



การเปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* ที่สร้าง
เอนไซม์คาร์บาพีนิเมสด้วยวิธี sCIM กับวิธี mCIM ในโรงพยาบาลสระบุรี
Comparison of sCIM and mCIM for Detection of Carbapenemase-producing
Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* in Saraburi Hospital

สิรินตรา จันทกุล¹, วัชรินทร์ รังษิภาณรัตน์^{2*}, กรวิภา วิกัยนภากุล², พชรี กัมมารเจษฎากุล²

¹กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรี สระบุรี 18000

²คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ 10540

Sirintra Juntokul¹, Watcharin Rangspanuratr^{2*}, Kornwipa Wikainapakul²,

Patcharee Kammarnjassadakul²

¹Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Saraburi Hospital, Saraburi 18000

²Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan 10540

*Email : watcharin.rang@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหา CPE (Carbapenemase-producing *Enterobacterales*) ทางพีโนไทป์ ด้วยวิธี Simplified carbapenem inactivation method (sCIM) และวิธี Modified carbapenem inactivation method (mCIM) จากเชื้อ CRE (Carbapenem-resistant *Enterobacterales*) ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลสระบุรี จำนวน 104 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับวิธีทางจีโนไทป์ (Multiplex PCR; polymerase chain reaction) วิธี sCIM พัฒนาวิธีทำมาจาก mCIM โดยการป้ายเชื้อบนแผ่นยา Imipenem โดยตรงแทนการบ่มเพาะเชื้อใน Trypticase soy broth ที่มีแผ่นยา Meropenem เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบความซุกของเชื้อ CRE ร้อยละ 1.38 จำแนกเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* และ *Escherichia coli* ร้อยละ 64.42 19.23 และ 16.35 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจหา CPE พบว่า ทั้ง 2 วิธี และวิธี Multiplex PCR ให้ผลบวกตรงกันทั้งหมด 103 สายพันธุ์ และผลลบตรงกันทั้งหมด 1 สายพันธุ์ สอดคล้องกันร้อยละ 100 (Cohen's kappa = 1.0, 95%CI = 1.0-1.0) จะเห็นว่าวิธี sCIM ทำได้ง่าย ลดขั้นตอนในการทำ สะดวก ลดต้นทุน และไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ แต่ต้องระมัดระวังเกี่ยวกับปริมาณเชื้อที่ป้าย ดังนั้นวิธี sCIM อาจมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก

คำสำคัญ : Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) คาร์บาพีนิเมส simplified carbapenem inactivation method (sCIM) modified carbapenem inactivation method (mCIM)



Abstract

This study aimed to compare the efficacy of phenotypic detection of CPE (carbapenemase-producing *Enterobacterales*) between simplified carbapenem inactivation method (sCIM) and modified carbapenem inactivation method (mCIM) comparable with genotypic method (multiplex PCR; polymerase chain reaction). The sCIM is based on the mCIM with the improvement of experimental procedures. Instead of 4-hours incubating the meropenem disk in trypticase soy broth medium, the organism was smeared directly onto the imipenem disk in the sCIM. The results revealed that the prevalence of CRE (carbapenem-resistant *Enterobacterales*) was 1.38%, classified as *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Escherichia coli* (64.42, 19.23, and 16.35%, respectively). Comparing the results of CPE detection, both methods and multiplex PCR showed 100% concordance with positive results for all 103 strains and negative results for 1 strain. (Cohen's kappa = 1.0, 95%CI = 1.0-1.0). Thus, the sCIM is easy to perform, reducing the step to make it more convenient, cost-effective, and does not require special tools, however, the amount of bacterial load has been carefully considered. Therefore, the sCIM may be suitable for routine use in clinical microbiology laboratories.

Keywords : Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), carbapenemase, simplified carbapenem inactivation method (sCIM), modified carbapenem inactivation method (mCIM)

บทนำ

ปัจจุบันการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและยังคงเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขในหลายประเทศทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย จากรายงานในภาพรวมทั่วโลก พบว่า มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากการติดเชื้อดื้อยาประมาณ 700,000 รายต่อปี และหากไม่เร่งแก้ไขปัญหาดังกล่าว คาดว่าใน ปี พ.ศ. 2593 จำนวนผู้เสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาจะสูงถึง 10 ล้านคน โดยประเทศในทวีปเอเชียจะมีคนเสียชีวิตมากที่สุด คือ 4.7 ล้านคน คิดเป็นผลกระทบทางเศรษฐกิจสูงถึงประมาณ 3.5 พันล้านล้านบาท สำหรับในประเทศไทย พบว่า มีการเสียชีวิตจากเชื้อดื้อยาประมาณ 38,000 รายต่อปี คิดเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจโดยรวมสูงถึง 4.2 หมื่นล้านบาท⁽¹⁾

Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) เป็นเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ (Family) *Enterobacteriaceae* และวงศ์อื่น ๆ ในลำดับ (Order) *Enterobacterales* ที่พบในลำไส้และดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ (Carbapenems) ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยไม่รวมการดื้อยาตามธรรมชาติ (Intrinsic resistance) ได้แก่ ยา Imipenem, Meropenem, Ertapenem และ Doripenem ซึ่งเป็นยาต้านสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยา จากรายงานการจัดลำดับความสำคัญของเชื้อดื้อยาขององค์การอนามัยโลก พบว่า มีแบคทีเรียดื้อยาหลายกลุ่มที่ต้องการยาต้านจุลชีพขนานใหม่ในการรักษาโดยเร็วที่สุดหรือเรียกว่า Superbug แพร่กระจายทั่วโลก 12 ชนิด โดย CRE จะจัดอยู่ในกลุ่มรุนแรงระดับวิกฤติ (Critical)⁽²⁾ กลไกการดื้อยามีหลายกลไก ได้แก่ 1) การสร้าง



เอนไซม์คาร์บาพีนิเมส (Carbapenemase) ทำลายโครงสร้างของยาบริเวณ Beta-lactam ring ทำให้ยาเสียสภาพ 2) การสร้างเอนไซม์ AmpC-type beta-lactamase ร่วมกับการกลายพันธุ์ที่โปรตีนพอริน (Porin mutation) บริเวณผนังเซลล์ชั้นนอก (Outer membrane) ทำให้ลดการผ่านของยาเข้าสู่เซลล์ และ 3) การขับยาออกนอกเซลล์ผ่านการทำงานของ Efflux pump ชนิด AcrAB-TolC RND system⁽³⁾ การสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมสเป็นกลไกสำคัญที่พบบ่อยที่สุดและต้องเฝ้าระวัง เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์อยู่บนพลาสมิด (Plasmid) ทำให้มีการถ่ายทอดระหว่างแบคทีเรียและแพร่กระจายได้ง่าย ดังนั้น จึงมีการเรียกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CRE ที่มีการสร้างเอนไซม์นี้ว่า Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) และไม่สร้างเอนไซม์แต่ดื้อยาด้วยกลไกอื่นว่า Non-carbapenemase-producing *Enterobacterales* (Non-CPE)

เอนไซม์คาร์บาพีนิเมสถูกจัดกลุ่มตามโครงสร้างโมเลกุล (Molecular classification หรือ Ambler classification) เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ Serine carbapenemase (ประกอบด้วย Class A, D) และ Metallo-beta-lactamase (MBL ประกอบด้วย Class B) โดยเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ Class A ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), Class B ได้แก่ New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM), imipenem-resistant phenotype (IMP), Verona integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM) และ class D ได้แก่ Oxacillinase-type carbapenemase (OXA-type)^(3,4) จากรายงานของระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาระดับชาติ ปี ค.ศ. 2016 พบรายงานอุบัติการณ์ CRE ในประเทศไทยร้อยละ 17.5 (237/1358) และเป็น CPE ที่สร้างเอนไซม์ชนิด NDM มากที่สุดถึงร้อยละ 86.5 (205/237)⁽⁵⁾

การตรวจหา CRE ประกอบด้วยการเพาะเชื้อจากสิ่งส่งตรวจ การทดสอบทางชีวเคมีและการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มคาร์บาพีเนมส์ โดยวิธี Disk diffusion หรือการหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) จากนั้น ถ้าพบว่าเชื้อดื้อยา จะนำเชื้อมาตรวจว่าเป็น CPE ด้วยวิธีทางพีโนไทป์และทางจีโนไทป์ วิธีทางพีโนไทป์ประกอบด้วย 3 หลักการ ได้แก่ 1) Growth-based assay ร่วมกับ Disk diffusion โดยดูการเจริญของเชื้อที่ไวต่อยาในสถานะมียาที่ถูกสลายด้วยเอนไซม์ ได้แก่ Modified Hodge test, Modified carbapenem inactivation method (mCIM) 2) Hydrolysis method โดยดูการสลายยาและตรวจหาผลผลิต ได้แก่ Carba NP test และ Matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) 3) Lateral flow immunoassay โดยใช้หลักการจับของแอนติบอดีที่จำเพาะ และวิธีทางจีโนไทป์ เป็นวิธีมาตรฐาน (Gold standard) ที่ศึกษาระดับดีเอ็นเอ ได้แก่ Polymerase chain reaction (PCR), Microarray และ Whole genome sequencing⁽⁴⁾ วิธีทางพีโนไทป์วิธีแรกที่ได้รับการรับรองให้เป็นวิธีตรวจหาเชื้อ CRE ว่าเป็น CPE หรือไม่ (Suspected CPE) ใน Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) ตั้งแต่ ค.ศ. 2009-2017 ได้แก่ Modified Hodge test แต่ภายหลังพบว่าวิธีนี้มีความไวสูงในการตรวจหาเอนไซม์ชนิด KPC, VIM, IMP และ OXA-48 เท่านั้น แต่มีความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์ชนิด NDM, MBL และ OXA-type บางชนิด มีผลบวกปลอมและการอ่านผลบวกไม่ชัดเจน จึงไม่ได้รับการรับรองตั้งแต่ CLSI 2018 เป็นต้นมา⁽⁶⁾ ในปี ค.ศ. 2012 Nordmann et al⁽⁷⁾ เสนอวิธี Carba NP และได้รับการรับรองเป็นวิธีตรวจหา Suspected CPE ใน CLSI 2017-ปัจจุบัน วิธีนี้มีความไวร้อยละ 75-100 แต่มีความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์ OXA-48 และ Class A บางชนิด วิธีนี้ใช้หลักการ Imipenem hydrolysis/colorimetric microtube assay จึงมีปัญหาด้านการเตรียมสารละลายที่ยุ่งยาก ยามาตรฐาน Imipenem มีราคาแพง แต่ไม่เสถียร



ไม่สามารถเก็บได้เป็นเวลานาน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งจึงไม่สะดวกต่องานประจำ ในปี ค.ศ. 2015 Zwaluw et al⁽⁸⁾ เสนอวิธี Carbapenem inactivation method (CIM) ในการตรวจหา CPE และถูกดัดแปลงวิธีทำเมื่อปี ค.ศ. 2017 โดย Pierce et al⁽⁹⁾ เป็น Modified carbapenem inactivation method (mCIM) และได้รับการรับรองให้เป็นวิธีตรวจหา Suspected CPE ใน CLSI 2017-ปัจจุบัน⁽¹⁰⁾ วิธีนี้มีการบ่มเพาะเชื้อ CRE ในอาหารเหลวที่มีแผ่นยาากลุ่มคาร์บาเพนิมส์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนนำแผ่นยามาทดสอบต่อกับเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานด้วยหลักการ Disk diffusion ที่ทำได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป และเมื่อปี ค.ศ. 2018 Jing et al⁽¹¹⁾ ได้พัฒนาการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนิมจากวิธี mCIM โดยการป้ายเชื้อบนแผ่นยาากลุ่มคาร์บาเพนิมส์โดยตรงแทนการบ่มเพาะเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เรียกว่า วิธี Simplified carbapenem inactivation method (sCIM) และพบว่าให้ผลสอดคล้องกับวิธี PCR คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาวิธี sCIM เปรียบเทียบกับวิธี mCIM ในการตรวจหา CPE จาก CRE ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลสระบุรี โดยใช้วิธี PCR เป็นวิธีมาตรฐาน ซึ่งถ้าได้ผลดี อาจมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการตรวจหา CPE ทางพีโนไทป์ด้วยวิธี sCIM และวิธี mCIM จากเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลสระบุรี โดยใช้วิธี Multiplex PCR เป็นวิธีมาตรฐาน

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง เชื้อ CRE ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดเลือด เสมหะ หนอง และปัสสาวะ ของผู้ป่วยที่รักษาตัวในหอผู้ป่วยโรงพยาบาลสระบุรี ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2561 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563 จำนวน 104 สายพันธุ์ ทำการพิสูจน์ชนิดของเชื้อในระดับจิ้นส์ (Genus) และสปีชีส์ (Species) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ VITEK 2 Compact (Biomérieux, France) และทดสอบว่าติดต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิมส์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ได้แก่ Meropenem, Imipenem และ Ertapenem (Oxoid, UK) โดยวิธี Standard disk diffusion และแปลผลตาม CLSI 2017 guideline⁽¹⁰⁾

วิธีการวิจัย

1. การตรวจหา CPE ทางพีโนไทป์ด้วยวิธี mCIM⁽⁹⁻¹⁰⁾ ใช้หลักการ Meropenem disk inactivation โดยใช้ลูป (Loop) ขนาด 1 ไมโครลิตร หยดเชื้อ CRE ที่เพาะบน Blood agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาละลาย (Suspend) ใน Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้ Forceps ปราศจากเชื้อคืบแผ่นยา Meropenem (Oxoid, UK) ใส่ในหลอด โดยกดให้จมในอาหารทั้งแผ่นยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศปกติเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ± 15 นาที

เตรียมเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 (สายพันธุ์มาตรฐานที่ไวต่อยา Meropenem) ที่ได้จากการเพาะบน Blood agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Direct colony suspension โดยใช้ลูปหยดเชื้อลงในน้ำเกลือปกติ (Normal saline) ปราศจากเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 จากนั้น ใช้ไม้พันสำลี



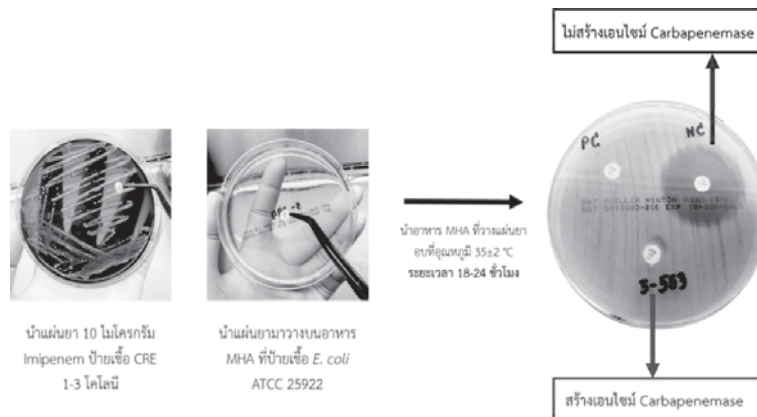
ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อและป้ายบนผิวหน้าอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA, Oxoid, UK) 3 ระบาย ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-10 นาที ใช้ลูปขนาด 10 ไมโครลิตรเชยแผ่นยา Meropenem ขึ้นมาจาก TSB ที่บ่มครบตามเวลา และพักวางที่ผนังด้านในของหลอดเพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เกินออกไป จากนั้นใช้ Forceps คีบมาวางบนผิวหน้าอาหาร MHA ที่เพาะเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศปกติเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 6-15 มิลลิเมตร หรือ 16-18 มิลลิเมตรที่มีโคโลนีขนาดเล็ก (Pinpoint colonies) ภายในวงใส แสดงว่า เชื้อที่ทดสอบมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส (Carbapenemase production positive) และถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ≥ 19 มิลลิเมตร แสดงว่า เชื้อที่ทดสอบไม่มีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส (Carbapenemase production negative) แต่ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 16-18 มิลลิเมตร หรือมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 19 มิลลิเมตร แต่มีโคโลนีขนาดเล็กภายในวงใส ไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส (Indeterminate)

2. การตรวจหา CPE ทางพีโนไทป์ด้วยวิธี sCIM⁽¹¹⁾ ใช้หลักการ Imipenem disk inactivation โดยเตรียมเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยวิธี Direct colony suspension เช่นเดียวกับวิธี mCIM จากนั้น ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อและป้ายบนผิวหน้าอาหาร MHA 3 ระบาย ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-10 นาที จากนั้นใช้ Forceps ปราศจากเชื้อคีบแผ่นยาทดสอบ Imipenem 10 ไมโครกรัม นำมาป้ายเชื้อ CRE ที่เพาะเลี้ยงบน Blood agar ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จำนวน 1-3 โคโลนี นำมาวางคว่ำลงบน MHA (โดยให้ด้านที่มีเชื้อที่ต้องการทดสอบสัมผัสกับบริเวณผิวหน้าของ MHA) ที่ป้ายเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศปกติเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง (รูปที่ 1)

การอ่านผล โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 6-20 มิลลิเมตร หรือ 21-22 มิลลิเมตรและมีโคโลนีขนาดเล็ก (Pinpoint colonies) ภายในวงใส แสดงว่า เชื้อที่ทดสอบมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส และถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ≥ 26 มิลลิเมตร แสดงว่า เชื้อที่ทดสอบไม่มีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส แต่ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 23-25 มิลลิเมตร ไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส (Indeterminate)

3. การควบคุมคุณภาพการทดสอบ ใช้ *Klebsiella pneumoniae* ที่มียืนควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัสชนิด *bla*_{NDM} ซึ่งได้รับการตรวจยืนยันจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็นเชื้อควบคุมผลบวก และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุมผลลบ และควบคุมคุณภาพแผ่นยาด้านจุลชีพ



รูปที่ 1 การทดสอบหา CPE ทางพีโนไทป์ด้วยวิธี sCIM; PC: positive control, NC: negative control, 5-583: CRE ให้ผลบวก สรุปเป็น CPE

4. การตรวจหาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส ใน CRE ทางจีโนไทป์ด้วยวิธี multiplex PCR โดยส่งตัวอย่างเชื้อ CRE จำนวน 104 สายพันธุ์ เพื่อตรวจหาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินิมัส ด้วยวิธี Multiplex PCR 5 ชนิด ได้แก่ bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{KPC} และ bla_{VIM} ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในโครงการพัฒนาระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพระดับชาติสู่ระดับโลก (Enhancing Incorporation of Global and National Antimicrobial Resistance Surveillance; EIGNA)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์และสรุปข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ จำนวนและร้อยละ
2. วิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธีทางพีโนไทป์ในการตรวจหา CPE ด้วยวิธี sCIM และวิธี mCIM ของเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลสระบุรี เทียบกับวิธีมาตรฐาน Multiplex PCR โดยคำนวณค่าความไวในการทดสอบ (Sensitivity) และความจำเพาะในการทดสอบ (Specificity)
3. วิเคราะห์ความสอดคล้องของผลการตรวจระหว่าง 2 วิธี ด้วยสถิติ Cohen's kappa และ 95% Confidence interval (CI)
4. วิเคราะห์ความแตกต่างของผลการตรวจระหว่าง 2 วิธี ด้วยสถิติ McNemar test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่รักษาตัวในหอผู้ป่วยของโรงพยาบาลสระบุรี ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2561 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563 พบเชื้อ *Enterobacterales* ทั้งหมด 7,485 สายพันธุ์ เป็นเชื้อ CRE 104 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.39 โดยพบการติดเชื้อจากหอผู้ป่วยอายุรกรรมมากที่สุด ร้อยละ 65.39 รองลงมาคือ หอผู้ป่วยศัลยกรรม หอผู้ป่วยหนักอายุรกรรม หอสูติ-นรีเวชกรรม และหอกุมารเวชกรรม คิดเป็นร้อยละ 20.19, 9.62, 2.89 และ 1.92 ตามลำดับ เมื่อแยกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ พบการติดเชื้อ CRE จากปัสสาวะ



มากที่สุด ร้อยละ 51.92 รองลงมาคือ เสมหะ เลือด และหนอง คิดเป็นร้อยละ 25.96, 14.42 และ 7.69 ตามลำดับ ผลการทดสอบทางชีวเคมีพบเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* มากที่สุด ร้อยละ 64.42 รองลงมา ได้แก่ เชื้อ *Enterobacter cloacae* และเชื้อ *Escherichia coli* คิดเป็นร้อยละ 19.23 และ 16.35 ตามลำดับ

ผลการตรวจหาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพิเนมโดยวิธี Multiplex PCR พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพิเนมจากเชื้อ CRE 103 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 99.04 และตรวจไม่พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพิเนม 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 0.96 โดยพบยีน bla_{NDM} มากที่สุด ร้อยละ 64.08 (66/103) จำแนกเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* พบยีน bla_{NDM} ร้อยละ 29.13 (30/103) ยีน $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 33.01 (34/103) และยีน $bla_{NDM}+bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 2.91 (3/103) เชื้อ *E. coli* พบยีน bla_{NDM} ร้อยละ 12.62 (13/103) ยีน $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 0.97 (1/103) และยีน $bla_{NDM}+bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 2.91 (3/103) และเชื้อ *E. cloacae* พบยีน bla_{NDM} ร้อยละ 16.51 (17/103), $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 1.94 (2/103) และพบเชื้อ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ ตรวจไม่พบยีน bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{KPC} และ bla_{VIM}

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหา CPE ด้วยวิธี sCIM และวิธี mCIM พบว่า ให้ผลตรงกันทั้งหมด 104 สายพันธุ์ สอดคล้องกัน ร้อยละ 100 โดยให้ผลบวกตรงกันทั้งหมด 103 สายพันธุ์ และผลลบตรงกันทั้งหมด 1 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเทียบกับวิธี Multiplex PCR พบว่า ให้ผลบวกตรงกันทั้งหมด 103 สายพันธุ์ และผลลบตรงกันทั้งหมด 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) แสดงว่า ทั้งวิธี sCIM, mCIM และ Multiplex PCR ให้ผลการทดสอบ สอดคล้องกันร้อยละ 100 (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เชื้อ CRE และผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาร์บาพิเนมทางจีโนไทป์ (Multiplex PCR) และฟีโนไทป์ (mCIM, sCIM)

เชื้อ CRE (จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมด)	ยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์	ผลบวกการทดสอบทางจีโนไทป์	ผลการทดสอบทางฟีโนไทป์			
			mCIM+	mCIM-	mCIM+	mCIM-
			sCIM+	sCIM+	sCIM-	sCIM-
Multiplex PCR						
<i>K. pneumoniae</i> (67)	<i>bla</i> _{NDM}	30	30	0	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	34	34	0	0	0
	<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{OXA-48-like}	3	3	0	0	0
<i>E. coli</i> (17)	<i>bla</i> _{NDM}	13	13	0	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-48}	1	1	0	0	0
	<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{OXA-48-like}	3	3	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (19)	<i>bla</i> _{NDM}	17	17	0	0	0
	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	2	2	0	0	0
<i>E. cloacae</i> (1)	-	0*	0	0	0	1
รวม (104)		103	103	0	0	1

หมายเหตุ : *ไม่พบยีนดื้อยา bla_{NDM} , $bla_{OXA-48-like}$, bla_{IMP} , bla_{KPC} และ bla_{VIM}



ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจหา CPE ด้วยวิธี mCIM และ sCIM

การตรวจ CPE ทางพีโนไทป์	ร้อยละความไว (95%CI)	ร้อยละความจำเพาะ (95%CI)
mCIM	100 (96.5-100)	100 (2.5-100)
sCIM	100 (96.5-100)	100 (2.5-100)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

ผลการตรวจหาเชื้อ CRE ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรี ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2561 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2563 พบจำนวน 104 สายพันธุ์ คิดเป็น ร้อยละ 1.39 ซึ่งเป็นอัตราที่ต่ำกว่ารายงานความชุกของ CRE ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ระหว่าง พ.ศ.2559-2560 ที่พบสูงถึง ร้อยละ 45.50⁽¹²⁾ เมื่อจำแนกตามสิ่งส่งตรวจ พบว่า แยกเชื้อได้จากปัสสาวะมากที่สุด ร้อยละ 51.92 สอดคล้องกับการศึกษาจากโรงพยาบาลราชวิถีและโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ที่แยกเชื้อ CRE ได้จากปัสสาวะมากที่สุด ร้อยละ 48.3 และ 38.9⁽¹²⁾ และโรงพยาบาลพิจิตร ร้อยละ 56.8⁽¹³⁾ ผลการจำแนกชนิดเชื้อพบ *K. pneumoniae* มากที่สุด ร้อยละ 64.42 รองลงมา ได้แก่ *E. cloacae* และ *E. coli* สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* เป็นเชื้อ CRE ที่พบมากที่สุดจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วย⁽¹²⁻¹⁵⁾ เมื่อจำแนกตามหอผู้ป่วย พบการติดเชื้อจากหอผู้ป่วยอายุรกรรมมากที่สุด ร้อยละ 65.39 สอดคล้องกับการศึกษาของโรงพยาบาลพิจิตร ทั้งนี้ ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ CRE ในโรงพยาบาล ได้แก่ ระยะเวลาในการนอนโรงพยาบาล การสอดใส่อุปกรณ์เข้าสู่ร่างกาย และผลของการรักษาว่าผู้ป่วยอาการดีขึ้นหรือเสียชีวิต⁽¹³⁾

ผลการตรวจหาชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินีเมสโดยวิธี Multiplex PCR พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินีเมสจากเชื้อ CRE ถึง ร้อยละ 99.04 และตรวจไม่พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาพินีเมส 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 0.96 โดยพบยีน *bla_{NDM}* มากที่สุด รองลงมา ได้แก่ *bla_{OXA-48-like}* และ 2 ชนิดรวมกัน ได้แก่ *bla_{NDM+OXA-48-like}* และพบเชื้อ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ ตรวจไม่พบยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ แสดงว่า เชื้อน่าจะดื้อยาด้วยกลไกอื่น ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ AmpC-type beta-lactamase ร่วมกับการกลายพันธุ์ที่โปรตีนพอริน หรือการขับยาออกนอกเซลล์ผ่านการทำงานของ Efflux pump ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานของโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์⁽¹²⁾ โรงพยาบาลรามธิบดีและโรงพยาบาลอีกหลายแห่งในเขตกรุงเทพมหานคร⁽¹⁴⁾ และโรงพยาบาลพระปกเกล้า จันทบุรี⁽¹⁵⁾

การตรวจหา CPE ด้วยวิธีทางพีโนไทป์ที่สามารถปฏิบัติได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไปและได้รับการรับรองจาก CLSI ได้แก่ วิธี Carba NP และ mCIM ปัจจุบันพบว่าวิธี mCIM เป็นวิธีที่ให้ผลถูกต้อง สอดคล้องกับวิธีทางจีโนไทป์ วิธีการไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ค่าใช้จ่ายไม่แพงเมื่อเทียบกับ Carba NP เพราะมีเพียงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และแผ่นยา Meropenem ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ แต่มีข้อจำกัดคือ ต้องมีขั้นตอนการบ่มเชื้อกับแผ่นยาเป็นเวลานานถึง 4 ชั่วโมง Jing et al.⁽¹¹⁾ จึงพัฒนาการตรวจจากวิธี mCIM เรียกว่า Simplified



carbapenem inactivation method (sCIM) ทั้ง 2 วิธีใช้หลักการ Growth-based assay ร่วมกับ Disk diffusion โดยถ้าเป็น CPE เชื้อจะสร้างเอนไซม์สลายยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมส์ ทำให้ยาไม่สามารถไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ปกติไวต่อยาได้ แต่ sCIM ใช้การป้ายเชื้อจากโคโลนีโดยตรงบนแผ่นยา Imipenem แทน Meropenem ทำให้ลดขั้นตอนการบ่มเชื้อ 4 ชั่วโมงออกไป โดยทดสอบเชื้อ *Enterobacteriales* 196 สายพันธุ์ นำมาทดสอบเทียบกับ mCIM และวิธี PCR ผลการทดสอบพบว่าวิธี sCIM สอดคล้องกับผลการทดสอบ PCR ร้อยละ 99.5 และวิธี mCIM ร้อยละ 100 คณะผู้วิจัยจึงสนใจนำวิธีนี้มาศึกษากับเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลสระบุรี พบว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลตรงกันทั้ง 104 สายพันธุ์ โดยให้ผลบวกตรงกัน 103 สายพันธุ์ และผลลบตรงกัน 1 สายพันธุ์ แสดงว่า วิธี sCIM และวิธี mCIM มีผลการทดสอบสอดคล้องกัน ร้อยละ 100 (Cohen's kappa = 1.0, 95%CI =1.0-1.0) และจากผลการทดสอบความไว และความจำเพาะของวิธี sCIM และวิธี mCIM เมื่อเทียบกับผลของการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนิมส์ด้วยวิธี Multiplex PCR พบว่า ไม่แตกต่างกัน โดยทั้งวิธี sCIM และวิธี mCIM มีความไวสูง ร้อยละ 100 (95% CI =96.5-100) และความจำเพาะสูง ร้อยละ 100 (95% CI = 2.5-100) และทั้ง 2 วิธียังให้ผลสอดคล้องอย่างสมบูรณ์ ร้อยละ 100 เมื่อเทียบกับผลการตรวจด้วยวิธี Multiplex PCR (Cohen's kappa = 1.0, 95%CI=1.0-1.0) จากข้อมูลผลการตรวจทั้ง 3 วิธี ที่สอดคล้องกันถึงร้อยละ 100 แต่ไม่สามารถคำนวณเพื่อแสดงค่า p-value ด้วยสถิติ McNemar chi-square ได้ เนื่องจากผลตรวจที่ได้จากทุกวิธีไม่แตกต่างกัน ดังนั้นสรุปได้ว่า ทั้ง 3 วิธี มีความสอดคล้องกันและไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างของเชื้อ CRE ที่มีเอนไซม์ชนิดอื่น และ CRE ที่ไม่ใช่ CPE เพื่อให้ผลความไวและความจำเพาะมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น และควรระมัดระวังเกี่ยวกับปริมาณเชื้อที่ป้ายบนแผ่นยาด้วย เนื่องจากมีรายงานว่า การป้ายเชื้อปริมาณ 1+ บนแผ่นยา Imipenem จะทำให้ sCIM มีความไวร้อยละ 97.0 (129/133) และความจำเพาะร้อยละ 100 (82/82) และเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น 2+ ความจำเพาะลดลงเป็นร้อยละ 57.3 (47/82) เนื่องจากเกิดผลบวกปลอมกับเชื้อที่มีเอนไซม์ AmpC และ extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) ในทางกลับกันถ้าไปป้ายเชื้อปริมาณ 1+ บนแผ่นยา Meropenem จะทำให้ sCIM มีความไวร้อยละ 78.2 (129/133) และความจำเพาะร้อยละ 100 (82/82) และเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อเป็น 2+ ความไวจะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 96.2 แต่ความจำเพาะลดลงเป็นร้อยละ 93.9⁽¹⁶⁾

วิธี mCIM และ sCIM มีข้อดีที่เหมือนกัน คือสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษหรือบุคลากรที่ต้องฝึกเฉพาะทาง แต่ข้อดีของวิธี sCIM คือ สามารถลดขั้นตอนและเวลาในการบ่มเพาะเชื้อใน TSB ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชั่วโมง ทำให้สามารถทำงานได้ง่าย สะดวกมากขึ้น และเมื่อคำนวณต้นทุนของวิธี mCIM พบว่า มีต้นทุนราคา 18.50 บาท เทียบกับวิธี sCIM ต้นทุนราคา 16.15 บาท ดังนั้น วิธี sCIM จึงมีต้นทุนที่ถูกกว่า เฉลี่ยตัวอย่างละ 2.35 บาท

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปว่า sCIM เป็นวิธีทางพีโนไทป์ที่ใช้ตรวจหา CPE ที่ให้ผลสอดคล้องกับวิธี mCIM และ Multiplex PCR เป็นวิธีที่ง่าย ลดขั้นตอน สะดวกและลดต้นทุน ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษหรือบุคลากรที่ต้องฝึกเฉพาะทาง แต่ต้องระมัดระวังเกี่ยวกับปริมาณเชื้อที่ป้ายบนแผ่นยา อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อที่มีเอนไซม์คาร์บาเพนิมส์ชนิดอื่นและเชื้อที่ดีด้วยกลไกอื่นเพิ่มเติม ถ้าผลความไวและความจำเพาะยังสอดคล้องกับวิธีมาตรฐาน อาจนำมาประยุกต์ใช้ในงานตรวจหา CPE จากเชื้อ CRE ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิกทั่วไป เพื่อนำผลที่ได้ไปสู่การกำหนดนโยบายในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลต่อไป



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก เจ้าหน้าที่ห้องจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลสระบุรีทุกท่านที่ช่วยกรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัยครั้งนี้จนทำให้ผลงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. กระทรวงสาธารณสุข กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560–2564 [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 13 เมษายน 2563]. เข้าถึงได้จาก: <http://narst.dmsc.moph.go.th/documentation/AMR%20strategy%202560-2564.pdf>
2. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotic [Internet]. 2017 [cited 2021 Apr 8]. Available from: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1
3. Suay-García B and Pérez-Gracia MT. Present and future of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) infections. Antibiotics [Internet]. 2019 [cited 2020 May 10]; 8,122-38. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-6382/8/3/122/htm>
4. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. J Clin Microbiol 2018;56(11):e01140-18.doi: 10.1128/JCM.01140-18.
5. วันทนา ปวีณกิตติพร. การพัฒนาระบบเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาระดับชาติและระดับโลก [อินเทอร์เน็ต]. 2559 [เข้าถึงเมื่อ 13 เมษายน 2563]. เข้าถึงได้จาก: http://nih.dmsc.moph.go.th/data/data/59/22_6/3.pdf
6. Al-Zahrani IA. Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. Saudi Med J 2018;39(9):861-72.
7. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2012;18(9):1503-7.
8. Zwaluw Kvd, Haan Ad, Gerlinde N, Bootsma HJ, Neeling A, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLOS ONE 2015;1-13. doi:10.1371/journal.pone.0123690.
9. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. The modified carbapenem inactivation method (mCIM) for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2017;55:2321–33.



10. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-seventh informational supplement. CLSI document M100-S29. Wayne, PA. 2017.
11. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, et al. The simplified carbapenem inactivation method (sCIM) for simple and accurate detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. *Front Microbiol* 2018;9(2391):1-7.
12. ศิริประภา มินาผล, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์, จิราภรณ์ นิลสกุล, มาตุตพงศ์ ปัญญา, ภาวนา พนมเขต. ความชุกของแบคทีเรียวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่ผลิตเอนไซม์ Carbapenemase ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2562;31:105-13.
13. สุกัญญา บัวชุม, ไพโรจน์ โจวตระกูล, สุชาดา วงพระจันทร์. ปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยา Carbapenem: CRE ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษานในโรงพยาบาลพิจิตร. *วารสารวิจัยและวิชาการสาธารณสุขจังหวัดพิจิตร* 2563;1:1-9.
14. Laolerd W, Akeda Y, Preeyanon L, Ratthawongjirakul P, and Santanirand P. Carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Bangkok, Thailand, and their detection by the Carba NP and modified carbapenem inactivation method tests. *Microb Drug Resist* 2018;24(7):1006-11.
15. วีวรรณ อาชีวะ. ความชุกของเอนไซม์ดื้อยากลุ่ม Carbapenems ที่แยกได้จากเชื้อดื้อยา Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ปี พ.ศ. 2555 - 2556. *วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิกโรงพยาบาลพระปกเกล้า* 2559;33(4):136-7.
16. Yamada K, Sasaki M, Murakami H, Aoki K, Morita T, Ishii Y. Evaluation of the simplified carbapenem inactivation method as a phenotypic detection method for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 20]; 1-5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106273>