



ความชุกของแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์

ศิริประภา มินาผล¹ สุรศักดิ์ เว่นรัมย์² จิราภรณ์ นิลสกุล³ มารุตพงศ์ ปัญญา² และ ภาวนา พนมเขต^{2*}

Received: November 15, 2018

Revised: January 14, 2019

Accepted: February 4, 2019

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งกลุ่มใหญ่ สมาชิกในวงศ์นี้เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์และบางชนิดเป็นเชื้อก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถก่อโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ การติดเชื้อในกระแสโลหิต อูจจาระร่วง และโรคติดเชื้อหลายระบบ มีรายงานพบสายพันธุ์ดื้อยาของแบคทีเรียในลำไส้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือการสอบสวนหาความชุกของแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม (carbapenemase resistant Enterobacteriaceae; CRE) และการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนม (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae; CPE) โดยการทดสอบทางฟิโนไทป์ที่แนะนำโดย CLSI เชื้อแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีจำนวนทั้งหมด 345 สายพันธุ์จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ระหว่าง กันยายน 2017 ถึง กันยายน 2018 ถูกนำมาศึกษาในครั้งนี้ เมื่อทดสอบด้วยแผ่นยาเออตาพีนตามเกณฑ์ CLSI เป็นเชื้อ CRE 157 สายพันธุ์ (ร้อยละ 45.50) ให้ผลบวกต่อการคัดกรอง CPE ด้วยวิธีให้ยาซึมผ่านในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แนะนำโดย EUCAST จำนวน 233 สายพันธุ์ (ร้อยละ 67.53) เชื้อ 233 สายพันธุ์ เหล่านี้ถูกนำมาตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมด้วยการทดสอบทางฟิโนไทป์และการหาความเข้มข้นต่ำสุดของยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมที่ยับยั้งเชื้อได้ การทดสอบ Modified Hodge test (MHT) บวก 120 สายพันธุ์ (ร้อยละ 51.50) และ modified carbapenem inactivation method (mCIM) บวก 135 สายพันธุ์ (ร้อยละ 57.94) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมที่ยับยั้งเชื้อได้อยู่ระหว่าง 0.125-128 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พิจารณาจากเกณฑ์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งเชื้อได้ตาม CLSI พบเชื้อดื้อยาเออตาพีน อิมิพีเนมและ เมอโรพีเนม คือ 122, 51 และ 87 สายพันธุ์ ตามลำดับ อุบัติการณ์ของเชื้อ CPE เป็นร้อยละ 39.13

คำสำคัญ: CRE, CPE, แบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี, คาร์บาพีเนม, Modified Hodge test, modified carbapenem inactivation method

¹ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเวชศาสตร์) วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

² วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 85 ถนนสกลมารค์ อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

³ หน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

* ผู้รับผิดชอบบทความ



The prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sapphasithiprasong Hospital

Siraprapa Minaphol¹, Surasak Wanram², Jiraporn Nilsakul³, Marutpong Punya² and Pawana Panomket^{2*}

Abstract

Family Enterobacteriaceae is a large family of Gram-negative bacilli bacteria. Several members in this family are enteric bacteria living in the intestines of animal and some members are pathogens. These bacteria can cause urinary tract infection, sepsis, diarrhea, and multi-system infection. There are several reports of the drug resistant strains in enteric bacteria. The aim of this study was to investigate the prevalence of carbapenemase-resistant Enterobacteriaceae (CRE) and to detect carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) by phenotypic tests recommended by CLSI. A total of 345 isolates of Enterobacteriaceae from patients admitted to Sapphasithiprasong Hospital between September 2017–September 2018 were included in this study. CRE were 157 isolates (45.50%) by tested ertapenem disk follow CLSI criteria. Using CPE screening disk diffusion method recommended by EUCAST, 233 isolates (67.53%) were CPE screening positive. They were further detected for carbapenemase production by phenotypic tests and determined for their carbapenem MICs. Of the 233 isolates, 120 (51.50%) isolates were Modified Hodge test (MHT)-positive and 135 (57.94%) isolates were modified carbapenem inactivation method (mCIM)-positive. The range of carbapenem MIC for the CPE isolates was 0.125-128 µg/mL. Carbapenem MICs interpreted using CLSI criteria presented resistance to ertapenem, imipenem and meropenem in 122, 51 and 87 isolates respectively. The prevalence of CPE was 39.13%.

Keywords: CRE, CPE, Enterobacteriaceae, Carbapenem, Modified Hodge test, Modified carbapenem inactivation method

¹ Master of Science, Biomedical Sciences, College of Medicine and Public Health, Ubon-Ratchathani University

² College of Medicine and Public Health, Ubon Ratchathani University

85 Sathollamark Rd. Warin Chamrap District, Ubon Ratchathani Province 34190, Thailand

³ Microbiology Laboratory, Sapphasithiprasong Hospital, Ubon Ratchathani Province 34190, Thailand

* Corresponding author (e-mail: pawana.p@ubu.ac.th)

บทนำ

แบคทีเรียวงค์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งที่มีสมาชิกหลายจีโนสจัดเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางจีโนสเป็นเชื้อก่อโรค ยาที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียในวงค์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี้ได้แก่ยาในกลุ่มเบต้า แลคแทม โดยเฉพาะยาด้านจุลชีพกลุ่มที่ออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum antimicrobials) เช่น extended-spectrum cephalosporins ซึ่งเป็นยาที่ใช้อย่างกว้างขวางในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจากแบคทีเรียในวงค์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี้ ยาในกลุ่มคาร์บาพีแนม (carbapenems) เป็นยาที่มีความสำคัญอีกกลุ่มหนึ่งที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อดังกล่าว และปัจจุบันก็พบเชื้อแบคทีเรียในวงค์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี้ที่ดื้อยาคาร์บาพีแนม (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae หรือ CRE) ได้ทั่วไปในหลายประเทศ⁽¹⁾ ประเทศไทยก็พบเชื้อมีดื้อดังกล่าวได้ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่⁽²⁾ กลไกหลักที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีแนมคือเชื้อสร้างเอนไซม์คาร์บาพีแนมเอส (carbapenemase) หรือเรียกว่า carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) เอนไซม์ carbapenemase มีหลายชนิด เช่น New Delhi metallo- β -lactamases (NDM), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), Verona integrin-encoded metallo- β -lactamases (VIM), Oxacillinase type carbapenemase (OXA), Imipenemase (IMP) metallo- β -lactamases เป็นต้น⁽¹⁾ วิธีที่ยอมรับสำหรับการตรวจยืนยันเอนไซม์คาร์บาพีแนมเอส ได้แก่ modified carbapenem inactivation method (mCIM) การทดสอบ Modified Hodge test (MHT) การทดสอบ Carba NP และการตรวจด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction; PCR) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการทราบความชุกของเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลขนาดใหญ่ เช่นโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ตลอดจนแนวโน้มของเชื้อ CRE ที่เป็น CPE ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อหน่วยงานควบคุมโรคติดเชื้อและการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาล ในการควบคุมป้องกันและลดการแพร่ระบาดของเชื้อต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรีย

เก็บเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ตั้งแต่เดือนกันยายน 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561 จากผู้ป่วยไม่ซ้ำราย วินิจฉัยเป็นเชื้อแบคทีเรียวงค์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี้ โดยการทดสอบทางชีวเคมี

2. การทดสอบความไวของแบคทีเรียวงค์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซี้ต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีแนม

2.1 วิธีมาตรฐานให้แผ่นยาที่มียาด้านจุลชีพที่ทราบปริมาณแน่นอนซึมลงไปในอาหาร (Standard disk diffusion)

เตรียมเชื้อโดยเพาะเลี้ยงบน Blood agar และเลือก 1 โคโลนี เลี้ยงใน Trypticase soy broth (Hardy Diagnostics Criterion, Santa Maria, USA) และปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อ และป้ายลงบนอาหาร Mueller Hinton agar (Hardy Diagnostics) จากนั้นวางแผ่นยาในกลุ่มคาร์บาพีแนม ดังนี้ เมอโรพิแนม (meropenem 10 μ g) เออตาพิแนม (ertapenem 10 μ g) และ อิมิปีแนม (imipenem 10 μ g) (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผลโดยวัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ แผ่นยา (inhibition zone) ควบคุมคุณภาพการทดลองโดยทดสอบยากับเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 วัดขนาดบริเวณโซนใสรอบๆ แผ่นยาอิมิปีแนม อยู่ในช่วง 26-32 มิลลิเมตร (mm) โดยใช้เกณฑ์การแปลผลตาม CLSI⁽⁴⁾ คัดเอาเฉพาะเชื้อที่มีโซนใสรอบแผ่นยาเมอโรพิแนม เออตาพิแนม และอิมิปีแนม น้อยกว่า 25 มิลลิเมตรตามเกณฑ์ EUCAST⁽⁵⁾

2.2 วิธีการทดสอบหาความเข้มข้นยาดำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (Minimum Inhibitory concentration ; MIC)

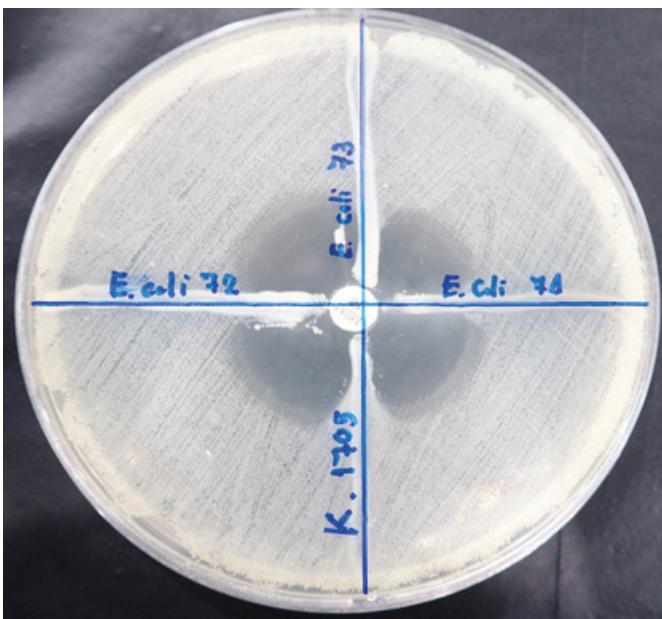
ทดสอบ MIC agar dilution โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาด้านจุลชีพกลุ่มคาร์บาพีแนม ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.01 - 128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ McFarland No. 0.5 ทำให้เจือจาง 10 เท่าและดูดเชื้อมา 10 ไมโครลิตร

เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/spot และ spot ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาความเข้มข้นต่างๆ และปล่อยให้เชื้อที่เติมลงไปแห้ง จากนั้นคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และอ่านผล ความเข้มข้นของจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของยาต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ *E. coli* ATCC 25922 เป็นสายพันธุ์อ้างอิงทดสอบ MIC โดยใช้เกณฑ์การแปลผลตาม CLSI⁽⁴⁾

3. การทดสอบเอนไซม์ carbapenemase

3.1 การทดสอบ MHT

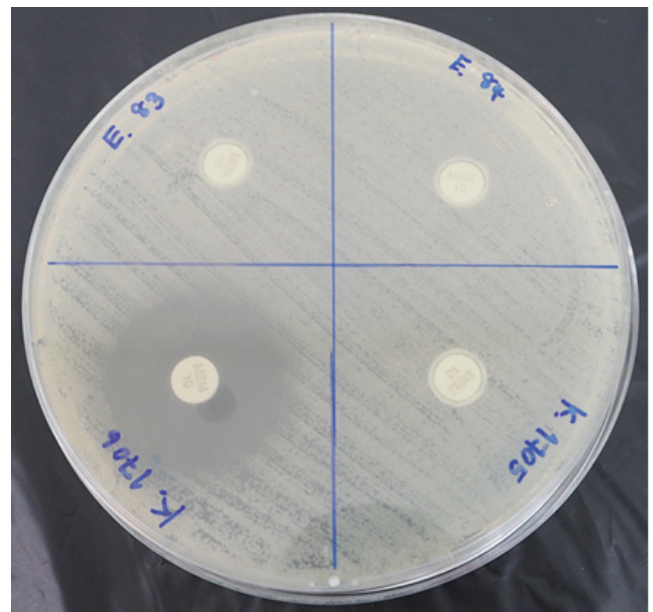
เตรียมเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และเชื้อทดสอบให้อยู่ในระยะ log phase ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 นำไม้พินสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มาระบาย (streak) ให้ทั่ว Mueller Hinton agar นำแผ่นยาเมอโรพิเนม ขนาด $10\ \mu\text{g}$ วางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไม้พินสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อทดสอบมาขีดจากขอบจานเข้าหาแผ่นยาดังรูปที่ 1 และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลบวกจะพบโซนใสเป็นรอยโค้งเข้าหาเชื้อทดสอบ⁽⁶⁾ เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 เป็นเชื้อควบคุมผลบวกและเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706 เป็นเชื้อควบคุมผลลบ



รูปที่ 1 การทดสอบ Modified Hodge test

3.2 การทดสอบ

ใช้โคโลนีของเชื้อ 1 ไมโครลิตร ลูป (μL loop) ผสมลงใน Trypticase soy broth 2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้ 10 นาที เติมน้ำยาเมอโรพิเนม (MEM) ขนาด 10 ไมโครกรัม นำส่วนผสมทั้งหมดบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ให้อยู่ในระยะ log phase ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ McFarland No. 0.5 นำไม้พินสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มาระบาย (streak) ให้ทั่ว Mueller Hinton agar และนำแผ่นยาเมอโรพิเนมที่บ่มกับเชื้อทดสอบมาวางบนจานอาหารดังกล่าว และบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล เกณฑ์แปลผลบวกคือ inhibition zone 6-15 mm หรือ inhibition zone 16-18 mm และมีโคโลนีเล็กๆ อยู่ภายใน zone⁽⁶⁾



รูปที่ 2 การทดสอบ Modified carbapenem inactivation method

ผลการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอี จำนวน 345 isolates เป็นเชื้อ CRE ตามเกณฑ์ CLSI จำนวน 157 isolates ร้อยละ 45.50 (157/345) และเมื่อคัดกรอง CPE ตามเกณฑ์ EUCAST ได้จำนวน 233 isolates (ร้อยละ 67.53) (233/345) เป็นเชื้อที่แยกได้จากเลือด เสมหะ

ปัสสาวะ หนอง จำนวน 37, 109, 66, และ 21 isolates ตามลำดับ ได้แก่เชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* และ *Klebsiella* spp. ดังแสดงในตารางที่ 1

เชื้อ 233 isolates ให้ผลบวกต่อการทดสอบ MHT จำนวน 120 isolates (ร้อยละ 51.50) และให้ผลบวกต่อการทดสอบ mCIM จำนวน 135 isolates (ร้อยละ 57.94) โดยมีผลบวกให้ zone จำนวน 13 isolates และตัวอย่างไม่ให้ zone รอบ MEM จำนวน 122 isolates จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกตรงกันทั้งสองวิธี จำนวน 120

isolates เชื้อที่ให้ผลบวกต่อ mCIM อย่างเดียว จำนวน 15 isolates และไม่มีเชื้อที่ให้ผลบวกต่อ MHT อย่างเดียว ดังแสดงในตารางที่ 1 เป็นเชื้อ CPE ร้อยละ 39.13 (135/345)

MIC ของเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ MHT และ mCIM ต่อยาเมอโรปีเนม เออตาปีเนม อิมิปีเนม โบอะปีเนม มีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.125-128, 0.125->128, 0.125->128 และ 0.125-64 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g/mL}$) ตามลำดับ การกระจายของ MIC แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 จำนวนและชนิดของเชื้อแบคทีเรียวงศ์เอนเทอโรแบคทีเรียซียีที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Modified Hodge test และ Modified carbapenem inactivation method

เชื้อ	จำนวน (isolates)	จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวก		จำนวนเชื้อที่ ให้ผลลบ
		ทั้งสองวิธี	เฉพาะ MHT เฉพาะ mCIM	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	156	70	- 9	77
<i>Escherichia coli</i>	68	44	- 3	21
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	3	- 1	-
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1	- 1	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1	- -	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	- -	-
<i>Klebsiella</i> spp.	1	-	- 1	-
Total	233	120	- 15	98

ตารางที่ 2 MIC ของเชื้อแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีฟิไลส์ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ Modified Hodge test และ Modified carbapenem inactivation method

ความเข้มข้น ของยา (µg/mL.)	k. pneumoniae				E. coli				P. mirabilis				E. cloacae				E. aerogenes				K. oxytoca				Klebsiella spp.				Total (isolates)
	M	E	I	B	M	E	I	B	M	E	I	B	M	E	I	B	M	E	I	B	M	E	I	B					
0.125	3	3	10	28	3	3	2	36	2	2	1	2	1	3	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	102				
0.25	3	-	1	7	1	-	7	5	-	-	1	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	29				
0.5	-	-	3	4	1	-	20	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33				
1	-	3	13	5	14	1	6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43				
2	7	6	8	9	13	-	7	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53				
4	13	1	9	16	6	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	49				
8	14	10	14	6	4	3	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	56				
16	3	13	16	1	2	13	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	51				
32	9	4	4	1	2	12	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	1	-	37				
64	24	5	-	2	1	8	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	43				
128	3	2	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11				
>128	-	32	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33				
Total (isolates)	79	79	79	79	47	47	47	47	2	2	2	2	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	540				

หมายเหตุ * M = เมอร์โอฟีนัม, E = เออตาพีนัม, I = อิมิพีนัม, B = ไบอะพีนัม

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการรายงานแบบแผนความไวต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียในวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีต่อยา กลุ่มคาร์บาเพนิมพบว่ามีความไวลดลงและพบการระบาดของเชื้อ CRE และ CPE เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาค้างนี้จากโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ช่วงปี พ.ศ. 2559-2560 พบเชื้อ CRE มีความชุกร้อยละ 45.50 และพบเชื้อ CPE มีความชุกร้อยละ 39.13 ซึ่งเป็นอัตราที่สูงกว่าการรายงานของโรงพยาบาลราชวิถีในปี พ.ศ. 2558 ที่พบเชื้อ CRE ร้อยละ 5.8⁽⁷⁾ ความชุกของ CPE ที่สูงขึ้นจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิดจากการแพร่กระจายของเอนไซม์คาร์บาพินิเมสที่เกิดขึ้นภายในแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีทั้งในรูปแบบ clonal expansion และ transmission ผ่าน carbapenemase gene⁽⁸⁾ แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาค้างนี้ความชุกที่พบสูงอาจเนื่องจากการระบาดของเชื้อสายพันธุ์เดียวกันในโรงพยาบาล (clone เดียวกัน) หรือไม่ ควรทำการศึกษามulti-locus sequence typing ต่อไป เพื่อได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการระบาด

สิ่งส่งตรวจที่แยกได้เชื้อ CPE มาจากเสมหะ 43 isolates ปัสสาวะ 51 isolates เลือด 24 isolates และหนอง 17 isolates พบว่า CPE แยกได้มากที่สุดมาจากปัสสาวะ จากการศึกษาแยกเชื้อ CPE ได้จากปัสสาวะร้อยละ 37.78 จากเชื้อ CPE ทั้งหมด และ CRE แยกได้จากปัสสาวะร้อยละ 38.85 จากเชื้อ CRE ทั้งหมด ในขณะที่การศึกษาจากโรงพยาบาลราชวิถีแยก CRE ได้จากปัสสาวะร้อยละ 48.3⁽⁷⁾ ทั้งสองการศึกษาให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกันโดยพบ CRE ใน *K. pneumoniae* มากที่สุด ซึ่งการศึกษาจากโรงพยาบาลราชวิถีรายงานว่า *K. pneumoniae* ที่เป็น CRE มีอัตราเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 1.3 ในปี พ.ศ. 2552 และพบร้อยละ 1.6 , 3.8, 5.7, 11.1, 11.8, และ 16.4 ในปี พ.ศ. 2553 - พ.ศ. 2557 ตามลำดับ⁽⁷⁾ นอกจากนี้เชื้อ CPE ที่พบในการศึกษานี้ได้แก่ *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. oxytoca* และ *Klebsiella* spp. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานพบเชื้อ CRE มากที่สุดเป็น *K. pneumoniae* และดื้อต่อยาในกลุ่ม

คาร์บาเพนิมในอัตราที่สูงกว่าสปีชีส์อื่นๆ^(2,10) รองลงมาได้แก่ *E. coli*, *E. cloacae* และ *Citrobacter freundii* เป็นต้น

ผลการศึกษาเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบฟิโนไทป์ทั้งวิธี MHT และ mCIM จำนวน 135 isolates พบว่ามีบาง isolates ที่ให้ผลไวเมื่อทดสอบด้วย MIC แต่ให้ผลบวกจากการทดสอบ MHT หรือ mCIM อย่างไรก็ตามเชื่อดังกล่าวยังไม่ได้ตรวจยืนยันเอนไซม์คาร์บาพินิเมสด้วยการทดสอบจีโนไทป์ แต่จากการศึกษาความชุกของเอนไซม์ดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมที่แยกได้จากเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ในปี พ.ศ. 2555-2556 พบว่าความชุกสูงสุดของเอนไซม์คาร์บาพินิเมสคือ NDM-1 ร้อยละ 43.4 ซึ่งเชื่อดังกล่าวมีผลดื้อต่อยาเออตาพีนัม เมอโรพีนัม และอิมิพีนัม เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี E-test⁽²⁾ และจากการศึกษาความชุกของ CRE ในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัย ขนาดใหญ่ในปี พ.ศ. 2552-2554 พบเอนไซม์ KPC-13 และ IMP-14a⁽⁹⁾ และการรายงานพบเอนไซม์คาร์บาพินิเมสอื่นๆ อีกเช่น OXA-48, -181, -232 และ VEM เป็นต้น⁽²⁻³⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบการผลิตเอนไซม์ร่วมกันได้อีกด้วย เช่น พบ NDM-1 ร่วมกันกับ OXA ในเชื้อ CRE เป็นต้น⁽²⁾

จากการรายงานอัตราการพบเชื้อ Extended-spectrum β -lactamases (ESBL) producing Enterobacteriaceae ของประเทศไทยประมาณร้อยละ 26-39⁽⁹⁾ ซึ่งก็สอดคล้องกันกับในหลายประเทศในภูมิภาคเอเชียแปซิฟิก⁽¹¹⁾ ทำให้มีอัตราการดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมเพิ่มสูงขึ้น แต่การรายงานพบเชื้อ CRE ในประเทศไทยในช่วงแรกพบเพียงร้อยละ 1.4 และแยกเชื้อเหล่านี้มาจากการติดเชื้อในช่องท้อง (intra-abdominal infection) การติดเชื้อในกระแสเลือด (bloodstream infection) และการติดเชื้อปอดอักเสบในโรงพยาบาล (nosocomial pneumonia)⁽¹¹⁾ และต่อมามีการรายงานการพบเชื้อ CRE เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ ESBL ได้ จะเห็นได้ว่าอัตราการรายงานการดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมในเชื้อวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีเพิ่มสูงขึ้นกว่าในอดีต เนื่องจากถ้าพิจารณาตามเกณฑ์ CLSI กำหนดให้ค่า breakpoint ยาอิมิพีนัมและเมอโรพีนัม มีค่า

ความไว น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 µg/mL แต่ในปี 2010 CLSI ได้มีการแก้ไขค่า breakpoint สำหรับเชื้อวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีให้มีค่า น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 µg/mL⁽¹³⁾ จึงทำให้การรายงานเชื้อดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมสูงขึ้นตามลำดับ และจากการศึกษานี้ถ้าพิจารณาตามเกณฑ์ CLSI โดยแผ่นยาแอตตาพิเนมพบเชื้อ CRE ร้อยละ 45.50 แต่ถ้าคัดกรองเชื้อ CPE ตามเกณฑ์ EUCAST พบร้อยละ 67.13 เมื่อยืนยันด้วย MHT และ mCIM พบร้อยละ 39.13 เป็นต้น ซึ่งการอ้างอิง วิธีการทดสอบและเกณฑ์ที่ใช้ในการแปลผล มีผลต่ออัตราความชุกของเชื้อดื้อยาเหล่านี้

เชื้อ CRE ที่พบรายงานในประเทศไทยเป็นเชื้อที่สร้าง ESBL ที่มี *bla* ยีน และพบรายงานในอัตราที่สูงมาก แต่พบว่าการตรวจวินิจฉัยโดย MHT ซึ่งเป็นการตรวจหาเอนไซม์คาร์บาเพนิเมส ไม่สัมพันธ์กับการตรวจพบ CRE และหลายการศึกษายังพบว่าการตรวจด้วยวิธีพีโนไทป์ MHT มีความไวต่ำในการตรวจหาเอนไซม์คาร์บาเพนิเมส โดยเฉพาะกลุ่ม class B carbapenemases และมีความจำเพาะต่ำโดยเกิดผลบวกปลอม ในเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ AmpC ในระดับสูง (hyperproduction) ร่วมกับการลดการแสดงออกของพอริน (porin)⁽¹¹⁾ ทำให้การรายงานความชุกของเชื้อ CRE มีความคลาดเคลื่อน นอกจากนี้การอ่านผลการทดสอบด้วยวิธี MHT ส่งเสริมให้เกิดข้อสงสัยในเชื้อโค้งเข้าหาเชื้อทดสอบซึ่งอ่านได้ยากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี mCIM ที่สังเกตผลบวกโดยไม่พบโซนยับยั้งเชื้อรอบแผ่นยา (รูปที่ 1 และ 2) จากการศึกษาครั้งนี้การทดสอบ MHT พบเชื้อ CPE 120 isolates ซึ่งพบได้น้อยกว่าการตรวจด้วยวิธี mCIM ซึ่งให้ผลบวก 135 isolates เชื้อ 15 isolates ที่ให้ผลการทดสอบแตกต่างกันเมื่อแปลผลความไวจากการทดสอบ MIC พบว่าไวต่อยาเมอโรปีนิมและอิมิพีเนมทั้งหมด มีเพียง 7 isolates เท่านั้นที่ดื้อต่อยาแอตตาพิเนม

จากการศึกษาครั้งนี้การทดสอบ CPE โดยวิธี mCIM สามารถทดสอบและอ่านผลได้ง่ายเมื่อเทียบกับวิธี MHT นอกจากนี้ข้อมูลความชุกของ CPE พบค่อนข้างสูง การทำความเข้าใจที่ถูกต้องในการเผยแพร่ข้อมูลการดื้อยาของเชื้อ CRE ให้แก่บุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้มีการใช้ยาที่ถูกต้องเหมาะสม และการจัดการ

ควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาถือเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ทุกคน ทุกฝ่ายต้องให้ความร่วมมือและตระหนักเพื่อลดอัตราการพบเชื่อดังกล่าวในลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สนับสนุนอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย เจ้าหน้าที่หน่วยจุลชีววิทยา โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ ที่อนุเคราะห์ให้ความช่วยเหลือในการเก็บเชื้อแบคทีเรีย ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปี พ.ศ. 2561 และหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเวชศาสตร์ วิทยาลัยแพทยศาสตร์และการสาธารณสุข มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ช่วยสนับสนุนค่าน้ำยา และสารเคมีในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. Clin Infect Dis 2011; 53: 60-7.
2. Arsheea W. Prevalence of carbapenemase enzyme in clinical isolates of carbapenem resistant Enterobacteriaceae from Prapokklao hospital in 2012-2013. J Prapokklao Hosp Clin Med Educat Center 2016; 33: 314-25.
3. Laolerd W, Akeda Y, Preeyanon 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. Microb Drug Resist 2018; 24: 1006-11.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved standards. 27th ed. CLSI Document M100-S26. Wayne Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

5. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MIC and zone diameters version 8.0 valid from 2018-01-01.
6. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2017; 55: 2321-33.
7. Thongkoom P, Kanchanahareutai S, Chantrakooptungkul S, Rahule S, Pupan M, Tuntrakul P, et al. Carbapenem resistant Enterobacteriaceae at Rajavithi hospital: results of a microbiology laboratory program (2009-2015). *J Med Assoc Thai* 2017; 100: S212-21.
8. David van Duin, Yohei Doi. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence* 2017; 8: 460-9.
9. Netikul T, Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumonia* ST340 at a university hospital in Thailand. *PLoS One* 2015; 25: 10(9):e0139116. doi: 10.1371.
10. Hsueh PR, Badal RE, Hawser SP, Hoban DJ, Bouchillon SK, Ni Y, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: 2008 results from SMART (Study for monitoring antimicrobial resistance trends). *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 408-14.
11. Kiratisin P, Chongthaleong A, Tan TY, Lagamayo E, Roberts S, Garcia J, et al. Comparative in vitro activity of carbapenems against major Gram-negative pathogens: results of Asia-Pacific surveillance from the COMPACT II study. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 311-6.
12. Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 223-6.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved standards. 19th ed. CLSI Document M100-S20-U. Wayne Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.