**ตัวอย่างที่พบ MDR**	
	จำนวนตัวอย่างที่พบ	**เปอร์เซ็นต์**
3	3/82	3.7 %
4	12/82	14.6 %
5	14/82	17.1 %
6	32/82	39.0 %
7	21/82	25.6 %

ตารางที่ 4-7 : กลุ่มยาที่เกิดการดื้อยาพร้อมกันในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อการสร้าง ESBLs

จำนวนกลุ่มยาที่เกิด MDR	กลุ่มยาที่เกิด MDR	จำนวนตัวอย่างที่พบ
7 กลุ่มยา	B + Q + T + A + C + S + F	21
6 กลุ่มยา	B + Q + T + A + C + S	29
	B + Q + T + A + S + F	3
5 กลุ่มยา	B + Q + T + A + S	5
	B + Q + T + A + C	3
	B + T + A + C + S	3
	B + Q + A + C + S	2
	B + Q + T + A + F	1
4 กลุ่มยา	B + Q + T + C	5
	B + Q + T + S	2
	B + Q + T + F	2
	B + Q + T + A	1
	B + Q + A + C	1
	B + T + A + S	1
3 กลุ่มยา	B + Q + S	1
	B + Q + C	1
	B + C + F	1

B = beta-lactams, Q = Fluoroquinolones, T = Tetracyclines, A = Aminoglycosides,

C = Phenicols, S = Potentiated Sulfonamides, F = Furans

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย

การตรวจคัดกรองตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs

การตรวจคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี disk diffusion test นั้น นอกเหนือจากชนิดแผ่นยาต้านแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบและขนาด inhibition zones แล้ว CLSI แนะนำว่าควรทำการทดสอบกับแผ่นยามากกกว่า 1 ชนิด เพื่อเพิ่มความไว (sensitivity) ในการตรวจคัดกรองมากขึ้น (CLSI 2008) เนื่องจากเอนไซม์ ESBLs แต่ละชนิดมีความสามารถในการดื้อต่อยา third generation cephalosporins ได้แตกต่างกัน เช่น CTX-M มีความสามารถในการดื้อต่อ cefotaxime มากกว่า ceftazidime หรือ TEM และ SHV มีความสามารถในการดื้อต่อ ceftazidime มากกว่า cefotaxime เป็นต้น (Jarlier, Nicolas et al. 1988, Steward, Rasheed et al. 2001) การตรวจคัดกรองจึงเป็นเพียงการตรวจเพื่อดูแนวโน้มว่าเชื้อแบคทีเรียน่าจะมีการสร้าง ESBLs มาทำลายยาต้านแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบหรือไม่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงคัดตรวจกรองโดยใช้แผ่นยาทั้ง 4 ชนิดที่ CLSI แนะนำ เพื่อให้ได้ความไวในการตรวจคัดกรองมากที่สุด อย่างไรก็ตาม การตรวจคัดกรองนี้มีข้อจำกัดในการตรวจ เนื่องจากเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิดอื่น อาจให้ผลบวกต่อการทดสอบได้เช่นเดียวกับ ESBLs ทำให้ความจำเพาะในการตรวจคัดกรองต่อ ESBLs จึงค่อนข้างต่ำ (Shahid, Malik et al. 2004) ดังผลที่ได้จากการนำเชื้อที่ผ่านการคัดกรองว่าสามารถสร้าง ESBLs ทั้ง 58.4 % ไปตรวจยืนยัน พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์ ESBLs เพียง 58.22 % ของตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจคัดกรอง ดังนั้นในการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของ ESBLs จึงจำเป็นต้องนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองไปตรวจยืนยันเพื่อให้ได้ผลการตรวจที่ถูกต้องที่สุด (CLSI 2008)

การตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs

จากการตรวจยืนยันตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ด้วยวิธี combination disk test และด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2 พบอุบัติการณ์การค้นพบตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ ESBLs จากสุนัขและแมวป่วยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบอยู่ระหว่าง 32.8-34 % และอุบัติการณ์นี้ไม่มีความแตกต่างกันในสุนัขและแมว คือ 33.33 % ในสุนัขและ 30.91 % ในแมว อุบัติการณ์ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้สูงกว่าที่เคยมีรายงานมาในสุนัขป่วยซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 1.4 – 24.7 % และในแมวป่วยอยู่ในช่วง 2.7 – 22.0 % (Feria, Ferreira et al. 2002, Carattoli, Lovari et al. 2005, Sidjabat, Hanson et al. 2007, Pomba, da Fonseca et al. 2009, Smet, Martel et al. 2010, Ewers, Grobbel et al. 2011,

Ho, Chow et al. 2011, Rubin and Pitout 2014) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จัดเป็น referral animal hospital ดังนั้นตัวอย่างเชื้อที่เก็บจากสุนัขและแมวที่เข้ามารับการรักษา ในการศึกษาครั้งนี้ อาจสัมผัสกับยาต้านแบคทีเรียมาก่อนหน้านี้หลายครั้ง หรือการเลือกใช้และลักษณะการใช้ยาต้านแบคทีเรียของสัตวแพทย์ในประเทศไทยที่มากเกินความจำเป็น ทำให้มีโอกาสเกิดการคัดเลือกและกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียพัฒนาการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มเบตาแลคแทมหรือกลุ่มอื่นๆ หรือมีความเป็นไปได้ที่อุบัติการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ในประเทศไทย อาจมีสูงอยู่แล้วแต่ยังไม่มีข้อมูลทางระบาดวิทยามาก่อน

ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าผลการตรวจยืนยันด้วยวิธี combination disk test และการตรวจด้วยเครื่องอัตโนมัติไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในการตรวจยืนยันการสร้าง ESBLs ในแบคทีเรียนั้นวิธี combination disk test มีข้อจำกัด คือสามารถตรวจได้เฉพาะในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Escherichia coli* และ *Proteus mirabilis* เท่านั้น ส่วนการตรวจยืนยันเชื้อ *Enterobacteriaceae* ชนิดอื่นๆ ด้วยวิธีนี้ ทาง CLSI ยังไม่ได้กำหนดค่ามาตรฐานของการแปรผล เนื่องจากเชื้อในแฟมิลี่ *Enterobacteriaceae* ที่มีการแสดงออกในการสร้างเอนไซม์เบตาแลคทาเมสชนิด AmpC ปริมาณสูง เช่น *Enterobacter spp., Serratia spp., Citrobacter freundii* สามารถดื้อต่อ clavulanic acid ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลลบลวง (false negative) ได้ ถ้ามีการแสดงออกของเอนไซม์ ESBLs และ AmpC ร่วมกัน แต่ข้อจำกัดนี้สามารถแก้ไขได้โดยการใช้ tazobactam หรือ sulbactam ในการทดสอบแทน clavulanic acid หรือทดสอบเชื้อกับแผ่นยา cefepime เทียบกับ cefepime/clavulanic acid (Thomson, Sanders et al. 1999, Tzelepi, Giakkoupi et al. 2000, Thomson 2001, Sturenburg, Sobottka et al. 2004) ส่วนเครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2 นั้นจะประมวลผลการตรวจยืนยันการสร้าง ESBLs โดยเปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ ระหว่าง cefepime ต่อ cefepime/clavulanic acid, cefotaxime ต่อ cefotaxime/clavulanic acid และ ceftazidime ต่อ ceftazidime/clavulanic acid ทำให้ช่วยลดข้อจำกัดในการเกิดผลลบลวงดังกล่าวได้ นอกจากนี้การตรวจยืนยันด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติยังลดข้อผิดพลาดในการทดสอบอันเกิดจากตัวบุคคล เช่น ความหนาและความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการแพร่ของยาจากแผ่นยา ซึ่งจะมีผลต่อขนาดของ inhibition zones, การวางแผ่นยาในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม, ความไม่เที่ยงตรงในการวัดขนาด inhibition zones, ปริมาณเชื้อที่ spread ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เท่ากัน ซึ่งสิ่งเหล่านี้อาจมีผลต่อการแปรผล (Bradford 2001, Tenover, Raney et al. 2003, Pfaller and Segreti 2006) นอกเหนือจากการตรวจการสร้าง ESBLs ในเชื้อตัวอย่าง เครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2 ยังสามารถตรวจความไวรับของเชื้อต่อยาต้านแบคทีเรียได้หลายชนิด/กลุ่มในเวลาเดียวกัน ทำให้มีความสะดวกและลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานทางห้องปฏิบัติการ โดยใช้ระยะเวลาในการประมวลผลเพียง 6-13 ชั่วโมงอีกด้วย (Spanu, Sanguinetti et al. 2006) อย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2 ด้วยการ์ด

AST-GN 38 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้นั้น สามารถตรวจได้เฉพาะในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการออกซิเจน (aerobic gram negative bacteria) ที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (ภายใน 16-24 ชั่วโมง) เท่านั้น (Pincus 2013)

การดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli*

จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า 100 % ของตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ที่ให้ผลบวกต่อ ESBLs จากการตรวจด้วยเครื่องตรวจอัตโนมัติ ดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่ม Beta-lactams ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีของ ESBLs อย่างไรก็ตาม 52 ตัวอย่าง (63.41 %) จากแบคทีเรียกลุ่มนี้ดื้อต่อ amoxicillin/clavulanic acid (ไม่ได้แสดงไว้ในผลการทดลอง) ซึ่งบ่งชี้ถึงความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการสร้างเอนไซม์ beta-lactamases อื่นร่วมด้วย ซึ่งเอนไซม์นี้ไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitors เช่น plasmid-mediated AmpC beta-lactamase (Philippon, Arlet et al. 2002) หรือ TEM-variant type beta-lactamase เช่น TEM-50, TEM-158 ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมือนกับเอนไซม์ ESBLs แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย beta-lactamase inhibitor (Bush and Jacoby 2010) ดังนั้นควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของเอนไซม์ beta-lactamases ที่ถูกสร้างร่วมกับ ESBLs ในเชื้อ *E. coli* เหล่านี้

นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์ ESBLs ดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มอื่นในสัดส่วนที่สูง โดย 96.34 % ดื้อต่อยากลุ่ม fluoroquinolones, 90.24 % ดื้อต่อยากลุ่ม tetracycline , 84.15 % ดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides และ/หรือ phenicols และ 78.05 % ดื้อต่อยา potentiated sulonamides ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานก่อนหน้านี้ ที่พบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs มักมีการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ข้างต้น (Sirot, Chanal et al. 1988, Lautenbach, Patel et al. 2001, Lagace-Wiens, Nichol et al. 2007, Pitout 2010) แต่ผลการดื้อยาในกลุ่ม furans ของเชื้อกลุ่มนี้มีเพียง 34.15 % ซึ่งไม่แตกต่างจากการดื้อยาของเชื้อที่ให้ผลลบต่อการสร้าง ESBLs ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากยาในกลุ่ม furans ไม่ค่อยได้รับความนิยมในการใช้รักษาสุนัขและแมว ทำให้พบการดื้อยาน้อยกว่ายากลุ่มอื่น

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Ho และคณะในประเทศฮ่องกง ในปี ค.ศ.2011 ซึ่งทำการศึกษาอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. coli* ที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs ร่วมกับการตรวจความไวรับต่อยาต้านแบคทีเรีย 7 กลุ่ม เพื่อหาการเกิด MDR ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* 415 ตัวอย่าง (สุนัข 202 ตัวอย่าง, แมว 213 ตัวอย่าง) พบว่า 50 ตัวอย่าง (24.7 % ของตัวอย่างเชื้อที่ได้จากสุนัข) และ 47 ตัวอย่าง (22.0 % ของตัวอย่างเชื้อที่ได้จากแมว) มีความสามารถในการสร้าง ESBLs และ 100 % ของเชื้อที่ให้ผลบวกต่อ ESBLs นี้ ดื้อต่อยาในกลุ่ม Beta-lactams เช่นเดียวกับที่ผลที่ได้จากการศึกษานี้ นอกจากนี้ยังพบการดื้อต่อยาแยกตามกลุ่ม (% ดื้อยาในสุนัข, แมว) ดังนี้ fluoroquinolones (53.8 %, 32.7 %), tetracycline (50.8 %, 41.8 %), aminoglycosides (27.7 %, 16.4 %), phenicols (36.9 %, 16.4 %), potentiated sulfonamides (52.3 %,27.3 %) และ furans (3.1 %, 1.8 %)

(Ho, Chow et al. 2011) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ถึงแม้จะมีสัดส่วนการดื้อยาต่ำกว่าก็ตาม นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของเชื้อที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม furans ต่ำกว่ายากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกับที่ได้จากผลจากการศึกษาในครั้งนี้

ความสัมพันธ์ระหว่าง ESBLs และการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน

จากการศึกษาครั้งนี้ พบการเกิด MDR ใน 100 % ของตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการสร้างเอนไซม์ ESBLs ซึ่งมากกว่าที่ Ho และคณะรายงานไว้ในปี ค.ศ. 2011 ซึ่งรายงานการเกิด MDR ในตัวอย่างเชื้อที่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs เท่ากับ 44.6 % และ 18.2 % ในสุนัขและแมว และเชื้อที่ไม่มีความสามารถในการสร้าง ESBLs เกิด MDR เท่ากับ 1.5 % และ 2.4 % ในสุนัขและแมว ตามลำดับ (Ho, Chow et al. 2011) แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่สร้าง ESBLs ทำให้เกิด MDR อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีจำนวนและชนิดของกลุ่มยาต้านแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาเหมือนกับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ การดื้อยาที่เกิดขึ้นจากการศึกษาของ Ho และคณะนั้น เป็นการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียเกือบทุกชนิดที่ทดสอบ โดยเชื้อมีความไวต่อยาไม่เกิน 2 กลุ่มยา เรียกลักษณะการดื้อยาแบบนี้ว่า extremely drug resistant (XDR) (Canton and Ruiz-Garbajosa 2011) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาของ Ho และคณะสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ที่ส่วนใหญ่ (64.6 %) ของเชื้อที่ศึกษามีการดื้อยาต้านแบคทีเรียมากกว่า 5 กลุ่มขึ้นไปจากยาทั้งหมด 7 กลุ่ม

สิ่งที่น่าสังเกตจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าลักษณะการดื้อยาในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs มีรูปแบบเป็น XDR ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 รูปแบบ คือ ดื้อต่อยาต้านแบคทีเรีย 7 กลุ่มยา (25.6 %) และ 6 กลุ่มยา (39 %) โดยกลุ่มยาหลักที่เกิดการดื้อยาร่วมกันที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ beta-lactams, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, potentiated sulfonamides และ phenicols ซึ่งพบมากถึง 60.98 % จากจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ให้ผลบวกต่อ ESBLS รูปแบบการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกันนี้ อาจเกิดจาก (1) การถ่ายทอดยีนที่ดื้อต่อยากลุ่มต่างๆ ผ่านทางพลาสมิด (MDR plasmids) เช่นเดียวกับเอนไซม์ ESBLs (Schwarz and Chaslus-Dancla 2001, Carattoli 2013) กลุ่มยาทั้ง 6 กลุ่มที่เชื้อเกิดการดื้อพร้อมกันนี้ สามารถถ่ายทอดยีนในการดื้อยาผ่านทางพลาสมิดได้ เช่น ยีน *qnr* ซึ่งทำให้เกิดการดื้อต่อยาในกลุ่ม fluoroquionolones, ยีน *tetA* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม tetracyclines, ยีน *aac(6')-Ib* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม aminoglycosides, ยีน *catA* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม phenicols, หรือยีน *dhfr* และ *dhfs* ที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่ม potentiated sulfonamides (Boyd, Tyler et al. 2004, Martinez-Martinez, Eliecer Cano et al. 2008, Sandegren, Linkevicius et al. 2012) (2) การเพิ่มการกำจัดออกของยาผ่านทาง multidrug efflux pumps ก่อนที่ยาจะออกฤทธิ์ โดยการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการสร้าง efflux pumps ในเชื้อ *E. coli* เช่น AcrAB-TolC transporter ซึ่งเป็น MDR efflux pump สามารถขับยาต้านแบคทีเรียออกจากเซลล์แบบไม่จำเพาะ จึงทำให้เกิดการดื้อต่อยาต้านแบคทีเรียหลายกลุ่มพร้อมกัน

(Li and Nikaido 2009), PMQR efflux pump ที่แสดงออกโดยยีน *qepA* บนพลาสมิดของเชื้อ *E. coli* ที่มักทำให้เกิดการดื้อยาในระดับสูง (high level resistant) ต่อยากลุ่ม Fluoroquinolones Aminoglycosides, , Tetracyclines (Liu, Deng et al. 2008)

อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงกลไกในการเกิด MDR ในเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้าง ESBLs เปรียบเทียบกับกลไกการเกิด MDR ในเชื้อ *E. coli* ที่ไม่สามารถสร้าง ESBLs ว่ามีความเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กันอย่างไร เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันการเกิดการดื้อยาหลายกลุ่มพร้อมกัน และการแพร่กระจายของยีนดังกล่าวต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สรุปผลการวิจัย

1. อุบัติการณ์การค้นพบเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs จากสุนัขและแมวป่วย ณ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เท่ากับ 82 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 250 ตัวอย่าง หรือคิดเป็น 32.80 %
2. ตัวอย่างเชื้อ *Escherichia coli* ที่ให้ผลบวกการสร้างเอนไซม์ ESBLs มีการดื้อต่อยาในกลุ่ม beta-latams, fluoroquinolones, tetracyclines, aminoglycosides, potentiated sulfonamides และ phenicols มากกว่าเชื้อที่ให้ผลลบการสร้าง ESBLs อย่างมีนัยสำคัญ
3. ตัวอย่างเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBLs ทั้ง 82 ตัวอย่างมีความสัมพันธ์กับการเกิด MDR อย่างมีนัยสำคัญ และมักมีการดื้อยาต้านแบคทีเรีย 6-7 กลุ่มยาพร้อมกัน

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ทดสอบหาเอนไซม์ beta-lactamase ชนิดอื่นที่อาจแสดงออกร่วมกับเอนไซม์ ESBLs ทั้งการตรวจทาง phenotypic และ/หรือ genotypic identification เพื่อลดโอกาสการเกิดผลลบลวงหรือผลบวกลวง
2. ตรวจหายีน bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M} และ bla_{OXA} ด้วยวิธี PCR เพื่อจำแนกชนิดและรายงานเปอร์เซ็นต์ของชนิดเอนไซม์ ESBLs ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ และใช้เป็นเครื่องมือเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจยืนยันด้วยวิธี combination disk test กับเครื่องตรวจอัตโนมัติ VITEK® 2
3. ทำ DNA sequencing เพื่อระบุชนิดของเอนไซม์ TEM, SHV, CTX-M และ OXA-type
4. ตรวจหายีนดื้อยากลุ่มอื่นๆ ที่ไม่ใช่ยากลุ่ม beta-lactams บนพลาสมิดของเชื้อที่ทำการศึกษา เพื่อยืนยันสมมติฐานที่ได้อภิปรายไว้ข้างต้น และหากลไกการเกิดการดื้อยาร่วมกัน

รายการอ้างอิง

Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 289(1036): 321-331.

Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemauve, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. Grimont and J. M. Collard (2006). "Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing Salmonella enterica serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003)." J Clin Microbiol 44(8): 2897-2903.

Bonnedahl, J., M. Drobni, M. Gauthier-Clerc, J. Hernandez, S. Granholm, Y. Kayser, A. Melhus, G. Kahlmeter, J. Waldenstrom, A. Johansson and B. Olsen (2009). "Dissemination of Escherichia coli with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France." PLoS One 4(6): e5958.

Bonnet, R. (2004). "Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes." Antimicrob Agents Chemother 48(1): 1-14.

Boothe, D. M. (2012). Antimicrobial drugs. Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics. D. M. Boothe. St Louis, Elsevier Saunders: 189-269.

Boyd, D. A., S. Tyler, S. Christianson, A. McGeer, M. P. Muller, B. M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann and M. R. Mulvey (2004). "Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada." Antimicrob Agents Chemother 48(10): 3758-3764.

Bradford, P. A. (2001). "Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat." Clin Microbiol Rev 14(4): 933-951, table of contents.

Bush, K. and G. A. Jacoby (2010). "Updated functional classification of beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother 54(3): 969-976.

Bush, K., G. A. Jacoby and A. A. Medeiros (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." Antimicrob Agents Chemother 39(6): 1211-1233.

Canton, R. and P. Ruiz-Garbajosa (2011). "Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes." Curr Opin Pharmacol 11(5): 477-485.

Carattoli, A. (2008). "Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers." Clin Microbiol Infect 14 Suppl 1: 117-123.

Carattoli, A. (2013). "Plasmids and the spread of resistance." Int J Med Microbiol 303(6-7): 298-304.

Carattoli, A., S. Lovari, A. Franco, G. Cordaro, P. Di Matteo and A. Battisti (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003." Antimicrob Agents Chemother 49(2): 833-835.

CLSI (2008). Performance standards for antimicrobial disks and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standards-third edition: M31-A3. Pennsylvania, Wayne. 28: 102.

Costa, D., P. Poeta, L. Brinas, Y. Saenz, J. Rodrigues and C. Torres (2004). "Detection of CTX-M-1 and TEM-52 beta-lactamases in Escherichia coli strains from healthy pets in Portugal." J Antimicrob Chemother 54(5): 960-961.

Costa, D., P. Poeta, Y. Saenz, A. C. Coelho, M. Matos, L. Vinue, J. Rodrigues and C. Torres (2008). "Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal Escherichia coli isolates recovered from healthy pets." Vet Microbiol 127(1-2): 97-105.

DANMAP (2005). DANMAP 2005. consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Copenhagen, Denmark.

Dierikx, C. M., E. van Duijkeren, A. H. Schoormans, A. van Essen-Zandbergen, K. Veldman, A. Kant, X. W. Huijsdens, K. van der Zwaluw, J. A. Wagenaar and D. J. Mevius (2012). "Occurrence and characteristics of extended-spectrum-beta-lactamase- and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses." J Antimicrob Chemother 67(6): 1368-1374.

Drawz, S. M. and R. A. Bonomo (2010). "Three decades of beta-lactamase inhibitors." Clin Microbiol Rev 23(1): 160-201.

EARS-Net. (2009). "Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009: Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network." from http://www.ecdc.europa.eu/en/.

Ewers, C., M. Grobbel, A. Bethe, L. H. Wieler and S. Guenther (2011). "Extended-spectrum beta-lactamases-producing gram-negative bacteria in companion animals: action is clearly warranted!" Berl Munch Tierarztl Wochenschr 124(3-4): 94-101.

Ewers, C., M. Grobbel, I. Stamm, P. A. Kopp, I. Diehl, T. Semmler, A. Fruth, J. Beutlich, B. Guerra, L. H. Wieler and S. Guenther (2010). "Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-beta-lactamase-producing

Escherichia coli among companion animals." J Antimicrob Chemother 65(4): 651-660.

Feria, C., E. Ferreira, J. D. Correia, J. Goncalves and M. Canica (2002). "Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic Escherichia coli isolated from dogs in Portugal." J Antimicrob Chemother 49(1): 77-85.

Fluit, A. C., M. R. Visser and F. J. Schmitz (2001). "Molecular detection of antimicrobial resistance." Clin Microbiol Rev 14(4): 836-871, table of contents.

Frye, J. G. and P. J. Fedorka-Cray (2007). "Prevalence, distribution and characterisation of ceftiofur resistance in Salmonella enterica isolated from animals in the USA from 1999 to 2003." Int J Antimicrob Agents 30(2): 134-142.

Gold, H. S. and R. C. Moellering, Jr. (1996). "Antimicrobial-drug resistance." N Engl J Med 335(19): 1445-1453.

Guardabassi, L. and P. Courvalin (2006). Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. F. M. Aarestrup. Washington, D.C., ASM Press: 1-18.

Guardabassi, L., S. Schwarz and D. H. Lloyd (2004). "Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria." J Antimicrob Chemother 54(2): 321-332.

Hawkey, P. M. (2000). "Mechanisms of resistance to antibiotics." Intensive Care Med 26 Suppl 1: S9-13.

Ho, P. L., K. H. Chow, E. L. Lai, W. U. Lo, M. K. Yeung, J. Chan, P. Y. Chan and K. Y. Yuen (2011). "Extensive dissemination of CTX-M-producing Escherichia coli with multidrug resistance to 'critically important' antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10." J Antimicrob Chemother 66(4): 765-768.

Hunter, P. A., S. Dawson, G. L. French, H. Goossens, P. M. Hawkey, E. J. Kuijper, D. Nathwani, D. J. Taylor, C. J. Teale, R. E. Warren, M. H. Wilcox, N. Woodford, M. W. Wulf and L. J. Piddock (2010). "Antimicrobial-resistant pathogens in animals and man: prescribing, practices and policies." J Antimicrob Chemother 65 Suppl 1: i3-17.

Jacoby, G. A. and A. A. Medeiros (1991). "More extended-spectrum beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother 35(9): 1697-1704.

Jarlier, V., M. H. Nicolas, G. Fournier and A. Philippon (1988). "Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns." Rev Infect Dis 10(4): 867-878.

Kong, K. F., L. Schneper and K. Mathee (2010). "Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology." APMIS 118(1): 1-36.

Lagace-Wiens, P. R., K. A. Nichol, L. E. Nicolle, M. R. Decorby, M. McCracken, M. J. Alfa, M. R. Mulvey and G. G. Zhanel (2007). "ESBL genotypes in fluoroquinolone-resistant and fluoroquinolone-susceptible ESBL-producing Escherichia coli urinary isolates in Manitoba." Can J Infect Dis Med Microbiol 18(2): 133-137.

Lautenbach, E., J. B. Patel, W. B. Bilker, P. H. Edelstein and N. O. Fishman (2001). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes." Clin Infect Dis 32(8): 1162-1171.

Leverstein-van Hall, M. A., A. C. Fluit, A. Paauw, A. T. Box, S. Brisse and J. Verhoef (2002). "Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant Escherichia coli and Klebsiella spp." J Clin Microbiol 40(10): 3703-3711.

Li, X. Z., M. Mehrotra, S. Ghimire and L. Adewoye (2007). "beta-Lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin." Vet Microbiol 121(3-4): 197-214.

Li, X. Z. and H. Nikaido (2009). "Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update." Drugs 69(12): 1555-1623.

Liu, J. H., Y. T. Deng, Z. L. Zeng, J. H. Gao, L. Chen, Y. Arakawa and Z. L. Chen (2008). "Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing Escherichia coli isolates from pigs." Antimicrob Agents Chemother 52(8): 2992-2993.

Livermore, D. M. (1995). "beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance." Clin Microbiol Rev 8(4): 557-584.

Ma, J., Z. Zeng, Z. Chen, X. Xu, X. Wang, Y. Deng, D. Lu, L. Huang, Y. Zhang, J. Liu and M. Wang (2009). "High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals." Antimicrob Agents Chemother 53(2): 519-524.

Martinez-Martinez, L., M. Eliecer Cano, J. Manuel Rodriguez-Martinez, J. Calvo and A. Pascual (2008). "Plasmid-mediated quinolone resistance." Expert Rev Anti Infect Ther 6(5): 685-711.

Mascaretti, O. A. (2003). Antibiotics and synthetic antibacterial agents. Bacteria versus antibacterial agents: An integrated approach. O. A. Mascaretti. Washington, D.C, ASM Press: 97-106.

Matsumoto, Y., F. Ikeda, T. Kamimura, Y. Yokota and Y. Mine (1988). "Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins." Antimicrob Agents Chemother 32(8): 1243-1246.

O'Keefe, A., T. A. Hutton, D. M. Schifferli and S. C. Rankin (2010). "First detection of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli urinary tract isolates from dogs and cats in the United States." Antimicrob Agents Chemother 54(8): 3489-3492.

Perez, F., A. Endimiani, K. M. Hujer and R. A. Bonomo (2007). "The continuing challenge of ESBLs." Curr Opin Pharmacol 7(5): 459-469.

Petri, W. A. J. (2011). Penicillins, cephalosporins, and other β-lactam antibiotics. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. L. L. Brunton, Chabner, B.A. , Knollman, B.C. New York, McGraw-Hill: 1477-1504.

Pfaller, M. A. and J. Segreti (2006). "Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases." Clin Infect Dis 42 Suppl 4: S153-163.

Philippon, A., G. Arlet and G. A. Jacoby (2002). "Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother 46(1): 1-11.

Pincus, D. H. (2013). Microbial identification using the bioMérieux VITEK®2 system – an update. Encyclopedia of rapid microbiology method. M. J. Miller. Illinois, Davis Healthcare International Publishing: 85-121.

Pitout, J. D. (2010). "Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: changing epidemiology and drug treatment choices." Drugs 70(3): 313-333.

Poeta, P., H. Radhouani, G. Igrejas, A. Goncalves, C. Carvalho, J. Rodrigues, L. Vinue, S. Somalo and C. Torres (2008). "Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal Escherichia coli harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases." Appl Environ Microbiol 74(23): 7439-7441.

Pomba, C., J. D. da Fonseca, B. C. Baptista, J. D. Correia and L. Martinez-Martinez (2009). "Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent Escherichia coli CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog." Antimicrob Agents Chemother 53(1): 327-328.

Rubin, J. E. and J. D. Pitout (2014). "Extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals." Vet Microbiol 170(1-2): 10-18.

Sandegren, L., M. Linkevicius, B. Lytsy, A. Melhus and D. I. Andersson (2012). "Transfer of an Escherichia coli ST131 multiresistance cassette has created a Klebsiella pneumoniae-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak." J Antimicrob Chemother 67(1): 74-83.

Schwarz, S. and E. Chaslus-Dancla (2001). "Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance." Vet Res 32(3-4): 201-225.

Shahid, M., A. Malik, M. Agrawal and S. Singhal (2004). "Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test." J Antimicrob Chemother 54(3): 684-687.

Sidjabat, H. E., N. D. Hanson, E. Smith-Moland, J. M. Bell, J. S. Gibson, L. J. Filippich and D. J. Trott (2007). "Identification of plasmid-mediated extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in Enterobacter spp. isolated from dogs." J Med Microbiol 56(Pt 3): 426-434.

Simoes, R. R., L. Poirel, P. M. Da Costa and P. Nordmann (2010). "Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant Escherichia coli." Emerg Infect Dis 16(1): 110-112.

Sirot, J., C. Chanal, A. Petit, D. Sirot, R. Labia and G. Gerbaud (1988). "Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated beta-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: epidemiologic studies." Rev Infect Dis 10(4): 850-859.

Smet, A., A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, L. Herman, F. Haesebrouck and P. Butaye (2010). "Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health." FEMS Microbiol Rev 34(3): 295-316.

Sorlozano, A., J. Gutierrez, G. Piedrola and M. J. Soto (2005). "Acceptable performance of VITEK 2 system to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Escherichia coli: a comparative study of phenotypic commercial methods and NCCLS guidelines." Diagn Microbiol Infect Dis 51(3): 191-193.

Spanu, T., M. Sanguinetti, M. Tumbarello, T. D'Inzeo, B. Fiori, B. Posteraro, R. Santangelo, R. Cauda and G. Fadda (2006). "Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates." J Clin Microbiol 44(9): 3257-3262.

Steen, S. I. and P. J. Webb (2007). "Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria isolated from companion animals." Vet Rec 161(20): 703.

Steward, C. D., J. K. Rasheed, S. K. Hubert, J. W. Biddle, P. M. Raney, G. J. Anderson, P. P. Williams, K. L. Brittain, A. Oliver, J. E. McGowan, Jr. and F. C. Tenover (2001). "Characterization of clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum beta-lactamase detection methods." J Clin Microbiol 39(8): 2864-2872.

Sturenburg, E., I. Sobottka, D. Noor, R. Laufs and D. Mack (2004). "Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection." J Antimicrob Chemother 54(1): 134-138.

Sun, Y., Z. Zeng, S. Chen, J. Ma, L. He, Y. Liu, Y. Deng, T. Lei, J. Zhao and J. H. Liu (2010). "High prevalence of bla(CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in Escherichia coli isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China." Clin Microbiol Infect 16(9): 1475-1481.

Szmolka, A. and B. Nagy (2013). "Multidrug resistant commensal Escherichia coli in animals and its impact for public health." Front Microbiol 4: 258.

Tamang, M. D., H. M. Nam, G. C. Jang, S. R. Kim, M. H. Chae, S. C. Jung, J. W. Byun, Y. H. Park and S. K. Lim (2012). "Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing Escherichia coli isolated from stray dogs in South Korea." Antimicrob Agents Chemother 56(5): 2705-2712.

Tenover, F. C., P. M. Raney, P. P. Williams, J. K. Rasheed, J. W. Biddle, A. Oliver, S. K. Fridkin, L. Jevitt, J. E. McGowan, Jr. and I. Project (2003). "Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase confirmation methods for Escherichia coli with isolates collected during Project ICARE." J Clin Microbiol 41(7): 3142-3146.

Teshager, T., L. Dominguez, M. A. Moreno, Y. Saenz, C. Torres and S. Cardenosa (2000). "Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing Escherichia coli strain from a dog with recurrent urinary tract infections." Antimicrob Agents Chemother 44(12): 3483-3484.

Thomson, K. S. (2001). "Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases." Emerg Infect Dis 7(2): 333-336.

Thomson, K. S., C. C. Sanders and E. S. Moland (1999). "Use of microdilution panels with and without beta-lactamase inhibitors as a phenotypic test for beta-lactamase production among Escherichia coli, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter freundii, and Serratia marcescens." Antimicrob Agents Chemother 43(6): 1393-1400.

Tzelepi, E., P. Giakkoupi, D. Sofianou, V. Loukova, A. Kemeroglou and A. Tsakris (2000). "Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacter cloacae and Enterobacter aerogenes." J Clin Microbiol 38(2): 542-546.

van Heijenoort, J. (2001). "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." Glycobiology 11(3): 25R-36R.

Walsh, C. (2003). Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. Washington, D.C., ASM Press.

Wiegand, I., H. K. Geiss, D. Mack, E. Sturenburg and H. Seifert (2007). "Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures." J Clin Microbiol 45(4): 1167-1174.

Wieler, L. H., C. Ewers, S. Guenther, B. Walther and A. Lubke-Becker (2011). "Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples." Int J Med Microbiol 301(8): 635-641.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายวิริทธิ์พล จันทร์วาววาม เกิดเมื่อวันอังคารที่ 7 เมษายน 2530 ที่จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมต้นและระดับมัธยมปลาย จากโรงเรียนเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระศรีนครินทร์ กาญจนบุรี อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในปี 2548 เข้าศึกษาที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 1) และในปีการศึกษา 2554-2556 ได้เข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต หลักสูตร สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University