การตรวจหาเอนไซม์ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase ในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae

ปิยะรัตน์ จิตรภิรมย์[1,*] ธวัชชัย แจ่มนาค[2]

[1]สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพ ฯ
[2]กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์ โรงพยาบาลนครนายก จังหวัดนครนายก
[*]Corresponding author e-mail: p.chitpirom@yahoo.com

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความชุกของเอนไซม์ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) ในเชื้อกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลนครนายก จังหวัดนครนายก จำนวน 500 ไอโซเลต โดยการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ด้วยวิธี Disc diffusion ต่อยาในกลุ่ม Carbapenems พบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง จำนวน 46 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 9.2 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยพบในเชื้อ *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* และ *Salmonella* spp. จำนวน 16, 15, 11, 3 และ 1 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 3.2, 3.0, 2.2, 0.6 และ 0.2 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ และนำมาตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ทางฟีโนไทป์ โดยวิธี Modified Hodge test (MHT) พบเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจยืนยันด้วยวิธี MHT จำนวน 8 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 1.6 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยเป็นเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 6 ไอโซเลต เชื้อ *E. coli* จำนวน 1 ไอโซเลต และเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 1 ไอโซเลต ดังนั้นห้องปฏิบัติการทางการแพทย์จึงควรทำการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ KPC ของเชื้อกลุ่มดังกล่าวในงานประจำ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ในการเลือกใช้ยาในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อกลุ่มดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE)/ Enterobacteriaceae/ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)/ Modified Hodge test (MHT)

Detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Piyarat Chitpirom[1,*] Tawatchai Jamnak[2]

[1]Medical Technology Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdej-chaopraya Rajabhat University, Bangkok

[2]Department of Medical Technology, Nakhon Nayok Hospital, Nakhon Nayok Province

[*]Corresponding author e-mail: p.chitpirom@yahoo.com

Abstract

This study aims to determine the prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens of patients hospitalizing in Nakhon Nayok Hospital, Nakhon Nayok province. Five hundred Enterobacteriaceae isolates were taken for the detection of KPC-producing isolates by the disc diffusion method of carbapenems. The results showed 46 isolates (9.2%) of KPC-producing Enterobacteriaceae which were 16 isolates (3.2%) of *Acinetobacter baumannii*, 15 isolates (3.0%) of *Klebsiella pneumoniae,* 11 isolates (2.2%) of *Escherichia coli*, 3 isolates (0.6%) of *Enterobacter cloacae* and 1 isolate (0.2%) of *Salmonella* spp. The phenotypic confirmation of KPC enzyme productions was done by Modified Hodge test (MHT). The confirmatory results indicated 8 (1.6%) isolates were detected, which 6 isolates were *A. baumannii*, 1 isolate was *E. coli,* and 1 isolate was *K. pneumoniae*. This investigation suggests routine identification of KPC enzyme production is necessary for effective anti-microbial drug use.

Keywords: Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE)/ Enterobacteriaceae/ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)/ Modified Hodge test (MHT)

บทนำ

ปัจจุบันการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems ในแบคทีเรียแกรมลบเป็นปัญหาในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก โดยยากลุ่ม Carbapenems เป็นยาทางเลือกสุดท้ายที่นิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่มีสาเหตุจากเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่สร้างเอนไซม์ Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) (Pitout & Laupland, 2008) และพบเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems หรือ “Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE)” มากขึ้น (Queenan & Bush, 2007) โดยกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อต่อยากลุ่มนี้ที่สำคัญ คือ การที่เชื้อกลุ่มดังกล่าวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์บีตา-แลคทาเมส (Beta-lactamase) ที่สามารถสลายยาในกลุ่ม Carbapenems ได้ ที่เรียกว่า Carbapenemase (Gaynes & Culver, 1992; Nordmann *et al*., 2009)

ในปี พ.ศ. 2544 มีรายงานพบเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ Carbapenemase มาทำลายยา โดยพบครั้งแรกในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลทางตอนเหนือของรัฐคาโรไลนา ประเทศสหรัฐอเมริกา จึงเรียกชื่อเอนไซม์ดังกล่าวว่า *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (Yigit *et al*., 2001) จากนั้นไม่นานสามารถตรวจพบการแพร่กระจายของเอนไซม์นี้ไปยังรัฐต่าง ๆ ทั่วประเทศ รวมทั้งประเทศอื่น ๆ ทั่วโลก (Navon-Venezia *et al*., 2009; Nordmann *et al*., 2009) เนื่องจากการสร้างเอนไซม์ KPC ถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายการดื้อยาของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Nordmann *et al*., 2009; Gupta *et al*., 2011) KPC เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อสามารถต้านฤทธิ์ของยาในกลุ่ม Carbapenems ได้ เช่น Ertapenem, Meropenem และ Imipenem ในปัจจุบันเอนไซม์ KPC นอกจากจะตรวจพบในเชื้อ *K. pneumoniae* แล้ว ยังสามารถพบได้ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ เช่น *Escherichia coli, Enterobacter* spp., *Salmonella enterica, Proteus mirabilis, Citrobacter freundii, Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. และ *Acinetobacter baumannii* ได้เช่นกัน (Arnold *et al*., 2011)

ในปัจจุบันพบมีการรายงานเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ KPC ไปทั่วโลก นับตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2544 ที่มีรายงานการพบเอนไซม์ KPC ครั้งแรก ต่อมาพบมีรายงานของ Pasteran *et al*. (2009) จากการตรวจคัดกรองความไวของเชื้อที่สงสัยว่ามีการสร้างเอนไซม์ Class A Carbapenemases ในกลุ่ม Enterobecteriaceae ในประเทศอาร์เจนตินา พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ KPC ในเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 4.55 และพบในเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 3.03 ซึ่งดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems และยังมีรายงานของ Yusuf *et al.* (2012) ได้ทำการ

ตรวจหาเอนไซม์ Carbapenemases ทางฟีโนไทป์ในกลุ่ม Enterobecteriaceae ในประเทศไนจีเรีย พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ KPC ในเชื้อ *K. pneumoniae* ร้อยละ 1.48 และพบในเชื้อ *E. coli* ร้อยละ 9.63 โดยพบว่าส่วนใหญ่จะดื้อต่อยา Meropenem สำหรับความชุกของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ KPC ในประเทศไทย มีรายงานผู้ป่วยที่ติดเชื้อ KPC ไม่มากนัก ทั้งนี้ในปี พ.ศ. 2554 มีรายงานพบเชื้อ *E. coli* ที่มีการสร้างเอนไซม์ KPC ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี จากสิ่งส่งตรวจปัสสาวะ โดยพบว่าให้ผลดื้อต่อยา Ertapenem และ Meropenem จึงทำให้ไม่สามารถรักษาด้วยยากลุ่ม Carbapenems ได้ (ศศิธร, 2554) และมีรายงานความชุกของ Enterobecteriaceae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems ในวิทยาลัยแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล พบมีการสร้างเอนไซม์ KPC ร้อยละ 0.13 และพบว่ามีความไวต่อยา Ertapenem ลดลง (อุราภรณ์, 2554) ดังนั้นการเฝ้าติดตามการระบาดของเชื้อกลุ่มดังกล่าวในโรงพยาบาลจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากยากลุ่ม Carbapenems เป็นยากลุ่มสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อแบคทีเรียชนิดรุนแรงและนิยมใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อที่เกิดจาก Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด (Multiple-Drug Resistance: MDR) แต่เมื่อมีการระบาดของเชื้อที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ KPC ซึ่งจะเกิดการดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems จนไม่อาจใช้ในการรักษา และมีทางเลือกชนิดของยาต้านจุลชีพในการรักษาจำกัด ทำให้อัตราการเจ็บป่วยและเสียชีวิตจากการติดเชื้อสูงขึ้น เช่นเดียวกับที่เกิดปรากฏการณ์ระบาดของ Superbugs (แบคทีเรียดื้อยาแทบทุกชนิด) ในประเทศอินเดีย (ประชาชาติธุรกิจ, 2555)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงตระหนักถึงปัญหาของการดื้อต่อยาดังกล่าว โดยมีวัตถุประสงค์ในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ KPC ของ Enterobacteriaceae ที่แยกจากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลทั่วไป เพื่อเป็นการเฝ้าระวังการติดเชื้อดื้อยาชนิดนี้ จากการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ KPC โดยการทดสอบความไวต่อยากลุ่ม Carbapenems โดยวิธี Disc diffusion และตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ KPC ทางฟีโนไทป์โดยวิธี Modified Hodge test (MHT) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการบริหารจัดการในการควบคุม และป้องกันการแพร่กระจายการดื้อยาของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ KPC ไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่น เนื่องจากเอนไซม์ KPC ถูกควบคุมการสร้างโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด จึงสามารถแพร่กระจาย และถ่ายทอดยีนดื้อยาได้อย่างกว้างขวางและรวดเร็ว ซึ่งนอกจากสามารถถ่ายทอดยีนดื้อยานี้ในแบคทีเรียชนิดเดียวกันแล้ว ยังสามารถเกิดการถ่ายทอดยีนในแบคทีเรียต่างจีนัสได้อีกด้วย (Sayah *et al*., 2005) อีกทั้งสามารถนำข้อมูลของการดื้อยาไปช่วยให้แพทย์

เลือกใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ ที่เกิดขึ้นทั้งในโรงพยาบาลและชุมชน เพื่อให้การรักษาทำได้ทันท่วงที เป็นการลดอัตราการตาย และลดระยะเวลาในการนอนรักษาตัวในโรงพยาบาล ซึ่งส่งผลต่อการลดค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลของผู้ป่วย

วิธีดำเนินการวิจัย

นำ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลนครนายก จังหวัดนครนายก จำนวน 500 ไอโซเลต มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar (Oxoid, U.K.) นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่แยกได้มาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical test) ตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบและวินิจฉัยชนิดของเชื้อ เก็บตัวอย่างเชื้อที่แยกได้บน Nutrient agar slant เพื่อนำไปทำการตรวจคัดกรองหาการสร้างเอนไซม์ KPC ต่อไป

วิธีการตรวจคัดกรองหาการสร้างเอนไซม์ KPC โดยการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ ด้วยวิธี Disc diffusion นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ และเชื้อแบคทีเรียควบคุมคือ *E. coli* ATCC 25922 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid, U.K.) แล้วนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาปรับความเข้มข้นของเชื้อในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (Sterile normal saline solution) ให้มีความเข้มข้นหรือความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ซึ่งเทียบเท่ากับ *E. coli* จำนวน 1.0×10^6 CFU/ml โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นของสารละลาย (Densitometer ยี่ห้อ Grant รุ่น Den-1) นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ (Sterile cotton swab) จุ่มลงในเชื้อที่ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ดังกล่าว แล้วบิดให้หมาดกับบริเวณข้างหลอด นำไปทำสนามเชื้อหรือป้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA เป็น 3 ระนาบโดยเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ 3-5 นาที วางแผ่นยาต้านจุลชีพในกลุ่ม Carbapenems (Oxoid, U.K.) ได้แก่ Imipenem (IPM), Ertapenem (ETP) และ Meropenem (MEM) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่เตรียมไว้ ให้มีระยะห่างระหว่างขอบแผ่นยาประมาณ 20 มิลลิเมตร นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลและแปลผลตามวิธีของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013)

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ KPC ไปตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์

KPC ด้วยวิธี Modified Hodge test (MHT) สำหรับการควบคุมคุณภาพการตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ KPC ในห้องปฏิบัติการ (Quality control) จะใช้เชื้อแบคทีเรียควบคุม (Control stains) ได้แก่ เชื้อ *K. pneumoniae* BAA-1705 เป็นแบคทีเรียควบคุมคุณภาพที่สามารถสร้างเอนไซม์ KPC หรือแบคทีเรียควบคุมผลบวก (Positive control) และใช้เชื้อ *K. pneumonia* BAA-1706 เป็นแบคทีเรียควบคุมคุณภาพที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ KPC หรือแบคทีเรียควบคุมผลลบ (Negative control) ตามมาตรฐานของ CLSI โดยนำเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มาปรับความเข้มข้นของเชื้อในน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ให้มีความเข้มข้นหรือความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland โดยใช้เครื่องวัดความขุ่นของสารละลาย นำไม้พันสำลีปราศจากเชื้อมาจุ่มลงในเชื้อที่ปรับให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ดังกล่าวแล้วบิดให้หมาดกับบริเวณข้างหลอด นำไปป้ายลงบน MHA เป็น 3 ระนาบ ให้เชื้อเกลี่ยกระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง ใช้ Forceps คีบแผ่นสารต้านจุลชีพกลุ่ม Carbapenems มาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA กดเบา ๆ เพื่อให้แผ่นสารต้านจุลชีพติดกับอาหารเพาะเชื้อ นำเชื้อที่ต้องการทดสอบมาขีดเป็นเส้นตรงจากขอบแผ่นสารต้านจุลชีพไปถึงขอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA นำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบ โดยผลบวกจะพบเชื้อที่นำมาทดสอบสามารถเจริญเข้าไปใน Inhibition zone ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 มีลักษณะเป็นรูปเว้าเข้าไปตรงกลางของแผ่นยาคล้ายรูปดอกจิก (Clover leaf) ตรงบริเวณจุดตัดของเชื้อที่ต้องการทดสอบกับเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีความไวต่อยา Carbapenems จะมี การเจริญเข้าไปตามรอยที่ป้ายเชื้อทดสอบภายใน Inhibition zone ของแผ่นยา Carbapenems แสดงว่าเชื้อที่นำมาทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ KPC สำหรับผลลบจะพบเชื้อที่นำมาทดสอบไม่สามารถเจริญเข้าไปใน Inhibition zone ของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ได้ จะมีลักษณะ Inhibition zone ที่กว้าง แสดงว่าเชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์ KPC และใช้สถิติเชิงพรรณนาในการวิเคราะห์ข้อมูล ได้แก่ ค่าร้อยละ พร้อมทั้งนำเสนอข้อมูลวิจัยโดยใช้ตาราง

ผลการวิจัย

จากการแยกแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลนครนายก จังหวัดนครนายก จำนวน 500 ไอโซเลต โดยแยกเชื้อได้จากสิ่งส่งตรวจ 6 ชนิด ได้แก่ เสมหะ (Sputum) ปัสสาวะ (Urine) หนอง (Pus) เลือด (Hemo-culture) อุจจาระ (Stool) และไม่ระบุชนิดของสิ่งส่งตรวจ จำนวน 198, 188, 53, 50, 7 และ 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 39.6, 37.6, 10.6, 10.0, 1.4 และ 0.8 ของจำนวน

สิ่งส่งตรวจทั้งหมด ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *K. pneumoniae, A. baumannii*, *Salmonella* spp. และ *Enterobacter cloacae* จำนวน 266, 200, 20, 14 และ 10 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 51.2, 40.0, 4.0, 2.8 และ 2.0 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ

ผลการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ KPC โดยวิธี Disc diffusion ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae จำนวน 500 ไอโซเลต พบว่าเชื้อแบคทีเรียให้ผลดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems จำนวน 46 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 9.2 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยพบในเชื้อ *E. coli* จำนวน 11 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 2.2 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ร้อยละ 4.3 ของจำนวน *E. coli* ทั้งหมด) พบในเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 3.0 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ร้อยละ 7.5 ของจำนวน *K. pneumoniae* ทั้งหมด) พบในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 16 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 3.2 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ร้อยละ 80.0 ของจำนวน *A. baumannii* ทั้งหมด) พบในเชื้อ *Salmonella* spp. จำนวน 1 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 0.2 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ร้อยละ 7.1 ของจำนวน *Salmonella* spp. ทั้งหมด) และพบในเชื้อ *E. cloacae* จำนวน 3 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 0.6 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (ร้อยละ 30.0 ของจำนวน *E. cloacae* ทั้งหมด)

เมื่อแยกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจพบว่าแบคทีเรียที่ให้ผลดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems นั้นแยกได้จากสิ่งส่งตรวจจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เสมหะ จำนวน 19 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.8 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด (ร้อยละ 9.6 ของจำนวนตัวอย่างเสมหะทั้งหมด) พบในปัสสาวะ จำนวน 18 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.6 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด (ร้อยละ 9.6 ของจำนวนตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด) พบในหนอง จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.4 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด (ร้อยละ 3.8 ของจำนวนตัวอย่างหนองทั้งหมด) พบในเลือด จำนวน 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.8 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด (ร้อยละ 8.0 ของจำนวนตัวอย่างเลือดทั้งหมด) และพบในสิ่งส่งตรวจที่ไม่ระบุชนิด จำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0.6 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจทั้งหมด (ร้อยละ 75.0 ของจำนวนสิ่งส่งตรวจที่ไม่ระบุชนิดทั้งหมด) ดังตารางที่ 1

เมื่อนำมาเชื้อที่ให้ผลบวกต่อตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ KPC มาตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ KPC ทางฟีโนไทป์โดยวิธี MHT พบเชื้อที่ให้ผลบวกจำนวน 8 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 1.6 ของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยพบในเชื้อ *A. baumannii* จำนวน 6 ไอโซเลต เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *K. pneumoniae* ชนิดละ

1 ไอโซเลต ดังตารางที่ 2 สำหรับเชื้อ *A. baumannii* และเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ KPC พบว่าดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ทั้ง 3 ชนิด คือ Imipenem, Ertapenem รวมถึง Meropenem ส่วนเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ KPC พบว่าดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems เพียงชนิดเดียว คือ Imipenem

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ KPC โดยวิธี Disc diffusion

แบคทีเรีย	จำนวนของสิ่งส่งตรวจที่ให้ผลบวก (ตัวอย่าง)						รวม (ร้อยละ)
	Sputum (n=198)	Urine (n=188)	Pus (n=53)	Hemo culture (n=50)	Stool (n=7)	ไม่ระบุชนิด (n=4)	
E. coli (n=256)	1	8	1	1	-	-	**11 (2.2)**
K. pneumoniae (n=200)	8	7	0	0	0	-	**15 (3.0)**
A. baumannii (n=20)	10	-	1	2	-	3	**16 (3.2)**
Salmonella spp. (n=14)	0	0	0	1	0	-	**1 (0.2)**
E. cloacae (n=10)	0	3	0	-	-	-	**3 (0.6)**
รวม (ร้อยละ)	**19 (3.8)**	**18 (3.6)**	**2 (0.4)**	**4 (0.8)**	**0 (0.0)**	**3 (0.6)**	**46 (9.2)**

ตารางที่ 2 จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรองโดยวิธี Disc diffusion และการตรวจยืนยันผลการสร้างเอนไซม์ KPC โดยวิธี MHT

แบคทีเรีย	วิธี Disc diffusion (ไอโซเลต)	วิธี MHT (ไอโซเลต)
A. baumannii	16	6
K. pneumoniae	15	1
E. coli	11	1
E. cloacae	3	0
Salmonella spp.	1	0
รวม (ร้อยละ)	**46 (9.2)**	**8 (1.6)**

อภิปรายผล

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ที่สร้างเอนไซม์ KPC จำนวน 6 ไอโซเลต ดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Imipenem, Ertapenem และ Meropenem นอกจากนี้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่าเชื้อ *A. baumannii* ทั้ง 6 ไอโซเลต มีการสร้างเอนไซม์ ESBL ร่วมด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Keerasuntonpong *et al*. (2006) ที่พบเชื้อ *A. baumannii* ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลศิริราช ร้อยละ 57.0 เป็น Pandrug-resistant *A. baumannii* (PDR-AB) โดยเชื้อ PDR-AB ดังกล่าวมีอุบัติการณ์ดื้อต่อยา Cotrimoxazole, Gentamicin, Amikacin, Piperacillin, Imipenem, Meropenem, Piperacillin/tazobactam, Ceftazidime, Cefoperazone/sulbactam, Cefpirome และ Ciprofoxacin ยกเว้น Colistin เช่นเดียวกับรายงานของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (2555) ที่พบว่าเชื้อ *A. baumannii* เป็นแบคทีเรียดื้อยาที่เป็นปัญหาสำคัญของประเทศ ซึ่งเป็นเชื้อดื้อยาที่พบในโรงพยาบาล ก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต โลหิตเป็นพิษ และปอดอักเสบ โดยพบว่าในช่วงระยะเวลาเพียง 10 ปี (พ.ศ. 2543-2554) เชื้อนี้มีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะกลุ่ม Carbapenems ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะขนานสุดท้ายของการรักษาเชื้อดื้อยาอยู่ระหว่างร้อยละ 1.0-2.0 เพิ่มขึ้นเป็นอยู่ระหว่างร้อยละ 63.0-64.0 โดยเฉพาะเชื้อ *A. baumannii* ที่ก่อโรคในผู้ป่วยที่อยู่ในห้องผู้ป่วยหนัก (ICU) พบว่าในปี พ.ศ. 2554 มีการดื้อต่อยา Imipenem สูงถึงร้อยละ 79.0

จากการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *E. coli* ที่สร้างเอนไซม์ KPC ดื้อต่อยาในกลุ่ม Carbapenems ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Imipenem, Ertapenem และ Meropenem เช่นเดียวกับเชื้อ

A. baumannii และจากการศึกษาของ ศศิธร (2554) ที่พบเชื้อ *E. coli* ที่ได้แยกจากสิ่งส่งตรวจในโรงพยาบาลพระปกเกล้า จังหวัดจันทบุรี มีการสร้างเอนไซม์ KPC ครั้งแรก และจากการศึกษาของ Gupta *et al*. (2013) พบเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ KPC ร้อยละ 2.0 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pasteran *et al*. (2009) ซึ่งพบเชื้อ *E. coli* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ KPC ร้อยละ 3.0 นอกจากนี้พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ KPC ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yusuf *et al*. (2012) ที่พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ KPC ร้อยละ 1.5 จะเห็นได้ว่าผลที่ได้จากการศึกษาสอดคล้องกับผลการสำรวจการสร้างเอนไซม์ KPC ในเชื้อ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีอัตราการตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวได้สูง และเป็นเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยได้ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 95.0

สำหรับในประเทศไทยพบการสร้างเอนไซม์ KPC มีแนวโน้มสูงขึ้น โดยพบว่าในช่วงระยะเวลา 10 ปี ผ่านมา (พ.ศ. 2543 -2554) พบเชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์กว้าง และดื้อต่อยาในกลุ่ม Cepharosporins รุ่นที่ 3 และ รุ่นที่ 4 สูงมากขึ้น ซึ่งนำไปสู่การนำยาในกลุ่ม Carbapenems มาใช้ในการรักษาเพิ่มสูงตามไปด้วย (สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข, 2555) ดังนั้นจากการตรวจพบการสร้างเอนไซม์ KPC ใน Enterobacteriaceae โดยพบในเชื้อ *A. baumannii*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* ดังกล่าว ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและควบคุมการแพร่กระจายของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจากยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ KPC พบอยู่บนพลาดมิด ซึ่งจะทำให้มีการแพร่กระจายของยีนดังกล่าวออกไปได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลให้เกิดปัญหาต่อการรักษาอย่างมาก เพราะยากลุ่ม Carbapenems เป็นยากลุ่มสุดท้ายสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียชนิดรุนแรง

ปัญหาโรคติดเชื้ออันเนื่องมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาต้านจุลชีพ เป็นปัญหาใหญ่ซึ่งในปัจจุบันพบได้ทั้งในโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial infections) และในกลุ่มโรคติดเชื้อในชุมชน (Community-acquired infections) รวมไปถึงการติดเชื้อในสถานพยาบาลที่ดูแลผู้ป่วยสูงอายุ หรือผู้ป่วยโรคเรื้อรัง (Health-care associated infections) และยังมีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้น ส่วนใหญ่จะพบในผู้ป่วยที่เคยได้รับยาต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์กว้าง หรือเป็น Broad spectrum มาก่อนในช่วง 90 วัน หรือผู้ที่เคยได้รับการรักษาในโรงพยาบาลอย่างน้อย 5 วัน ในช่วง 2-3 เดือน ที่ผ่านมา ผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง รวมไปถึงผู้ป่วยที่มาจากสถานรับผู้แลผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาลนาน ๆ ซึ่งปัจจุบันพบมีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาที่มีสาเหตุมาจากการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสไปทั่วโลก โดยเฉพาะใน

แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ซึ่งเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสที่สำคัญชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์ KPC เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายยาในกลุ่มบีตาแลคแทมชนิดที่มีฤทธิ์กว้าง เช่น ยาในกลุ่ม Cephalosporins รุ่นที่ 3 และรุ่นที่ 4 รวมทั้งสามารถทำลายยาในกลุ่ม Carbapenems ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาความชุกหรือระบาดวิทยาของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว เนื่องจากหากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ KPC ขึ้น อาจก่อให้เกิดปัญหาในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพตามมา ด้วยเหตุนี้การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา เพื่อหาเชื้อที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อดื้อยา จึงควรเพิ่มการทดสอบความไวของเชื้อที่สร้างเอนไซม์ KPC ในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ต่อสารต้านจุลชีพที่ใช้เป็นงานประจำ เช่นเดียวกับการตรวจหาการสร้างเอนไซม์บีตา-แลคทาเมสอื่น ๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยและใช้เป็นแนวทางแก่แพทย์ในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วยได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพตลอดจนเพื่อเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้ป่วยได้ทันท่วงที นอกจากนี้ยังพบว่าสาเหตุหลักของการเกิดการดื้อยาส่วนใหญ่เกิดมาจากการใช้ยาที่มากเกินความจำเป็นด้วย ดังนั้นโรงพยาบาลหรือสถานพยาบาลต่าง ๆ ควรมีการควบคุมการใช้ยาต้านจุลชีพให้มีการใช้เท่าที่จำเป็น เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อพัฒนากลไกการดื้อยาต่อไป และที่สำคัญบุคลากรทางการแพทย์ควรร่วมมือกันในการป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา โดยการลดโอกาสในการติดเชื้อ เช่น การล้างมือที่ถูกสุขลักษณะ และควรให้ความรู้กับบุคลากรทางการแพทย์ในการปฏิบัติงานกับโรคติดเชื้ออย่างถูกต้อง ส่วนผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ควรทำการรักษาให้หายขาด เพื่อไม่ให้เป็นแหล่งแพร่เชื้อไปยังสิ่งแวดล้อมและบุคคลอื่น

การศึกษาความชุกของการสร้างเอนไซม์ KPC ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในครั้งนี้ เป็นการศึกษาในระดับฟีโนไทป์เท่านั้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญ เพื่อใช้เป็นแนวทางแก่แพทย์ในการตัดสินใจเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสม ในการรักษาผู้ป่วยโรคติดเชื้อได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ตลอดจนช่วยในการติดตามและเฝ้าระวังการติดเชื้อดื้อยา เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาได้จริง ที่สำคัญควรทำการศึกษาต่อถึงปัจจัยเสี่ยงในการติดเชื้อ และระบาดวิทยาของเชื้อในระดับจีโนไทป์ในเชิงลึกต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนป้องกันการติดเชื้อ และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาที่อาจไม่มียาต้านจุลชีพใดสามารถรักษาโรคติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพเลยในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ได้กรุณาวิพากษ์และให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์แก่โครงการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ประชาชาติธุรกิจ. (2555). **เตือน“อินเดีย” กำลังกลายเป็นแหล่งกำเนิดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ**. ฉบับวันที่ 17 มิ.ย 2555.

วีรพงศ์ วัฒนาวนิช และพรรณทิพย์ ฉายากุล. (2555). Acinetobacter infection. **Songkla Med J**, 31(2), 91-100.

ศศิธร ไทยเจริญ. (2554). Carbapenem-Resistant Escherichia coli ครั้งแรกในโรงพยาบาลพระปกเกล้า. **วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า**, 28(4), 238-242.

สถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวธส.). (2555). เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะ วิกฤตและทางออกของสังคมไทย. **จุลสาร HSRI Forum**, 1(1), 1-6.

อุราภรณ์ ภูมิศานติพงศ์. (2554). อุบัติการณ์ของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems. **วารสารวชิรเวชสาร**, 55(3), 265-272.

Arnold, R.S., Thom, K.A., Sharma, S., Phillips, M., Kristie Johnson, J., & Morgan, D.J. (2011). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **South Med J**, 104(1), 40-45.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-three informational supplement M100-S23**. USA: CLSI.

Gaynes, R.P., & Culver, D.H. (1992). Resistance to imipenem among selected gram-negative bacilli in the united states. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 13(1), 10-14.

Gupta, N., Limbago, B.M., Patel, J.B., & Kallen, A.J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. **Clin Infect Dis**, 53(1), 60-67.

Gupta, V., Bansal, N., Singla, N., & Chander, J. (2013). Occurrence and phenotypic detection of class A carbapenemases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates at a tertiary care center. **Microbiology, Immunology and Infection**, 46(2), 104-108.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., & Williams, S.T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. (9th edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Keerasuntonpong, A., Samakeenich, C., Tribuddharat, C., & Thamlikitkul, V. (2006). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections in Siriraj Hospital 2002. **Siriraj Med J**, 58(8), 951-954.

Navon-Venezia, S., Leavitt, A., Schwaber, M.J., Rasheed, J.K., Srinivasan, A., Patel, J.B., & Carmeli, Y. (2009). First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrob Agents Chemother**, 53(2), 818-820.

Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carba penemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, 9(4), 228-236.

Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., & Corso, A. (2009). Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology**, 47(6), 1631-1639.

Pitout, J.D., & Laupland, K.B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobac teriaceae: an emerging public health concern. **Lancet Infect Dis**, 8(3), 159-166.

Queenan, A.M., & Bush, K. (2007). Carbapenemase: the versatile beta-lactamases. **Clin Micro biol Rev**, 20(3), 440-458.

Sayah, R.S., Kaneene, J.B., Johnson, Y., & Miller, R.A. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic and wild-animal fecal sample, human septage, and surface water. **Appl Environ Microbiol**, 71(3), 1394-1404.

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F.C. (2001). Novel carbapenem- hydrolyzing beta-lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemo ther**, 45(4), 1151-1161.

Yusuf, I., Magashi, A.M., Firdausi, F.S., Sharif, A.A., Getso, M.I., Bala J.A., & Aliyu, I.A. (2012). Phenotypic Detection of Carbapenemases in Members of Enterobacteriaceae in Kano, **Nigeria. Science and Technology**, 11(2), 802-806.