Emergence of Colistin Resistance in Carbapenems Resistant *Enterobacteriaceae* strains

Nittaya Singpoltan

Department of Medical Technology Maharat Nakhonratchasima Hospital, Nakhonratchasima Province, Thailand

Abstract

The multidrug resistant organisms are major problem of public health worldwide. *Enterobacteriaceae* is one of the family that is increasing in drug resistance especially to carbapenems, a broad spectrum and high potency antibiotic. Colistin has been used as the last resort for the treatment of carbapenems resistant strains. In the recent years, there are many reports of colistin resistance by gene transfer via the mechanism of plasmid mediated colistin resistance gene, *mcr-1.* This research aimed to study the emergence of colistin resistance and the resistance gene profile in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). During August to December 2019, 80 isolates of CRE (68 *Klebsiella pneumoniae*, 8 *Escherichia coli* and 4 *Enterobacter cloacae*) which were isolated from the clinical microbiology unit, Maharat Nakhon Ratchasima Hospital were studied. The bacteria were identified by using a Vitek 2 compact instrument. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion method. The minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin was done by microbroth dilution method via Sensititre machine. Six resistance genes (*bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA48\text{-}like}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{VIM}$ and *mcr-1)* were detected by multiplex PCR. The results showed that colistin-resistance rate was 18.8% (15/80) whereas the *mcr-1* gene was not found. The detecting resistance gene profile of 15 colistin resistant isolates were *bla*$_{NDM}$ 9 isolates, *bla*$_{OXA48\text{-}like}$ 5 isolates and one isolate without any resistance gene was detected. Although the *mcr-1* gene was not found, it showed that the colistin resistance mechanism does not depend only on this gene and it is still necessary for further study to avoid the emergence of more colistin resistant in CRE isolates.

Keywords: Colistin resistance, *Enterobacteriaceae*

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

Received: 17 April 2019 Revised: 25 May 2020 Accepted: 17 August 2020

อุบัติการณ์การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems

นิตยา สิงห์พลทัน

กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา

บทคัดย่อ

เชื้อดื้อยานับว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก เชื้อแบคทีเรียแกรมลบวงศ์ *Enterobacteriaceae* เป็นเชื้อชนิดหนึ่งที่พบว่ามีอัตราการดื้อยาเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาที่มีศักยภาพสูงเพราะเป็นยาที่มีการออกฤทธิ์กว้างและดีที่สุดในการรักษาการติดเชื้อนี้ และได้มีการนำยาโคลิสตินมาใช้เป็นยาทางเลือกสุดท้ายในการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อดื้อยานี้ ปัจจุบันมีรายงานพบเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาโคลิสติน โดยพบว่ามีกลไกที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายและเร็วขึ้น (plasmid mediated resistance mechanism, MCR-1) การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสตินและชนิดของยีนดื้อยาในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (CRE) โดยศึกษาในเชื้อ CRE จำนวน 80 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* 68 สายพันธุ์ *Escherichia coli* 8 สายพันธุ์และเชื้อ *Enterobacter cloacae* 4 สายพันธุ์ โดยการเก็บข้อมูลระหว่างเดือนสิงหาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2562 ที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา การจำแนกชนิดเชื้อทำโดยเครื่องอัตโนมัติ Vitek 2 compact ทดสอบความไวต่อยาด้วยวิธี disk diffusion ตรวจหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ต่อยาโคลิสตินด้วยวิธี microbroth dilution โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ และตรวจหายีนดื้อยา 6 ชนิด (*bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA48\text{-}like}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{VIM}$ and *mcr-1*) โดยวิธี multiplex PCR ผลการศึกษาพบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินร้อยละ 18.8 (15/80) ผลการตรวจหายีนดื้อยาไม่พบยีน *mcr-1* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน พบยีนดื้อยา *bla*$_{NDM}$ ในเชื้อ 9 สายพันธุ์, ยีนดื้อยา *bla*$_{OXA48\text{-}like}$ ในเชื้อ 5 สายพันธุ์ และไม่พบชนิดของยีนดื้อยาที่ตรวจหา 1 สายพันธุ์ จากผลการศึกษาพบการดื้อต่อยาโคลิสตินเป็นสัญญาณเตือนว่าต้องมีการเฝ้าระวังการดื้อต่อยานี้และต้องวางแผนหาแนวทางการเลือกใช้ยาเพื่อรักษาการติดเชื้อดื้อต่อยากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบยีน *mcr-1* ในเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสตินซึ่งแสดงว่าการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้ออาจไม่ได้ขึ้นกับยีน *mcr-1* เพียงอย่างเดียวซึ่งจะต้องศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: การดื้อต่อยาโคลิสติน เชื้อ *Enterobacteriaceae*

***ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address:** nscmu@hotmail.com

รับบทความ: 17 เมษายน 2563 แก้ไขบทความ: 25 พฤษภาคม 2563 รับตีพิมพ์บทความ: 17 สิงหาคม 2563

บทนำ

เชื้อดื้อยานับว่าเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลกและกำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากมีการกระจายของเชื้อดื้อยาเพิ่มมากขึ้น และอย่างรวดเร็ว ก่อให้เกิดความยากลำบากในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพ การดื้อยาในเชื้อแกรมลบที่เป็นปัญหาอุบัติใหม่ และเป็นสิ่งที่น่ากลัวมากที่สุดปัญหาหนึ่ง คือการระบาดของเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems (carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) ซึ่งถือเป็นยากลุ่มสุดท้ายที่มีฤทธิ์กว้างที่สุด การดื้อต่อยา carbapenems เกิดจาก 2 กลไกหลักคือ การสร้างเอนไซม์ carbapenemases เช่น KPC, NDM-1, IMP หรือ VIM หรือการสร้าง β-lactamase enzymes เช่น ESBL, AmpC ร่วมกับการกลายพันธุ์ของโปรตีน porin ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ปัจจุบัน มีรายงานการพบ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในหลายประเทศ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการรักษาและสัมพันธ์กับอัตราการเสียชีวิตของผู้ป่วยที่เพิ่มสูงขึ้น[1, 2] อีกทั้งยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวสามารถแพร่กระจายออกไปได้ง่ายเนื่องจากพบได้บนหน่วยพันธุกรรมเคลื่อนที่ จึงจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังและควบคุมการระบาดของเชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้

ยาโคลิสติน (colistin) หรือ polymyxin E เป็นยาต้านจุลชีพหนึ่งในสองขนานในกลุ่ม polymyxins ที่นำมาใช้ในคนได้นอกเหนือจาก polymyxin B ยาโคลิสติน มีการนำมาใช้ครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่นเมื่อ พ.ศ. 2492 และที่ยุโรปและสหรัฐอเมริกาเมื่อ พ.ศ. 2493 และ พ.ศ. 2503 ตามลำดับ ยานี้ถูกนำมาใช้รักษาโรคติดเชื้ออยู่นาน 20 ปี จนมียาต้านจุลชีพกลุ่มอื่นที่มีประสิทธิผลมากขึ้นและปลอดภัยมากขึ้น ความนิยมใช้ยาโคลิสตินจึงลดลงมาก ยาโคลิสตินถูกนำไปใช้รักษาผู้ป่วยทั่วไปอีกครั้งตั้งแต่ พ.ศ. 2530 สำหรับโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายขนาน ยาโคลิสตินเป็นยาต้านจุลชีพประเภท polypeptide ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ยานี้ออกฤทธิ์ทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) โดยการแย่งจับและขับแคลเซียมและแมกนีเซียมของผนังเซลล์ (cell membrane) ของแบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์รั่วและแบคทีเรียตายในที่สุด[3]

โคลิสติน เป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistance, MDR) รวมทั้งเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำยาโคลิสตินมารักษาการติดเชื้อในผู้ป่วยจำนวนมากขึ้นก็เริ่มพบเชื้อดื้อต่อยานี้เพิ่มขึ้น ทั้งเชื้อที่ดื้อจริงต่อยาโคลิสติน และเชื้อที่ดื้อยาแฝงต่อยาโคลิสติน (heteroresistance)[4, 5] การดื้อต่อยาโคลิสตินของแบคทีเรียส่วนใหญ่เกิดจากการดัดแปลง lipopolysaccharide (LPS) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อ เช่น การลดการสร้าง LPS การลดส่วนประกอบของแคลเซียมและแมกนีเซียมในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ปัจจัยสำคัญที่สัมพันธ์กับการดื้อต่อยาโคลิสตินคือการได้รับยาโคลิสตินติดต่อกันเป็นเวลานาน[6] เมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2558 มีรายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยกลไกการดื้อยาที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายขึ้นและเร็วขึ้น (plasmid mediated resistance mechanism, MCR-1) ในฟาร์มปศุสัตว์ของประเทศจีน[7] การศึกษาตรวจหายีน *mcr-1* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในโรงพยาบาลต่างๆ ในประเทศจีน ช่วงเดือนมกราคมปี พ.ศ. 2557 ถึงเดือนธันวาคมปี พ.ศ. 2558 พบยีน *mcr-1* ในผู้ป่วย 3 รายใน 2 จังหวัด แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น[8] ต่อมาในช่วงเดือนธันวาคมปี พ.ศ.

2558 มีรายงานว่าพบเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา *mcr-1* ในคนและเนื้อสัตว์ในประเทศอังกฤษ[9] ปัจจุบันพบเชื้อแบคทีเรียที่มียีนดื้อยา *mcr-1* ในหลายประเทศรวมทั้งประเทศไทย[10] โดยมีรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีน *mcr-1* ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2560 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย[11] และมีรายงานตรวจพบยีน *mcr-1* เช่นกันที่ โรงพยาบาลสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ กรมแพทย์ทหารเรือ จังหวัดชลบุรี[12] การศึกษาที่โรงพยาบาลศิริราชพบความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อ colistin ร้อยละ 47.5[13] การดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและอาจเป็นปัญหาในอนาคต งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาหาอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems รวมถึงตรวจหายีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ในเชื้อ CRE ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน ที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เพื่อเป็นข้อมูลในการติดตามเฝ้าระวังการดื้อต่อยานี้ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา

ศึกษาในเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา เก็บข้อมูลระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 80 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อตัวอย่างแรก (first isolates) ที่แยกได้จากผู้ป่วยไม่ซ้ำราย ซึ่งได้จากการวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อโดยวิธีทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) และโดยเครื่องอัตโนมัติ Vitek 2 compact (bioMerieux, France) ให้ผลเป็นเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และทุกสายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างต้องให้ผลการทดสอบความไวต่อยาเป็นดื้อ (resistant) ต่อยากลุ่ม carbapenems ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้ง 3 ชนิด แล้วจึงนำเชื้อมาทดสอบความไวต่อยาโคลิสติน เพื่อตรวจหาการดื้อต่อยาโคลิสติน

2. สารต้านจุลชีพที่ใช้ทดสอบ

การวิจัยนี้ทดสอบการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ด้วยวิธี disk diffusion test โดยใช้แผ่นยาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร (Oxoid, UK) ประกอบด้วยยา 3 ชนิด คือ ertapenem 10 ไมโครกรัม, imipenem 10 ไมโครกรัม, meropenem 10 ไมโครกรัม และแปลผลการทดสอบตามมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)[14] สำหรับยาโคลิสติน ทดสอบโดยวิธีหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของยาในการยับยั้งเชื้อ minimum inhibitory concentration (MIC) และแปลผลการทดสอบตามมาตรฐานของ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)[15]

3. การทดสอบความไวเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ

3.1 วิธี Disk diffusion หรือ Kirby-Bauer method

ทดสอบโดยปรับความขุ่นของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้ ปรับเทียบความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard (1-2 × 10^8 CFU/mL) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (BBL, Becton Dickinson, USA.) ที่มีความหนา 4 มิลลิเมตร วางแผ่นยาที่ต้องการทดสอบโดยแผ่นยามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ประกอบด้วยยาชนิดต่าง ๆ ดังต่อไปนี้คือ amoxicillin/clavulanic acid 30 ไมโครกรัม, ceftriaxone 30 ไมโครกรัม, ceftazidime 30 ไมโครกรัม, cefepime 30 ไมโครกรัม, amikacin 30 ไมโครกรัม, gentamicin 10 ไมโครกรัม, netilmicin 30 ไมโครกรัม, cipro-

floxacin 5 ไมโครกรัม, piperacillin/tazobactam 110 ไมโครกรัม, ertapenem 10 ไมโครกรัม, imipenem 10 ไมโครกรัม, meropenem 10 ไมโครกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีเชื้อเจริญรอบแผ่นสารต้านจุลชีพ (inhibition zone) เทียบกับเกณฑ์มาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) แปลผลเป็นไว (susceptible), ไวปานกลาง (intermediate) และดื้อ (resistant) (Table 1)

Table 1 Zone diameter and MIC breakpoints of carbapenems and colistin for *Enterobacteriaceae* according to CLSI

Antimicrobial agent	Zone diameter breakpoint (mm)			MIC breakpoint (μg/mL)		
	S	I	R	S	I	R
Ertapenem	≥22	19-21	≤18	≤0.5	1	≥2
Imipenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Meropenem	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
Colistin*	-	-	-	≤2	-	>2

*Interpreted according to EUCAST[15]
S; susceptible, I; intermediate, R; resistant

3.2 วิธี Sensititre^{TM}-ARIS^{TM}2X (Thermo Fisher Scientific, Cleveland, OH, USA)

ทดสอบความไวต่อยาโคลิสตินเชิงปริมาณเพื่อหาค่าความเข้มข้นของยาต่ำสุด (MIC) ในการยับยั้งเชื้อ และแปลผลทดสอบตามมาตรฐานของ EUCAST (Table 1)

4. การตรวจยืนยันและหาชนิดของยีนดื้อยา

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินเก็บรักษาใน nutrient agar ก่อนนำส่งที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เพื่อตรวจยืนยันผลการดื้อยาและตรวจหาชนิดของยีนดื้อยา โดยตรวจหาชนิดของยีนดื้อยา 6 ชนิด ได้แก่ bla_{NDM}, $bla_{OXA48\text{-}like}$, bla_{IMP}, bla_{KPC}, bla_{VIM} และ *mcr-1* โดยวิธี multiplex PCR[16] โดยใช้ไพร์เมอร์ดังแสดงใน Table 2

ผลการศึกษา

เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ที่ใช้ในการศึกษา รวม 80 สายพันธุ์ เป็นเชื้อ *K. pneumoniae*, *E. coli* และ *E. cloacae* ชนิดละ 68, 8 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ โดยแยกได้จากสิ่งส่งตรวจที่แตกต่างกัน ข้อมูลแสดงใน Table 3

Table 2 The sequences of oligonucleotide primers

Primer	Sequence (5' to 3')	Product	
		Gene	size (bp)
NDM-F	5'- AACGGTTTGGCGATCTGGTTTTC -3'	bla_{NDM}	621
NDM-R	5'- GGCGGAATGGCTCATCACGATC -3'		
IMP-F	5'- GCGGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC -3'	bla_{IMP}	232
IMP-R	5'- GTA CGGTTTAAYAAAACAACCACC -3'		
OXA48-F	5'- GGGCGTGGTTAAGGATGAACAC -3'	bla_{OXA-48}	438
OXA48-R	5'- TTATCATCAAGTTCAACCCAACCG -3'		
VIM-F	5'- GATGGTGTTTGGTCGCATA -3'	bla_{VIM}	390
VIM-R	5'- CGAATGCGCAGCACCAG -3'		
KPC-F	5'- CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG -3'	bla_{KPC}	798
KPC-R	5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG -3'		
MCR1-F	5'- GGGTGTGCTACCAAGTTTGC -3'	*mcr-1*	1126
MCR1-R	5'- CATTGGCGTGATGCCAGTTT -3'		

Table 3 Characteristics of 80 *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	Specimen (n)				
	sputum	urine	blood	other	total
Klebsiella pneumoniae	45	8	10	5	68
Escherichia coli	1	3	4	-	8
Enterobacter cloacae	1	1	2	-	4
Total	**47**	**12**	**16**	**5**	**80**

ความไวต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems

ผลทดสอบความไวต่อยาโคลิสตินของเชื้อ CRE ทั้งหมด 80 สายพันธุ์ด้วยวิธี Sensititre^{TM} ARIS^{TM}2X พบเป็นเชื้อดื้อต่อยาโคลิสติน 15 สายพันธุ์ (ร้อยละ 18.8) โดยเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* 13 สายพันธุ์ ร้อยละ 16.2 (13/80), *Escherichia coli* 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 1.2 (1/80) และ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ ร้อยละ 1.2 (1/80) โดยทั้ง 15 สายพันธุ์ มีค่า MIC ของยาโคลิสตินมากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบยีนดื้อยา carbapename และยีนดื้อยาโคลิสตีนชนิด *mcr-1* ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยาโคลิสติน ด้วยวิธี multiplex PCR

ผลตรวจหายีนดื้อยา carbapename 5 ชนิด (bla_{NDM}, $bla_{OXA48\text{-}like}$, bla_{IMP}, bla_{KPC}, bla_{VIM}) และยีนดื้อยาโคลิสตีนชนิด *mcr-1* ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยาโคลิสติน 15 สายพันธุ์ ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีนดื้อยาชนิด bla_{NDM} ในเชื้อ *K. pneumoniae* 8 สายพันธุ์ และ *E. coli* 1 สายพันธุ์ และพบยีนดื้อยาชนิด $bla_{OXA48\text{-}like}$ ในเชื้อ *K. pneumoniae* 5 สายพันธุ์ ทั้งนี้ ตรวจไม่พบยีนดื้อยาทั้ง 6 ชนิดในเชื้อ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ ซึ่งการดื้อยาอาจเกิดจากกลไกอื่นหรือยีนชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ได้ตรวจหาในครั้งนี้ ในการศึกษานี้ตรวจไม่พบยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ดื้อต่อยาโคลิสติน ทั้ง 15 สายพันธุ์ ข้อมูลแสดงใน Table 6

ความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems และโคลิสติน

ผลทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ทั้ง 68 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* ส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 86) ดื้อต่อยาที่ใช้ทดสอบ ยกเว้นยา amikacin, gentamicin และ netilmicin ที่ยังพบว่ามีความไวอยู่ที่ประมาณ ร้อยละ 81, 75 และ 71 ตามลำดับ ข้อมูลแสดงใน Table 4

ในขณะที่ เชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินทั้ง 13 สายพันธุ์ มีความไวต่อยา amikacin, gentamicin และ netilmicin ร้อยละ 38, 38 และ 46 ตามลำดับ ในจำนวนนี้ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน สายพันธุ์ที่มียีนดื้อยา ชนิด $bla_{OXA48\text{-}like}$ ให้ผลความไวต่อยา amikacin, gentamicin และ netilmicin ร้อยละ 100 ส่วน *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยาโคลิสติน สายพันธุ์ที่มียีนดื้อยาชนิด bla_{NDM} ให้ผลดื้อต่อยาทั้งสามชนิด ข้อมูลแสดงใน Table 5

วิจารณ์

โคลิสตินเป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (multidrug resistant, MDR) รวมทั้งเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งปัจจุบันพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อนำยาโคลิสตินมาใช้ในการรักษาการติดเชื้อดื้อยามากขึ้น ก็เริ่มพบการดื้อต่อยาโคลิสตินทำให้เกิดปัญหาในการจัดการรักษาการติดเชื้อดื้อยาดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาอุบัติการณ์การดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ที่โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 และนำเชื้อสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินไปตรวจหาชนิดของยีนที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินด้วยกลไกการดื้อยาแบบใหม่ที่สามารถส่งต่อยีนดื้อยาข้ามสายพันธุ์ได้ง่ายขึ้นและเร็วขึ้น (plasmid mediated colistin

Table 4 Antimicrobial susceptibility profile of 68 carbapenem resistant *K. pneumoniae*

Antimicrobial agent	%Susceptible	%Resistant
Amoxicillin/clavulanic acid	0	100
Ceftriaxone	1	99
Ceftazidime	1	99
Cefepime	6	94
Amikacin	81	19
Gentamicin	75	25
Netilmicin	71	29
Ciprofloxacin	6	94
Piperacillin/tazobactam	0	100
Ertapenem	0	100
Meropenem	14	86
Imipenem	10	90

Table 5 Susceptibility results of 15 colistin resistant in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	Resistance gene	%Susceptibility							
		ETP	IMP	MEM	CIP	AK	GN	NET	CL
***K. pneumoniae* (13)**	$bla_{\text{OXA48-like}}$ **(5)**	0	20	20	0	100	100	100	0
	bla_{NDM} **(8)**	0	0	0	0	0	0	0	0
	All (13)	0	8	8	0	38	38	46	0
***E. coli* (1)**	bla_{NDM}	0	0	0	0	100	0	0	0
***E. cloacae* (1)**	**none**	0	0	0	100	100	100	100	0

ETP; ertapenem, IMP; imipenem, MEM; meropenem, CIP; ciprofloxacin, AK; amikacin, GN; gentamicin, NET; netilmicin, CL; colistin

Table 6 Laboratory testing results of 15 colistin resistant in carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolates

Organism	Specimen	Resistant gene	MIC (µg/mL)			
			ETP	MEM	IMP	CL
1. K. pneumoniae	sputum	$bla_{\text{OXA48-like}}$	>4	>8	>8	4
2. K. pneumoniae	sputum	bla_{NDM}	>4	>8	8	>4
3. K. pneumoniae	sputum	bla_{NDM}	>4	8	2	>4
4. K. pneumoniae	urine	$bla_{\text{OXA48-like}}$	2	1	1	>4
5. K. pneumoniae	urine	bla_{NDM}	>4	8	8	>4
6. K. pneumoniae	sputum	bla_{NDM}	>4	>8	>8	>4
7. K. pneumoniae	sputum	bla_{NDM}	>4	8	2	4
8. K. pneumoniae	urine	bla_{NDM}	>4	>8	8	4
9. K. pneumoniae	sputum	$bla_{\text{OXA48-like}}$	>4	>8	>8	>4
10. K. pneumoniae	sputum	$bla_{\text{OXA48-like}}$	>4	>8	>8	>4
11. E. coli	blood	bla_{NDM}	>4	4	2	>4
12. K. pneumoniae	blood	bla_{NDM}	>4	>8	>8	4
13. E. cloacae	blood	not detect	>4	>8	>8	>4
14. K. pneumoniae	sputum	bla_{NDM}	>4	>8	8	>4
15. K. pneumoniae	sputum	$bla_{\text{OXA48-like}}$	>4	>8	8	>4

ETP; ertapenem, IMP; imipenem, MEM; meropenem, CL; colistin

resistance, MCR-1) เพื่อนำผลการศึกษาไปใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังติดตามสถานการณ์ดื้อยาในโรงพยาบาลและควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเหล่านี้ในโรงพยาบาลต่อไป

ในการศึกษานี้ ตัวอย่างเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems 80 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อ *K. pneumoniae* 68 สายพันธุ์ *E. coli* 8 สายพันธุ์ และเชื้อ *E. cloacae* 4 สายพันธุ์ พบเชื้อที่ดื้อต่อยาโคลิสติน 15 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 18.8 (15/80) ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 16.2 (13/80) พบในเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 1.2 (1/ 80) และเชื้อ *E. cloacae* ร้อยละ 1.2 (1/80) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในแถบเอเชียแปซิฟิกที่รายงาน *K. pneumoniae*

ดื้อต่อยาโคลิสตินร้อยละ 13.8 ที่อินเดีย และร้อยละ 50 ที่ฟิลิปปินส์ แต่ในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน ในประเทศไทยมีรายงาน *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสตินเพียงร้อยละ 7.3[17] ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินที่สูงกว่าการศึกษาหลายแห่งที่มีรายงานก่อนหน้านี้ เช่น ในปี พ.ศ. 2554 มีรายงานจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ CRE ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่ไม่ได้รับการรักษาด้วยยาโคลิสติน ร้อยละ 4.9 (4/82)[18] สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *K.pneumoniae* จากสถาบันสุขภาพเด็กแห่งชาติมหาราชินี ในปี พ.ศ. 2549-2550 พบว่า *K. pneumoniae* 55 ตัวอย่าง ที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems ร้อยละ 100 แต่ดื้อต่อยาโคลิสตินร้อยละ 7.3[19] และรายงานของ Olaitan และคณะ ซึ่งได้สำรวจในคนสุขภาพดี ในประเทศไทย ลาว อิสราเอล ไนจีเรีย และฝรั่งเศส ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2556 โดยการแยกเชื้อจากอุจจาระ พบว่า *K. pneumoniae* ดื้อต่อยาโคลิสติน ร้อยละ 6.6 (14/212)[20] และรายงานการศึกษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ซึ่งเป็นโรงพยาบาลขนาดใหญ่ในภูมิภาคเดียวกัน ที่พบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ CRE ร้อยละ 12.4 (36/291) และพบอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 17.9[21] อย่างไรก็ตาม มีรายงานจาก Capone และคณะ พบการดื้อต่อยาโคลิสตินของเชื้อ *K. pneumoniae* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาล 9 แห่งในกรุงโรม ประเทศอิตาลี ปี พ.ศ. 2553-2554 สูงถึงร้อยละ 36.1[22] อย่างไรก็ดี ในการศึกษานี้พบว่าอัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่โรงพยาบาลศิริราชในผู้ป่วยนอนโรงพยาบาลที่ได้รับการรักษาด้วยโคลิสติน ซึ่งเป็นเชื้อที่ colonization พบความชุกของเชื้อ *E. coli* และ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อโคลิสตินถึงร้อยละ 47.5[14] อัตราการดื้อต่อยาโคลิสตินที่แตกต่างกันอาจเกิดจาก ช่วงเวลาที่ศึกษา เกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่าง ชนิดของสิ่งส่งตรวจและจำนวนตัวอย่างเชื้อที่ศึกษา

ผลตรวจหาชนิดของยีนดื้อยา ตรวจไม่พบยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* พบยีนดื้อยา 2 ชนิด ได้แก่ bla_{NDM} และ $bla_{\text{OXA48-like}}$ ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems การตรวจไม่พบยีนดื้อยาโคลิสตินชนิด *mcr-1* ในการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าการดื้อยาโคลิสตินไม่ได้ขึ้นกับยีน *mcr-1* เพียงอย่างเดียวซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป โดยก่อนหน้านี้มีรายงานการศึกษาตรวจหายีน *mcr-1* ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ในโรงพยาบาลต่าง ๆ ในประเทศจีนช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2557 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2558 พบยีน *mcr-1* ในผู้ป่วย 3 รายใน 2 จังหวัด แสดงว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาเกิดขึ้น ในประเทศไทยมีการรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินที่เกิดจากยีน *mcr-1* ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วย ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2560 จากการศึกษาของวันทนา ปวีณกิติพร และคณะ ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข[11] และมีรายงานการศึกษาที่โรงพยาบาลสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ กรมแพทย์ทหารเรือ จังหวัดชลบุรี ซึ่งมีการตรวจพบยีน *mcr-1*[12] เช่นกัน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการเฝ้าระวังการดื้อยานี้ และควบคุมการระบาดในโรงพยาบาลด้วย

การรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาหลายขนาน (MDR) รวมทั้งเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems มักใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน (combination therapy) จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ให้ผลความไวต่อยา amikacin มากที่สุดคือร้อยละ 81 รองลงมาคือยา gentamicin ร้อยละ 75 ส่วนเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อ

ยากลุ่ม carbapenems ที่ดื้อต่อยาโคลิสตินยังมีผลความไวต่อยาทั้ง amikacin และ gentamicin ร้อยละ 38-100 ข้อมูลนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการเลือกยาที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยได้

สรุป

การศึกษานี้เป็นการรายงานการดื้อต่อยาโคลิสตินในเชื้อ CRE ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาเป็นครั้งแรก โดยพบการดื้อยาร้อยละ 18.8 และยังตรวจไม่พบยีนดื้อยาชนิด *mcr-1* ที่ทำให้เชื้อดื้อต่อยาโคลิสตินในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและมีมาตรการควบคุมไม่ให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยานี้เพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจารุกรณ์ วิศาลสวัสดิ์ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนในการทำวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ผศ.ประพันธ์ หลวงสุข คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้คำปรึกษาและชี้แนะแก้ไขบทความวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ดร.อนุศักดิ์ เกิดสิน สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนข้อมูลในการวิจัยทำให้การศึกษาวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาระบบบริการโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Bratu S, Mooty M, Nichani S, *et al*. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. Antimicrob Agent and Chemother 2005; 49: 3018-20.
2. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, *et al*. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 2010; 10: 597-602.
3. Thamlikitkul V. Colistin: Antimicrobial for treat gram negative bacterial infection. Siriraj Med Bull 2008; 1: 152-8. (in Thai)
4. Antonaidou A, Kontopiduo A, Kontopidou F, *et al*. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 786-90.
5. Beno P, Kremery V, Demitrovicova A. Bacteraemia in cancer patients caused by colistin-resistant gram-negative bacilli after previous exposure to ciprofloxacin and /or colistin. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 497-8.

6. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, *et al.* Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant Gram-negative bacteria: a matched case-control study. Crit Care Med 2008; 36: 807-11.
7. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, *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 2016; 16: 161-8.
8. Yu H, Qu F, Shan B, *et al.* Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistnant *Enterobacteriaceae* from different hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 5033-5.
9. Doumith M, Godbole G, Ashton P, *et al.* Detection of plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 2300-5.
10. Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016; 16: 289-90.
11. Paveenkittiporn W, Kerdsin A, Chokngam S, Bunthi C, Sangkitporn S, Gregory CJ. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance and New Delhi metallo-β-lactamase gene in extensively drug-resistant *Escherichia coli* isolated from a patient in Thailand. Diagn Microbiol Infect Dis 2017; 87: 157-9.
12. Srijan A, Margulieux KR, Ruekit S, *et al.* Genomic characterization of nonclonal *mcr-1*-positive multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from clinical samples in Thailand. Microb Drug Resist 2018; 24: 403-10.
13. Wangchinda W, Pati N, Maknakhon N, Seenama C, Tiengrim S, Thamlikitkul V. Collateral damage of using colistin in hospitalized patients on emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection. Antimicrob Resist Infect Control 2018; 7: 1-12.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th Informational supplement. M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Sweden: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. [cite 2020 April 9] available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
16. Hatrogjit R, Kerdsin A, Akeda Y, Hamada S. Detection of plasmid-mediated colistin-resistant and carbapenem-resistant genes by multiplex PCR. MethodsX 2018; 5: 532-6.
17. Bialvaei AZ, Samadi KH. Colistin mechanisms and prevalence of resistance. Curr Med Res Opin 2015; 31: 707-21.

18. Chen S, Hu F, Zhang X, *et al.* Independent emergence of colistin-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates without colistin treatment. J Clin Microbiol 2011; 49: 4022-3.
19. Punpanich W, Tantichattanon W, Wongwatcharapaiboon S, Treeraweeraphong V. *In vitro* susceptibility pattern of cephalosporin-resistant Gram-negative bacteria. J Med Assoc Thai 2008; 91: 21-7.
20. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, *et al.* Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from health humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob Agents 2014; 44: 500-7.
21. Sangrut S, Siripanthong S. Surveillance of colistin resistance in carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolates from Srinagarind Hospital. [B.Sc. Thesis in Medical Technology] Khon Khaen: Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Khaen University; 2015. (in Thai)
22. Capone A, Giannella M, Fortini D, *et al.* High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection account for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect 2013; 19: E23-30.