Prevalence of Colistin Resistance among Third Generation Cephalosporins- or Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated from Clinical Specimens in Ratchaburi Hospital, Thailand

Puncharat Wongut-sa[1, 2], Pradchama Khumdee[3], Worada Samosornsuk[3], Jiraporn Yansombat[3] and Seksun Samosornsuk[3*]

[1]*Microbiology Division, Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Ratchaburi Hospital, Ratchaburi Province, Thailand*

[2]*Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand*

[3*]*Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Pathum Thani Province, Thailand*

Abstract

Currently, carbapenem and colistin resistant Gram negative bacilli are increasingly reported worldwide. Moreover, *mcr-1,* a plasmid-mediated colistin resistant gene, has recently been reported. The finding has brought clinical concern because colistin is the last-resort antibiotic for the treatment of extensively drug-resistant Gram-negative bacterial infections. Therefore, the prevalence data of colistin-resistant bacteria in different areas of the country can be used to support the prevention and control measures of these organisms. The objectives of this research were to determine the prevalence of colistin resistance and investigate the *mcr-1* genes among third generation cephalosporin-or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from patients in Ratchaburi Hospital during June 2016 to May 2017. A total of 243, non-duplicated and non-intrinsic resistance to colistin, clinical isolates of third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* were used in this study. The bacterial isolates were screened for colistin resistance using Mueller-Hinton agar containing 2 μg/mL of colistin. The colistin resistant isolates were determined the MIC of colistin using

***Corresponding author E-mail address:** seksun@hotmail.com

Received: 22 June 2019 Revised: 17 August 2019 Accepted: 24 February 2020

broth microdilution and the *mcr-1* gene was investigated using PCR assay. Forty (16.5 %) of 243 third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant isolates were resistant to colistin. These strains were mostly detected in surgery, medicine and ICU wards at 45.0, 37.5 and 10.0 %, respectively. Urine, sputum and pus/swab were the top three sources where 42.5, 27.5 and 15.0 %, respectively, of colistin-resistant isolates were detected. The colistin MICs of these isolates ranged from 4 to > 64 μg/mL. The *mcr-1* gene was detected in 6 isolates, 5 from surgery and 1 from a medicine ward, in 3 pus/swab, 2 sputum and a blood sample, all of which were identified as *Escherichia coli*. The colistin MICs of the *mcr-1* positive isolates ranged from 4 to 16 μg/mL. In conclusion, the prevalence of colistin resistance and the existence of *mcr-1* gene in third generation cephalosporins- or carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* among patients in Ratchaburi Hospital would raise the awareness and proper use of antibiotics. The information could also be used as an input for prevention and control of the hospital spreading of these resistant organisms.

Keywords: Colistin resistant *Enterobacteriaceae*, *mcr-1*

ความชุกของการดื้อยาโคลิสตินของแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Third Generation Cephalosporins หรือคาร์บาพีเนมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี

ปุญชรัสมิ์ วงษ์อุตสาห์[1, 2] ปรัชมา คำดี[3] วรดา สโมสรสุข[3] จิราภรณ์ ญาณสมบัติ[3] และ เสกสรรค์ สโมสรสุข[3*]

[1]งานจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลราชบุรี จังหวัดราชบุรี
[2]บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี
[3]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีรายงานแบคทีเรียแกรมลบดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (carbapenems) ร่วมกับการดื้อยาโคลิสติน (colistin) เพิ่มขึ้นทั่วโลก และมีรายงานพบยีน *mcr-1* ซึ่งเป็นยีนสัมพันธ์กับการดื้อยาโคลิสตินบนพลาสมิด จึงต้องให้ความสำคัญเป็นอย่างยิ่งกับการศึกษาวิจัยแบคทีเรียเหล่านี้ เนื่องจากโคลิสตินเป็นยาลำดับท้าย ๆ สำหรับรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาเกือบทุกขนาน ดังนั้น ความรู้เกี่ยวกับแบคทีเรียดื้อยาโคลิสติน ในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศ จะช่วยสนับสนุนมาตรการการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยาเหล่านี้ได้ การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความชุกของการดื้อยาโคลิสติน และหายีน *mcr-1* ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins และหรือคาร์บาพีเนม ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งตรวจเพาะเชื้อที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลราชบุรี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ซึ่งเป็นตัวอย่างจากผู้ป่วยไม่ซ้ำรายและไม่เป็นเชื้อที่ดื้อยา colistin โดยกำเนิด (intrinsic resistance) จำนวนทั้งสิ้น 243 ตัวอย่าง ถูกนำมาคัดกรองการดื้อต่อยา colistin โดยใช้ Mueller Hinton agar ที่มีโคลิสติน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น นำเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสติน จากการคัดกรอง มาทดสอบหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution และตรวจหายีน *mcr-1* ด้วยวิธี

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** seksun@hotmail.com
รับบทความ: 22 มิถุนายน 2562 แก้ไขบทความ: 17 สิงหาคม 2562 รับตีพิมพ์บทความ: 24 กุมภาพันธ์ 2563

polymerase chain reaction (PCR) จากการศึกษาพบว่า ในเชื้อแกรมลบ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนม จำนวน 243 ตัวอย่าง พบเชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.5) โดยพบมากที่สุดจากผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม แผนกอายุรกรรม และแผนกผู้ป่วยระยะวิกฤต (intensive care unit, ICU) คิดเป็นร้อยละ 45.0, 37.5 และ 10.0 ตามลำดับ ชนิดของสิ่งส่งตรวจที่พบเชื้อดื้อต่อโคลิสตินมากที่สุด ได้แก่ ปัสสาวะ เสมหะ และหนองหรือไม้ป้าย (swab) คิดเป็นร้อยละ 42.5, 27.5 และ 15.0 ตามลำดับ โดยค่า MIC ต่อยาโคลิสตินพบอยู่ในช่วง 4 ถึง >64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อยีน *mcr-1* จำนวน 6 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น *Escherichia coli* ทั้งหมด เชื้อที่พบยีน *mcr-1* ได้จากผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม 5 ตัวอย่าง และอายุรกรรม 1 ตัวอย่าง โดยแยกได้จากสิ่งส่งตรวจชนิดหนองหรือไม้ป้าย 3 ตัวอย่าง เสมหะ 2 ตัวอย่าง และเลือด 1 ตัวอย่าง และมีค่า MIC ต่อยาโคลิสตินอยู่ในช่วง 4 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสรุปความชุกของการดื้อต่อยาโคลิสติน และการพบยีน *mcr-1* ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนมที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลราชบุรี จะเป็นข้อมูลให้แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องตระหนักในการเลือกใช้ยารักษา ตลอดจนใช้ประกอบการจัดทำมาตรการป้องกันและควบคุมการแพร่กระจายเชื้อในโรงพยาบาล

คำสำคัญ: *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อโคลิสติน, ยีน *mcr-1*

บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการดื้อยาของเชื้อจุลชีพก่อโรคมีแนวโน้มสูงขึ้น มีการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 100,000 คน สาเหตุสำคัญมาจากการใช้ยาต้านจุลชีพมากขึ้น ทั้งการใช้ยาที่ไม่จำเป็นและเกินความจำเป็น โดยมูลค่าการใช้ยาปฏิชีวนะของประชากรไทยมากกว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี และมีการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 100,000 คน ทำให้ยาปฏิชีวนะชนิดเก่าที่เคยใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร ผู้ป่วยบางรายต้องเปลี่ยนใช้ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าและมีราคาแพง[1] การรักษาเชื้อดื้อยาบางชนิด ไม่มียารักษาที่มีประสิทธิผลดีและปลอดภัยทำให้ค่าใช้จ่ายในการรักษาเพิ่มขึ้น ใช้เวลารักษานานขึ้นและโอกาสเสียชีวิตสูง นอกจากนั้นแบคทีเรียเหล่านี้สามารถถ่ายทอดรหัสพันธุกรรมดื้อยาไปสู่แบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ปัญหาการดื้อยาทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น ทั้งนี้จากศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ระบุว่าอัตราความชุกของแบคทีเรียดื้อยาเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumoniae*[2] ซึ่งการดื้อยาของเชื้อแกรมลบวงศ์นี้ที่เป็นปัญหามากที่สุด คือการดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (carbapenem) ซึ่งถือว่าเป็นยากลุ่มที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด ดังนั้นการรักษาโรคติดเชื้อจากเชื้อกลุ่มนี้จึงมีความจำเป็นต้องใช้ยาอื่นที่ยังคงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ เช่น ยาโคลิสติน (colistin)

ยาโคลิสติน หรือ polymyxin E เป็นยาในกลุ่ม polymyxins มีโครงสร้างเป็นสารโพลีเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับกรดไขมัน ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus polymyxa* subspecies *colistinus* มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียโดย cationic polypeptide ของยาโคลิสตินทำปฏิกิริยากับ anionic lipopolysaccharide (LPS) ที่เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบ ทำให้ยาเข้าแทนที่แมกนีเซียม (Mg^{+2}) และแคลเซียม (Ca^{+2}) ทำให้เกิดการเพิ่ม permeability ของผนังเซลล์ ทำให้ cytoplasmic membrane แยกออกจากกัน ส่งผลให้เซลล์แบคทีเรียตาย[3] อย่างไรก็ตาม มีรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินในแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีกลไกสำคัญคือการดัดแปลง LPS จากการกลายพันธุ์ของ two-component regulatory system (TCS) ได้แก่ PhoP/PhoQ TCS และ PmrA/PmrB TCS การกลายพันธุ์ของ MgrB ซึ่งทำหน้าที่กดการทำงาน (negative feedback) ของ PhoP/PhoQ TCS การกลายพันธุ์เหล่านี้ทำให้มีการเพิ่มของโมเลกุล 4 amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) และ phosphoethanolamine (PEtN) ซึ่งมีประจุบวกบน lipid A จึงไปลดปฏิกิริยาระหว่าง cationic polypeptide ของโคลิสติน กับ anionic lipopolysaccharide (LPS) ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน หรือการสร้าง efflux pump เพื่อขับยาออกนอกเซลล์ซึ่งพบในเชื้อ *K. pneumoniae* เกิดจากยีน *acr*AB และ *kpn*EF ซึ่งกลไกการดื้อต่อยาโคลิสตินเหล่านี้เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในโครโมโซม (chromosomally-mediated)[4, 5] ในปี พ.ศ. 2558 นักวิจัยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ภาคใต้ของจีนรายงานพบเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในเนื้อสุกร จากยีน *mcr-1* (plasmid-mediated colistin resistance) บนพลาสมิดของแบคทีเรียเป็นครั้งแรก ซึ่งพลาสมิดที่มียีนนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นได้[6] และมีข้อมูลที่บ่งชี้ว่าอุบัติการณ์เชื้อดื้อยาโคลิสตินสายพันธุ์ที่มียีน *mcr-1* มีการแพร่กระจายในหลาย ภูมิภาคทั่วโลก ต่อมา Xavier และคณะ จากประเทศเบลเยี่ยมศึกษาการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* พบว่าเกิดจากยีน *mcr-2* ที่พบอยู่บนพลาสมิดของแบคทีเรียเช่นเดียวกับยีน *mcr-1*[7] สำหรับประเทศไทย เริ่มมีรายงานครั้งแรกจากสถาบันวิจัย

วิทยาศาสตร์สาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี โดยศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ เมื่อเดือนเมษายน พ.ศ. 2559 โดยตรวจพบ *E. coli* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินมียีนดื้อยา *mcr-1* จากตัวอย่างปัสสาวะของผู้ป่วยที่เข้ารักษาตัวที่โรงพยาบาลเพชรบูรณ์ และพบอีก 4 ราย จากตัวอย่างของผู้ป่วยจังหวัดน่าน นนทบุรี จันทบุรี และนครศรีธรรมราช จากอุบัติการณ์ดังกล่าว ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี เนื่องจากยาโคลิสติน ถูกนำมาใช้สำหรับการรักษาการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก multidrug resistant Gram negative bacilli และการติดเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนมเมส (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae;* CRE) ซึ่งปัจจุบันพบว่าโรงพยาบาลราชบุรีพบเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาคาร์บาพีเนมเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ คือ ในปี พ.ศ. 2557 พบ 58 ราย ปี พ.ศ. 2558 พบ 63 ราย และในปีพ.ศ. 2559 พบ 108 ราย แพทย์จำเป็นต้องใช้ยาโคลิสตินมากขึ้น ทำให้มีโอกาสพบเชื้อดื้อยาโคลิสตินมากขึ้น และจากนโยบายการเฝ้าระวังเชื้อวงศ์ *Enterobactericeae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ของกระทรวงสาธารณสุข แต่ยังมีข้อจำกัดในการทดสอบการดื้อต่อยาโคลิสติน คือไม่สามารถใช้วิธี disk diffusion หรือ modified Kirby-Bauer หรือการทดสอบด้วย E-test ต้องใช้วิธี broth dilution เท่านั้น และเนื่องจากโรงพยาบาลราชบุรีมีข้อจำกัดในการทำ MIC ด้วยวิธี broth dilution เป็นเหตุให้ไม่มีข้อมูลผลการทดสอบความไวของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ต่อยาโคลิสตินในโรงพยาบาลราชบุรี ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาความชุกของการดื้อต่อยาโคลิสติน ของเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนม และศึกษาหายีน *mcr-1* ในตัวอย่างสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี ผลการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลในการศึกษาทางระบาดวิทยาเพื่อกำหนดมาตรการควบคุมเชื้อดื้อยาและเป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลราชบุรีต่อไป

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเชื้อ

ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือคาร์บาพีเนม ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยไม่ซ้ำราย และผ่านการทดสอบวินิจฉัยยืนยันชนิดเชื้อด้วยการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลราชบุรี ทั้งนี้ตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษาไม่ใช่เชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสตินโดยกำเนิด ประกอบด้วย *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* และ *Serratia* spp. เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2560 จำนวนทั้งสิ้น 243 ตัวอย่าง ตัวอย่างเชื้อถูกเก็บรักษาในglycerol stock ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยทำการเพาะเชื้อบน MacConkey agar (Becton Dickinson, USA) และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ในการทดสอบ

2. การตรวจคัดกรองเชื้อดื้อยาโคลิสติน โดยวิธี agar screening

เจือจางเชื้อตัวอย่างใน normal saline solution (NSS) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland standards No. 0.5 จากนั้น นำเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA)

(Becton Dickinson, USA) ที่มียาโคลิสติน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) หลังจาก บ่มที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส นาน 16-20 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทดสอบหาค่า MIC และนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหายีน *mcr-1* ต่อไป

3. การทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์ของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution

นำเชื้อที่ขึ้นบน screening agar มาทดสอบหาค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution[8, 9] ที่ระดับความเข้มข้นของยาโคลิสติน เท่ากับ 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 16, 32 และ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และควบคุมคุณภาพการทดสอบด้วยเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน *E. coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* NCTC 13846 (colistin resistant strain) นำค่า MIC ที่ได้มาแปลผลการทดสอบตามที่กำหนดโดยมาตรฐานของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2018)[10] ซึ่งแปลผลการดื้อยาโดยใช้ค่า MIC break-point >2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การตรวจหายีน *mcr-1* ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เตรียม boiled DNA template โดยเพาะเชื้อที่เจริญบน screening agar ใน Tryptic soy broth (Bacto™, France) บ่มที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับ TE buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใส (supernatant) ทิ้งแล้วเติม TE buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเข้า heat box ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง 3 นาที นำไปปั่น 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดเก็บส่วนใส นำไปตรวจหายีน *mcr-1* ด้วย PCR โดย primer ที่เลือกใช้ แสดงใน Table 1

Table 1 Primers used for amplification of the *mcr-1* gene

Target gene	Primer sequences	Amplicon size (bp)	Reference
mcr-1	CLR F 5'CGGTCAGTCCGTTTGTTC'3 CLR R 5'CTTGGTCGGTCTGTAGGG'3	309	Liu et al., 2015

ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dNTP ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, primer แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์, DNA Taq polymerase ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และ boiled DNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สำหรับ PCR condition ที่ใช้ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 2.0 (w/v)

ผลการวิจัย

1. ผลการตรวจคัดกรองหาเชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผลตรวจยืนยันด้วย MIC

จากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อยากลุ่ม third generation cephalosporins หรือ คาร์บาพีเนม จำนวน 243 ตัวอย่าง พบเป็น *E. coli* 146 ตัวอย่าง *K. pneumoniae* 86 ตัวอย่าง *Enterobacter cloacae* complex 8 ตัวอย่าง *Klebsiella aerogenes* 2 ตัวอย่าง และ *Salmonella* spp. 1 ตัวอย่าง เมื่อนำมาทดสอบคัดกรองการดื้อต่อยาโคลิสติน โดยวิธี agar screening พบว่าให้ผลบวกจำนวน 48 ตัวอย่าง และเมื่อนำไปตรวจหาค่า MIC ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี broth microdilution พบว่าเชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินจำนวน 40 ตัวอย่าง (ร้อยละ 16.4) โดยเป็น *E. coli* 21 ตัวอย่าง และ *K. pneumoniae* 19 ตัวอย่าง

เมื่อจำแนกเชื้อดื้อยาทั้ง 40 ตัวอย่างตามแผนกผู้ป่วยและชนิดสิ่งส่งตรวจ พบว่าแหล่งหลักของเชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินคือผู้ป่วยแผนกศัลยกรรมและแผนกอายุรกรรม ซึ่งครอบคลุมกว่าร้อยละ 80 ของเชื้อดื้อยาที่พบ (Table 2) และเมื่อจำแนกตามประเภทสิ่งส่งตรวจพบว่า เชื้อส่วนใหญ่พบมากที่สุดจากสิ่งส่งตรวจจากปัสสาวะร้อยละ 42.5 (17/40) รองลงมาเป็นเชื้อที่พบจากเสมหะ ร้อยละ 27.5 (11/40) และจากหนองหรือไม้ป้าย ร้อยละ 15 (6/40) (Table 3)

Table 2 Distribution of colistin resistant *Enterobacteriaceae* in different departments

Department	Colistin resistant *Enterobacteriaceae* (n)		Total (n)	%
	E. coli	*K. pneumoniae*		
Surgery	13	5	18	45.0
Internal medicine	6	9	15	37.5
Intensive care unit	0	4	4	10.0
Pediatrics	1	0	1	2.5
Physical medicine and rehabilitation	0	1	1	2.5
Outpatient	1	0	1	2.5
Total (n)	**21**	**19**	**40**	**100**

Table 3 Distribution of colistin resistant *Enterobacteriaceae* in different clinical specimens

Specimens	Colistin resistant *Enterobacteriaceae* (n)		Total (n)	%
	E. coli	*K. pneumoniae*		
Urine	10	7	17	42.5
Sputum	3	8	11	27.5
Pus/Swab	5	1	6	15.0
Blood	2	3	5	12.5
Body fluid	1	0	1	2.5
Total (n)	**21**	**19**	**40**	**100**

2. ผลการทดสอบความไวแบบปริมาณวิเคราะห์ของเชื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี broth microdilution

ผลทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบต่อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง พบค่า MIC ต่อยาโคลิสติน ของ เชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* มีค่าตั้งแต่ 4 ถึง >64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 4)

Table 4 Minimal inhibitory concentrations (MICs) for colistin of *Enterobacteriaceae* resistant to colistin

Organism	Colistin MIC						Total (n)
	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL	64 µg/mL	>64 µg/mL	
Escherichia coli	5	10	5	0	0	1	21
Klebsiella pneumoniae	1	1	5	9	1	2	19
Total (n)	**6**	**11**	**10**	**9**	**1**	**3**	**40**

3. ผลการตรวจหายีนดื้อยา *mcr-1* ด้วยวิธี PCR

จากผลตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ด้วยวิธี PCR ในเชื้อที่ให้ผลดื้อต่อยาโคลิสติน จำนวน 40 ตัวอย่าง พบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อยีน *mcr-1* จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยพบเป็นเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม third generation cephalosporins ทั้งหมด ซึ่งเชื้อที่พบยีน *mcr-1* แยกได้จากผู้ป่วยแผนกศัลยกรรม 5 ตัวอย่าง และอายุรกรรม 1 ตัวอย่าง โดยมีค่า MIC ต่อยาโคลิสติน อยู่ในช่วง 4-16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 5)

Table 5 Demographics of colistin resistant *Enterobactericeae* carrying *mcr-1* gene

Strains	Sample collection date	Department	Ward	Specimen	Organism	Drug resistance	Colistin MIC (µg/mL)
RBH037	Oct 14, 2015	Surgery	Male surgical ward-2	Sputum	*E. coli*	3rd generation cephalosporin	8
RBH049	Oct 18, 2015	Surgery	Pediatric surgical ward	Pus/Swab	*E. coli*	3rd generation cephalosporin	16
RBH056	Nov 15, 2015	Surgery	Orthopaedic surgical ward	Pus/Swab	*E. coli*	3rd generation cephalosporin	8
RBH134	Feb 21, 2016	Surgery	Female surgical ward	Pus/Swab	*E. coli*	3rd generation cephalosporin	16
RBH135	Feb 6, 2016	Internal medicine	Male medical ward-1	Blood	*E. coli*	3rd generation cephalosporin	8
RBH162	Mar 27, 2016	Surgery	Male surgical ward-1	Sputum	*E. coli*	3rd generation cephalosporin	4

วิจารณ์และสรุป

งานวิจัยครั้งนี้เลือกศึกษาเฉพาะในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* เนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อโรคได้หลายระบบ และเป็นเชื้อที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของคนทั่วไป จึงทำให้สามารถแพร่กระจายเกิดการระบาดได้ ดังนั้นหากเชื้อได้รับการถ่ายทอดยีนดื้อยาแล้ว จะทำให้การรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อทำได้ยาก เนื่องจากเชื้อมักจะดื้อต่อยาหลายกลุ่ม ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้

จากการศึกษาครั้งนี้พบการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* เท่านั้น โดยพบในเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 22.1 และ *E. coli* ร้อยละ 14.4 ซึ่งมีอัตราใกล้เคียงกับการศึกษาของ Moosavian และ Emam[11] ที่ได้รายงานการดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 21.8 (26/119) และ *E. coli* ร้อยละ 10.8 (38/351) ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยในประเทศอิหร่าน

เมื่อจำแนกตามแผนกของผู้ป่วย พบเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสตินมากในผู้ป่วยแผนกศัลยกรรมอายุรกรรม และแผนกผู้ป่วยระยะวิกฤต ตามลำดับ เนื่องจากเป็นแผนกที่ผู้ป่วยได้รับยาต้านจุลชีพมากและเป็นประจำ จึงทำให้เกิดโอกาสพบเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อยามากขึ้น แต่เมื่อแยกตามหอผู้ป่วยพบว่าพบต่างหอผู้ป่วยกันโดยที่แต่ละหอผู้ป่วยไม่ได้อยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน และช่วงเวลาที่พบเชื้อส่วนใหญ่อยู่ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2559 และเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 แสดงว่าอาจมีการระบาดแบบกระจายอยู่ทั่วไปในโรงพยาบาล และเมื่อจำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจพบว่าเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ส่วนใหญ่จะเป็นตำแหน่งที่มีเชื้อประจำถิ่น จึงทำให้พบในตัวอย่างปัสสาวะและเสมหะมากกว่าตัวอย่างชนิดอื่นที่เป็นเลือดและสารน้ำในร่างกาย และเมื่อทดสอบหาค่า MIC ต่อยาโคลิสตินพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีค่า MIC สูงกว่าเชื้อ *E. coli*

ผลการนำเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสตินทั้งหมดจำนวน 40 ตัวอย่าง มาตรวจหายีน พบว่ามียีน *mcr-1* ซึ่งพบในเชื้อ *E. coli* เท่านั้น โดยไม่พบในเชื้อ *K. pneumoniae* และค่า MIC ต่อยาโคลิสตินมีค่า 4 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Bianco และคณะ[12] ที่ได้สำรวจหายีน *mcr-1* ถึง *mcr-5* ของเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ใน Romagna ทางตอนเหนือของอิตาลี ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2560 พบว่าการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจาก *mcr-1* พบ 26 ตัวอย่าง จาก 19,053 ตัวอย่าง (ร้อยละ 0.14) เป็นเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด ซึ่งค่า MIC ต่อยาโคลิสตินมีค่า 4 ถึง 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของเอี่ยม พึ่งพรและคณะ[13] ที่ได้ศึกษาหายีน *mcr-1* ในตัวอย่างเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในตัวอย่างจากประเทศไทย ช่วงปี พ.ศ. 2557 พบว่าการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจาก *mcr-1* พบในเชื้อ *E. coli* มากกว่า ซึ่งพบ 11 ตัวอย่าง (ร้อยละ 29.7) และค่า MIC ต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *E. coli* ที่พบยีน *mcr-1* มีค่า 4-32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อ *E. coli* ทั้งหมดที่พบว่ามียีน *mcr-1* เป็นเชื้อที่มีการดื้อต่อยาในกลุ่ม third generation cephalosporins แต่มีความไวของยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม ข้อมูลสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kawahara และคณะ[14] ที่พบยีน *mcr-1* จำนวน 31 ตัวอย่าง ในเชื้อ *E. coli* ที่ดื้อต่อยา cefotaxime แต่มีความไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ในตัวอย่างอุจจาระของประชากรในหมู่บ้านประเทศเวียดนาม ดังนั้นการที่พบยีน *mcr-1* ไม่จำเป็นต้องมีการดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งเป็นยากลุ่มที่มีฤทธิ์กว้างที่สุดในการรักษาเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* หรือการได้รับยาโคลิสติน แต่อาจเกิดจากการได้รับเชื้อจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่เป็นห่วงโซ่อาหาร เนื่องจากปัจจุบันมีการนำยาโคลิสตินมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์จำนวนมาก ดังนั้นอาจต้องมีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ คน และสิ่งแวดล้อม เพื่อที่จะได้ควบคุมและป้องกันการระบาดของยีน *mcr-1*

สำหรับเชื้อที่มีการดื้อต่อยาโคลิสติน แต่ไม่พบยีน *mcr-1* อาจมีการดื้อยาที่เกิดจากยีนดื้อยาอื่นๆ ซึ่งไม่ได้เกิดจากยีน *mcr-1* เช่น *mcr-2, mcr-3, mcr-4* หรือ *mcr-5* เนื่องจาก Wise MG และคณะ[15] ได้สำรวจความชุกของยีน *mcr-1-mcr-5* ที่เก็บจากเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินทั่วทุกทวีปในช่วง พ.ศ. 2557 พบเชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน 908 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อดื้อยาโคลิสติน ที่เกิดจากยีน *mcr -1* และ *mcr-3* จำนวน 29 ตัวอย่าง เป็นยีน *mcr -1* จำนวน 25 ตัวอย่าง และ *mcr-3* จำนวน 4 ตัวอย่าง ยีน *mcr-3* ที่พบเป็นตัวอย่างจากประเทศไทยทั้งหมด โดยแยกได้จากเชื้อ *E. coli* 3 ตัวอย่าง และเชื้อ

K. pneumoniae 1 ตัวอย่าง หรือการดื้อยาโคลิสตินอาจไม่ได้เกิดจากยีน *mcr* แต่อาจเกิดจากมีการกลายพันธุ์ของยีนในโครโมโซม โดยเฉพาะเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เกิดการกลายพันธุ์ของโปรตีน MgrB ทำให้ดื้อต่อยาโคลิสติน[16] ดังนั้นควรศึกษากลไกการดื้อยาในเชื้อเหล่านี้ต่อไป

การศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดในเรื่องตัวอย่าง เนื่องจาก เชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่พบส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ส่วนตัวอย่างที่เป็นเชื้อชนิดอื่น เช่น *Enterobacter* spp. และ *C.freundii* ยังมีจำนวนน้อย ทำให้การทดสอบไม่ครอบคลุมเชื้อที่มี colistin heteroresistance ซึ่งมีค่า MIC ต่ำ[17-18]

จะเห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเชื้อแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลราชบุรี แสดงให้เห็นการเกิดอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสติน ซึ่งจะเป็นประโยชน์แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ตระหนักในการเลือกใช้ยารักษา ทั้งนี้ ผลทดสอบอณูชีววิทยาทำให้ทราบถึงกลไกการดื้อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ซึ่งจะเป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการดื้อยา และสถานการณ์การดื้อยาของโรงพยาบาลเพื่อการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมสนับสนุนการวิจัยประเภททุนบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2561

เอกสารอ้างอิง

1. Research and Development Committee for the Control and Prevention of Antimicrobial Resistance in Thailand. Control and Antimicrobial resistance. [Internet]. 2014. Available from: https://sites.google.com/ site/amr thailand net. (in Thai).
2. Health Systems Research Institute. There are research documents indicating that the antibiotic resistance problem is a national crisis, if we do not solve this problem, it will ruin national economy and our life. [Internet]. 2015. Available from: http://www.hsri.or.th/news/939. (in Thai).
3. Koomanachai P, Colistin. In: Asavabhokhi N, Tantawichien T, Phiboon T, editors. Important Antimicrobial Agents1. Bangkok: VG printing; 2015. p. 601-8. (in Thai).
4. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol 2014; 5: 643.
5. Pragasam AK, Shankar C, Veeraraghavan B, *et al.* Molecular mechanisms of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* causing bacteremia from India - A first report. Front Microbiol 2016; 7: 2135.
6. Liu Y, Wang Y, Walsh T, *et al.* Emergence of plasmid mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2015; 16: 161-8.

7. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, *et al.* Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill 2016; 21. http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A9 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Wayne, PA: CLSI; 2012.
9. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Pennsylvania: CLSI; 2018.
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018.
11. Moosavian M, Emam N. The first report of emerging mobilized colistin-resistance *(mcr)* genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. Infect Drug Resist 2019; 12: 1001-10.
12. Del Bianco F, Morotti M, Pedna MF, Farabegoli P, Sambri V. Microbiological surveillance of plasmid mediated colistin resistance in human Enterobacteriaceae isolates in Romagna (Northern Italy): August 2016-July 2017. Int J Infect Dis 2018; 69: 96-8.
13. Eiamphungporna W, Yainoya S, Jumderma C, Tan-arsuwongkula R, Tiengrima S, Thamlikitkul V. Prevalence of the colistin resistance gene *mcr-1* in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand. J Glob Antimicrob Resist 2018; 15: 32-5.
14. Kawahara R, Khong DT, Le HV, *et al.* Prevalence of *mcr-1* among cefotaxime-resistant commensal *Escherichia coli* in residents of Vietnam. Infect. Drug Resist 2019; 12: 3317-25.
15. Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM, Prevalence of *mcr*-type genes among colistin- resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PLoS One 2018;13:e0195281.
16. Chen L, Zhang J, Wang J, *et al.* Newly identified colistin resistance genes, *mcr*-4 and *mcr*-5, from upper and lower alimentary tract of pigs and poultry in China. PLoS One 2018; 13: e0193957.
17. Landman D, Salamera J, Quale J. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes.* J Clin Microbiol 2013; 51: 4106-11.
18. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59: 2780-4.