การศึกษาความชุกของแบคทีเรียชนิดที่สร้างเอนไซม์ บีตา-แลคทาเมสที่มีฤทธิ์ขยาย จากแหล่งน้ำสิ่งแวดล้อม

(Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Environmental Water)

ปิยะรัตน์ จิตรภิรมย์*

*สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา 1061 ซอยอิสรภาพ 15 ถนนอิสรภาพ แขวงหิรัญรูจี เขตธนบุรี กรุงเทพฯ 10600

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่สร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสที่มีฤทธิ์ขยาย (ESBL) จากแหล่งน้ำสิ่งแวดล้อม โดยการเก็บตัวอย่างน้ำสิ่งแวดล้อมใน 3 แหล่ง คือ คลองรับน้ำเสียจากชุมชน แม่น้ำเจ้าพระยา และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล จำนวนแหล่งละ 7 ตัวอย่าง ตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี Double disc synergy test (DDST) จากการสุ่มเลือกแบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละแหล่ง แหล่งละ 70 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 210 ไอโซเลท พบว่าเป็น *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* และ *Enterobacter cloacae* จำนวน 168 (ร้อยละ 80.0), 18 (ร้อยละ 8.6), 5 (ร้อยละ 2.4) และ 19 (ร้อยละ 9.0) ไอโซเลท โดยตรวจพบการสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 32 (ร้อยละ 15.2), 1 (ร้อยละ 0.5), 0 และ 0 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็น Class A ESBL และ Class C ESBL จำนวน 26 (ร้อยละ 12.4) และ 7 (ร้อยละ 3.3) ไอโซเลทตามลำดับ ทั้งนี้ตรวจพบ *E. cloacae* ที่แยกได้จากน้ำในคลองรับน้ำเสียจากชุมชนมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL จำนวน 5 (ร้อยละ 2.4) ไอโซเลท การตรวจพบความชุกของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางสุขาภิบาล และปนเปื้อนได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในแหล่งน้ำ ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL แสดงว่ามีโอกาสพบเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ ที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้มากขึ้น จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการบริหารจัดการ ควบคุมการแพร่กระจาย และเฝ้าระวังแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว ตลอดจนเป็นเครื่องชี้วัดการใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่เหมาะสมจนเกิดการปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม

คำสำคัญ: เอนไซม์บีตา-แลคทาเมสที่มีฤทธิ์ขยาย/ แหล่งน้ำสิ่งแวดล้อม/ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม

Abstract

This study aimed to determine the prevalence of Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing coliform bacteria isolated from environmental water. Three major sources of environmental water were collected for culture and detection of ESBL producing coliform bacteria by Double disc synergy test (DDST), which consisted of 21 water samples: 7 samples of Community waste water from canal, 7 samples from the Chaopraya river (the major river in Bangkok, Thailand) and 7 samples from drain water in treatment plant of the hospital. Randomly selected 70 bacterial isolates in each source (total 210 isolates) showed *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* with the number of isolates of 168 (80.0%), 18 (8.6%), 5 (2.4%), and 19 (9.0%), respectively. The detection of ESBL producing bacteria was found in 32 (15.2%), 1(0.5%), 0 and 0 isolates, respectively, which was classified as Class A ESBL and Class C ESBL; 26 (12.4%) and 7 (3.3%) isolates, respectively. Furthermore, 5 (2.4%) isolates of *E. cloacae* (from the community waste water) produced both AmpC beta-lactamase and ESBL was found. The prevalence of coliform bacteria is used as indicators of the sanitary and general environmental contamination such as in water sources. Therefore, detection of ESBL producing coliform bacteria has a possibility to find other pathogens that can produce this enzyme. The results of this study can be used as the basis for managing and monitoring the spread of these bacteria. It is also indicators for inappropriate use of antimicrobial agents and occurrence of contaminants into the environment.

Keywords: Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)/ Environmental water/ Coliform bacteria

บทนำ

การปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลที่เพิ่มขึ้นในแหล่งน้ำนับว่าเป็นปัญหาหลักที่สำคัญของประเทศที่กำลังพัฒนา (American Society for Microbiology (ASM) Colloquium Report, 1999) ซึ่งก่อให้เกิดการระบาดของโรคที่มีน้ำเป็นสื่อ โดยเฉพาะโรคในระบบทางเดินอาหารและโรคฉวยโอกาสอื่น ๆ ในผู้ที่มีภูมิต้านทานลดต่ำลง (WHO, 1996; WHO, 2000) ในปัจจุบันได้มีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างกว้างขวาง ทั้งทางการแพทย์ สัตวแพทย์ การเกษตรกรรม ตลอดจนการปศุสัตว์ จนเกิดการปนเปื้อนของยาดังกล่าวลงสู่สิ่งแวดล้อม จนเป็นสาเหตุให้จุลชีพมีการปรับตัวจนก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อการรักษาในทางการแพทย์และสาธารณสุข ตลอดจนการสูญเสียทางเศรษฐกิจ (ASM Colloquium Report, 1999; Balagué and Garcia, 2001) นอกจากนี้มีรายงานข่าวการพบเชื้อแบคทีเรียในประเทศอินเดียที่ดื้อยาปฏิชีวนะในระดับที่ไม่สามารถใช้ยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการรักษาได้ ทั้งยังพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียนี้ได้นอกโรงพยาบาล เช่น พบในน้ำดื่ม ตลอดจน

ในระบบบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกต้องและขาดการควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะ (ประชาชาติธุรกิจ, 2555) เช่นเดียวกับหลาย ๆ ประเทศที่ประสบวิกฤตการณ์เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะที่กำลังทวีความรุนแรงและขยายผลไปทั่วโลก ปัญหาเรื่องเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะนี้ถือเป็นปัญหาเร่งด่วนที่สำคัญจนองค์การอนามัยโลกได้กำหนดเป็นคำขวัญในวันสุขภาพโลก ประจำปี 2554 ว่า “Antimicrobial Resistance : No Action Today, No Cure Tomorrow” เนื่องจากกำลังจะเข้าสู่ยุคที่ไม่มียาปฏิชีวนะหรือยาที่มีประสิทธิภาพพอในการรักษาโรค (สวธส., 2555)

การดื้อของเชื้อแบคทีเรียต่อยาในกลุ่มบีตาแลคแทม ซึ่งยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้จัดว่าเป็นยาที่แพทย์เลือกใช้เป็นอันดับแรกในการรักษาผู้ป่วย เนื่องจากยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และยังมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ยาสูง ในบรรดากลไกต่าง ๆ ที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียดื้อยาในกลุ่มบีตาแลคแทมได้นั้น พบว่าการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส เพื่อทำลายฤทธิ์ของยาเป็นกลไกหลักที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบดื้อยากลุ่มนี้ได้ ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมานี้มีการค้นพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดใหม่ๆ เพื่อทำลายยากลุ่มบีตา-แลค-แทมเพิ่มมากขึ้น เช่น การสร้างเอนไซม์บีตา-แลค-ทาเมสที่มีฤทธิ์ขยาย (Extended spectrum beta-lactamase, ESBL) เอนไซม์นี้พบได้ในแบคทีเรียชนิดแกรมลบรูปแท่ง โดยพบมากในแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* และ*Pseudomona-daceae* โดยมีฤทธิ์ในการสลายยากลุ่มบีตา-แลค-แทมได้มากชนิดขึ้น ESBL จัดเป็นเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส Molecular (Ambler) class A หรือ D โดยจัดอยู่ใน Functional group 2be หรือ 2d แบ่งออกเป็น 4 Class ได้แก่ Class A ได้แก่ TEM , SHV, CTX–M, KPC, Class B ได้แก่ MBL, Class C ได้แก่ AmpC, CMY ส่วน Class D ได้แก่ OXA (Ambler, 1980) และพบมีการแพร่กระจายเอนโซม์นี้ไปทั่วโลก

ในประเทศไทยมีรายงานการพบแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยที่ติดเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* และ *Pseudomonadaceae* จำนวนร้อยละ 28 และ 26 ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด ตามลำดับ (Lulitanond and Kaewkes, 2001) ตลอดจนสามารถตรวจพบเอนไซม์ ESBL ชนิดใหม่ได้เป็นครั้งแรก คือ SHV-12 และ SHV-2a (Chanawong *et al*., 2004)

การค้นหาแหล่งของเชื้อและความชุกของเชื้อกลุ่มนี้ในสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญยิ่งที่ไม่ควรจะละเลย จากการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าแม่น้ำเป็นแหล่งที่สำคัญหลักในการตรวจพบแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ (Ash *et al*., 2002) เนื่องจากแหล่งน้ำนับว่าเป็นแหล่งรองรับของเสียตามธรรมชาติ และพบว่ามีการปนเปื้อนขยะมูลฝอยและสิ่งปฏิกูลเพิ่มมากขึ้น สำหรับแบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นดัชนีทางสุขาภิบาลเพื่อประเมินการปนเปื้อนสิ่งปฏิกูลในน้ำคือ แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) รวมถึง *Escherichia coli* เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มดังกล่าวนี้มักพบในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จึงมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการตรวจพบเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารด้วย (APHA, 1995)

การที่แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวนี้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ปนเปื้อนยาปฏิชีวนะอย่างสม่ำเสมอ ทำให้เกิดการกระตุ้นจนทำให้แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ตลอดจนการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างฟุ่มเฟือยนี้ เป็นตัวคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่ไวต่อยาให้เจริญได้น้อยลง แต่หลงเหลือเชื้อที่ดื้อยาเจริญเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียสามารถถ่ายทอดความสามารถในการดื้อยาในสายพันธุ์เดียวกันและระหว่างสายพันธุ์ หรือในระดับจีนัสได้โดยการ conjugation (Anthony *et al*, 2006; Hasan *et al*, 2009)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเน้นการค้นหาความชุกและชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในแหล่งน้ำ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการบริหารจัดการ ควบคุมการแพร่กระจาย สำหรับการเฝ้าระวังแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว อันนับว่ามีประโยชน์ในการที่จะใช้เป็นเครื่องชี้วัดการใช้ยาต้านจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถบ่งชี้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพถึงการใช้ยาที่ไม่เหมาะสมหรือใช้มากเกินความจำเป็น ตลอดจนเกิดการปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม และเพื่อเป็นข้อมูลของการดื้อยาที่ช่วยให้แพทย์ใช้เป็นทางเลือกในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อจากโรงพยาบาลหรือชุมชน หรือเป็นแนวทางในการเลือกใช้ยาในการป้องกันการติดเชื้อหลังการผ่าตัด นอกจากนี้การตรวจพบการสร้างเอนไซม์ ESBL ในแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางสุขาภิบาล อาจแสดงว่าน่าจะมีโอกาสพบเชื้อก่อโรคชนิดอื่น ๆ ที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้มากขึ้น เนื่องจากพบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวนั้นสามารถแลกเปลี่ยนกันระหว่างเชื้อในวงศ์ของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งได้ด้วย (Chanawong *et al*., 2004)

วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร และกลุ่มตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมใน 3 แหล่ง คือ คลองรับน้ำเสียจากชุมชน แม่น้ำเจ้าพระยา และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล จำนวนแหล่งละ 7 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 21 ตัวอย่าง และตรวจแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มจากตัวอย่างน้ำจากสิ่งแวดล้อมทั้ง 3 แหล่ง แหล่งละ 70 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 210 ไอโซเลท

วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำ

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำในสิ่งแวดล้อมโดยใช้อุปกรณ์จ้วงตักที่ระดับความลึกจากผิวน้ำ 20-30 เซนติเมตร ใส่ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 200 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาสภาพตัวอย่างน้ำในกล่องควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ระหว่างเดินทางมายังห้องปฏิบัติการ

การแยก และจำแนกเชื้อ

แยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มโดยใช้วิธี Enrichment culture โดยการตวงตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงใน 2x Lactose broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MacConkey agar โดยบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีในแต่ละตัวอย่าง เพื่อนำมาแยก

ชนิดโดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Merck, 2000) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่แยกได้ไปตรวจวิเคราะห์หาการสร้างเอนไซม์ ESBL

การตรวจวิเคราะห์หาการสร้างเอนไซม์ ESBL

ตรวจวิเคราะห์หาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่แยกได้ ด้วยวิธี Double disc synergy test (DDST) ซึ่งดัดแปลงจากวิธี disc diffusion (Toronto medical laboratories, 2005) โดยอาศัยหลักการว่าเอนไซม์ ESBL จะถูกยับยั้งด้วยสารต้านบีตาแลคทาเมส จึงใช้กรด clavulanic ใน amoxicillin/clavulanate (AMC) 20/10 ไมโครกรัม วางตรงจุดศูนย์กลางอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่ได้เกลี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้ววาง cefpodoxime (CPD) 10 ไมโครกรัม ceftazidime (CAZ) 30 ไมโครกรัม ceftriaxone (CRO) 30 ไมโครกรัม และ aztreonam (ATM) 30 ไมโครกรัม ให้ห่างจากจุดศูนย์กลางของ AMC ประมาณ 15-20 มิลลิเมตร (Jarlier *et al*, 1998) และวาง cefoxitin (FOX) 30 ไมโครกรัม เพื่อแปลผลตามวิธีของ Toronto medical laboratories (2005)

การแปลผลการสร้างเอนไซม์ ESBL หากพบเกิดการยับยั้งการสร้างวงใส (antagonism) ระหว่าง FOX กับ CRO และ/หรือ CAZ เนื่องจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL จะทำการทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase โดยวิธี disc antagonism test หรือ DAT (Arora and Bal, 2005) และทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี DDST โดยวาง AMC ร่วมกับ Cefepime (FEP) 30 ไมโครกรัม (Tzelepi *et al.*, 2000)

สำหรับการควบคุมคุณภาพการตรวจวิเคราะห์หาการสร้างเอนไซม์ ESBL ในห้องปฏิบัติการ (Quality control) จะใช้เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 เป็น positive control และ *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็น negative control (NCCLS, 2000)

ผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างน้ำสิ่งแวดล้อมใน 3 แหล่งคือ คลองรับน้ำเสียจากชุมชน แม่น้ำเจ้าพระยา และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล จำนวนแหล่งละ 7 ตัวอย่าง ตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL (ภาพที่ 1) จำนวน 7, 6 และ 7 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อและสุ่มเลือกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแต่ละแหล่ง แหล่งละ 70 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 210 ไอโซเลท ตรวจพบแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 11, 8 และ 19 ไอโซเลท หรือคิดเป็นร้อยละ 15.7, 11.4 และ 27.1 ของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่แยกได้ในแต่ละแหล่ง (ภาพที่ 2)

ผลการแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มจากแหล่งน้ำทั้ง 3 แหล่งพบว่าเป็น *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* และ *Enterobacter cloacae* จำนวน 168 (ร้อยละ 80.0), 18 (ร้อยละ 8.6), 5 (ร้อยละ 2.4) และ 19 (ร้อยละ 9.0) ไอโซเลท โดยตรวจพบเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 32 (ร้อยละ 15.2), 1 (ร้อยละ 0.5), 0 และ 0 ไอโซเลท ตามลำดับ และตรวจ

พบการสร้างเอนไซม์ Class A ESBL และ Class C ESBL จำนวน 26 (ร้อยละ 12.4) และ 7 (ร้อยละ 3.3) ไอโซเลท ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ตรวจพบ *E. cloacae* ที่แยกได้จากน้ำในคลองรับน้ำเสียจากชุมชน ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับการสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 5 ไอโซเลท หรือร้อยละ 2.4 ของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด ซึ่งเอนไซม์ AmpC beta-lactamase นี้สามารถบดบังการตรวจพบเอนไซม์ ESBL โดยวิธี DDST แต่สามารถยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ ESBL ได้โดยวิธีอื่น ๆ (ภาพที่ 3)

ในตัวอย่างน้ำจากคลองรับน้ำเสียจากชุมชน พบว่าจากการสุ่มแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม จำนวน 70 ไอโซเลท พบเป็น *E. coli, E. cloacae*, *K. pneumoniae* และ *K. oxytoca* จำนวน 49, 14, 5 และ 2 ไอโซเลท โดยพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 6 (ร้อยละ 8.6), 5 (ร้อยละ7.1), 0 และ 0 ไอโซเลท ตามลำดับ

ในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา พบว่าจากการสุ่มแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม จำนวน 70 ไอโซเลท พบเป็น *E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca* และ *E. cloacae* จำนวน 55, 7, 3 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยพบ *E. coli* เท่านั้นที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 8 (ร้อยละ 11.4) ไอโซเลท

ส่วนในตัวอย่างน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล พบว่าจากการสุ่มแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม จำนวน 70 ไอโซเลท พบเป็น *E. coli* และ *K. pneumoniae* จำนวน 64 และ 6 ไอโซเลท โดยพบว่าสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 18 (ร้อยละ25.7) และ 1 (ร้อยละ 1.4) ไอโซเลท ตามลำดับ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 ตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำในสิ่งแวดล้อม และการตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL

แหล่งน้ำ	จำนวนตัวอย่าง (ร้อยละ)	ESBL positive (ร้อยละ)
คลองรับน้ำเสียจากชุมชน	7 (33.3)	7 (33.3)
แม่น้ำเจ้าพระยา	7 (33.3)	6 (28.6)
น้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล	7 (33.3)	7 (33.3)
รวม	**21 (100)**	**20 (95.2)**

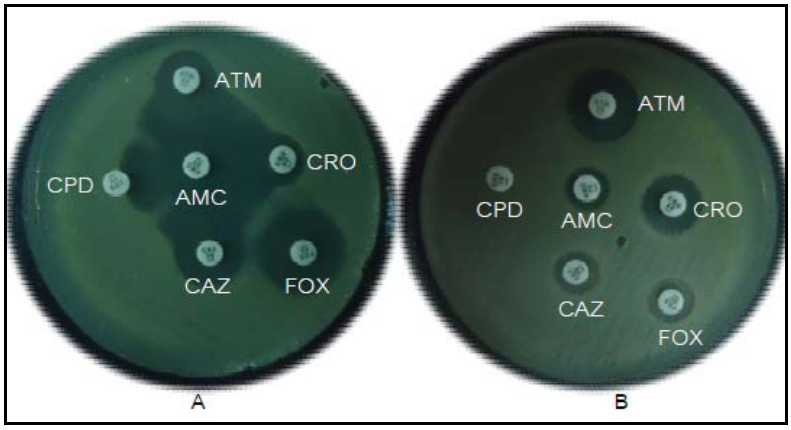
ตารางที่ 2 จำนวนและรูปแบบของเอนไซม์ ESBLที่แยกได้จากแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มแต่ละชนิด

แบคทีเรีย กลุ่มโคลิฟอร์ม	จำนวน (ร้อยละ)	ESBL positive (ร้อยละ)	รูปแบบของเอนไซม์ ESBL		
			Class A (ร้อยละ)	Class C (ร้อยละ)	พบร่วมกับ AmpC beta-lactamase (ร้อยละ)
E. coli	168 (80.0)	32 (15.2)	26 (12.4)	6 (2.8)	0
K. pneumoniae	18 (8.6)	1 (0.5)	0	1 (0.5)	0
K. oxytoca	5 (2.4)	0	0	0	0
E. cloacae	19 (9.0)	5 (2.4)*	0	0	5 (2.4)*
รวม	**210 (100)**	**38 (18.1)**	**26 (12.4)**	**7 (3.3)**	**5 (2.4)**

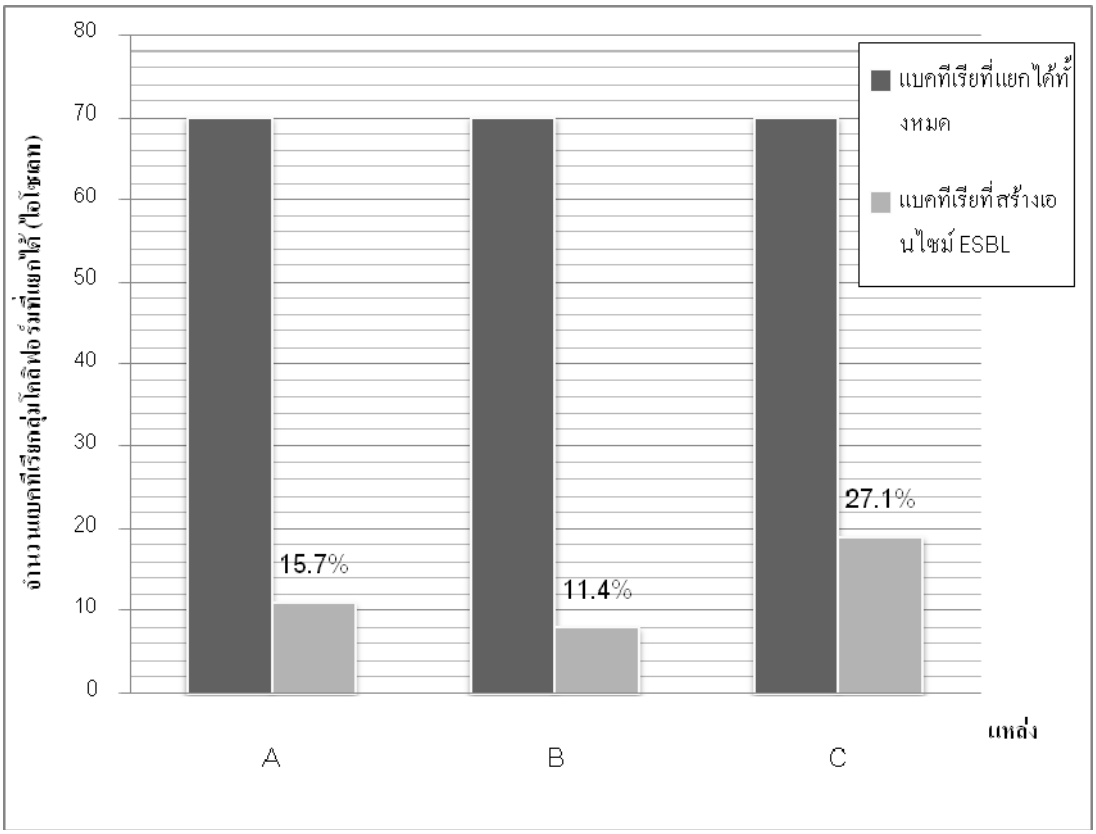
*, ไม่สามารถระบุ class ESBL ได้ ต้องทดสอบในระดับอณูชีวโมเลกุลเพิ่มเติม

ตารางที่ 3 จำนวน และรูปแบบของเอนไซม์ ESBLที่แยกได้จากแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแต่ละแหล่ง

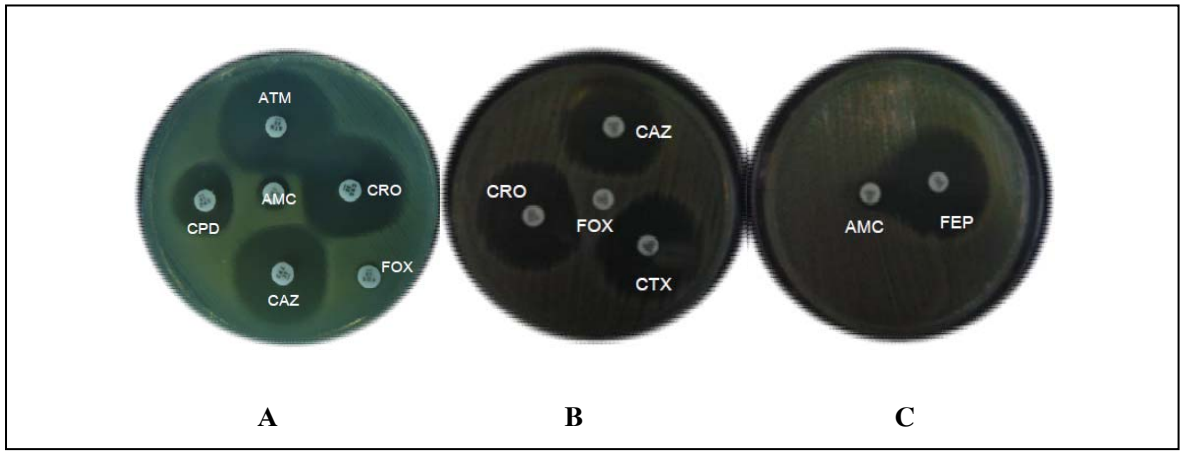
แหล่งน้ำ	ชนิด และจำนวนของแบคทีเรีย กลุ่มโคลิฟอร์มที่สุ่มแยกได้ (ไอโซเลท)		รูปแบบของเอนไซม์ ESBL ที่ตรวจพบ (ไอโซเลท)			รวม (ร้อยละ)
			Class A	Class C	พบร่วมกับ AmpC beta-lactamase	
คลองรับน้ำเสียจากชุมชน	*E. coli*	49	6	0	0	6 (8.6)
	E. cloacae	14	0	0	5	5 (7.1)
	K. pneumoniae	5	0	0	0	0
	K. oxytoca	2	0	0	0	0
	รวม (ร้อยละ)	**70 (100)**	**6 (8.6)**	**0**	**5 (7.1)**	**11 (15.7)**
แม่น้ำเจ้าพระยา	*E. coli*	55	4	4	0	8 (11.4)
	K. pneumoniae	7	0	0	0	0
	K. oxytoca	3	0	0	0	0
	E. cloacae	5	0	0	0	0
	รวม (ร้อยละ)	**70 (100)**	**4 (5.7)**	**4 (5.7)**	**0**	**8 (11.4)**
น้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล	*E. coli*	64	16	2	0	18 (25.7)
	K. pneumoniae	6	0	1	0	1 (1.4)
	รวม (ร้อยละ)	**70 (100)**	**16 (22.8)**	**3 (4.3)**	**0**	**19 (27.1)**



ภาพที่ 1 การแปลผลการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี DDST พบเกิดการเสริมฤทธิ์ (synergy) ระหว่างยาตัวใดตัวหนึ่งกับ AMC และไวต่อ FOX จัดเป็น Class A ESBL (A) ไม่พบเกิดการเสริมฤทธิ์ ระหว่างยาตัวใดตัวหนึ่งกับ AMC และดื้อต่อยาทุกตัวรวมทั้ง FOX จัดเป็น Class C ESBL (B)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบการตรวจพบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ในแต่ละแหล่งคลองรับน้ำเสียจากชุมชน (A) แม่น้ำเจ้าพระยา (B) และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล (C)



ภาพที่ 3 การตรวจพบการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL ของ *E. cloacae* การสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างวงใส ระหว่าง FOX กับ CRO และ/หรือ CAZ (A), ยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase โดยวิธี DAT (B) และ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี DDST โดยวาง AMC ร่วมกับ FEP (C)

สรุปผล

จากการเก็บตัวอย่างน้ำสิ่งแวดล้อมใน 3 แหล่งคือ คลองรับน้ำเสียจากชุมชน แม่น้ำเจ้าพระยา และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล จำนวนแหล่งละ 7 ตัวอย่าง นำไปเพาะเลี้ยง และแยกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มโดยวิธี Enrichment culture จากนั้นสุ่มเลือกแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในแต่ละแหล่ง แหล่งละ 70 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 210 ไอโซเลท นำมาตรวจวิเคราะห์หาการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี DDST พบว่าสามารถตรวจพบแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ ESBL ในทุกแหล่ง

โดยแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่แยกได้ทั้ง 210 ไอโซเลท ประกอบด้วย *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* และ *E. cloacae* จำนวน 168 (ร้อยละ 80.0), 18 (ร้อยละ 8.6), 5 (ร้อยละ 2.4) และ 19 (ร้อยละ 9.0) ไอโซเลท และตรวจพบเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 32 (ร้อยละ 15.2), 1 (ร้อยละ 0.5), 0 และ 0 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยตรวจพบการสร้างเอนไซม์ Class A ESBL และ Class C ESBL จำนวน 26 (ร้อยละ 12.4) และ 7 (ร้อยละ 3.3) ไอโซเลท ตามลำดับ ทั้งนี้ตรวจพบ *E. cloacae* ที่แยกได้จากน้ำในคลองรับน้ำเสียจากชุมชน ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับการสร้างเอนไซม์ ESBL จำนวน 5 ไอโซเลท หรือร้อยละ 2.4 ของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด

นอกจากนี้พบว่าในน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาลมีโอกาสพบแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำจากคลองรับน้ำเสียจากชุมชน และน้ำจากแม่น้ำเจ้าพระยา โดยมีความชุกของแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่มี

ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL เป็นร้อยละ 27.1, 15.7 และ 11.4 ตามลำดับ

อภิปรายผล

จากการตรวจหาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี DDST ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำในสิ่งแวดล้อม 3 แหล่ง ได้แก่ คลองรับน้ำเสียจากชุมชน แม่น้ำเจ้าพระยา และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาล พบเชื้อจากทุกแหล่งสามารถสร้างเอนไซม์ ESBL สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Mesa *et al.* (2006) ซึ่งตรวจพบการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่แยกได้ทั้งในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม โดยการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจพบในเชื้อ *E. coli* ได้ร้อยละ 15.2 จากแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมด หรือคิดเป็นร้อยละ19.0 ของเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้ทั้งหมด และพบการสร้างเอนไซม์นี้ได้ในแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มที่แยกได้จากน้ำในคลองรับน้ำเสียจากชุมชน และน้ำที่ผ่านระบบบำบัดน้ำเสียในโรงพยาบาลทุกตัวอย่าง ในทำนองเดียวกับรายงานของ Reinthaler *et al.* (2010) ที่ตรวจพบเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ ESBL ได้ร้อยละ 20.8 ในตัวอย่างตะกอนน้ำเสียในออสเตรีย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Prado *et al.* (2008) ซึ่งตรวจพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL สูงถึงร้อยละ 46.5 จากเชื้อที่แยกได้จากน้ำทิ้งและตะกอนน้ำเสียที่บำบัดแล้วจากโรงพยาบาลในประเทศบราซิล

จากการศึกษานี้ตรวจพบเชื้อ *E. cloacae* ที่แยกได้จากน้ำในคลองรับน้ำเสียจากชุมชนมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL จำนวน 5 ไอโซเลท (ร้อยละ 2.4) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fokas *et al.* (2006) ซึ่งตรวจพบ *E. cloacae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL เพียง 1 ไอโซเลท (ร้อยละ 1.3) ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วย การสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ที่ตรวจพบนี้สามารถยับยั้งการตรวจพบการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี DDST ได้ (Tzelepi e*t al.*, 2000) จึงเป็นข้อจำกัดในการใช้วิธีนี้ในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL อย่างไรก็ตามสามารถสังเกตการเกิดการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับการสร้างเอนไซม์ ESBL ได้จากการเกิดการยับยั้งการสร้างวงใสของการยับยั้งยาที่เกิดขึ้นระหว่าง FOX กับ CRO และ/หรือ CAZ จากนั้นนำไปทำการทดสอบยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase โดยวิธี DAT (Arora and Bal, 2005) และทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ AmpC beta-lactamase ร่วมกับเอนไซม์ ESBL ด้วยวิธี DDST โดยวาง AMC ร่วมกับ FEP (Tzelepi e*t al.*, 2000)

ข้อเสนอแนะ

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ ESBL โดยวิธี DDST ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบทางฟีโนไทป์ จะมีข้อจำกัดในการตรวจพบชนิดของเอนไซม์ ESBL ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องตรวจหาชนิดของเอนไซม์นี้โดยวิธีทางจีโนไทป์หรือวิธีทางชีวโมเลกุลเพิ่มเติม แต่เนื่องจากวิธี DDST นี้เป็นวิธีที่สะดวก ไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้

เครื่องมือที่จำเพาะ จึงสามารถนำไปปฏิบัติได้จริงในงานประจำของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ 2555 ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้โครงการวิจัยสามารถดำเนินไปได้ตามวัตถุประสงค์ด้วยความเรียบร้อย และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ประชาชาติธุรกิจ. (2555). **เตือน!"อินเดีย"กำลังกลายเป็นแหล่งกำเนิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ**. ฉบับวันที่ 17 มิถุนายน 2555.

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวธส.) (2555). **เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ: ภาวะวิกฤติต่อคุณภาพคนไทย**. สืบค้นเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน 2555 จากwww.hsri.or.th/sites/default/files/fact%20sheet_Art-2.pdf

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

Anthony, R.B., Gabriele, C., Siritron, S., John, B.B, Frederick, M.A., Terence, I.M. and Kim, L. (2006). Conjugating Berberine to a Multidrug Resistance Pump Inhibitor Creates an Effective Antimicrobial. **ASC Chemica Biology,** 1(9): 594-600.

Arora, S. and Bal, M. (2005). Amp C beta-lactamase producing bacterial isolates from a Kolkata hospital. **Indian. J. Med. Res.** 122: 224-233.

Ash, R.J., Mauck, B. and Morgan, M. (2002). Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in river, United States. **Emerging Infect. Dis.** 8: 713-716.

American Society for Microbiology (ASM) Colloquium Report. (1999). **Antimicrobial Resistance, An Ecological Perspective**. Washington DC: American Society for Microbiology.

American Public Health Association (APHA), (1995). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** (19th ed.). APHA: Washington, DC.

Balagué, C., and Garcia, V. (2001). Activation of multiple antibiotic resistances in uropathogenic *E. coli* strains by aryloxo-alcanoic acid compound. **Antimicrob Agents Chemother,** 45: 1815 -1822.

Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Lulitanond, A., Hawkey, P.M. (2004). **SHV-12, SHV- 5, SHV-2a and VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in Gram-negative bacteria isolated in university hospital in Thailand**. Retrieved December 25, 2012, from http: jar.outjournals.Org/cgi/ontent/full/8/6/834.

Hasan, M. Z., Zinat, M. and Mamun, R. (2009). Intergenic and intragenic conjugal transfer of multiple antibiotic resistance determinants among bacteria in the aquatic environment of Bangladesh.

African Journal of Biotechnology, 8 (2): 155-160.

Fokas, S.P., Fokas, S.T., Lauranou, E., Sarris, I., Kalkani, M., Dionysopoulou, M. (2006). Detection of extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* with AmpC beta-lactamase type of inducible resistance. **16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Nice, France**. April 1-4, 2006.

Lulitanond, A., and Kaewkes, W. (2001). Prevalence of extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) production in gram-negative bacilli isolated from Srinagarind Hospital, Thailand. **Antimicrob Chemo-Ther**, 48: 839-852.

Mesa, R.J, Blanc, V., Blanch, A.R, Cortés, P., González, J.J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G. and Navarro, F. (2006). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). **Antimicrob. Chemo-Ther.** 58: 211-215.

Merck. (2000). **Microbiology Manual**. Petrick, K, Parsch, J. (eds), August 1994 Edition, USA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A5 and informational supplement M100-S10. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Reinthaler, F.F., Feierl, G., Galler, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G. and Marth, E. (2010). ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. **Water Res**. 44(6): 1981-1985.

Prado, T., W. C. Pereira, D. M. Silva, L. M. Seki, A. P. Carvalho, and M. D. Asensi. (2008). Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Lett Appl. Microbiol**. 46:136-141.

Toronto medical laboratories. (2005). **Antimicrobial Susceptibility Testing Manual**. Procedure manual Toronto medical laboratories/Mount Sinai hospital microbiology department, November 21, 2005.

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

World Health Organization (WHO). (1996). **Epidemic Dysentery**. Fact sheet No 108. 1996; pp. 1-2. Retrieved August 3, 2012, from http://www.who.int/inf-/fact 108.html.

World Health Organization (WHO). (2000). **Global Surveillance of Epidemic-prone Infections Diseases**. Chapter 4: Cholera. World Health Organization. 2000, WHO/CDS/CSR/ISR/2000.