บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ยากลุ่ม β-lactam [1- 3]

ยากลุ่ม β-lactam มีโครงสร้างที่สำคัญ คือส่วนวงแหวน β-lactam (β-lactam ring) ซึ่งเป็นวงแหวนชนิด 4 อะตอม ยาออกฤทธิ์โดยการเข้าจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาย peptidoglycan คือ carboxypeptidase และ transpeptidase จึงรวมเรียกเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้ว่า penicillin-binding protein (PBP) การออกฤทธิ์ของยามีผลเฉพาะต่อเซลล์ในระยะแบ่งตัวที่จำเป็นต้องมีการสร้างผนังเซลล์ ทำให้ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และเซลล์ตายในที่สุด ยาในกลุ่ม β-lactam จึงจัดอยู่ที่ออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bacteriacidal)

ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วยยากลุ่ม penicillins, cephalosporins, cephamycins, monobactams และ carbapenems

ตารางที่ 1. β-lactam antibiotics [2]

β-lactam groups	Examples of antimicrobial agents
Penicillins	Penicillin G, penicillin
	Penicillinase resistant penicillins: methicillin, nafcillin, oxacillin, cloxacillin
	Aminopenicillins: ampicillin, amoxicillin
	Carboxypenicillins: carbennicillin, ticarcillin
	Ureidopenicillins: mezlocillin, piperacillin
Cephalosporins	First generation: cefazolin, cephalothin, cephalexin
	Second generation: cefuroxime, cefaclor, cefamandole, cefamycins (cefotetan, cefoxitin)
	Third generation: cefuroxime, ceftriaxone, cefpodoxime, ceftrizoxime, cefoperazone, ceftazidime
	Fourth generation: cefepime, cefpirome
Carbapenems	Imipenem, meropenem, ertapenem
Monobactams	Aztreonam

2.2 เอนไซม์ β-lactamase

เอนไซม์ β-lactamases เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม serine peptidase ซึ่งมีตำแหน่งออกฤทธิ์ (active site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน serine โดย β-lactamases จะอาศัยหมู่ไฮดรอกซิลของ serine ในตำแหน่งออกฤทธิ์เข้าทำปฏิกิริยากับวงแหวน β-lactam ในส่วนของยา เรียกปฏิกิริยาเช่นนี้ว่า nucleophilic attack มีผลทำให้เกิดการแยกของพันธะ amide ของวงแหวน β-lactam และเกิดการเปิดออกของวงแหวน β-lactam เรียกผลผลิตที่เกิดขึ้นนี้ว่า penicilloyl (สำหรับยาในกลุ่ม penicillins) หรือ cephalosporyl (สำหรับยาในกลุ่ม cephalosporins) ซึ่งจะเชื่อมต่อกับกรดอะมิโน serine ในตำแหน่งออกฤทธิ์ของ β-lactamases ทำให้เกิดเป็นสารกึ่งกลางที่เรียกว่า acylenzyme intermediate และต่อมาจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำทำให้โมเลกุล มีผลทำให้ยา β-lactams ถูกทำให้หมดฤทธิ์ร่วมกับการคืนรูปของ β-lactamases เพื่อทำลายยาต่อไป

การทำปฏิกิริยาดังกล่าวคล้ายกับการออกฤทธิ์ของยา β-lactams ในการยับยั้งการทำงาน β-lactams นั้นดื้อต่อการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของน้ำ ทำให้ PBP และ β-lactams ยังคงเชื่อมต่อกันในรูปของ acylenzyme intermediate เป็นผลให้ PBP ถูกทำให้หมดฤทธิ์และการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกยับยั้ง

การสร้าง β-lactamases พบเกิดขึ้นยิ่งรวดเร็วภายหลังจากเริ่มมีการใช้ยา penicillin ในการต้านเชื้อ *S. aureus* โดยพบพลาสมิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ penicillinase และมีการแพร่กระจายออกไปอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันพบการสร้าง β-lactamases ที่มีคุณสมบัติต่างกันไปได้ในเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ การจัดกลุ่มของ β-lactamases ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมี 2 ระบบ ได้แก่ การจัดกลุ่มตามระบบของ Bush (Bush-jacoby-Medeiros) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (Group 1-4) ตามคุณสมบัติทางชีวเคมีและความสามารถในการออกฤทธิ์ และการจัดกลุ่มตามระบบของ Ambler ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (molecular class A-D) ตามคุณสมบัติทางอณูชีววิทยาหรือโครงสร้างในระดับโมเลกุล แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 2 [1, 3]

ตารางที่ 2. Classification schemes for bacterial β-lactamases

Molecular class	Bush-Jacoby-Medeiros group	ยาที่เป็นเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์	ตัวอย่างเอนไซม์หรือเชื้อที่สร้าง
A	2a	penicillins	penicillinases จากเชื้อแกรมบวก
	2b	penicillins, cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1 จากเชื้อแกรมลบหลายชนิด
	2be	penicillins, extended-spectrum cephalosporins, monobactams	TEM-3 และ SHV-2 เป็นต้นไป (ยกเว้นบางชนิด) จากเชื้อแกรมแกรมหลายชนิด
	2br	penicillins	TEM-30 ถึง TEM-36, SHV-10
	2c	penicillins; carbenicillin	PSE-1 เป็นต้นไป (ยกเว้น PSE-2)
B	3	ยากลุ่ม β-lactamases ทุกชนิด	Metallo-β-lactamases จาก Stenotrophomonas maltophilia
C	1	cephalosporins	AmpC β-lactamases จากเชื้อแกรมลบหลายชนิด
D	2d	penicillins; cloxacillin	OXA-1 เป็นต้นไป รวมถึง PSE-2 (OXA-10)
E	4	penicillins	penicillinases จาก Burkholderia cepacia

*ดัดแปลงจาก Bush et al.

2.3 เอนไซม์แอมซีเบต้าแลคทาเมส (AmpC β -lactamase)

เอนไซม์ AmpC β- lactamase ถูกรายงานการค้นพบในช่วงปี 1980 – 1985 และได้กระจายไปทั่วโลก เชื่อว่าโครงสร้างยีนส่วนใหญ่ถ่ายทอดมาจากโครโมโซมที่มียีน AmpC แล้วถ่ายทอดมาสู่ พลาสมิด จึงมียีนควบคุมอยู่บนทั้งโครโมโซมหรือพลาสมิด เอนไซม์มีฤทธิ์ต้านยากลุ่ม Broad-spectrum cephalosporins และ narrow-spectrum cepharosporins ถูกยับยั้งโดยกรด clavulanic ได้ต่ำ แต่จะไวต่อกรด boronic เอนไซม์ AmpC β- lactamases จะพบในแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli, Klebsiella oxytoca, Proteus mirabilis* รวมไปถึงเชื้อ *Psuedomonas aeruginosa* โดยทั่วไปการสร้าง AmpC β-lactamase จะเกิดขึ้นตลอดเวลา แต่สร้างใน

ระดับต่ำและมักไม่มีผลทำให้เชื้อดื้อยาในทางคลินิก สามารถพบการกลายพันธุ์ของยีนในเชื้อบางสายพันธุ์หรือได้รับพลาสมิดที่มียีนดื้อยาทำให้มีการผลิต AmpC β-lactamase เพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการดื้อต่อยา cepharosporins เพิ่มสูงขึ้น ยังพบอีกว่ายาต้านเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น cefoxitin, imipenem, และกรด clavulanic สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง AmpC β-lactamase ซึ่งจะพบได้บ่อยในแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* โดยเฉพาะ *Enterobactor cloaceae* และ *Citrobactor frondii* [1, 4-6]

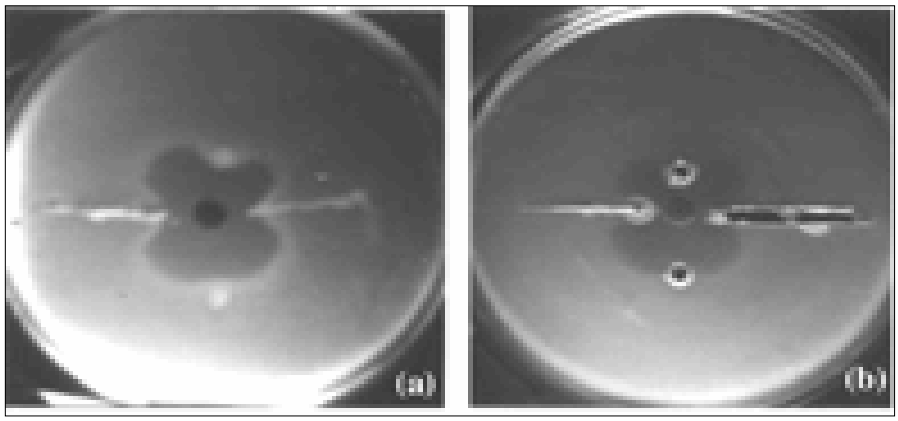
ในปี 2007 Pitout และคณะ ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase ในประเทศแคนาดา พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ตรวจพบในช่วงปี 2000-2003 จำนวน 78,275 isolates โดย 93% หรือ 72,756 isolates ตรวจพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยตรง และ 7% หรือ 5,519 isolates ตรวจพบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในโรงพยาบาล และพบว่า 384 isolates หรือ 0.7% เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา cefoxitin โดยคิดเป็น 0.1% ในปี 2000 , 0.3% ในปี 2001 , 1% ในปี 2002 และ 1.3% ในปี 2003 และสามารถนำมาตรวจหาพบเชื้อที่สร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase จำนวน 369 isolates หรือ 96% นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase โดย 17% พบในผู้ป่วยที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลเอง และ 83% เป็นผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยตรงมาจากที่อื่น และพบว่าอัตราการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase จะค่อยๆสูงขึ้นในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อในโรงพยาบาลและสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อโดยตรง โดยเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase ส่วนใหญ่พบในกลุ่มผู้ป่วยสูงอายุ (เฉลี่ย 51.1 ปี) และเป็นเพศหญิง 84% คิดเป็น 5 เท่าของเพศชาย [7]

ในปี 2002 Subha และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการดื้อยาและการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase ในเชื้อ *Klebsiella* spp. และ *E. coli* ในเด็กอายุไม่ต่ำกว่า 5 ปี จากสถาบัน Child Health and Hospital for Children ประเทศอินเดีย พบว่า 24.1% ของเชื้อ *Klebsiella* spp. จาก 116 isolate และ 37.5% ของเชื้อ *E. coli* จาก 32 isolate มีการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase โดย 66.6% และ 81.0% ของเชื้อ *Klebsiella* spp. และ *E. coli* ดื้อต่อยากลุ่ม Third generation (board spectrum) cephalosporins โดยทั้งหมดไวต่อยา imipenem และ 72.0% ของเชื้อ *Klebsiella* spp. และ 62.5% ของเชื้อ *E. coli* ดื้อต่อยา cefoxitin [8]

2.4 การตรวจหาเอนไซม์ AmpC β-lactamase ทางห้องปฏิบัติการ

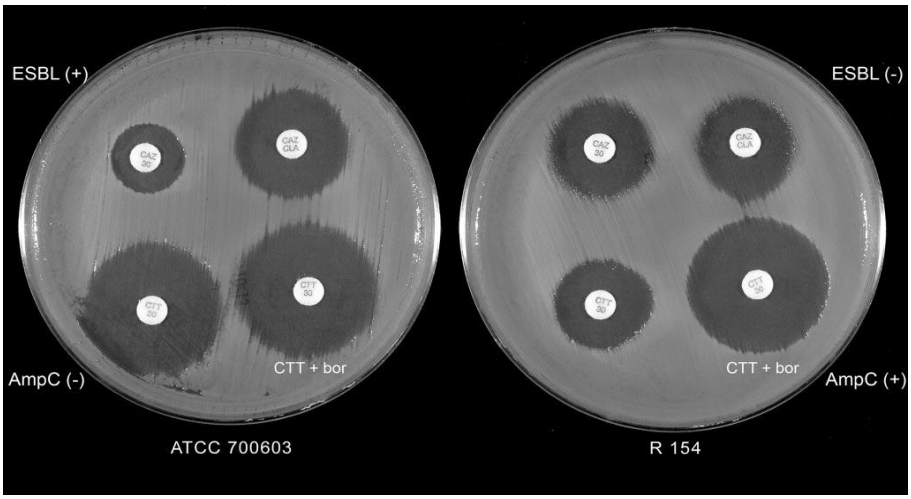
สำหรับการตรวจหาเอนไซม์ AmpC β-lactamase ทางห้องปฏิบัติการนั้นวิธีการตรวจหานั้นจะต้องมีความจำเพาะและความไวสูงพอ ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาวิธีการตรวจหาเอนไซม์ AmpC β-lactamase หลายวิธี แต่สถาบัน CLSI ก็ยังไม่สามารถกำหนดแนวทางสำหรับการตรวจกรองและการตรวจยืนยันได้ชัดเจนเหมือนการตรวจการเอ็นไซม์ ESBL ซึ่งวิธีการต่างๆ ได้แก่

2.4.1. วิธี Three dimensional เริ่มด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 บน Mueller-Hinton agar ให้ทั่วทั้งเพลท แล้ววางแผ่นยา ceftazidime ไว้ตรงกลาง แล้วใช้มีดกรีดอาหารให้เป็นช่องโดยห่างจากขอบแผ่นยา 5 มิลลิเมตร แล้วเขี่ยเชื้อใส่ลงไปในช่องที่กรีดไว้ แล้วเอาเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ้าเกิดรอยเว้าเข้าไป ดังรูป (a) แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase [9]



ภาพที่ 1 แสดงการทดสอบ AmpC β-lactamase โดยวิธี Three dimensional method
(ที่มา : http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/full/54/3/684)

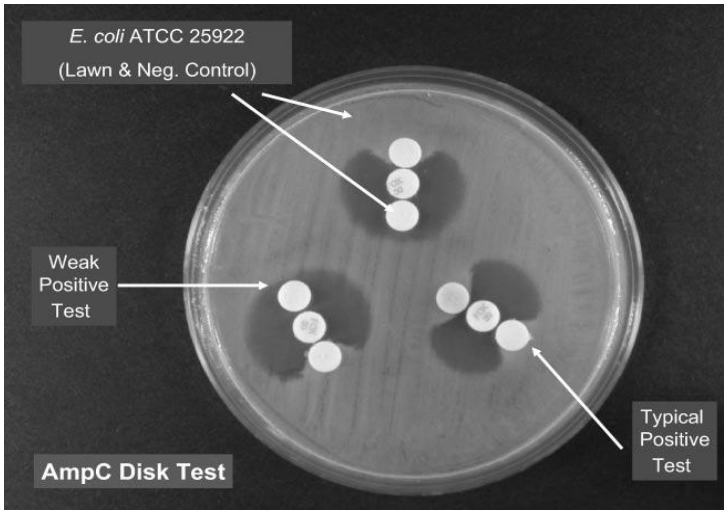
2.4.2 วิธี Inhibitor based เริ่มด้วยการเขี่ยเชื้อที่เราต้องการทดสอบลงบน Mueller-Hinton agar ให้ทั่วทั้งเพลท แล้ววางแผ่นยา cefotetan และ cefotetan+boronic acid ห่างกันประมาณ 5 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วนำมาวัด inhibition zone โดยถ้า inhibition zone แตกต่างกันเกิน 5 มิลลิเมตร แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase [10]



ภาพที่ 2 แสดงการทดสอบ AmpC β-lactamase โดยวิธี inhibitor based method

(ที่มา : http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1233913&blobtype=pdf)

2.4.3 AmpC disk test เริ่มด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E .coli* สายพันธุ์ ATCC 25922 บน Mueller-Hinton agar ให้ทั่วทั้งเพลท แล้ววางแผ่นยาที่ชุบด้วยส่วนผสมของ saline (20 มิลลิลิตร) และ 100x tris EDTA ในอัตราส่วน 1:1 ไว้ด้านบน แล้ววางแผ่นยา cefoxitin ไว้ตรงกลาง แล้ววางแผ่นยาที่เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบไว้ด้านล่าง โดยแผ่นยาทั้ง 3 แผ่นให้วางชิดกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถ้าเกิด inhibition zone ดังรูป แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase [11]



ภาพที่ 3 แสดงการทดสอบ AmpC β-lactamase โดยวิธี AmpC disk test

(ที่มา : http://jcm.asm.org/cgi/reprint/43/7/3110)

2.4.4 วิธีทางอณูชีววิทยา เช่น Multiplex PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อ เพื่อตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ AmpC β-lactamase โดยวิธีทางอณูชีววิทยา เช่น ACC-1, CMY-2, CMY-2b, I113 *ampC* เป็นต้น