

Prevalence of Carbapenemase Genes in Carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens in Buddhachinaraj Phitsanulok Hospital

Sirilak Teeraputon*, Jirawat Wimonjariyaboon, Parinya Pengkong,
and Panupong Talan

Department of Medical Technology, Allied Health Sciences Faculty, Naresuan University,
Phitsanulok Province, Thailand

Abstract

Increasing of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* affects the drug selection and is a major problem in treating infectious diseases. This study aimed to determine the prevalence of carbapenemase encoding genes in 160 carbapenem non-susceptible *K. pneumoniae* isolated from clinical specimens in Buddhachinaraj Phitsanulok Hospital during August 2018 to July 2019. Five carbapenemase genes including the bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} and $bla_{OXA-48-like}$ were detected by multiplex PCR method. Of 160 isolates, only three resistant genes were found, the prevalences of which were as follow: $bla_{OXA-48-like}$ 80.62 % (129/160), bla_{NDM} 52.50% (84/160) and bla_{IMP} 3.13% (5/160). The bla_{KPC} and bla_{VIM} genes were not detected. This study revealed a unique prevalence and spread of carbapenemase genes in carbapenemase-producing *K. pneumoniae* of Buddhachinaraj Phitsanulok Hospital, for guidance in surveillance and prevention of drug resistance.

Keywords: Carbapenemase enzyme, *Klebsiella pneumoniae*, Multiplex PCR

*Corresponding author E-mail address: sirilakt@nu.ac.th, ams027@hotmail.com

Received: 14 December 2020

Revised: 9 February 2021

Accepted: 9 March 2021

ความชุกของยีน carbapenemase ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ที่แยกได้จาก สิ่งส่งตรวจผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก

ศิริลักษณ์ ธีระภูธร*, จิรวัดน์ วิมลจริยาบุลย์, ปริญา เฟื่องคง, และกานพงษ์ ตาลาน

ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทคัดย่อ

การดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการเลือกจ่ายและเป็นปัญหาสำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส (carbapenemase) ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมอย่างน้อยหนึ่งชนิด ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 จำนวน 160 ไอโซเลต โดยได้ตรวจหา ยีนคาร์บาพีเนมเมสทั้งหมด 5 ยีน ได้แก่ ยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} และ $bla_{OXA-48-like}$ ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีน คาร์บาพีเนมเมสในเชื้อทั้งหมด 160 ไอโซเลต โดยจำแนกเป็นความชุกของแต่ละยีนในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสดังนี้ ยีน $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 80.62 (129/160), ยีน bla_{NDM} ร้อยละ 52.50 (84/160) และยีน bla_{IMP} ร้อยละ 3.13 (5/160) การศึกษานี้ทำให้ทราบถึงความชุกและการแพร่กระจายของยีนคาร์บาพีเนมเมสในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสของโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก สำหรับเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาต่อไป

คำสำคัญ: เอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส *Klebsiella pneumoniae*, Multiplex PCR

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: sirilakt@nu.ac.th, ams027@hotmail.com

รับบทความ: 14 ธันวาคม 2563

แก้ไขบทความ: 9 กุมภาพันธ์ 2564

รับตีพิมพ์บทความ: 9 มีนาคม 2564

บทนำ

แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและส่งผลต่อการเลือกใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย⁽¹⁾ โดยยากลุ่มคาร์บาพีเนมเป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มยา β -lactam ที่สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุด และเป็นทางเลือกสุดท้ายสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายขนาน⁽²⁾ อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในอันดับ *Enterobacterales* เพิ่มขึ้นทั่วโลก ปัจจุบันพบการดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ของเชื้อ *K. pneumoniae* เพิ่มมากขึ้น จากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาด้านจุลชีพแห่งชาติของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2561 พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* มีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นจากปีก่อนโดยดื้อต่อยาertapenem ร้อยละ 11.5, imipenem ร้อยละ 10.8 และ meropenem ร้อยละ 10.2 ตามลำดับ⁽³⁾ และจากแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาด้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560 - 2564 ได้จัดให้เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญต้องมีการแจ้งเตือนระดับประเทศ และเป็นเชื้อดื้อยาที่องค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำให้มีการเฝ้าระวัง⁽⁴⁾ เนื่องจากเชื้อที่ดื้อยาคาร์บาพีเนมมีการส่งผ่านพลาสมิดที่มียีนดื้อยาคาร์บาพีเนม ส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็ว โดยกลไกหลักในการดื้อยาของเชื้อคือการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส(carbapenemase) ที่มียีนสร้างเอนไซม์อยู่บนพลาสมิด และแบ่งเอนไซม์ตามโครงสร้างโมเลกุล (molecular classification หรือ Ambler classification) ได้แก่ class A (เอนไซม์ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; KPC), class B (เอนไซม์ New Delhi metallo- β -lactamase; NDM, เอนไซม์ Verona integron-encoded metallo- β -lactamase;

VIM, และเอนไซม์ imipenemase; IMP) และ class D (เอนไซม์ Oxacillinase-48; OXA-48)^(1, 5) ซึ่งยีนที่พบบ่อย ได้แก่ ยีน *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} และ *bla*_{OXA-48}^(6, 7) และยังพบว่ามียีนดื้อยาชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น ยีนสร้างเอนไซม์ Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) ยีนสร้างเอนไซม์ AmpC^(8, 9)

นอกจากนี้ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) ได้แนะนำให้ตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสของเชื้อ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) เพื่อป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม โดยเฉพาะเชื้อ *Klebsiella* spp. และ *Escherichia coli* ซึ่งพบเป็นเชื้อ CRE ร้อยละ 11 และ 2 ตามลำดับ⁽¹⁰⁾ โดยการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสใช้การทดสอบความไวต่อยาด้านจุลชีพในงานบริการประจำวัน คือทดสอบความไวของเชื้อต่อยาertapenem, imipenem และ meropenem โดยวิธี disk diffusion หรือการหาค่า MIC ตามคำแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)^(11, 12)

การตรวจหาเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนมอย่างรวดเร็ว และการทราบกลไกการดื้อยาของเชื้อ สามารถช่วยการเลือกใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ และยังสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้^(6, 13) นอกจากเทคนิคทางพีโนไทป์ในการตรวจหาการดื้อยาแล้ว การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่มีประโยชน์และรวดเร็วที่ใช้ตรวจสอบยีนดื้อยาได้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส⁽¹⁴⁾ และเหมาะสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยสนใจและต้องการทราบความชุกของยีนคาร์บาพีเนมเมส ใน

เชื้อ *K. pneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งเพาะเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก เพื่อให้ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} และ $bla_{OXA-48-like}$ โดยใช้วิธี multiplex PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความแม่นยำ ความจำเพาะ และสามารถตรวจสอบยีนได้อย่างได้หลายยีนในปฏิกิริยาเดียว ซึ่งช่วยให้ลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อได้อย่างได้ ส่งผลให้สามารถควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างรวดเร็ว

วัสดุและวิธีการ

1. กลุ่มตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมอย่างน้อยหนึ่งชนิด ได้แก่ ertapenem, imipenem และ meropenem ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก ตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 จำนวน 160 ไอโซเลท โดยแต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจแต่ละชนิดได้มาจากผู้ป่วยคนละรายกัน และได้ผ่านการพิสูจน์ชนิดเชื้อซ้ำโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar, MacConkey agar และการทดสอบทางชีวเคมี^(11, 15) โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (IRB No. 0632/61)

2. การทดสอบความไวต่อยาในกลุ่ม carbapenem ด้วยวิธี disk diffusion

ตรวจคัดกรองเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมโดยใช้แผ่นยา meropenem (10 ไมโครกรัม) ertapenem (10 ไมโครกรัม) และ imipenem (10 ไมโครกรัม) วางบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton

agar ที่ป้ายเชื้อที่มีความขุ่น 0.5 McFarland แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณที่ยาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบแผ่นยา โดยใช้เกณฑ์การทดสอบและอ่านผลการทดสอบตาม Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽¹¹⁾

3. การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี multiplex PCR

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *K. pneumoniae* จากการบ่มเพาะเชื้อข้ามคืนใน Trypticase soy broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่มีส่วนใสด้านบนและล่างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในเครื่อง dry bath และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว (screw cap tube) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน carbapenemase โดยวิธี Multiplex PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนคาร์บาพีเนมเมส ได้แก่ ยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} และ $bla_{OXA-48-like}$ โดยใช้เครื่อง thermocycler Bio-rad รุ่น MJ Mini ด้วยชุดไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 1 ตามขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing

Table 1 Primers used for carbapenemase genes

Gene	Primer ^a	Sequence (5'-3') ^b	Product size (bp)	Reference
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	188	(14)
	IMP-R	CCAAACYACTASGTTATCT		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM2004A-F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	(14)
	VIM2004B-R	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	(14)
	OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621	(14)
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798	(14)
	KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG		

Note: a) F, sense primer; R, antisense primer, b) Y = C or T

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 32 รอบ และขั้นตอน final elongation step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้โดยกระบวนการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 2 (2% agarose gel electrophoresis) ใน 0.5X TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 35 นาที และใช้ 100 base pairs DNA ladder เป็น DNA marker นำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นนาน 5 นาที จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและถ่ายภาพเก็บไว้ เปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของเชื้อควบคุม โดยเชื้อแบคทีเรีย

ควบคุมผลบวกคือ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (*bla*_{KPC}), *K. pneumoniae* (Lab strain; *bla*_{NDM} และ *bla*_{OXA-48}) และ *Pseudomonas aeruginosa* (Lab strain; *bla*_{VIM} และ *bla*_{IMP}) และเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลลบคือ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 160 ไอโซเลทที่นำมาทดสอบทุกไอโซเลทคือต่อยา ertapenem (ร้อยละ 100) คือต่อยา meropenem 144 ไอโซเลท (ร้อยละ 90) และคือต่อยา imipenem 121 ไอโซเลท (ร้อยละ 75.62) ตามลำดับ และมี 11 ไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบไวต่อยา meropenem (2/160; ร้อยละ 1.25)

Table 2 Carbapenem susceptibility testing by disk diffusion in 160 *K. pneumoniae* isolates

Antibiotics	Susceptibility		
	S (%)	I (%)	R (%)
Ertapenem	-	-	160 (100)
Meropenem	2 (1.25)	14 (8.75)	144 (90)
Imipenem	9 (5.62)	30 (18.75)	121 (75.62)

Note: S = susceptible, I = intermediate, R = resistant

และ imipenem (9/160; ร้อยละ 5.62) (Table 2) ซึ่งในจำนวนนี้มี 2 ไอโซเลทที่ให้ผลการทดสอบไวต่อทั้ง meropenem และ imipenem และเมื่อตรวจหายีนคาร์บาพีเนมเมส ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม พบยีนคาร์บาพีเนมเมสทั้งหมด 3 ยีน คือ $bla_{OXA-48-like}$, bla_{NDM} และ bla_{IMP} โดยยีนที่พบมากที่สุดคือ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 44.38 (71/160), ยีน bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 34.38 (55/160), ยีน bla_{NDM} ร้อยละ 18.12 (29/160), ยีน bla_{IMP} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 1.88 (3/160) และยีน bla_{IMP}

ร้อยละ 1.25 (2/160) ตามลำดับ (Table 3) โดยไม่พบยีน bla_{KPC} และ bla_{VIM} ในเชื้อ *K. pneumoniae* ทุกไอโซเลท ทั้งนี้สามารถตรวจพบยีน $bla_{OXA-48-like}$, bla_{NDM} และ bla_{IMP} ร้อยละ 2.5 (4/160), 1.25 (2/160) และ 0.62 (1/160) ตามลำดับ ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มีความไวต่อยา imipenem เพียงชนิดเดียว (7 ไอโซเลท) และพบยีน bla_{IMP} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$ ใน เชื้ออีก 2 ไอโซเลท ที่มีความไวต่อยาทั้ง imipenem และ meropenem (2 ไอโซเลท)

Table 3 Prevalence of carbapenemase genes in 160 carbapenems non-susceptible *K. pneumoniae*

Carbapenemase genes	Number of Isolates (%)
KPC	0 (0)
NDM	29 (18.12)
VIM	0 (0)
IMP	2 (1.25)
OXA-48-like	71 (44.38)
IMP and OXA-48-like	3 (1.88)
NDM and OXA-48-like	55 (34.38)
Total	160 (100)

วิจารณ์และสรุป

จากอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยมีกลไกที่สำคัญคือการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนิมเมส ซึ่งเชื่อในกลุ่มนี้ที่พบมากที่สุดจากรายงานทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ได้แก่ เชื้อ *K. pneumoniae*^(16 - 18) ในการศึกษาที่พบยีน คาร์บาเพนิมเมสในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิมในทุกไอโซเลท โดยพบยีน *bla*_{OXA-48-like} มากที่สุด รองลงมาคือ ยีน *bla*_{NDM} และยีน *bla*_{IMP} จะเห็นได้ว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิมมีกลไกหลักจากการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา โดยอัตราการดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนิมที่พบมากที่สุด ได้แก่ การดื้อยา ertapenem รองลงมาคือยา meropenem และ imipenem คิดเป็นร้อยละ 100, 90 และ 75.63 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นหลังของ วิรากร ดวงแก้ว และคณะในปี พ.ศ. 2561 ที่พบว่าเชื้อมีการดื้อยา ertapenem มากที่สุดร้อยละ 100 รองลงมาคือยา meropenem และ imipenem⁽¹⁸⁾ ซึ่งการที่เชื้อแบคทีเรียไม่ไวต่อยา ertapenem (ertapenem non-susceptibility) สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรานั้นน่าจะมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนิมเมส ดังนั้นเมื่อพบว่ามีการดื้อยา ertapenem จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะตรวจพบยีนคาร์บาเพนิมเมส^(11 - 12) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Abouddihaj Barguigua และคณะในปี พ.ศ. 2558 และการศึกษาของสุจิตรา มานะกุล และคณะ ในปี พ.ศ. 2559 ที่พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่พบยีนคาร์บาเพนิมเมสมีการดื้อยา ertapenem ร้อยละ 100^(15, 20) โดยการศึกษาสามารถยืนยันได้จากการตรวจพบยีนที่สร้างเอนไซม์คาร์บาเพนิมเมส จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *bla*_{OXA-48-like}, ยีน *bla*_{NDM} และยีน *bla*_{IMP} แต่ไม่พบยีน *bla*_{KPC} และยีน *bla*_{VIM} ซึ่งสอดคล้องกับ

การศึกษาของ วราวุฒิ เลาเลิศ และคณะในปี พ.ศ. 2561⁽²⁾ และยังสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไทยที่พบความชุกของยีน *bla*_{KPC} และยีน *bla*_{VIM} ในระดับที่ต่ำ^(2, 9, 15)

เมื่อจำแนกเป็นความชุกของแต่ละยีนพบยีน *bla*_{OXA-48-like} มากที่สุด สูงถึงร้อยละ 80.62 รองลงมาคือยีน *bla*_{NDM} ร้อยละ 52.5 และ ยีน *bla*_{IMP} ร้อยละ 3.13 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในต่างประเทศก่อนหน้านี้ที่พบกลุ่มยีน *bla*_{OXA-48-like} ซึ่งเป็น variant type ของยีน *bla*_{OXA-48} มากที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zeinab Jafari และคณะ ประเทศอิหร่านในปี พ.ศ. 2561 ที่พบยีน *bla*_{OXA-48} มากที่สุดร้อยละ 72⁽²¹⁾ การศึกษาของ Mateja Pirš และคณะ ประเทศสโลวีเนียในปี พ.ศ. 2561 พบยีน *bla*_{OXA-48} มากที่สุดร้อยละ 57.89⁽²²⁾ การศึกษาของ Ye-Mun Low และคณะ ประเทศมาเลเซียในปี พ.ศ. 2560 พบยีน *bla*_{OXA-48} มากที่สุดร้อยละ 70.59⁽²³⁾ การศึกษาของ Seok Hoon Jeong และคณะ ประเทศเกาหลีใต้ในปี พ.ศ. 2559 พบยีน *bla*_{OXA-232} มากที่สุดร้อยละ 63.01⁽²⁴⁾ และการศึกษาของ Abouddihaj Barguigua และคณะ ประเทศโมร็อกโก ในปี พ.ศ. 2558 พบยีน *bla*_{OXA-48} มากที่สุดร้อยละ 81.81⁽¹⁹⁾ สำหรับประเทศไทยพบว่าการศึกษาให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานีในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งพบความชุกของยีน *bla*_{OXA-48-like} สูงสุดร้อยละ 61.54, และยีน *bla*_{NDM} ร้อยละ 48.72 ตามลำดับ⁽¹⁵⁾ แต่ให้ผลแตกต่างจากการศึกษาในโรงพยาบาลรามาริบัติและโรงพยาบาลในกรุงเทพฯ ในปี พ.ศ. 2561 ซึ่งพบความชุกของยีน *bla*_{NDM} สูงสุดร้อยละ 69.64, ยีน *bla*_{OXA-48-like} ร้อยละ 61.53 และยีน *bla*_{IMP} ร้อยละ 1.19 ตามลำดับ⁽²⁾ เช่นเดียวกับการศึกษาในโรงพยาบาลพระปกเกล้าในปี พ.ศ. 2559⁽²⁵⁾ และโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาในปี พ.ศ. 2557 ซึ่งพบความ

ชุกของยีน bla_{NDM} สูงสุดด้วยเช่นกัน⁽²⁶⁾ อย่างไรก็ตามสำหรับประเทศไทยพบยีน $bla_{OXA-48-like}$ และ bla_{NDM} ในอัตราที่สูงมาตลอด ทั้งนี้ความแตกต่างระหว่างความชุกของยีนในแต่ละพื้นที่อาจขึ้นกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ สังคม และวัฒนธรรมที่แตกต่างกัน รวมถึงการเดินทางระหว่างประเทศที่มีอุบัติการณ์ของยีนนั้นๆ โดยการแพร่กระจายของยีนสามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างโรงพยาบาล ชุมชน และสิ่งแวดล้อม⁽²⁷⁾

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความชุกของยีน bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{VIM} , bla_{IMP} และ $bla_{OXA-48-like}$ ที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีเนมเมสในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมของโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก ทำให้ทราบถึงข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาปฏิชีวนะ การเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาคาร์บาพีเนม รวมถึงเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังการดื้อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนม ของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับโรงพยาบาลต่อไป รวมถึงเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ ที่นำมารักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CRE โดยเฉพาะเชื้อ *K. pneumoniae* เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวให้ดื้อต่อยาและแพร่กระจายยีนดื้อยาได้สูง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยงานจุลชีววิทยาคลินิก กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณะสหเวชศาสตร์ และมหาวิทยาลัยนเรศวรที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol* 2016; 7: 895.
2. 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.
3. National Antimicrobial Resistant Surveillance Center, Thailand. Antimicrobial resistance situation 2000-2018 [cited 2019 Apr 28]. Available from: <http://narst.dmsc.moph.go.th>. (in Thai)
4. National Health Commission Office. Thailand national strategic plan on antimicrobial resistance 2017-2021. [cited 2019 Apr 28]. Available from: <http://kb-phpp.nationalhealth.or.th/handle/123456789/7525>. (in Thai)
5. AlTamimi M, AlSalamah A, AlKhulaifi M, AlAjlan H. Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by *Enterobacteriaceae*. *Saudi J Biol Sci* 2017; 24: 155-61.

6. Khorvash F, Yazdani MR, Soudi AA, Shabani S, Tavahen N. Prevalence of acquired carbapenemase genes in *Klebsiella pneumoniae* by multiplex PCR in Isfahan. *Adv Biomed Res* 2017; 6: 41.
7. Zhao D, Zuo Y, Wang Z, Li J. Characterize carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates for nosocomial pneumonia and their gram-negative bacteria neighbors in the respiratory tract. *Mol Biol Rep* 2019; 46: 609-16.
8. Findlay J, Hamouda A, Dancer SJ, Amyes SG. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 140-6.
9. Netikul T, Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340 at a university hospital in Thailand. *PLoS One* 2015; 10: e0139116.
10. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic/antimicrobial resistance (AR/AMR): biggest threats and data. 2015 [cited 2019 Apr 27]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
11. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
12. Trakulsomboon S, Paveenkittiporn W, Dejsirilert S. Antimicrobial drug susceptibility test. In Worachit M, editors. *Bacteria and Mold Operation Manual for Hospitals, Centers and General Hospitals*. Bangkok: Premier Marketing Company Solutions Ltd.; 2018. p. 215-64. (in Thai)
13. Workneh M, Yee R, Simner PJ. Phenotypic methods for detection of carbapenemase production in carbapenem-resistant organisms: what method should your laboratory choose?. *Clin Microbiol Newsl* 2019; 41: 11-22.
14. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 119-23.
15. Manankul S, Kertsin A. Comparison of standard Carba-NP and Modified Carba-NP for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Reg J Med* 2016; 30: 145-7. (in Thai)
16. Chotiprasitsakul D, Srichatrapimuk S, Kirdlarp S, Pyden AD, Santanirand P. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a 5-year experience at a tertiary care hospital 2019; 12: 461-8.
17. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis* 2017; 215: s28-36.

18. Malchione MD, Torres LM, Hartley DM, Koch M, Goodman JL. Carbapenem and colistin resistance in *Enterobacteriaceae* in Southeast Asia: review and mapping of emerging and overlapping challenges. *Int J Antimicrob Agents* 2019; 54: 381-99.
19. Duangkaw W, Khamprom N, Amornthip-ayawong D, Tuntrakul P, Phannachet K. Identification of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) clinical isolates from hospitals in Nan province. *Chiang Mai Med J* 2018; 57: 183-94.
20. Barguigua A, Zerouali K, Katfy K, El Otmani F, Timinouni M, Elmdaghri N. Occurrence of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco. *Infect Genet Evol* 2015; 31: 142-8.
21. Jafari Z, Harati AA, Haeili M, *et al.* Molecular epidemiology and drug resistance pattern of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Microb Drug Resist* 2019; 25: 336-43.
22. Pirš M, Cerar Kišek T, Križan Hergouth V, *et al.* Successful control of the first OXA-48 and/or NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Slovenia 2014-2016. *J Hosp Infect* 2019; 101: 142-9.
23. Low Y-M, Yap PS-X, Abdul Jabar K, *et al.* The emergence of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia: correlation between microbiological trends with host characteristics and clinical factors. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017; 6: 5.
24. Jeong SH, Kim HS, Kim JS, *et al.* Prevalence and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from five hospitals in Korea. *Ann Lab Med* 2016; 36: 529-35.
25. Arsheewa W. Prevalence of carbapenemase enzyme in clinical Isolates of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Prapokklao Hospital in 2012 - 2013. *J Prapokklao Hosp Clin Med Educ Cent* 2016; 33: 314-24. (in Thai)
26. Singpoltan N. Carbapenems resistant *Enterobacteriaceae* surveillance in Maharat Nakhonratchasima Hospital. *J Med Tech Assoc Thailand* 2014; 42: 4930-9. (in Thai)
27. Branka Bedenić, Sardelić S. Carbapenemases [Online First], IntechOpen, 2018 [cited 2019 May 12]. Available from: <https://www.intechopen.com/onlinefirst/carbapenemases>.