Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) and EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method (eCIM) for Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in Sawanpracharak Hospital.

การตรวจทางฟีโนไทป์เพื่อหาเชื้อที่สร้างเอนไซม์ Carbapenemase โดยวิธี Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) และ EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method (eCIM) ในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์

กิตติกานต์ เจิมขุนทด

Kittikan Chermkhuntod

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเชื้อแกรมลบกลุ่ม Carbapenemase-producing Carbapenem-Resistant Organism (CP-CRO) มีความรุนแรงและพบได้มากขึ้น วิธี modified Carbapenem Inactivation Methods (mCIM) และ EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method(eCIM) ถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบหาการสร้าง carbapenemase และ metallo β-lactamase การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) และ Carbapenem Resistant *P. aeruginosa* (CRPA) ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ย้อนหลัง 5 ปี ตั้งแต่ 1 มกราคม 2015 – 30 กันยายน 2019 การทดสอบด้วยวิธี mCIM และ eCIM จากตัวอย่าง จำนวน 63 สายพันธุ์ ซึ่งทราบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จำนวน 22 สายพันธุ์ และการศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยแยกเป็นเชื้อกลุ่ม CRE จำนวน 48 สายพันธุ์และเชื้อ CRPA จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อ CRE และ CRPA มีการดื้อยาเพิ่มสูงขึ้น โดยปี 2019 มี CRE ร้อยละ 4.34 CRPA ร้อยละ 19.56% พบปริมาณ *K. pneumoniae* สูงสุดร้อยละ 44.59 (33/74) การทดสอบ mCIM ให้ความไวและความจำเพาะร้อยละ 100 ส่วน eCIM ให้ความไวร้อยละ 100 แต่ความจำเพาะร้อยละ 66.67 เมื่อทดสอบกับเชื้อที่ให้ผลดื้อต่อ carbapenem จำนวน 63 สายพันธุ์ พบการสร้าง carbapenemase ร้อยละ 71.43 (45/63) และในจำนวนนี้เป็น metallo β-lactamase ร้อยละ 82.22 (37/45) สอดคล้องกับการศึกษาจีโนไทป์ที่พบยีนที่สร้าง carbapenemase ร้อยละ 76.19(48/63) โดยส่วนใหญ่เป็นยีนที่กำหนดการสร้าง NDM ดังนั้นวิธี mCIM และ eCIM จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการทดสอบ CRE และ CRPA เพื่อหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase เมื่อมีข้อจำกัดในการทดสอบด้วยวิธีทางจีโนไทป์

คำสำคัญ : Carbapenemase, metallo beta-lactamase, mCIM, eCIM, NDM

บทนำ

ทั่วโลกกำลังเผชิญกับภัยคุกคามของการแพร่กระจายเชื้อดื้อยา(Antimicrobial Resistance, AMR) ที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุข[1] เนื่องจากการรักษาผู้ติดเชื้อจะมีความยากและมีทางเลือกที่จำกัดในการใช้ยา ประกอบกับค่าใช้จ่ายที่เพิ่มสูงขึ้นและระยะเวลาในการรักษาที่นานขึ้น[2] สำหรับเชื้อกลุ่มแกรมลบยาในกลุ่ม Carbapenem ถูกใช้เป็น broad spectrum เพื่อที่จะใช้ในการรักษาเชื้อที่ดื้อยาหลายขนาน (Multidrug resistance, MDR) โดยเก็บไว้ใช้เมื่อจำเป็น การเพิ่มขึ้นของการดื้อยาในยากลุ่มนี้พบเห็นได้มากขึ้นและมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว กลไกการดื้ออาจเกิดจากการสร้างหรือไม่สร้างเอนไซม์ (carbapenemase producing(CP) หรือnon-carbapenemase producing(non-CP))ก็ได้ สำหรับ Carbapenemase เป็นเอ็นไซม์ β-lactamase ที่เข้าไปยึด amide bound ของ β-lactam ring ของยา carbapenem ทำให้ยาหมดฤทธิ์[3-5] ส่วนเชื้อที่ดื้อต่อยาcarbapenem แต่ไม่ได้สร้างเอ็นไซม์ carbapanemase (non-CP carbapenem-resistant organism, non-CP CRO)จะใช้กลไกการดื้ออื่นได้แก่ porin mutation หรือ efflux pump หรือร่วมกันทั้งสองกลไก, กับการสร้าง extended-spectrum β-lactamase(ESBL) หรือ AmpC β-lactamase ทั้งนี้ขึ้นกับความจำเพาะของเชื้อแกรมลบแต่ละตัว[3-5]เชื้อที่ดื้อยากลุ่มcarbapanem(Carbapenem-resistant Organism,CRO) แม้จะดูน่ากังวลเพราะมีโอกาสที่จะเป็นเชื้อดื้อยาหลายชนิด(Multidrug resistant, MDR) แต่เชื้อกลุ่มนี้หากเป็น Carbapenemase-producing CRO ด้วยแล้ว ก็จะยิ่งมีความรุนแรงและเป็นปัญหาต่อกระบวนการรักษาด้วยยา (antibiotic stewardship) และการควบคุมการติดเชื้อในโรงพยาบาล(Infection control program)มากยิ่งขึ้นไปอีก และกระบวนการดังกล่าวนี้เองทีทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา carbapenem ไปทั่วโลก[1] อีกทั้งยังสัมพันธ์กับการเสียชีวิตอย่างน่าตกใจ[6]

เอนไซม์ carbapenemase สามารถจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ Ambler class A, B และ D ในส่วนของ Ambler class A จะประกอบไปด้วย *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), *Serratia marcescens* enzyme (SME), imipenemase (IMI), non-metallocarbapenamase-A (NMC) และเอ็นไซม์ Guiana extended-spectrum (GES) โดยพบว่าเอนไซม์ KPC เป็นปัญหามากที่สุดในสหรัฐอเมริกา[7-8] Ambler class B ประกอบด้วย New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), Verona integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM) และ imipenemase (IMP) โดยกลุ่มเอนไซม์นี้จะต้องการ divalent cation เช่น Zinc เป็น cofactor ในการทำงาน และถูกยับยั้งการทำงานได้เมื่อมีได้รับสารเช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งมีฤทธิ์เป็น cation chelator ส่วน Ambler class D จะเป็นเอนไซม์ชนิด OXA[7-8]

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase สามารถทำได้ทั้งวิธีทางจีโนไทป์ (Genotypic Methods) และฟีโนไทป์ (Phenotypic Methods) ซึ่งวิธีทางจีโนไทป์เป็นการตรวจหายีนที่มีความจำเพาะต่อการสร้างเอ็นไซม์ และเนื่องจากเชื้อสามารถส่งต่อยีนดังกล่าวให้แก่เชื้อตัวอื่นได้ทาง plasmid การทราบถึง

ระดับยีนจึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการวินิจฉัย แต่การศึกษาทางยีโนไทป์จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมืออัตโนมัติและมีความทันสมัยสูง[9] อีกทั้งมีราคาสูง ส่วนวิธีทางฟีโนไทป์เดิมใช้วิธี modified Hodge test (MHT) แต่เนื่องจาก MHT มักให้ผลบวกปลอมเมื่อ ESBL และ AmpC ถูกสร้างมากขึ้นร่วมกับ porin mutation และ/หรือร่วมกับ efflux และหากเป็น SME, OXA-type หรือตัวที่ไม่ใช่ MBL carbapenemase ก็มักให้ผล ลบปลอม[10] จึงได้ถูก Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ถอดออกจากการรับรองในปี 2018 แล้วแทนที่ด้วยวิธีใหม่ที่ให้สมรรถนะในการตรวจที่ดีกว่า ได้แก่ Carba NP และ modified Carbapenem Inactivation Methods (mCIM) [11-12]ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ใช้อุปกรณ์ไม่มาก ให้ผลความจำเพาะและความไวที่ดี โดยเฉพาะ mCIM ซึ่งมีราคาไม่แพงและทำได้ทันที และหากเพิ่มการทำ eCIM (EDTA-modified Carbapenem Inactivation Method) จากเชื้อที่ให้ผล mCIM เป็นบวก จะสามารถแยกเชื้อที่สร้าง MBL (Ambler class B) ซึ่งให้ผลบวกกับ eCIM จากเชื้อที่สร้าง serine carbapenemase (Ambler class A หรือ D)ที่ให้ผล eCIM เป็นลบ ได้

โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ เป็นโรงพยาบาลระดับตติยภูมิ มีขนาด 660 เตียง ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยา ได้ดำเนินการตรวจวิเคราะห์การตรวจเพาะเชื้อทางห้องปฏิบัติการมาเป็นระยะเวลายาวนาน และรายงานผลในกรณีพบเชื้อดื้อยากลุ่ม CRO แก่หน่วยงาน IC และหอผู้ป่วยอย่างเร่งด่วน (lab alert) เพื่อทำการแยกผู้ป่วยให้เข้าสู่ระบบการป้องกันการแพร่กระจายและการรักษา หากแต่ยังไม่เคยได้ทำการศึกษารวบรวมสถานการณ์เชื้อดื้อยากลุ่ม carbapenem และการทดสอบเพื่อค้นหาเชื้อที่สร้างเอ็นไซม์ carbapenemase ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ CRE และ Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa (CRPA), การรวบรวมข้อมูลจีโนไทป์ และการพิสูจน์เชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM และ eCIM ซึ่งเป็นวิธีทางฟีโนไทป์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางระบาดวิทยา, การควบคุมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อ และเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ยาให้เหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ CRE และ CRPA ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จ. นครสวรรค์ ย้อนหลัง 5 ปี
2. การพิสูจน์เชื้อที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี mCIM และ eCIM ซึ่งเป็นวิธีทางฟีโนไทป์ เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลทางจีโนไทป์

ขอบเขตงานวิจัย

เป็นการศึกษาเชื้อแกรมลบที่ดื้อยากลุ่ม Carbapenem ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ โดยวิธี mCIM และ eCIM

กรอบแนวคิด

ทำการทดสอบหาเชื้อที่มีการสร้างเอนไซม์ Carbapenemase ด้วยวิธี mCIM และ eCIM ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดแล้วนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับวิธีทางจีโนไทป์เพื่อประโยชน์ทางระบาดวิทยา

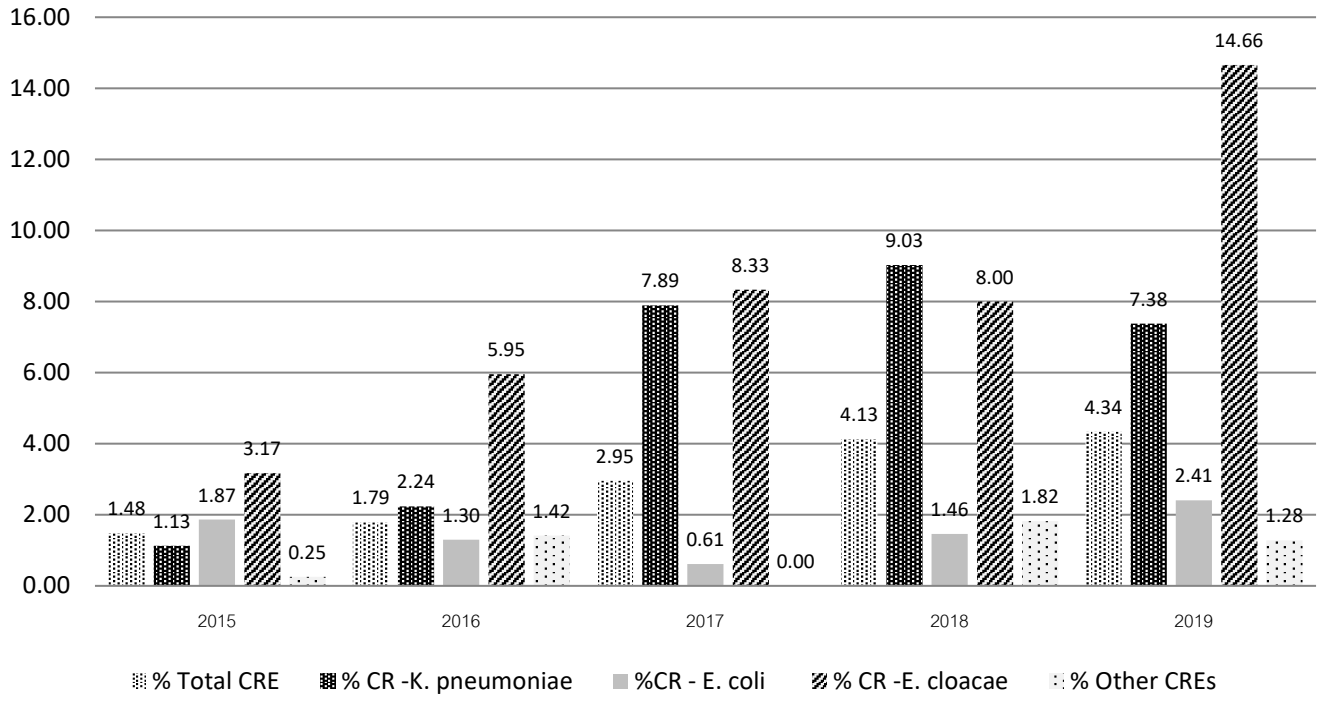
วิธีการศึกษา

1. การศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ CRE และ CRPA ที่แยกได้จากผู้ป่วยของโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จ. นครสวรรค์ ย้อนหลัง 5 ปี ตั้งแต่ 1 มกราคม 2558 – 30 กันยายน 2019 โดยวิธี Retrospective Descriptive study
2. การทดสอบหาเอนไซม์ carbapenem ด้วยวิธี mCIM และ eCIM (EDTA-Carbapenem Inactivation Method) [11] จากตัวอย่างในช่วงปี 2015 -2019 จำนวน 63 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อ *K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae* และ *P. aeruginosa* จำนวน 20, 23, 5 และ 15 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยเป็นเชื้อที่ทราบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จำนวน 22 สายพันธุ์ ประกอบด้วยเชื้อ *K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae* และ *P. aeruginosa* จำนวน 11, 6, 2 และ 3 สายพันธุ์ตามลำดับ
3. การศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยแยกเป็นเชื้อกลุ่ม CRE จำนวน 48 สายพันธุ์และเชื้อ CRPA จำนวน 15 สายพันธุ์ จากผลการวิเคราะห์เชื้อดื้อยาโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ด้วยวิธี PCR

ผลการศึกษา

จากการศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ CRE และลักษณะการดื้อยาของเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่ส่งมาวินิจฉัย ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จ. นครสวรรค์ ย้อนหลัง 5 ปี ตั้งแต่ 1 มกราคม 2558 – 30 กันยายน 2562 จำนวนทั้งสิ้น 14,738 สายพันธุ์ โดยแยกเป็นเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriacae* จำนวน 10,947 สายพันธุ์ และ *Pseudomonas aeruginosa* จำนวน 3,791 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อที่เป็น CRE มีจำนวนทั้งสิ้น 305 สายพันธุ์(2.79%) โดยหากพิจารณาเป็นรายปีจะพบเปอร์เซ็นต์การพบ CRE ที่เพิ่มสูงขึ้นจากปี ค.ศ. 2015 มี 1.48%(33/2,230) เพิ่มขึ้นเป็น 4.34%(74/1,706) ในปี ค.ศ. 2019 โดยในปี 2019(มกราคม-กันยายน) มีปริมาณเชื้อดื้อยา carbapenem ที่เป็น *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* และเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriacae* อื่นๆ จำนวน 33, 20, 17 และ 4 สายพันธุ์ตามลำดับ แต่เมื่อดูสัดส่วนร้อยละของเชื้อดื้อยาแต่ละชนิดที่เป็น CRE ในเชื้อชนิดเดียวกันที่เป็น non-CRE จะพบว่า *Enterobacter cloacae* มีการพบที่สูงสุด 14.66%(17/116) รองลงมาเป็น *Klebsiella pneumoniae* 7.38%(33/447), *Escherichia coli* 2.41%(20/831) และเชื้อในกลุ่ม *Enterobacteriacae* อื่นๆ1.28%(4/312)ตามลำดับ ในส่วนของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อ CRPA 533 สายพันธุ์ พบการดื้อยาในช่วง 5 ปีมีค่าใกล้เคียงกันโดยหากพิจารณาเฉพาะปี2019 จะพบอัตราการดื้อยาอยู่ที่ 19.56% (รูปที่ 1)

สัดส่วนการดื้อยา carbapenem ในหอผู้ป่วยเทียบกับเชื้อดื้อยาที่พบทั้งหมดในโรงพยาบาล พบเชื้อ CRE ในหอผู้ป่วยประเภท non-ICU 85.25%(260/305), ICU 12.79%(39/305) และ OPD 1.97%(6/305) เชื้อ CRPA ในหอผู้ป่วยประเภท non-ICU 79.03%(309/391), ICU 18.67%(73/391) และ OPD 2.30%(9/391)ตามลำดับ



รูปที่ 1 ร้อยละของเชื้อ CRE ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละปี แยกตามชนิดของเชื้อ

ในการศึกษาการใช้ mCIM และ eCIM เพื่อหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในตัวอย่างเชื้อที่ทราบข้อมูลยีนดื้อยา ผลการทดสอบเชื้อ *E. coli, K. pneumoniae, E. cloacae* และ *P. aeruginosa* จำนวน 6, 11, 2 และ 3 สายพันธุ์ตามลำดับ พบว่า เชื้อ *E. coli* ทั้ง 6 สายพันธุ์ให้ผลกับการทดสอบ mCIM และ eCIM เป็นบวกทั้งหมด เชื้อ *K. pneumonia* ที่มียีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ทั้ง 10 สายพันธุ์ให้ผล mCIM เป็นบวกทั้งหมด แต่ให้ผล eCIM เป็นบวกจำนวน 9 สายพันธุ์และผลลบจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยเชื้อ 2 ใน 10 สายพันธุ์นี้มียีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ OXA48-like เชื้อ *E. cloacae* จำนวน 2 สายพันธุ์แต่ให้ผล eCIM เป็นบวกและลบอย่างละ 1 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ไม่พบยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้ผลการทดสอบ mCIM เป็นลบทั้งหมด จากการศึกษาพบว่า mCIM มี sensitivity และ specificity เท่ากับ 100% ส่วน eCIM มี sensitivity 100% และ specificity 66.67%(ตารางที่ 1)

ผลการใช้ mCIM และ eCIM ทำการทดสอบเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ที่ให้ผลดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem จำนวน 63 สายพันธุ์ พบว่า ให้ผล mCIM เป็น บวก จำนวน 45 สายพันธุ์ (71.43%) และผล ลบ จำนวน 12 สายพันธุ์ (28.57%) และเมื่อนำเชื้อที่ให้ผล mCIM เป็น บวก จำนวน 45 สายพันธุ์มาทำการทดสอบต่อด้วย eCIM พบว่าให้ผล eCIM เป็น บวก จำนวน 37 สายพันธุ์(58.73%) และให้ผล eCIM เป็น ลบ จำนวน 8 สายพันธุ์ (12.70%)(ตารางที่ 2) แสดงถึงการที่เชื้อส่วนใหญ่ที่ดื้อยา carbapenem ในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จะสร้างเอนไซม์ carbapenemase และเกินครึ่งเชื้อที่สร้างเอนไซม์นี้เป็นการสร้าง metallo beta-lactamase

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ mCIM และ eCIM เทียบกับผลทางจีโนไทป์ของเชื้อ 22 สายพันธุ์

Organisms	Gene encoding	Carbapenemase Producing Organisms			
		mCIM		eCIM	
		pos	neg	pos	neg
E. coli (n = 6)	NDM	5	-	5	-
	IMP	1	-	1	-
K. pneumoniae (n=11)	NDM	8	-	8	-
	OXA48-like	2	-	1	1
	non KPC, NDM, IMP, VIM and OXA48-like	-	1	-	-
E. cloacae (n = 2)	IMP	1	-	1	-
	OXA48-like	1	-	-	1
P. aeruginosa (n=3)	non KPC, NDM, IMP, VIM and OXA48-like	-	3	-	-

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ mCIM และ eCIM ในเชื้อกลุ่ม CRE และ CRPA ที่พบในห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จำนวน 63 สายพันธุ์

Organisms	Drug susceptibility testing			Carbapenemase Producing Organisms	
	ETP	IPM	MEM	mCIM	eCIM
Enterobacteriaceae					
E. coli (n = 10)	R	R	R	8	8
K. pneumoniae (n=22)	R	R	R	19	17
E. cloacae (n = 10)	R	R	R	10	4
P. aeruginosa (n=21)		R	R	8	8

การศึกษาจีโนไทป์จากผลการวิเคราะห์เชื้อดื้อยา carbapenem โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยวิธี PCR เป็นเชื้อ *K. pneumoniae, E. coli, E. cloacae* และ *P. aeruginosa* จำนวน 20, 23, 5 และ 15 สายพันธุ์ตามลำดับ(ตารางที่ 3) พบว่า เชื้อ CRE ทั้งหมด 48 สาย

พันธุ์มียีนเดี่ยว(single gene) ทีกำหนดการสร้าง NDM จำนวน 23สายพันธุ์(48%) และ OXA48-like จำนวน 11สายพันธุ์(23%) โดยเป็นเชื้อ *K. pneumonia* และ *E. coli* มียีนเดี่ยว(single gene) ทีกำหนดการสร้าง NDM จำนวน 11สายพันธุ์(55%) จาก 20 สายพันธุ์ และ 12 สายพันธุ์(53 %)จาก 23 สายพันธุ์ ตามลำดับ เชื้อที่พบยีนร่วม(combination gene) ชนิด NDM ร่วมกับ IMP ใน *E. coli* 1 สายพันธุ์ ยีน NDM ร่วมกับ OXA48-like ใน *K. pneumonia* และ *E. coli* เชื้อละ 1 สายพันธุ์(5% และ 4%) ตามลำดับ พบยีนเดี่ยวที่กำหนดการสร้าง IMPใน *E. cloacae* จำนวน 3 สายพันธุ์ พบยีนเดี่ยวที่กำหนดการสร้าง OXA48-like ใน *K. pneumoniae, E. coli* และ *E. cloacae* จำนวน 6, 4 และ 1 สายพันธุ์(30 %, 17 % และ 20 %) ตามลำดับ พบยีน OXA ใน *P. aeruginosa* จำนวน 1 สายพันุ์ และไม่พบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ทั้ง 5 ยีน ได้แก่ KPC, NDM, IMP, VIM และ OXA48-like ในเชื้อ *P. aeruginosa* จำนวน 10 สายพันธุ์จากทั้งหมด 15 สายพันธุ์ (67%)

ตารางที่ 3 การศึกษาจีโนไทป์ในเชื้อดื้อยา carbapenem จำนวน 63 สายพันธุ์

Carbapenem Resistant gene encoding	*ENTEROBACTERIACEAE* (n=48)	*Klebsiella pneumoniae* CRE (n=20)	*Escherichai coli* CRE (n=23)	*Enterobacter cloacae* CRE (n=5)	Carbapenem Resistant *P. aeruginosa* (n=15)
NDM	**23**	11	12	0	**3**
IMP	**5**	1	1	3	**1**
NDM + IMP	**2**	0	2	0	**0**
NDM + OXA48=like	**2**	1	1	0	**0**
OXA48-like	**11**	6	4	1	**1***
non KPC, NDM, IMP, VIM and OXA48-like	**5**	1	3	1	**10**

* พบเป็น OXA type

อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาอุบัติการณ์ของการพบเชื้อ CRE และลักษณะการดื้อยาของเชื้อในสิ่งส่งตรวจจากผู้ป่วยที่ส่งมาวินิจฉัย ณ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จ. นครสวรรค์ ย้อนหลัง 5 ปี ตั้งแต่ 1 มกราคม 2558 – 30 กันยายน 2562 พบการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นอย่าง

ต่อเนื่องสอดคล้องกับหลายๆการศึกษา [13-16] โดยในปี 2019 พบปริมาณเชื้อ CRE ที่ 4.34% CRPA 19.56 % พบปริมาณของเชื้อ *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E.cloacae* และเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae อื่นๆ เป็น 44.59%(33/74), 27.03%(20/74), 22.97%(17/74) และ 5.41%(4/74)ตามลำดับซึ่งพบว่ามีจำนวน *K. pneumoniae* สูงสุดในทุกการศึกษา [13-16] แต่หากเทียบสัดส่วนร้อยละของการดื้อยาในแต่ละเชื้อกลับพบว่า *E. cloacae* กลับมีร้อยละของการดื้อยาสูงที่สุดที่ 14.66% รองลงมาเป็น *K. pneumonia* ที่ 7.38% และ *E. coli* ที่ 2.41% เมื่อดูข้อมูลของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ (National Antimicrobial Resistance Surveillance, Thailand) [17] ในช่วงครึ่งปีแรกของปี 2019 พบว่าร้อยละของการดื้อยาในเขตบริการสุขภาพที่ 3 อันประกอบด้วยจังหวัดนครสวรรค์, กำแพงเพชร, พิจิตร, อุทัยธานีและชัยนาท มีร้อยละของเชื้อ *K. pneumonia* และ *E. coli* ชนิด non susceptible carbapenem เป็น 10.2% และ 2.4% ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษานี้ และเชื้อ CRE ที่พบมีมีมากในหอผู้ป่วยทั่วไปมากกว่าหอผู้ป่วยหนักเช่นเดียวกับหลายๆการศึกษา [13,15-6]

ในการทดสอบหาเชื้อที่สร้าง carbapenemase ด้วยวิธี mCIM และ eCIM จากเชื้อที่ทราบยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จำนวน 22 สายพันธุ์พบว่า mCIM ให้ผล sensitivity และ specificity ที่ 100% แสดงถึงสมรรถนะที่ดีของวิธีการตรวจนี้ตามที่ CLSI ได้แนะนำ[11] ในขณะที่ eCIM ให้ผล sensitivity ที่ 100% และ specificity ที่ 66.67% ซึ่งผล specificity ที่น้อยลงเกิดจาก false-positive ของเชื้อ *K. pneumonia* จำนวน 1 สายพันธุ์ที่มียีนที่กำหนดการสร้าง OXA48-like ร่วมกับ TEM, SHV และ CTX-M คาดว่าอาจเกิดจากการสร้างเอนไซม์ ESBL ที่มีปริมาณสูงมาก

การทดสอบหาเอนไซม์ carbapenem ด้วยวิธี mCIM และ eCIM จากตัวอย่างเชื้อดื้อยา carbapenem ที่แยกได้ในช่วงปี 2015 -2019 จำนวน 63 สายพันธุ์ ให้ผล mCIM เป็นบวก 71.43% (45/63) แสดงถึงการพบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ของตัวเชื้อในปริมาณที่สูงจากการจำแนกเชื้อดื้อยาด้วยวิธี disc diffusion ที่ให้ผลดื้อยาในกลุ่ม carbapenem อันได้แก่ Ertapenem, Imipenem และ Meropenem โดยเชื้อที่ให้ผล mCIM เป็นลบ น่าจะใช้กลไกการดื้อยาอย่างอื่นเช่น porin loss หรือ efflux pump หรืออาจเป็นยีนชุดอื่นที่การตรวจด้วยวิธี PCR นี้ยังไม่ครอบคลุม ส่วนผลการศึกษา eCIM ตามที่ CLSI แนะนำ[11] จะทำการตรวจและแปลผลเฉพาะที่ให้ผล mCIM เป็นบวกจำนวน 45 สายพันธุ์เท่านั้น โดยพบ eCIM ให้ผลบวก 82.22%(37/45) แสดงให้เห็นว่า carbapenemase ที่เชื้อต่างๆสร้างนั้นส่วนใหญ่เป็น Metallo beta-latamase ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการกระจายของยีนที่พบที่ส่วนใหญ่จะเป็นยีนที่กำหนดการสร้าง carbapenemase Ambler class B โดยเฉพาะsingle gene ที่กำหนดการสร้าง NDM ในเชื้อที่ระบาดในโรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์มีปริมาณ 41.27%(26/63)เช่นเดียวกับโรงพยาบาลหลายๆแห่งในประเทศไทย[13-4,18]

สรุปผลการศึกษา

โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์มีการเพิ่มขึ้นของเชื้อดื้อยากลุ่ม carbapenem อย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2019 พบเชื้อดื้อยากลุ่ม CRE ร้อยละ4.34 เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวนมากที่สุด 33 สายพันธุ์ แต่สัดส่วนการดื้อยาในเชื้อแต่ละชนิดพบ *E. cloacae* มีการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ร้อยละ 14.66 และพบเชื้อ CRPA ร้อยละ 19.56

mCIM และ eCIM มีประสิทธิภาพดีและเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทดสอบหาเชื้อดื้อยาที่มีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยมี sensitivity กับ specificity เป็น 100%ในการทดสอบด้วย mCIM สอดคล้องกับการวินิจฉัยทางจีโนไทป์ซึ่งพบว่าเชื้อที่พบส่วนใหญ่มีการสร้างเอนไซม์ metallo beta-lactamase จากการกำหนดการสร้างของยีน NDM

ข้อเสนอแนะ

วิธีการวิเคราะห์เชื้อดื้อยา CRE และ CRPA ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ทางจีโนไทป์แม้จะมีข้อดีคือมี sensitivity และ specificity ที่ดี ให้ผลการทดสอบที่มีความละเอียดถูกต้อง และนำไปใช้ประโยชน์ด้านระบาดวิทยาได้เป็นอย่างดี ก็มีข้อจำกัดคือทางโรงพยาบาลยังไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ได้เอง จำเป็นต้องนำส่งไปยังห้องปฏิบัติการภายนอก จึงทำให้ต้องใช้กระบวนการในการนำส่งใช้เวลารอผลจากห้องปฏิบัติการภายนอก ค่าใช้จ่ายที่สูง จำนวนการส่งที่ถูกจำกัด แต่การตรวจด้วยวิธี mCIM และ eCIM เป็นวิธีการตรวจที่ไม่ยุ่งยาก สามารถใช้อุปกรณ์และน้ำยาที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ ให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพโดยใช้เวลาเพียงข้ามคืน จึงน่าจะเป็นประโยชน์ทางระบาดวิทยา, การควบคุมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาและเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้ยาให้เหมาะสม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณาจารย์หลักสูตรเทคนิคการแพทย์เฉพาะทาง 16 หน่วยกิต สาขาจุลชีววิทยาคลินิก แขนงวิชาแบคทีเรียดื้อยา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความรู้และเป็นที่ปรึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ทนพ. เอกธง ลิ้มวีระประจักษ์ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก และทนพญ. ขวัญใจ เกตวงษ์ หัวหน้างานจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จ. นครสวรรค์ ที่ให้โอกาสในการเข้ารับการอบรมในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. Geneva, World Health Organization. Who. 2017.

2. ภาณุมาศ ภูมาศ, วิษณุ ธรรมลิขิตกุล, ภูษิต ประคองสาย, ตวง รัตน์โพธะ, อาทร ริ้วไพบูลย์, สุพล ลิมวัฒนานนท์. ผลกระทบด้านสุขภาพและเศรษฐศาสตร์จากการติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. วารสารวิจัยระบบสาธารณสุข [Internet]. 2555;6(3):352–60. Available from: http://kb.hsri.or.th/dspace/bitstream/handle/11228/3699

3. Meletis G, Vavatsi N, Sofiano D, Diza E . Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. Hippokratia. 2012;16:303–7.

4. Munoz-Price LS. *Acenetobacter* infection. N Eng J Med. 2008;358:1271-81.

5. Gniadek TJ, Simner PJ. Carbapenem-resistant non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. J Clin Microbiol 2016;54:1700-10.

6. Logan LK, Weinstein RA. 2017. The epidemiology of cabapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. J Infect Dis 215:S28-S36. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282.

7. Queenan AM. Carbapenemase: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007;20:440-58.

8. Canton R, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, et al. Rapid evolution and spred of carbapenemase among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2012;18:413-31.

9. Workneh M, Yee R, Simner PJ. Phenotypic Methods for Detection of Carbapenemase Production in Carbapenem-Resistant Organisms: What Method Should Your Laboratory Choose? Clin Microbiol Newsl [Internet]. 2019;41(2):11–22. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2019.01.001

10. Tamma PD, Opene BN, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae.* J Clin Micrebiol 2017;55:1046-55.

11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th informational supplement. M100S. Wayne, PA:CLSI;2019.

12. EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidermological importance. 2017: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PGFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf.

13. Arsheewa W. Prevalence of Carbapenemase Enzyme in Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* from Prapokklao Hospital in 2012 – 2013. J

Prapokklo Hosp Clin Med Educat Center 2016;33(4):314-25.

14. Rangsipanuratn W, Kanjanavas P, Suttiprapha M, Juntokull S, Promken S, Injun P et al. Detection of Carbapenemase-producing Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Isolated from patients in Samutprakan Hospital and Saraburi Hospital. The 7th Academic Science and Technology Conference 2019 :1051-7.

15. Piwpong C. Incidence of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Suratthani Hospital. Reg 11 Med J 2016;30(2): 1-12.

16. Sadsee P. The Prevalence of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae at Somdejphrachoataksinmaharaj Hospital, Tak. Journal of Bamrasnaradura Infectious Diseases Institute 2019;13(2):78-86.

17. National Antimicrobial Resistance Surveillance Center. สถานการณ์เชื้อดื้อยาประจำปี 2562 แยกตามเขตสุขภาพ (6 เดือน) [อินเตอร์เน็ต].2562[เข้าถึงเมื่อ 19 ธันวาคม 2562]. เข้าถึงได้จาก : http://narst.dmsc.moph.go.th/

18. Laolerd W, Akeda Y, Preeyanoon L, Ratthawongjirakul P, Santanirand P. Carbapenemase-Producing Carbapenem=Resistant *Enterobacteriaceae* from Bangkok, Thailand, and Their Detection by the Carba NP and Modified Carbapenem Inactivation Method Tests. Microbial Drug Resistace 2018;24(7):1006-1011.