อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2563C023

สำนักหอสมุด

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

## ความชุกของยีนดื้อยา carbapenem ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 21 เม.ย. 2565
เลขทะเบียน 1050577
เลขเรียกหนังสือ QR 177 ค484ค 2563

ผู้วิจัย
ดร. ศิริลักษณ์ ธีระภูธร

สังกัด
คณะสหเวชศาสตร์

สนับสนุนโดย
งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2563

# บทสรุปผู้บริหาร

แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและส่งผลต่อการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย โดยยากลุ่ม carbapenem เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มยา β-lactam ที่สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุด และเป็นทางเลือกสุดท้ายสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายขนาน อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา carbapenem โดยเฉพาะเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เพิ่มมากขึ้นจากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติของประเทศไทย ได้จัดให้เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญต้องมีการแจ้งเตือนระดับประเทศและเป็นเชื้อดื้อยาที่องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำให้มีการเฝ้าระวัง

การตรวจหาเชื้อดื้อยา carbapenem อย่างรวดเร็วและการทราบถึงกลไกการดื้อยาของเชื้อสามารถช่วยในการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อและยังสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้ นอกจากเทคนิคทางฟีโนไทป์ในการตรวจหาการดื้อยาแล้ว การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่มีประโยชน์และรวดเร็วที่จะทำให้ทราบถึงยีนดื้อยาได้ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase และเหมาะสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา

<u>วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย</u>

1. เพื่อตรวจคัดกรองหาเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases
2. เพื่อตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases
3. เพื่อหาความชุกของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อยา Carbapenem ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

จากการศึกษาโดยการตรวจหายีน $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี multiplex PCR ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจทุกชนิดของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลในขเตภาคเหนือตอนล่าง รวม 6 โรง ได้แก่ โรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ โรงพยาบาลกำแพงแพชร จังหวัดกำแพงเพชร โรงพยาบาลอุทัยธานี จังหวัดอุทัยธานี โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร และโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ตั้งแต่เดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2562 เป็นระยะเวลา 1 ปี พบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่ม carbapenem จำนวน 269 ไอโซเลท และตรวจพบยีน carbapenemase ในทุกไอโซเลท โดยตรวจพบทั้งหมด 3 ยีน ได้แก่ ยีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$, ยีน $bla_{NDM}$ และยีน

$bla_{IMP}$ โดยพบ ยีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ จำนวนมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 81.41 รองลงมาคือยีน $bla_{NDM}$ และยีน $bla_{IMP}$ คิดเป็นร้อยละ 61.71และร้อยละ 1.86 ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบเชื้อที่มียีนดื้อยา 2 ชนิดร่วมกัน คือ ยีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ร่วมกับยีน $bla_{NDM}$ ร้อยละ 34.38 แล ยีน$bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ร่วมกับยีน $bla_{IMP}$ คิดเป็นร้อยละ 43.87 และ 1.12 ตามลำดับ

จากการศึกษาครั้งนี้ทราบถึงความชุกของยีน $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่าง ในช่วงระยะเวลา 1 ปี ทำให้ทราบถึงข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาปฏิชีวนะ การเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยา carbapenem รวมถึงเป็นแนวทางการกำหนดมาตราการและการแก้ไขปัญหาการดื้อยา carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับโรงพยาบาลต่อไป รวมถึงเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆที่นำมารักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CRE โดยเฉพาะเชื้อ *K. pneumoniae* เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวให้ดื้อต่อยาและแพร่กระจายยีนดื้อยาได้สูง

มหาวิทยาลัยนเรศวร

# บทคัดย่อ

การดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการเลือกใช้ยาและเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ *K .pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมอย่างน้อยหนึ่งชนิด ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 จำนวน 269 ไอโซเลท ทำการตรวจหายีน carbapenemase ทั้งหมด ยีน ได้แก่ ยีน 5$bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีน carbapenemase ในเชื้อทั้งหมด โดยจำแนกเป็นความชุกของแต่ละยีนในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ดังนี้คือ ยีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ คิดเป็นร้อยละ 81.41 (219/269), ยีน $bla_{NDM}$ คิดเป็นร้อยละ 61.71 (166/269) และยีน $bla_{IMP}$ คิดเป็นร้อยละ 1.86 (5/269) ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบยีน $bla_{KPC}$ และ $bla_{VIM}$ ในเชื้อ *K. pneumoniae* ในทุกไอโซเลท การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความชุกและการแพร่กระจายของยีน carbapenemase ในเชื้อ *K .pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของโรงพยาบาล สำหรับเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาต่อไป



**คำสำคัญ** :เอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส, เคล็บเซียลลานิวโมเนีย, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

# Abstract

Increasing of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* that affect the drug selection and is a major problem in treating infectious diseases. This study aimed to determine the prevalence of carbapenemase encoding genes in 269 carbapenems non-susceptible *K .pneumoniae* that isolated patients of hospitals in lower north of Thailand during August 2018 to July 2019. They were detected five carbapenemase genes: $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ and $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ using multiplex PCR method. The carbapenemase genes were found in all isolates, which were classified as the prevalence of each gene of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* as follows :$bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ 81.41) % 219/269(, $bla_{NDM}$ 61.71) %166/269 (and $bla_{IMP}$ 1.86 % )5/269(, repectively. However, $bla_{KPC}$ and $bla_{VIM}$ genes were not found in all *K. pneumoniae* isolates. This study revealed a unique prevalence and spread of carbapenemase genes in carbapenemase-producing *K .pneumoniae* in hospitals, for guidance in surveillance and prevention of drug resistance.



**Keyword** : enzyme carbapenemase , *Klebsiella pneumoniae*, multiplex PCR

# สารบัญ

หน้า


| | |
|---|---|
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ | 4 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย | 8 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัย | 14 |
| บทที่ 5 อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย | 18 |
| บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย | 20 |
| เอกสารอ้างอิง | 21 |


มหาวิทยาลัยนเรศวร

# บทคัดย่อ

การดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลต่อการเลือกใช้ยาและเป็นปัญหาที่สำคัญในการรักษาโรคติดเชื้อ ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความชุกของยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ *K .pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมอย่างน้อยหนึ่งชนิด ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2562 จำนวน 269 ไอโซเลท ทำการตรวจหายีน carbapenemase ทั้งหมด ยีน ได้แก่ ยีน 5$bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA-48-like}$ ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีน carbapenemase ในเชื้อทั้งหมด โดยจำแนกเป็นความชุกของแต่ละยีนในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ดังนี้คือ ยีน $bla_{OXA-48-like}$ คิดเป็นร้อยละ 81.41 (219/269), ยีน $bla_{NDM}$ คิดเป็นร้อยละ 61.71 (166/269) และยีน $bla_{IMP}$ คิดเป็นร้อยละ 1.86 (5/269) ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบยีน $bla_{KPC}$ และ $bla_{VIM}$ ในเชื้อ *K. pneumoniae* ในทุกไอโซเลท การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความชุกและการแพร่กระจายของยีน carbapenemase ในเชื้อ *K .pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของโรงพยาบาล สำหรับเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยาต่อไป

**คำสำคัญ** :เอนไซม์คาร์บาพีเนมเมส, เคล็บเซียลลานิวโมเนีย, มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์

# Abstract

Increasing of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* that affect the drug selection and is a major problem in treating infectious diseases. This study aimed to determine the prevalence of carbapenemase encoding genes in 269 carbapenems non-susceptible *K .pneumoniae* that isolated patients of hospitals in lower north of Thailand during August 2018 to July 2019. They were detected five carbapenemase genes: $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ and $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ using multiplex PCR method. The carbapenemase genes were found in all isolates, which were classified as the prevalence of each gene of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* as follows :$bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ 81.41) % 219/269(, $bla_{NDM}$ 61.71) %166/269 (and $bla_{IMP}$ 1.86 % )5/269(, repectively. However, $bla_{KPC}$ and $bla_{VIM}$ genes were not found in all *K. pneumoniae* isolates. This study revealed a unique prevalence and spread of carbapenemase genes in carbapenemase-producing *K .pneumoniae* in hospitals, for guidance in surveillance and prevention of drug resistance.



**Keyword** : enzyme carbapenemase , *Klebsiella pneumoniae*, multiplex PCR

# บทที่ 1
# บทนำ

## ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แนวโน้มการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องและส่งผลต่อการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย[1] โดยยากลุ่ม carbapenem เป็นยาปฏิชีวนะกลุ่มยา β-lactam ที่สามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุด และเป็นทางเลือกสุดท้ายสำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาหลายขนาน[2] อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยา carbapenem โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* เพิ่มขึ้นทั่วโลก ปัจจุบันพบการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae* เพิ่มมากขึ้นจากรายงานของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 พบว่า เชื้อ *K. pneumoniae* มีอัตราการดื้อยาเพิ่มขึ้นจากปีก่อนโดยดื้อต่อยา ertapenem ร้อยละ 11.5, imipenem ร้อยละ 10.8 และ meropenem ร้อยละ 10.2 ตามลำดับ[3] และจากแผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 ได้จัดให้เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่สำคัญต้องมีการแจ้งเตือนระดับประเทศและเป็นเชื้อดื้อยาที่องค์การอนามัยโลก (WHO) แนะนำให้มีการเฝ้าระวัง[4] เนื่องจากเชื้อที่ดื้อต่อยา carbapenem มีการส่งผ่านพลาสมิดที่มียีนดื้อยา carbapenem ส่งผลให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาอย่างรวดเร็วโดยกลไกหลักในการดื้อยาของเชื้อ คือ การสร้างเอนไซม์ 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] ซึ่งยีนที่พบได้บ่อย ได้แก่ ยีน $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA\text{-}48}$[6-7] และยังพบว่ามียีนดื้อยาชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น ยีนสร้างเอนไซม์ ESBL ยีนสร้างเอนไซม์ AmpC เป็นต้น[8-9]

นอกจากนี้ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (CDC) ได้แนะนำให้ตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) เพื่อป้องกันและควบคุมเชื้อดื้อยากลุ่ม carbapenem โดยเฉพาะเชื้อ *Klebsiella* spp. และ

*Escherichia coli* ซึ่งพบเป็นเชื้อ CRE ร้อยละ 11 และ 2 ตามลำดับ[10] โดยการตรวจคัดกรองการสร้าง carbapenemase ใช้การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพในงานบริการประจำวันทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยา ertapenem, imipenem และ meropenem โดยวิธี disk diffusion หรือการหาค่า MIC ตามคำแนะนำของ Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)[11-12]

การตรวจหาเชื้อดื้อยา carbapenem อย่างรวดเร็วและการทราบถึงกลไกการดื้อยาของเชื้อสามารถช่วยในการเลือกใช้ยาในการรักษาโรคติดเชื้อและยังสามารถควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้ [6, 13] นอกจากเทคนิคทางฟีโนไทป์ในการตรวจหาการดื้อยาแล้ว การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีที่มีประโยชน์และรวดเร็วที่จะทำให้ทราบถึงยีนดื้อยาได้ ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase [14] และเหมาะสำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยา

ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยสนใจและต้องการทราบความชุกของยีน carbapenemase ในเชื้อ *K. pneumoniae* จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งเพาะเชื้อแบคทีเรียในโรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่าง เพื่อให้ทราบข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีน $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ด้วยวิธี multiplex PCR เนื่องจากเป็นเทคนิคทางอณูชีววิทยาที่มีความแม่นยำ ความจำเพาะและสามารถตรวจสอบยีนดื้อยาได้หลายยีนในปฏิกิริยาเดียว ทำให้ช่วยลดระยะเวลาในการตรวจหาเชื้อเดื้อยาได้ ส่งผลให้สามารถควบคุมและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว

**วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย**

1. เพื่อตรวจคัดกรองหาเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases
2. เพื่อตรวจหายีนดื้อยาในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases
3. เพื่อหาความชุกของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ดื้อยา Carbapenem ในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษา ณ โรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

# บทที่ 2
# ทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information)

## 2.1 เชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

เชื้อ *K. pneumoniae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง (rod-shaped) อยู่ในวงศ์ *Enterobacteriaceae* มีแคปซูลหุ้ม ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (non-motile) สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ (lactose fermenter) ให้ colony สีชมพูบน MacConkey agar สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ซึ่งเชื้อ *K. pneumoniae* มักเป็นเชื้อที่สามารถติดต่อได้ในโรงพยาบาล (hospital-acquired infection) ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เช่น ปอดบวม การติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยเชื้อ *K. pneumoniae* สามารถพบได้ใน ดิน ผิวน้ำ และยังเป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถพบได้ทั่วไปในปาก ผิวหนัง ลำไส้ (15)

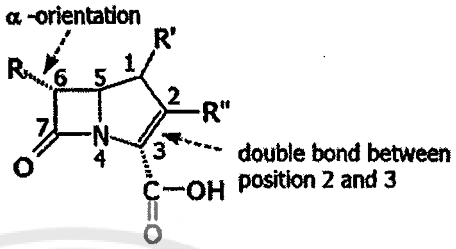
## 2.2 กลไกการดื้อยาของเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*

กลไกการดื้อยาของเชื้อ *K. pneumoniae* มีหลายกลไกเกิดร่วมกัน โดยการทำให้เกิดการบกพร่องในการซึมผ่านเข้าออกร่วมกับการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase มาขึ้นทำลายยา carbapenem ที่เรียกว่า carbapenem-hydrolysing beta-lactamase หรือ carbapenemase ซึ่งพบได้บ่อยและจำแนกได้หลายชนิด การจัดกลุ่มเอนไซม์ตามโครงสร้างโมเลกุลนั้น เอนไซม์ carbapenemase ประกอบด้วย เอนไซม์ใน Ambler class A class B และ class D

## 2.3 ยาคาร์บาพีเนม (carbapenems)

คาร์บาพีเนม (carbapenems) เป็นยาต้านแบคทีเรียกึ่งสังเคราะห์กลุ่ม beta-lactam ชนิดฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal) ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบทั้งชนิดที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน และยังทนต่อเอนไซม์ beta-lactamase ได้ดี ทำให้ผลการรักษาที่ดีต่อเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยา beta-lactamase ชนิดอื่นอื่นๆ ยาในกลุ่ม carbapenems ได้แก่ imipenem ertapenem biapenem และ meropenem โครงสร้างทางเคมีของคาร์บาพีเนม เป็น bicyclic system ประกอบด้วยวงแหวน beta-lactam เชื่อมต่อกับวงแหวน 2-pyrroline เรียกรวมกันว่าวงแหวน carbapenems ซึ่งตำแหน่งที่ 1 เป็น methylene carbon (-CH2) และมีพันธะคู่อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 2 และ 3 นอกจากนี้ตำแหน่งที่ 6 มีหมู่

แทนที่เป็น aliphatic chain สายสั้นๆและมีการจัดเรียงตัวต่อกับวงแหวน carbapenems แบบ α-orientation




ภาพที่ 1 โครงสร้างของยากลุ่ม carbapenems

กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม carbapenems โดยยากลุ่ม carbapenems มีส่วนของวงแหวน beta-lactam ที่ใช้จับกับ penicillin binding proteins (PBPs) ชนิดต่างๆ ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียมีผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกระหว่างภายใน และภายนอกได้ทำให้เซลล์แบคทีเรียตาย

**2.4 เอนไซม์ carbapenemase**

เอนไซม์ carbapenemase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม beta-lactamase ที่สามารถทำลายฤทธิ์ของยาในกลุ่มcabapenems ที่เป็นยาต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งออกฤทธิ์ในวงกว้าง รวมถึงยาในกลุ่ม beta-lactam อื่นๆด้วย สามารถแบ่งตามโครงสร้างโมเลกุลได้เป็น 2 กลุ่ม(16) คือ

1) เอนไซม์ serine beta-lactamase ประกอบด้วยเอนไซม์ beta-lactamase ใน 3 กลุ่ม คือ

1.1) class A เช่น เอนไซม์ KPC ซึ่งพบได้บ่อยในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ปัจจุบันพบมีการระบาดในเชื้อ *K. pneumoniae* เนื่องจากมียีน *bla*$_{KPC}$ ที่สามารถถ่ายทอดได้ทางพลาสมิด Transposon และถ่ายทอดข้ามสปีชีส์ได้ และยังพบอยู่บนพลาสมิดที่มียีนดื้อยาอื่นร่วมด้วย นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ GES SME และ IM/NMC

1.2) Ampler class C ได้แก่ เอนไซม์ AmpC beta-lactamase ซึ่งปกติไม่มีคุณสมบัติในการทำลายยา carbapenem ได้ แต่ต่อมามีการกลายพันธุ์ และทำให้มีฤทธิ์ขยายในการทำลายยา imipenem ได้มากขึ้น เช่น เอนไซม์ CMY-10 และ BER (199-201) และยังพบอุบัติการณ์ใหม่และมีข้อมูลน้อย

1.3) Ampler class D ได้แก่ เอนไซม์บางชนิดในวงศ์ OXA ชนิดที่สามารถทำลายยากลุ่ม carbapenem ได้เรียกว่า OXA-type carbapenemase

2) เอนไซม์ metallo-beta-lactamase (MBL) เป็นเอนไซม์ beta-lactamase ที่ถูกจัดอยู่ใน class B ตามโครงสร้างโมเลกุล ถือว่าเป็นเอนไซม์ beta-lactamase ที่มีฤทธิ์กว้าง สามารถทำลายยาในกลุ่ม beta-lactam ได้เกือบทุกชนิดที่มีใช้ทางการแพทย์ในปัจจุบัน ยกเว้นยา monobactam และไม่สามารถต้านฤทธิ์ได้ด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ ชนิดที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ในวงศ์ IMP และ VIM โดยมียีน $bla_{MBL}$ ที่การกำหนดการสร้างเอนไซม์ MBL ที่พบได้ทั้งบนโครโมโซมหรือบนพลาสมิด นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2551 ได้มีอุบัติใหม่ของเอนไซม์ MBL คือ New Delhi Metallo beta-lactamase-1 (NDM-1) ในผู้ติดเชื้อ *K. pneumoniae*

**2.5 การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase**

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase มี 2 วิธี ได้แก่ วิธีการทดสอบทางฟีโนไทป์ (phenotypic methods) และการทดสอบทางจีโนไทป์ (genotypic methods)

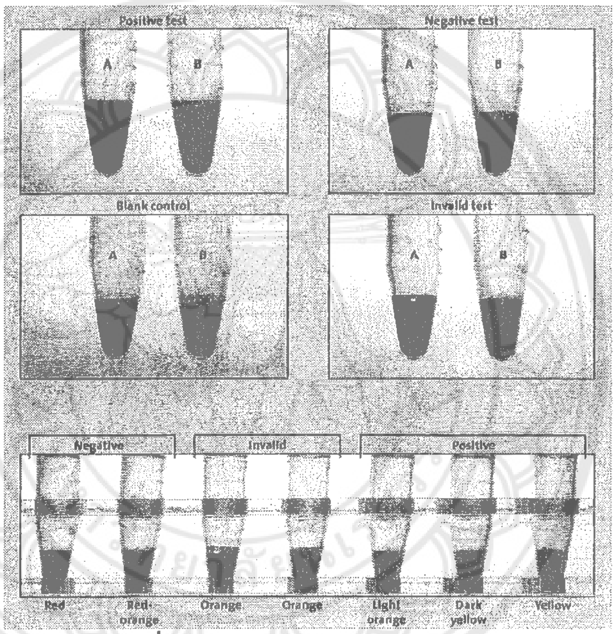
**2.5.1 การทดสอบทางฟีโนไทป์ (Phenotypic methods)** เพื่อตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ตามวิธีมาตรฐานตาม CLSI ประกอบด้วย วิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้น และวิธีการตรวจยืนยัน ดังนี้

1) วิธีการตรวจคัดกรองเบื้องต้น (Initial Screening test)[11] ประกอบด้วย การทดสอบ disk diffusion และ broth microdilution

วิธี disk diffusion เป็นการทดสอบความไวของเชื้อตัวอย่างต่อยาต้านจุลชีพตามมาตรฐาน CLSI โดยอ่านค่าขนาดความกว้างในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรอบๆ แผ่นยา meropenem และ ertapenem ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม หากพบความกว้างของ zone diameter อยู่ในช่วง 16-21 มิลลิเมตร และ 19-21 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าเชื้ออาจจะมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase

วิธี broth microdilution เป็นการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของยาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) ด้วยวิธี broth microdilution ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI โดยการอ่านค่า MIC ของยา imipenem หรือ meropenem หรือ ertapenem ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หากพบค่า MIC ของยา imipenem และ meropenem อยู่ในช่วง 2-4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และยา ertapenem เท่ากับ 2 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แสดงว่าเชื้ออาจจะมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase

2) วิธีการตรวจยืนยัน ด้วยวิธี carbapenemase Nordmann-Poirel (carba NP) test วิธีนี้เป็นการทดสอบทางฟีโนไทป์ที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง โดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนแปลง pH ในการทดสอบทางชีวเคมีหากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จะสามารถทำลายวงแหวน bata-lactam (bata-lactam ring) ของยา carbapenems ได้แล้วเปลี่ยนสีของ pH indicator จากสีแดงเป็นสีเหลือง [17]



ภาพที่ 1 ผลการทดสอบวิธี Carba NP

**2.5.2 การทดสอบทางจีโนไทป์ (Genotypic methods)** เป็นการตรวจหายีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ โดยอาศัยวิธีทางอณูชีวโมเลกุลซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่มีความถูกต้องและให้ผลที่รวดเร็ว การทดสอบทางอณูชีวโมเลกุลที่นิยมใช้ในการตรวจหายีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ carbapenemase เช่น KPC IMP VIM และ NDM-1 ซึ่งวิธีเหล่านี้ ได้แก่ conventional polymerase chain reaction (conventional PCR), multiplex PCR และ real-time PCR

# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างเชื้อ *K.* pneumoniae ที่ไม่ไวต่อยากลุ่ม carbapenem อย่างน้อยหนึ่งชนิด ได้แก่ ertapenem, imipenem และ meropenem ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา โรงพยาบาลในเขตภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 6 โรง ได้แก่ โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ โรงพยาบาลกำแพงแพชร จังหวัดกำแพงเพชร โรงพยาบาลอุทัยธานี จังหวัดอุทัยธานี โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร และโรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อตั้งแต่เดือนสิงหาคม ปี พ.ศ. 2561 ถึงเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2562 จำนวน 269 ตัวอย่าง

นำมาทำการพิสูจน์ชนิดเชื้อซ้ำ โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar และ MacConkey agar และการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ triple sugar iron agar (TSI), motile indole lysine (MIL), lysine deaminase test (LDA), lysine decarboxylase test (LDC), citrate utilization test, urea hydrolysis test และ malonate test

## 3.2 การตรวจคัดกรองการสร้างเอนไซม์ carbapenemase [11]

ทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยากลุ่ม carbapenem ด้วยวิธี disk diffusion โดยการเตรียมสารละลายของเชื้อตัวอย่างให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (1-2 x$10^8$ CFU/ml) ใน Tryptic soy broth (TSB) ด้วย 0.85% normal saline solution (NSS) จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่นไว้แล้ว มาป้ายบนผิวหน้าอาหารวุ้นชนิด Mueller-Hinton agar (MHA) ให้เชื้อกระจายทั่วผิวหน้าอาหารโดยหมุน 60 องศา ประมาณ 3 รอบ ทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารวุ้นแห้ง จากนั้นนำแผ่นยาต้านจุลชีพวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ sterile forceps ยาที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ meropenem หรือ ertapenem ที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม จากนั้นนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (Inhibition zone) เป็น

มิลลิเมตร ซึ่งจะเห็นเป็นวงใสรอบแผ่นยา จากนั้นนำไปแปลผลตามมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standard Institute 2018 (CLSI 2018 M100-S28)

**3.3 การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase [11]**

**3.3.1) การตรวจยืนยันทางฟีโนไทป์ (Phenotypic confirmatory test)**

**1) วิธี carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP)**

ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI 2018 (M100-S28) Carba NP test เป็นวิธีการทดสอบทางฟีโนไทป์ที่มีการพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ *Enterobacteriaceae* และ *P. aeruginosa* โดยอาศัยหลักการการเปลี่ยนแปลง pH ในการทดสอบทางชีวเคมี โดยทำการเตรียม solution A และ B (solution A เตรียมจากการผสม 0.5% Phenol red 2 มิลลิลิตร ซึ่งเป็น indicator กับ deionized water 16.6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร 10 mM zinc sulfate heptahydrate 180 ไมโครลิตร และปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.8±0.1 ด้วย 0.1 N NaOH หรือ 10% HCl ข้อควรระวัง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียสได้นาน 2 สัปดาห์ และสำหรับ solution B เตรียมโดยการผสมยา imipenem 12 มิลลิกรัม ใน solution A 2 มิลลิลิตร ข้อควรระวัง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียสได้นาน 3 วัน) จากนั้นทำการสกัดโปรตีนของเชื้อโดยน้ำยาสกัดโปรตีน (น้ำยาสกัดโปรตีนที่อยู่ในสารละลาย Tris HCl buffer ที่มี pH 7.4) โดยใส่ Tris HCl buffer 200 ไมโครลิตร ลงใน microcentifuge tube (ขนาด 0.6 มิลลิลิตร) แล้วใช้ loop (ขนาด 1 ไมโครลิตร) เขี่ยเชื้อจาก blood agar ใส่ลงใน microcentifuge tube ข้างต้น นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นเตรียม microcentifuge tube ที่ label a และ b ตามลำดับ และนำสารสกัดโปรตีนของเชื้อที่ได้จากการเตรียมข้างต้นใส่ลง microcentifuge tube a และ b โดยใส่หลอดละ 100 ไมโครลิตร แล้วเติม solution A และ B ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน microcentifuge tube a และ b ตามลำดับ จากนั้นนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex อีกครั้งหนึ่ง แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งการทดสอบ Carba NP test ทุกครั้งต้องมี reagent blank ที่ไม่ต้องใส่สารสกัดโปรตีนของเชื้อและมีเชื้อควบคุมคุณภาพผลบวกคือเชื้อ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 และเชื้อ *K. pneumoniae ATCC* BAA-1706 เป็นเชื้อควบคุมที่ให้ผลลบ หากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จะสามารถทำลายวงแหวน beta-lactam (beta-lactam ring) ของยา carbapenems ได้ เกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ทำให้ indicator เปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลือง และสามารถแปลผลการทดสอบได้ดังนี้

ผลบวก หมายถึง เชื้อตัวอย่างสามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งจะพบการเปลี่ยนแปลงของสี phenol red ใน solution B เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ หมายถึง เชื้อตัวอย่างไม่สามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสี phenol red ใน solution B

แปลผลไม่ได้ (Invalid) หมายถึง solution B เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้ม

**2) วิธี modified carbapenem inactivation method (mCIM)**

ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI 2018 (M100-S28) การทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (Class A, B และ D) ของเชื้อ *Enterobacteriaceae* และ *P. aeruginosa* โดยใช้ loop (ขนาด 1 ไมโครลิตร) เขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจาก blood agar plate ที่ได้จากบ่มเพาะข้ามคืนแล้วใส่ลงใน Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10-15 วินาที ใส่แผ่นยา meropenem 10 ไมโครกรัม ลงไปใน TSB และทำการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ±15 นาที (เมื่อใกล้ครบเวลา 4 ชั่วโมงแล้ว จะทำการเตรียม 0.5 MacFarland จากเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ทำการ swab ลงไปบนอาหารอาหารวุ้นชนิด Muller-Hinton agar ซึ่งขั้นตอนนี้ต้องทำให้เสร็จภายใน 15 นาที และรอให้แห้ง 3-10 นาทีก่อนวางยา) จากนั้นนำแผ่นยาที่บ่มเพาะใน TSB ออกมาและทำการวางยาลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นชนิด Muller-Hinton agar ที่ป้ายเชื้อ จากนั้นบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งหากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase จะสามารถทำลายวงแหวน beta-lactam ของยา meropeneme ได้ ทำให้ยาออกฤทธิ์ได้ลดลง และเมื่อนำแผ่นยาที่บ่มเพาะใน TSB ออกมาและทำการวางยาลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นชนิด Muller-Hinton agar ที่ป้ายเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากนั้นบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง พบว่า มีเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 จะเจริญเติบโตขึ้น ทำให้เห็นโซนแคบลงกว่าในกรณีที่เชื้อไม่สร้างเอนไซม์ carbapenemase และทำการอ่านค่าของ Inhibition zone จาก Zone diameter ได้ดังนี้

Zone diameter 6-15 มิลลิเมตร หรือพบ โคโลนีภายในโซน 16-18 มิลลิเมตร จะให้ผลบวกวิธี mCIM รายงานผลได้ว่าพบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (Class A, B และ D)

Zone diameter มากกว่าหรือเท่ากับ 19 มิลลิเมตร (Clear zone) จะให้ผลลบวิธี mCIM รายงานผลได้ว่าไม่พบการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (Class A, B และ D)

Zone diameter 16-18 มิลลิเมตร หรือ มากกว่าหรือเท่ากับ 19 มิลลิเมตร แต่พบการขึ้นของโคโลนีในโซนนั้น และรายงานผลได้ว่า แปลผลไม่ได้ (Intermediate)

**3) EDTA-modified carbapenem inactivation metmhod (eCIM) )**

ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI 2018 (M100-S28) การทดสอบยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase (Class A, B และ D) ของเชื้อ *Enterobacteriacea* ที่ให้ผลบวกในการทดสอบวิธี mCIM ซึ่งการทดสอบนี้เป็นการแยกเอนไซม์ carbapenemase (Class A, B และ D) โดยจะแยกเป็นกลุ่มเอนไซม์ Serine-beta-lactamase (Class A และ D) และ Metallo-beta-lactamase (Class B) โดยการทดสอบใช้ loop (ขนาด 1 ไมโครลิตร) เขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียจาก blood agar plate ที่ได้จากบ่มเพาะข้ามคืนแล้ว ใส่ลงใน Trypticase soy broth (TSB ) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และใส่ 0.5 mM EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10-15 วินาที ใส่แผ่นยา meropenem 10 ไมโครกรัม ลงไปใน TSB และทำการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ±15 นาที (เมื่อใกล้ครบเวลา 4 ชั่วโมงแล้ว จะทำการเตรียม 0.5 MacFarland จากเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ทำการ swab ลงไปบนอาหารวุ้นชนิด Muller-Hinton agar ซึ่งขั้นตอนนี้ต้องทำให้เสร็จภายใน 15 นาที และรอให้แห้ง 3-10 นาทีก่อนวางยา) จากนั้นนำแผ่นยาที่บ่มเพาะใน TSB ออกมาแล้วทำการวางแผ่นยานั้นลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นชนิด Muller-Hinton agar ที่ป้ายเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 35±2 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase กลุ่ม Metallo-beta-lactamase ทำให้ EDTA ที่ใส่ลงไปขัดขวางปฏิกิริยาการสร้างพันธะระหว่างไอออนของสังกะสี ($Zn^{2+}$) และโมเลกุลน้ำทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ Metallo-beta-lactamase ส่งผลให้วงแหวน beta-lactam ของยา meropeneme ไม่ถูกทำลาย ยาจึงสามารถออกฤทธิ์ทำลายเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยในการทดสอบของ eCIM นี้จะไม่สนใจ pinpoint colonies ในทุกๆ Inhibition Zone และอ่านผล Inhibition Zone ได้จากนำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (Zone diameter ) ของการทดสอบวิธี eCIM ลบด้วย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (Zone diameter ) ของวิธี mCIM ซึ่งผลต่างที่ได้ สามารถแปลผลได้ดังนี้

ผลต่างมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ให้ผลบวกกับวิธี mCIM และ วิธี eCIM และรายงานผลได้ว่าพบการสร้างเอนไซม์ Metallo-beta-lactamase (Class B)

ผลต่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตร ให้ผลบวกกับวิธี mCIM แต่ให้ผลลบกับวิธี eCIM และรายงานผลได้ว่าพบการสร้างเอนไซม์ Serine-beta-lactamase (Class A และ D)

### 3.3 การตรวจหายีน ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อ *K. pneumoniae* ด้วยวิธี multiplex PCR(18, 19)

#### 3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อ *K. pneumoniae* จาก TSB จากการบ่มเพาะเชื้อข้ามคืนที่อุณหภูมิ 35°C ปริมาตร 1 ml ใส่ใน microtube ขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบนแล้วทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 500 µl แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 500 µl นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 10 นาที ในเครื่อง dry bath และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ใน screw cap tube นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C

#### 3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน carbapenemase โดยวิธี Multiplex PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน carbapenemase ได้แก่ ยีน $bla_{KPC}$, $bla_{NDM}$, $bla_{VIM}$, $bla_{IMP}$ และ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ด้วยเครื่อง thermocycler ยี่ห้อ Bio-rad รุ่น MJ Mini ด้วยไพรเมอร์ ดังแสดงในตาราง 7 ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 95องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 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

จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตของ PCR (PCR product) ที่ได้โดยกระบวนการแยกดีเอ็นเอด้วยไฟฟ้าโดยใช้ เจลความเข้มข้น 2% (2% Agarose gel electrophoresis) ใน 0.5X TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ นาน 35 นาที และใช้ 100 base pairs DNA ladder เป็น DNA marker นำเจลไปย้อมด้วยสีพิเศษเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นนาน 5 นาที จากนั้นนำไปดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตและถ่ายภาพเก็บไว้ ทำการเปรียบเทียบลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอของเชื้อควบคุม โดยเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวกคือ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 ($bla_{KPC}$), *K. pneumoniae* (Lab strain; $bla_{NDM}$ และ $bla_{OXA\text{-}48}$), และ *P. aeruginosa* (Lab strain; $bla_{VIM}$ และ $bla_{IMP}$ ) และเชื้อแบคทีเรียควบคุมผลลบ คือ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706

**Table 1. Primers used for carbapenemase genes detection**

| Gene | Primer [a] | Sequence (5′–3′) [b] | Product size (bp) | Reference |
|---|---|---|---|---|
| *bla*$_{IMP}$ | IMP-F | GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC | 188 | (19) |
| | IMP-R | CCAAACYACTASGTTATCT | | |
| *bla*$_{VIM}$ | VIM2004A-F | GTTTGGTCGCATATCGCAAC | 382 | (20) |
| | VIM2004B-R | AATGCGCAGCACCAGGATAG | | |
| *bla*$_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ | OXA-F | GCGTGGTTAAGGATGAACAC | 438 | (14) |
| | OXA-R | CATCAAGTTCAACCCAACCG | | |
| *bla*$_{NDM}$ | NDM-F | GGTTTGGCGATCTGGTTTTC | 621 | (14) |
| | NDM-R | CGGAATGGCTCATCACGATC | | |
| *bla*$_{KPC}$ | KPC-F | CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG | 798 | (14) |
| | KPC-R | CTTGTCATCCTTGTTAGGCG | | |

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

**3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล**

คำนวณหาความชุกของยีน carbapenemase ได้แก่ ยีน *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$ และ *bla*$_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ โดยใช้สถิติร้อยละ จากสูตร

$$\text{ความชุกของแต่ละยีน} = \frac{\text{ความถี่ของแต่ละยีน carbapenemase ที่ตรวจพบ}}{\text{จำนวนเชื้อ } \textit{K. pneumoniae} \text{ ที่พบยีน carbapenemase}}$$

# บทที่ 4
# ผลการวิจัย

## 4.1 กลุ่มตัวอย่าง

การหาความชุกของ เชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีทางฟีโนไทป์ได้แก่ วิธี carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP) test, modified carbapenem inactivation method (mCIM) และวิธี EDTA-modified carbapenem inactivation method (eCIM) โดยเก็บเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems (non-susceptible) ที่เพาะแยกได้จากสิ่งส่งตรวจ ในโรงพยาบาลเขตภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 6 โรง ได้แก่ โรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก โรงพยาบาลสวรรค์ประชารักษ์ จังหวัดนครสวรรค์ โรงพยาบาลอุทัยธานี จังหวัดอุทัยธานี โรงพยาบาลแม่สอด จังหวัดตาก โรงพยาบาลพิจิตร จังหวัดพิจิตร และโรงพยาบาลกำแพงเพชร จังหวัดกำแพงเพชร ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2561 ถึง 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2562 รวมทั้งหมด 269 ไอโซเลท (isolates) จำแนกตามชนิดของสิ่งส่งตรวจ ดังแสดงใน Table 2.

**Table 2.** The number and percentage of site of infection in 269 carbapenemase producing *K. pneumoniae* isolates

| Type of specimens | Number (%) |
|---|---|
| Blood/body fluid | 34 (12.64) |
| Sputum | 99 (36.80) |
| Urine | 90 (33.46) |
| Pus | 46 (17.10) |
| **total** | **269 (100)** |

10.50577
สำนักหอสมุด
21 เม.ย. 2565

**4.2 การตรวจคัดกรองหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase**

ทำการตรวจคัดกรองหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี disk diffusion โดยใช้แผ่นยา meropenem ขนาด 10 ไมโครกรัม หากพบ Inhibition zone ที่มีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง น้อยกว่าหรือเท่ากับ 19 มิลลิเมตร (Resistant) หรืออยู่ในช่วง 20-22 มิลลิเมตร (Intermediate) แปลว่าให้ผลบวกต่อการตรวจคัดกรอง ซึ่งพบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวนทั้งหมด 269 ไอโซเลทที่ให้ผลดื้อต่อยา Ertapenem ดื้อต่อยา Meropenem คิดเป็นร้อยละ 92.94 และดื้อต่อยา Imipenem คิดเป็นร้อยละ 84.39 แสดงดัง Table 3.

**Table 3.** Carbapenems susceptibility testing by disk diffusion in 269 *K. pneumoniae*

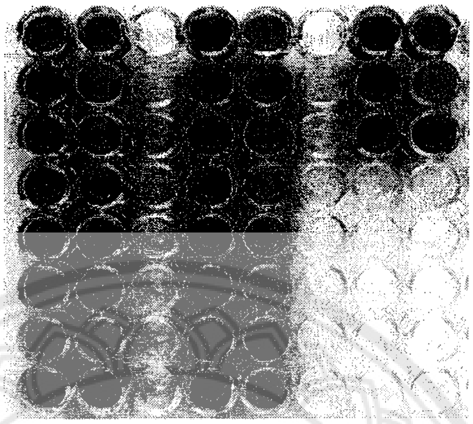
| Antibiotics | Antimicrobial drug susceptibility testing | | |
|---|---|---|---|
| | Susceptible, n (%) | Intermediate, n (%) | Resistant, n (%) |
| Ertapenem (10 µg) | - | - | 269 (100) |
| Meropenem (10 µg) | 2 (0.74) | 17 (2.60) | 250 (92.94) |
| Imipenem (10 µg) | 9 (3.34) | 33 (12.27) | 227 (84.39) |

**4.3 การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ทางฟีโนไทป์**

การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ทางฟีโนไทป์ประกอบด้วยวิธี Carba NP และวิธี mCIM

4.3.1 วิธี carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP) test

ทำการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ทางฟีโนไทป์ด้วยวิธี Carba NP ใน เชื้อ *K. pneumoniae* จานวนทั้งหมด 269 ไอโซเลท พบว่า ให้ผลบวกต่อการทดสอบ จำนวน 148 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 55.02 ซึ่งตัวอย่างผลการทดสอบ แสดงดังภาพที่ 3 และแสดงดัง Table 4.




**ภาพที่ 3** ตัวอย่างผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ด้วยวิธี carba NP
Blank control คือ น้ำยาควบคุมการทดสอบ (Reagent blank) Positive control คือ เชื้อ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 ให้ผลการทดสอบเป็นผลบวก Negative

**4.3.2 วิธี modified carbapenem inactivation method (mCIM)**

ทำการตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ทางฟีโนไทป์ด้วยวิธี mCIM ในเชื้อ *K. pneumoniae* จำนวนทั้งหมด 269 ไอโซเลท พบว่าให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วยวิธีนี้จำนวน 231 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 85.88 แสดงดัง Table 4.

**4.4 การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ทางจีโนไทป์ด้วยวิธี multiplex PCR**

เมื่อทำการตรวจหายีน carbapenemase ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenem 0eo;o 269 ไอโซเลท พบยีน carbapenemase ทั้งหมด 3 ยีน คือ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$, $bla_{NDM}$ และ $bla_{IMP}$ โดยยีนที่พบมากที่สุดคือ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ คิดเป็นร้อยละ 81.41 (219/269), ยีน $bla_{NDM}$ คิดเป็นร้อยละ 61.71 (166/269) และยีน $bla_{IMP}$ คิดเป็นร้อยละ 1.86 (5/269) ตามลำดับ (Table 4) นอกจากนี้ยังพบยีนร่วมกัน 2 ชนิด คือ ยีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ร่วมกับยีน $bla_{NDM}$ และยีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ร่วมกับยีน $bla_{KPC}$ คิดเป็นร้อยละ 43.87 (118/269) (2/160) และ 1.12 (3/269) ตามลำดับ แสดงดัง Table 4 ทั้งนี้ไม่พบยีน $bla_{KPC}$ และ $bla_{VIM}$ ในเชื้อ *K. pneumoniae* ในทุกไอโซเลท

**Table 4.** Distribution of carbapenemase genes among 269 carbapenem non susceptible *K. pneumoniae* isolates by multiplex PCR versus carbapenemase enzyme detection by the Carba NP and mCIM

| **Carbapenemase genes** | | **Phenotypic detection Carbapenemase** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **CarbaNP** | | **mCIM** | |
| Genes | n (%) | Positive, n (%) | Negative, n (%) | **Positive, n (%)** | **Negative, n (%)** |
| $bla_{NDM}$ | 48 (17.84) | 44 (16.36) | 4 (1.49) | 46 (17.10) | 2 (0.74) |
| $bla_{IMP}$ | 2 (0.74) | 2 (0.74) | 0 | 2 (0.74) | 0 |
| $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ | 98 (36.43) | 6 (2.23) | 92 (34.20) | 83 (30.86) | 15 (5.58) |
| $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ + $bla_{NDM}$ | 118 (43.87) | 94 (34.94) | 24 (8.92) | 97 (36.06) | 21 (7.81) |
| $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ + $bla_{IMP}$ | 3 (1.12) | 2 (0.74) | 1 (0.37) | 3 (1.12) | 0 |
| Total | 269 | 148 (55.02) | 121 (44.98) | **231 (85.88)** | **23 (14.13)** |

# บทที่ 5
# อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากอุบัติการณ์และการแพร่กระจายของเชื้อ carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก โดยกลไกที่สำคัญ คือ การสร้างเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งเชื้อที่มีการดื้อยากลุ่ม carbapenem จากการสร้างเอนไซม์ carbapenemase มากที่สุดจากรายงานทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ได้แก่ เชื้อ *K. pneumoniae* [21-23] ในการศึกษานี้พบยีน carbapenemase ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมในทุกไอโซเลท โดยพบยีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ มากที่สุด รองลงมาคือ ยีน $bla_{\text{NDM}}$ และยีน $bla_{\text{IMP}}$ จะเห็นได้ว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem มีกลไกหลักจากการสร้างเอนไซม์มาทำลายยา โดยอัตราการดื้อยาในกลุ่ม carbapenem ที่พบมากที่สุด ได้แก่ การดื้อต่อยา ertapenem รองลงมาคือยา meropenem และยา imipenem คิดเป็นร้อยละ 100, 92.94 และ 84.39 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาย้อนหลังของ วิรากร ดวงแก้ว และคณะ ในปี พ.ศ. 2561 ที่พบว่าเชื้อมีการดื้อยา ertapenem มากที่สุดร้อยละ 100 รองลงมาคือยา meropenem และยา imipenem[24] ซึ่งการที่เชื้อแบคทีเรียไม่ไวต่อยา ertapenem (ertapenem non-susceptibility) สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นน่าจะมีการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ดังนั้นเมื่อพบว่ามีการดื้อต่อยา ertapenem จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะตรวจพบยีน carbapenemase [25] ซึ่งสอดคล้องจากศึกษาของ Abouddihaj Barguigua และคณะ ในปี พ.ศ. 2558 และการศึกษาของสุจิตรา มานะกุล และคณะ ในปี พ.ศ. 2559 ที่พบว่าเชื้อ *K. pneumoniae* ที่พบยีน carbapenemase มีการดื้อยา ertapenem ร้อยละ 100 [26] โดยการศึกษานี้สามารถยืนยันได้จากการตรวจพบยีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase โดยพบยีนจำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$, ยีน $bla_{\text{NDM}}$ และยีน $bla_{\text{IMP}}$ แต่ไม่พบยีน $bla_{\text{KPC}}$, และยีน $bla_{\text{VIM}}$ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ วราวุฒิ เลาเลิศ และคณะ ในปี พ.ศ. 2561[2] และยังสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไทยที่พบความชุกของยีน $bla_{\text{KPC}}$ และยีน $bla_{\text{VIM}}$ ในระดับที่ต่ำ[2, 26-27]

เมื่อจำแนกเป็นความชุกของแต่ละยีน พบ ยีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ มากที่สุด และสูงถึงร้อยละ 81.41 รองลงมาคือ ยีน $bla_{\text{NDM}}$ ร้อยละ 61.71 และ ยีน $bla_{\text{IMP}}$ ร้อยละ 1.86 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในต่างประเทศก่อนหน้านี้ที่พบกลุ่มยีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ซึ่งเป็น variant type ของยีน $bla_{\text{OXA-48}}$ มากที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zeinab Jafari และคณะ ประเทศอิหร่าน ในปี พ.ศ. 2561 ที่พบยีน

*bla*$_{OXA-48}$ มากที่สุด ร้อยละ 72[28] การศึกษาของ Mateja Pirš และคณะ ประเทศสโลวีเนีย ในปี พ.ศ. 2561 พบเป็นยีน *bla*$_{OXA-48}$ มากที่สุด ร้อยละ 57.89 [29] การศึกษาของ Ye-Mun Low และคณะ ในประเทศมาเลเซีย ในปี พ.ศ. 2560 พบยีน *bla*$_{OXA-48}$ มากที่สุด ร้อยละ 70.59[30] การศึกษาของ Seok Hoon Jeong และคณะ ในประเทศเกาหลีใต้ ในปี พ.ศ. 2559 พบเป็นยีน *bla*$_{OXA-232}$ มากที่สุด ร้อยละ 63.01 [31] และการศึกษาของ Abouddihaj Barguigua และคณะ ประเทศโมร็อกโก ในปี พ.ศ. 2558 พบยีน *bla*$_{OXA-48}$ มากที่สุดร้อยละ 81.81 [32] สำหรับประเทศไทยพบว่าการศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี ในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งพบความชุกของยีน *bla*$_{OXA-48-like}$ สูงสุด ร้อยละ 61.54, และยีน *bla*$_{NDM}$ ร้อยละ 48.72 ตามลำดับ [26] และให้ผลแตกต่างกับการศึกษาในโรงพยาบาลรามาธิบดีและโรงพยาบาลในกรุงเทพฯ ในปี พ.ศ. 2561 ซึ่งพบความชุกของยีน *bla*$_{NDM}$ สูงสุด ร้อยละ 69.64, ยีน *bla*$_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 61.53 และยีน *bla*$_{IMP}$ ร้อยละ 1.19 ตามลำดับ [2] เช่นเดียวกับการศึกษาในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ในปี พ.ศ. 2559 [33] และโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2557 ซึ่งพบความชุกของยีน *bla*$_{NDM}$ สูงสุดด้วยเช่นกัน [34] อย่างไรก็ตามสำหรับประเทศไทยนั้นพบ ยีน *bla*$_{OXA-48-like}$ และ *bla*$_{NDM}$ ในอัตราที่สูงมาตลอด ทั้งนี้ความแตกต่างของความชุกของยีนในแต่ละพื้นที่นั้นอาจขึ้นกับลักษณะพื้นที่ทางภูมิศาสตร์ สังคม วัฒนธรรมที่แตกต่างกัน รวมถึงการเดินทางระหว่างประเทศที่มีอุบัติการณ์ของยีนนั้นๆ โดยการแพร่กระจายของยีนนั้นสามารถแพร่กระจายระหว่างโรงพยาบาล ชุมชน และสิ่งแวดล้อม [35-37]

การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงความชุกของยีน *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$ และ *bla*$_{OXA-48-like}$ ที่สร้างเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อ *K. pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมของโรงพยาบาลพุทธชินราชพิษณุโลก ทำให้ทราบถึงข้อมูลทางระบาดวิทยาและการแพร่กระจายของยีนดื้อยาในโรงพยาบาล เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาปฏิชีวนะ การเฝ้าระวังและป้องกันเชื้อดื้อยา carbapenem รวมถึงเป็นแนวทางการกำหนดมาตราการและการแก้ไขปัญหาการดื้อยา carbapenem ของเชื้อ *K. pneumoniae* ในระดับโรงพยาบาลต่อไป รวมถึงเฝ้าระวังการใช้ยาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ ที่นำมารักษาการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม CRE โดยเฉพาะเชื้อ *K. pneumoniae* เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวให้ดื้อต่อยาและแพร่กระจายยีนดื้อยาได้สูง

# 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(7):1006-11.
3. ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. สถานการณ์เชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ 2000-2018 2018 [cited 2019 Apr 28]. Available from: http://narst.dmsc.moph.go.th.
4. สำนักงานคณะกรรมการสุขภาพแห่งชาติ. แผนยุทธศาสตร์การจัดการการดื้อยาต้านจุลชีพประเทศไทย พ.ศ. 2560-2564 2017 [cited 2019 Apr 28]. Available from: http://kbphpp.nationalhealth.or.th/handle/123456789/7525.
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(1):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(1):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(2):140-6.
9. Netikul T, Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem-resistant

*Enterobacteriaceae* and the spread of carbapenem- resistant *Klebsiella pneumonia* ST340 at a university hospital in Thailand. PLoS One. 2015;10(9):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://wwwcdcgov/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. มาลัย วรจิตร, สุวรรณา ตระกูลสมบูรณ์, วันทนา ปวีณกิตติพร, กระทรวงสาธารณสุข. คู่มือปฏิบัติงานแบคทีเรียและรา สำหรับโรงพยาบาลศูนย์และโรงพยาบาลทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: บริษัท พรีเมียร์ มาร์เก็ตติ้ง โซลูชั่น จำกัด; 2018.
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(2):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(1):119-23.
15. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. Infection and immunity. 2002;70(5):2583-90.
16. ภัทรชัย กีรติสิน. อนุชา อภิสารธนรักษ์. Beta-lactamase ในแบคทีเรียแกรมลบ: จากความรู้พื้นฐานสู่เวชปฏิบัติ พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. ห้างหุ้นส่วนจำกัด วี.เจ. พริ้นติ้ง; 2555.
17. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerging infectious diseases. 2012;18(9):1503.
18. Singh-Moodley A, Perovic O. Antimicrobial susceptibility testing in predicting the presence of carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae* in South Africa. BMC Infect Dis. 2016;16(1):536.

19. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2007;59(2):321-2.

20. Pitout JDD, Gregson DB, Poirel L, McClure J-A, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol. 2005;43(7):3129-35.

21. 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(461-468).

22. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem- resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. J Infect Dis. 2017;215(s1):s28-36.

23. 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(4):381-99.

24. Duangkaw W, Khamprom N, Amornthipayawong 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(4):183-94.

25. 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.

26. สุจิตรา มานะกุล, อนุศักดิ์ เกิดสิน. เปรียบเทียบการตรวจวิธี Carba NP มาตรฐานกับวิธี Carba NP ประยุกต์ ในการตรวจหา การสร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อแบคทีเรียตระกูล *Enterobacteriaceae*. Reg 11 Med J. 2559;30(3):145-57.

27. Netikul T, Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem- resistant *Enterobacteriaceae* and the spread of carbapenem- resistant *Klebsiella pneumonia* ST340 at a university hospital in Thailand. PLoS One. 2015;10(9):e0139116.

28. Jafari Z, Harati AA, Haeili M, Kardan-Yamchi J, Jafari S, Jabalameli F, et al. Molecular epidemiology and drug resistance pattern of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. Microb Drug Resist. 2019;25(3):336-43.

29. Pirš M, Cerar Kišek T, Križan Hergouth V, Seme K, Mueller Premru M, Jeverica S, 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(2):142-9.

30. Low Y-M, Yap PS-X, Abdul Jabar K, Ponnampalavanar S, Karunakaran R, Velayuthan R, 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(1):5.

31. Jeong SH, Kim HS, Kim JS, Shin DH, Kim HS, Park MJ, et al. Prevalence and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from five hospitals in Korea. Ann Lab Med. 2016;36(6):529-35.

32. 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.

33. วีวรรณ อาชีวะ. ความชุกของเอนไซม์ดื้อยากลุ่ม Carbapenems ที่แยกได้จากเชื้อดื้อยา Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ปีพ.ศ. 2555 - 2556. J Prapokklao Hosp Clin Med Educ Cent. 2016;33:314-324.

34. นิตยา สิงห์พลทัน. สำรวจหาเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbaspenems ในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา. J Med Tech Assoc Thailand. 2557;42(2): 4930-9.

35. Branka Bedenić, Sardelić S. Carbapenemases [Online First], IntechOpen, 2018 [cited 2019 May 12]. Available from: https://www.intechopen.com/online-first/carbapenemases.

36. โครงการควบคุมและป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. การควบคุมและป้องกันแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาล. 2558.

37. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252-75.