เปรียบเทียบการตรวจวิธี Carba NP มาตรฐานกับวิธี Carba NP ประยุกต์ ในการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ของเชื้อแบคทีเรียตระกูล *Enterobacteriaceae*

สุจิตรา มานะกุล[1] และอนุศักดิ์ เกิดสิน[2]

Comparison of Standard Carba NP and Modified CarbaNP for detection of carpapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

Abstract

Carbapenemase is an enzyme found in many bacteria especially in Enterobacteriaceae which stands for carbapenem-resistant Enterobacteriace (CRE). Once mechanism of CRE is containing the resistant genes e.g. $bla_{IMP-14a}$, bla_{KPC}, $bla_{NDM,}$ $bla_{OXA48-like}$. Most of regional and provincial hospital can not identify the resistant genes. They must be referring organisms to university hospital or National Institute of health of Thailand (NIH) to confirm the resistant genes that take too much times. Many hospitals can detect CRE by disk diffusion susceptibility testing (Imipenem meropenem and ertapenem)or by Modified Hodge Test, The Imipenem-EDTA combination disk, however these techniques can not cover every resistant genes, take a time and some methods show false-positive. Carba NP is the method recommended by CLSI which can cover more resistant genes than the described methods above and save time as well as high specificity.

This study aims to modified the standard carba NP method to reduce processing time and using Imipenem/cilastatin which already have in the hospital instead of Imipenem monohydrate that is expensive. About 6 miligrams of Imipenem/cilastatin in modified Carba NP can detect CRE (Standard carba NP used 3 miligrams of Imipenem/monohydrate)

Modified Carba NP can reduce the processing time from 35-40 minutes to 2-3 minutes. The positive color of standard Carba NP revealed more yellow than the modified carba NP.

Modified Carba NP can be one option for region or general hospital in Thailand to do for initial detection carbapenem-resistant that useful for the clinician and infectious team to rapid management and proper control spreading resistant organisms in affordability way.

Sujitra Manankul
Clinical Pathology Department
Suratthani Hospital

Anusak Kertsin
Faculty of Public Health,
Kasetsart University
Chalermphrakiat Sakon Nakorn
Province Campus

Keywords : CRE, $bla_{IMP-14a}$, bla_{KPC}, bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$, Carba NP

วารสารวิชาการแพทย์ เขต 11 Reg 11 2559 Med J 2016 ;30 : 145 - 157

บทคัดย่อ

Carbapenemase เป็นเอนไซค์ที่พบในแบคทีเรียหลายชนิดโดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriacae ทำให้เชื้อดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenem กลไกการดื้อยาของเชื้อจะถูกควบคุมโดย gene หลายชนิดเช่น $bla_{IMP-14a}$, bla_{KPC}, $bla_{NDM,}$ $bla_{OXA48-like}$ เป็นต้น เรียกเชื้อดื้อยากลุ่มนี้ว่า Carbapenemase-resistant enterobacteriaceae (CRE) อาจพบเชื้อมี gene ดื้อยาชนิดเดียวหรือหลายชนิดในตัวเดียวกันได้ การตรวจหาgene นี้โรงพยาบาลในส่วนภูมิภาคทั่วประเทศส่วนใหญ่จะไม่มีเครื่องมือหรือขีดความสามารถในการตรวจ ต้องส่งตรวจต่อที่โรงพยาบาลระดับมหาวิทยาลัย หรือกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งต้องใช้เวลานานในการจะทราบผลการตรวจยืนยัน วิธีการตรวจการดื้อยาดังกล่าวที่โรงพยาบาลในส่วนภูมิภาคจะสามารถทำการตรวจได้ในเบื้องต้นนอกจากการทำผลความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Carbapenem เช่น Imipenem Ertapenem Meropenem การตรวจหาการดื้อยาของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriacae มีหลายวิธี เช่น Modified Hodge Test, The Imipenem-EDTA combination disk ซึ่งการอ่านผลค่อนข้างยากและมีปัญหาที่ไม่สามารถตรวจพบได้ครอบคลุมในทุก gene ที่ดื้อยา CLSI แนะนำให้ใช้วิธี Carba NP ในการตรวจ ซึ่งจะสามารถตรวจพบเชื้อที่มีgeneดื้อยาได้มากกว่าสองวิธีแรก การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ตรวจหาเชื้อดื้อยาโดยวิธี Carba NP วิธีมาตรฐานพบว่ามีขั้นตอนการทำงานที่น่าจะลดเวลาลงได้และการใช้ Imipenem/cilastatin ที่ใช้เป็นยาในการรักษาผู้ป่วยที่มีอยู่แล้วในโรงพยาบาล แทนการใช้ Imipenem monohydrate ที่มีราคาแพงกว่ามาก โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการ ปริมาณสารที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษาพบว่าวิธีการตรวจ Carba NPประยุกต์ สามารถลดระยะเวลาการตรวจลงได้ จาก 35-40 นาที เป็นใช้เวลาในการตรวจประมาณ 2-3 นาที และสาร imipenem/cilastatin ที่ใช้ปริมาณ 6 มิลิกรัมเป็นปริมาณน้อยสุดที่สามารถตรวจพบเชื้อดื้อยา Carbapenem ได้เช่นเดียวกับวิธี Carba NPมาตรฐาน พบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ความเข้มของสีที่ตรวจได้จากวิธี Carba NP ประยุกต์จะสีสดน้อยกว่า ส่วนสาร Cilastatin ที่มีผสมในยา Imipenem เพื่อป้องกันยาถูกทำลายโดยเอนไซค์ Dehydropeptidase เท่านั้นไม่รบกวนปฏิกิริยาในการทดสอบวิธี Carba NP แต่อย่างใด หากมีข้อสงสัยหรือไม่แน่ใจในผลการตรวจ ควรตรวจยืนยันโดยวิธีการตรวจหาgene ดื้อยาต่อไปทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีประยุกต์

ดังนั้นวิธี Carba NP ประยุกต์จะเป็นทางเลือกให้กับโรงพยาบาลในส่วนภูมิภาคที่พบเชื้อสงสัยดื้อยากลุ่ม Carbapenem และต้องการตรวจสนับสนุนการดื้อยาในเบื้องต้น สำหรับแพทย์ผู้รักษา พยาบาลควบคุมโรคเพื่อควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อได้รวดเร็วและลดต้นทุนทางการแพทย์

คำหัส : CRE, $bla_{IMP-14a}$, bla_{KPC}, bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$, Carba NP, เชื้อดื้อยา carbapenem

Original Articles นิพนธ์ต้นฉบับ

[1]กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี

[2]คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

บทนำ

โรคติดเชื้อเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย มีอัตราการเจ็บป่วยและอัตราเสียชีวิตสูงในลำดับต้นๆ เมื่อเปรียบเทียบกับโรคไม่ติดเชื้ออื่นๆ เช่น โรคหัวใจ โรคมะเร็งการใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียเป็นไปอย่างกว้างขวางในวงการแพทย์ พบว่าการพบเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษามีมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่ม Carbapenems เช่น Imipenem Ertapenem และ Meropenem เป็นยาทางเลือกที่ใช้ในการรักษาเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceaeในปี พ.ศ.2544 มีรายงานการพบเชื้อ Klebseilla pneumonia ที่ดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems(KPCs) เป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา[1-3] และเริ่มพบเชื้อดื้อยาดังกล่าวในประเทศไทย โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานีมีการพบ

เชื้อดื้อยากลุ่มนี้ในปี พ.ศ. 2558 แบคทีเรียดื้อยาที่เป็นปัญหาสำคัญคือ เชื้อ *Enterobacteriaceae* เช่น *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Enterobacter spp.* เป็นต้น ซึ่งเชื้อ *Enterobacteriaceae* เป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีมากในลำไส้ จึงเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในผู้ป่วยที่มีปัจจัยเสี่ยงโดยเฉพาะการติดเชื้อในโรงพยาบาล[4] กลไกการดื้อยาของแบคทีเรียตระกูล *Enterobacteriaceae* คือ การสร้างเอนไซม์ *carbapenemase* มาย่อยสลายยากลุ่ม carbapenem โดยตรงจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียมีแนวโน้มสูงขึ้น การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันเชื้อดื้อยากลุ่มนี้จึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อประโยชน์ในการรักษา การป้องกันการแพร่กระจายเชื้อดื้อยานี้ การตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วไปที่ไม่ใช่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัย หรือส่วนกลางเช่นกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ส่วนใหญ่ใช้วิธี Screening ในเบื้องต้นแล้วส่งตรวจยืนยัน gene ดื้อยาของเชื้อได้ต่อไป

การตรวจแบคทีเรียที่ดื้อยา carbapenem ในเบื้องต้นของห้องปฏิบัติการปัจจุบัน คือการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม carbapenem (Imipenem-Meropenem and Ertapenem) การทดสอบด้วยวิธี Double disk synergy หรือ วิธี Modified Hodge Test วิธี Combined disc ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบเหล่านี้ต้องใช้เวลานาน คือประมาณ 18-24 ชั่วโมง จึงจะทราบผลและการอ่านผลในบางรายไม่ชัดเจนทำให้ต้องทำการทดสอบซ้ำ และเป็นการทดสอบที่ไม่ครอบคลุม gene ดื้อยาทุกตัวในแต่ละการทดสอบ ส่งผลให้การควบคุมและการป้องกันการติดเชื้อในโรงพยาบาลมีความล่าช้า อาจส่งผลให้เกิดการระบาดขึ้น[4,5]

วิธีการทดสอบ Carba NP (แบบมาตรฐาน) ที่พัฒนาขึ้นโดยNordmannและคณะตั้งแต่ปี 2555[6] เป็นวิธีที่สามารถทราบผลได้ภายใน 2 ชั่วโมง อีกทั้งมีความไวและความจำเพาะสูงและเป็นวิธีหนึ่งที่ CLSI[8] แนะนำให้ใช้ในการตรวจหา Carbapenemase ได้ แต่วิธี carba NP มาตรฐานนั้นมีขั้นตอนในการปฏิบัติหลายอย่างเช่น การบ่มเชื้อ การปั่นเหวี่ยง และต้องมีเครื่องมือเช่นเครื่องปั่นเหวี่ยงทำให้ต้องใช้เวลาในการทดสอบมากขึ้น รวมถึงยา Imipenem monohydrate ที่ใช้กับวิธีมาตรฐานมีราคาค่อนข้างสูงไม่มีการใช้งานจริงในโรงพยาบาล ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจในการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพวิธี Carba NP ประยุกต์ เพื่อใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase โดยลดขั้นตอนการบ่มและการปั่นเหวี่ยงของวิธีมาตรฐาน รวมถึงการใช้ยา imipenem/cilastatin ที่มีใช้กับผู้ป่วยอยู่แล้วในโรงพยาบาล แทน Imipenem monohydrateเพื่อให้ได้การทดสอบที่มีความรวดเร็ว ไม่ยุ่งยากในการปฏิบัติและสามารถลดต้นทุนได้ ซึ่งหาได้จากกลุ่มงานเภสัชกรรมของโรงพยาบาล ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี Carba NP มาตรฐานจะเป็นประโยชน์ต่อตรวจวิเคราะห์เชื้อดื้อยาที่รายงานผลได้รวดเร็ว และลดต้นทุนทางการแพทย์

วัตถุประสงค์

เพื่อหาสาร Imipenem/cilastatin ทดแทนสารมาตรฐาน Imipenem ที่ชในการตรวจหาเชื้อดื้อยา Carbapenem ของเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae และลดขั้นตอนในการทดสอบลงเพื่อทำให้ระยะเวลาในการรายงานผลให้สั้นลง

วัสดุและวิธีการ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง : เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากตัวอย่างผู้ป่วยของโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานีในช่วงปี พ.ศ. 2558-2559 เป็นเชื้อดื้อต่อยากลุ่ม Carbapenems ตัวใดตัวหนึ่ง (imipenem, meropenem และ ertapenem) โดยวิธี Disk Diffusion ที่ยืนยันโดยวิธี Multiplex PCR แล้วว่าเชื้อดื้อยาด้วยกลไกอย่างใดอย่างหนึ่ง เชื้อที่ศึกษามีเชื้อ *E.coli* จำนวน 18 สายพันธุ์ *K.pneumoniae* จำนวน 88 สายพันธุ์ *Enterobacter sp.* จำนวน 5 สายพันธุ์

เชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพ : เชื้อ *Klebsiellapneumoniae* ATCC®BAA1705 (bla_{KPC}), *K.pneumoniaestrain* 22 ($bla_{IMP-14a}$), *K.pneumoniae* ATCC®BAA-2524™(bla_{OXA48}),Escherichia coli ATCC® BAA-2471™(bla_{NDM-1}) และ *K.pneumoniae* ATCC® BAA1706 (neative control) ใช้เป็นเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานสำหรับการทดสอบวิธี Carba NP ทั้งสองวิธีและวิธี multiplex PCR

เชื้อที่ได้นำมาทดสอบทั้งสองวิธีคือ Carba Np มาตรฐาน และ Carba NP ประยุกต์ ดังนี้

1. การทดสอบ Carba NP แบบมาตรฐาน[6]

1.1 เขี่ยโคโลนีของเชื้อ *Enterobacteriaceae* ที่จะทดสอบ ที่เป็น young culture อายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง มา 1 loop (ขนาด10 ul)

1.2 ละลายลงในสารละลาย B-PER II®Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 100 ulผสมให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

1.3 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 x g เป็นเวลาประมาณ 5 นาที ดูด supernatant ปริมาตร 30 ul. ใส่ลงในหลอดสารละลาย Phenol red + Zn solution (pH 7.8) ที่มียา Imipenem monohydrate (USP Reference Standard, USA) (หลอด A) และหลอดที่ไม่มียา Imipenem monohydrate (หลอด B) ที่มีปริมาตรหลอดละ 100 ul. ผสมให้เข้ากัน

1.4 สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลาอย่างน้อย 5 - 10 นาที ถ้ายังไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของสีให้เข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำออกมาดูการเปลี่ยนแปลงสี

1.5 ผลบวกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีเหลืองหรือสีส้ม ตามภาพแสดงที่ 1

1.6 ในการเตรียมสารละลาย Phenol red+Zn solution (pH 7.8) ที่มียา Imipenem monohydrate (หลอด A) ทำโดยการชั่งImipenem monohydrate ปริมาณ 3 mg ใส่ลงในหลอด microfuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นทำการละลายด้วยการเติมน้ำยา Phenol red+Zn solution (pH 7.8) ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงแบ่งใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 ml ปริมาตรละ 100 ul เพื่อทำการทดลองกับ supernateปริมาตร 30 ulในข้อ 4.3 (หลอด A) ต่อไป

2. การทดสอบ Carba NP ประยุกต์

2.1 ทำการเตรียมสารละลาย A โดยทำการเติมน้ำยา Phenol red+Zn (pH 7.8) ปริมาตร 500 µl ลงในหลอดที่มียา Imipenem/cilastatin ปริมาณ 3, 6 และ 8 mg (สามชุดระดับความเข้มข้นเพื่อหาความเข้นข้นน้อยสุดที่สามารถอ่านผลบวกได้ชัดเจน) ผสมให้เข้ากัน ดูดมา 100 µl ผสมกับน้ำยา B-PER II®Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA) ที่มีปริมาตร 100 µl เท่ากัน

2.2 สารละลาย B ให้ทำการผสมน้ำยา B-PER II®Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA)ปริมาตร 100 µl กับ Phenol red+Zn (pH 7.8) ที่ไม่ผสมImipenem/cilastatinปริมาตร 100 µl สุดท้ายจะได้ปริมาตรรวมทั้งหมด 200 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง สำหรับแต่ละหลอด (หลอด A และ B)

2.3 เขี่ยโคโลนีของเชื้อ Enterobacteriaceae ที่จะทดสอบที่มีอายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง มาเต็มloopขนาด 1 µl ละลายเชื้อ ลงในสารละลายหลอด A และ B ผสมให้ละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน (เชื้อ 1 ตัว ต่อสารละลาย A และ B จำนวน 1 ชุด)

2.4 สังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลาอย่างน้อย 1-10 นาที ถ้ายังไม่เห็นการ เปลี่ยนแปลงของสีให้ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นแปลผลตามภาพที่ 1

3. การแปลผลการทดสอบ Carba NP ทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีประยุกต์ทั้ง 3 ความเข้มข้น

หลอดที่มี Imipenem (หลอด A)	หลอดที่ไม่มี Imipenem (หลอด B)	การแปลผล
สีเหลือง	**สีแดง**	เชื้อมีเอนไซม์ Carbapenemaseที่มีฤทธิ์ในการย่อยสลายยาในกลุ่ม Carbapenemได้
สีส้ม-เหลือง	**สีแดง**	เชื้อมีเอนไซม์ Carbapenemase ที่มีฤทธิ์ในการย่อยสลายยาในกลุ่ม Carbapenem ได้
สีส้ม-แดง	**สีแดง**	ให้ดูผลการทดสอบ susceptibility ประกอบเพื่อยืนยันผลว่าเป็น CRE หรือไม่
สีแดง	**สีแดง**	เชื้อไม่มีเอนไซม์ Carbapenemase แต่ต้องดูผลการทดสอบ susceptibility ประกอบเพื่อวินิจฉัยว่าเป็น CRE หรือไม่
สีเหลืองหรือ	**สีส้ม-เหลือง**	ให้ทำการทดสอบใหม่ แต่ถ้ายังให้ผลเหมือนเดิมอยู่
สีเหลืองหรือ	**สีส้ม-เหลือง**	ต้องดูผลการทดสอบ susceptibility ประกอบเพื่อวินิจฉัยว่าเป็น CRE หรือไม่

4. การตรวจหาชนิดของยีนดื้อยาด้วยวิธี Multiplex PCR

ส่งตรวจหาชนิดของ gene ดื้อยาของเชื้อที่ทำการทดสอบที่คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร โดยอาจารย์อนุศักดิ์ เกิดสิน

เพื่อตรวจหาgeneดื้อยา carbapenemจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ $bla_{IMP-14a}$, bla_{KPC}, bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$, และยีนดื้อยา colistin คือ mcr ซึ่งมีวิธีดังนี้ ทำการเตรียม PCR master mix ให้ได้ปริมาตร 15 ul ประกอบด้วย JumpStart REDTaqReadyMix PCR Reaction Mix (Sigma) ในความเข้มข้นสุดท้าย 1X, ไพร์เมอร์ (ตารางที่ 1)

ในความเข้มข้นสุดท้ายเส้นละ 0.5 uM และดีเอ็นเอแม่แบบ ในความเข้มข้นสุดท้าย 10-20 ng จากนั้นนำลงเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR Thermal Cycler (Takara, Japan) ในจำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วินาทีและ extentionที่อุณหภูมิ 72องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที ตรวจสอบ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophotoresis ที่ความเข้มข้น 2% agarose จากนั้นแปลผลดังภาพที่ 2

5. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

สถิติ พรรณนา ร้อยละ และดูความสัมพันธ์ของวิธี Carba NP มาตรฐานกับวิธี Carba NP ประยุกต์โดยใช้สถิติ Chi- Square

ผลการศึกษา

เชื้อ *Enterobacteriaceae* จำนวน 111สายพันธุ์ เมื่อทดสอบหาชนิดของยีนดื้อยา carbapenem ด้วยวิธี multiplex PCR พบว่า 95 สายพันธุ์พบ Gene ดื้อยาที่สามารถจำแนก gene ดื้อยาออกได้ 3 กลุ่มได้แก่ เชื้อที่มียีน bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$ และมียีนทั้ง2ชนิด (bla_{NDM}+$bla_{OXA48-like}$) จำนวน 38, 48 และ 9 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อ *E. coli* ที่มีเฉพาะยีน bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$ และมียีนทั้งคู่ เป็นจำนวน 5, 6 และ 1 สายพันธุ์ ตามลำดับ เป็นเชื้อ *K.pneumoniae* ที่มีเฉพาะยีน bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$ และมียีนทั้งคู่ เป็นจำนวน 30, 40 และ 8 สายพันธุ์ ตามลำดับเป็นเชื้อ *Enterobacter sp.* ที่มีเฉพาะยีน bla_{NDM}จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มีเฉพาะยีน $bla_{OXA48-like}$ จำนวน 2 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2)

เมื่อเทียบผลความดื้อยาโดยวิธี Disk Diffusion กับ gene ดื้อยา ให้ผลดื้อยาไม่ตรงตรงกัน 100% โดยเฉพาะใน gene ดื้อยา $bla_{OXA-48-like}$ ของเชื้อ *E.coli* กับ *K. pneumo-*

nia และ gene ดื้อยา bla_{NDM} ของเชื้อ *K. pneumonia* และ *Enterobacter sp.* (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามจากเชื้อที่ทดสอบทั้งหมด ไม่พบเชื้อที่มีgene mac ที่ทำให้ดื้อต่อยา colistin

เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการตรวจ gene ดื้อยามาเทียบกับผลการตรวจ Carba NP พบว่า เชื้อ *E.coli* ที่มี gene ดื้อยา 18 สายพันธุ์พบว่ามีgeneดื้อยา blaNDM และมี gene ดื้อยาคู่ ($bla_{NDM+blaOxa48-like}$) ให้ผลบวกตรงกัน 5 และ 1 สายพันธุ์ตามลำดับ ส่วน gene ดื้อยาชนิด $bla_{Oxa48-like}$ จำนวน 6 สายพันธุ์พบให้ผลบวกวิธี Carba NP 4 สายพันธุ์ ให้ผลเป็นลบ 2 สายพันธุ์ มี 6 สายพันธุ์ให้ผลลบตรงกันทั้งสองวิธี (ตารางที่ 4)

เชื้อ *K.pneumoniae* จำนวน 88 สายพันธุ์ เมื่อเทียบสองวิธีพบ gene ดื้อยา bla_{NDM} 30 สายพันธุ์ให้ผลบวกตรงกัน 29 สายพันธุ์ วิธี Carba NP ให้ผลลบ 1 สายพันธุ์ gene ดื้อยา $bla_{Oxa48-like}$ ให้ผลบวกตรงกัน 31 สายพันธุ์ วิธี Carba NP ให้ผลลบ 9 สายพันธุ์ ส่วน gene ดื้อยาทั้งคู่ ให้ผลบวกตรงกัน 8 สายพันธุ์ และมี 3 สายพันธุ์ ที่ไม่พบ gene ดื้อยาแต่ตรวจวิธี CarBa NP ให้ผลบวก (ตารางที่ 5) เชื้อ *Enterobacter spp.* ให้ผลบวกตรงกันใน gene ดื้อยา blaNDM และ Carba NP 3 สายพันธุ์ มี 2 สายพันธุ์ที่ตรวจพบ gene ดื้อยา blaOxa48-like แต่ผลการตรวจ Carba NP เป็นลบ (ตารางที่ 6)

เชื้อที่ให้ผลบวกโดยวิธี Carba NP ทั้งหมด 84 สายพันธุ์ ผลลบทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ทำการทดสอบโดยวิธี Carba NP ประยุกต์ในระดับความเข้มข้นของ Imipenem/Cillastatin 3, 6 และ 8 มิลลิกรัมพบว่าให้ผลบวกตรงกันได้ดีในระดับความเข้มข้นที่ 6 และ 8 มิลลิกรัม ส่วนที่ 3 มิลลิกรัมวิธีประยุกต์จะได้ผลเป็นลบทั้งหมด (ตารางที่ 7) เมื่อนำทั้งสองวิธีมาดูความสัมพันธ์กันพบว่าทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเทียบผลในระดับความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมกับวิธี Carba NP มาตรฐาน พบว่าให้ผลตรงกันทั้งหมด 84 สายพันธุ์ และผลลบตรงกันทั้งหมด 24 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

เมื่อทำการทดสอบวิธี carba NP แบบมาตรฐานและแบบประยุกต์กับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน ประกอบด้วย *E.coli* ที่มี gene bla_{NDM}, $bla_{OXA48-like}$ และมี gene bla_{NDM} + $bla_{OXA48-like}$ เชื้อ *K.pneumoniae* ที่มี gene $bla_{NDM,}$ $bla_{OXA48-like}$ และมี gene ทั้งคู่ ส่วนเชื้อ *Enterobacter spp.* มีเฉพาะ gene bla_{NDM} และ gene $bla_{OXA48-like}$ เชื้อแบคทีเรีย Enterobacteriaceae ที่นำมาทดสอบเป็นเชื้อที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลสุราษฎร์ธานีเพื่อนำมาทดสอบด้วยวิธี Carba NP ทั้งแบบมาตรฐานและแบบประยุกต์ โดยเชื้อให้ผลดื้อต่อยา Carbapenem (Imipenem, Meropenem และ Ertapenem)ตัวใดตัวหนึ่งหรือทุกตัว (ตารางที่ 2) ผลความสอดคล้องของการตรวจด้วยวิธี Carba NP เทียบกับการตรวจหา gene ดื้อยาให้ผลบวกที่ตรงกันได้ดีใน gene $_{blaNDM}$, $bla_{NDM+OXA48-like}$ ส่วน gene blaOXA48-like จะให้ผลบวกที่ตรงกันในเปอร์เซ็นต์ที่ต่ำกว่า (ตามตารางที่ 4,5 และ 6) ซึ่งสอดคล้องกับคำแนะนำของ CLSI ที่ว่าวิธี Carba NP จะมีความไวต่อการตรวจหา gene ดื้อยาชนิด blaOXA48-like ได้ต่ำประมาณ 11%8 พบการให้ผลบวกในวิธีCarba NP แต่ตรวจไม่พบgene ดื้อยาในเชื้อ K. pneumoniae (ตารางที่ 5) อาจเป็นจากเชื้อดื้อยาโดยกลไกอื่นหรือจากผลบวกปลอม

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงการใช้ยา Imipenem/cilastatin แทนการใช้ Imipenem monohydrate (สารมาตรฐาน) ในการทดสอบ Carba NP ที่เรียกว่าวิธี Carba NP ประยุกต์นั้นสามารถใช้แทนได้ในสัดส่วนที่มากกว่าวิธีมาตรฐาน (จากวิธีมาตรฐานใช้ Imipenem monohydrate 3 มิลลิกรัม เป็นการใช้ Imipenem/cilastatin 6 มิลลิกรัม) ซึ่งพบว่าในส่วนประกอบของ Imipenem/cilastatin นั้นเป็นยาฉีดที่มีส่วนผสมของ Imipenem : Cilastatin ในสัดส่วน 1 : 1 ซึ่งจุดประสงค์ในการเติมสาร Cilastatin ลงไปเพื่อยับยั้งเอนไซค์ Dehydropeptidase ซึ่งเอนไซค์นี้จะทำให้การออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อของ Imipenem ลดลง[9] สาร Cilastatin นี้จะไม่ออกฤทธิ์ในการรบกวนปฏิกริยาในการทดสอบการเปลี่ยนแปลงสีแต่อย่างใด แต่อย่างไรก็ตามสีเหลืองที่เป็นผลบวกของวิธีประยุกต์ที่ใช้ยา imipenem/cilastatin แทน Imipenem monohydrate จะให้สีเหลืองที่สดน้อยกว่า เมื่อเทียบกับวิธีมาตรฐานที่ใช้ imipenem

monohydrate (ภาพที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างวิธี Carba NP ประยุกต์และวิธีมาตรฐานโดยเทียบความสัมพันธ์ทางสถิติโดยใช้ Chi-squaer พบว่าทั้งวิธีมาตรฐานและวิธีประยุกต์มีความสัมพันธ์กันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ ค่า $p \leq 0.05$ จึงสามารถใช้แทนกันได้และให้ผลการทดสอบที่ดี

วิธีประยุกต์จะสามารถลดขั้นตอนโดยตัดขั้นตอนการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีและการปั่นเหวี่ยงทำให้การทดสอบด้วยวิธีประยุกต์มีความรวดเร็วขึ้น จากวิธีมาตรฐานจะใช้เวลาในการทดสอบประมาณ 35-40 นาทีต่อการทดสอบเชื้อ 1 ตัวเหลือเวลาเฉลี่ยในการทดสอบแต่ละรายประมาณ 2-3 นาที จะมีประโยชน์ที่ทำให้สามารถรายงานผลการตรวจได้รวดเร็วขึ้น สามารถตอบสนองต่อการควบคุมการแพร่กระจายเชื้อได้เร็วขึ้น นอกจากนี้เมื่อคำนวณต้นทุนของวิธี Carba NP ประยุกต์เทียบกับวิธีมาตรฐาน พบว่า วิธีแบบประยุกต์มีต้นทุนถูกกว่า เฉลี่ยตัวอย่างละ 6.50 บาท ในขณะที่วิธีมาตรฐานมีต้นทุนประมาณตัวอย่างละ 50 บาท เนื่องจากยาที่ใช้ในการทดสอบแบบวิธีมาตรฐานเป็นสารบริสุทธิ์ที่มีราคาแพงกว่าวิธีประยุกต์จึงเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในการทดสอบได้

อย่างไรก็ตามการทดสอบ Carba NP เป็นการทดสอบเอนไซม์ carbapenemaseที่เชื้อผลิตออกมาเท่านั้นซึ่งเป็นกลไกหนึ่งของการดื้อยาต้านจุลชีพ carbapenem ซึ่งการดื้อยาดังกล่าวอาจมีกลไกอื่นอีก ควรระมัดระวังหากผลการทดสอบ Carba NP เป็นลบ ควรดูผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพ (Disk Diffusion)ก่อนที่จะรายงานผล ดังนั้นการทดสอบ Carba NP แบบประยุกต์ให้ผลที่สอดคล้องกับวิธี Carba NP มาตรฐาน สามารถปฏิบัติได้ง่าย สะดวก มีความรวดเร็วและต้นทุนต่ำ

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณ Dr.Yukihiro Akeda Osaka University, Japan. ที่สนับสนุนน้ำยาในการตรวจวิเคราะห์

ขอบคุณ นางณัฐิยา มหาพันธ์ และเจ้าหน้าที่ห้องจุลชีววิทยาคลินิก โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานีที่ช่วยคิดสถิติวิเคราะห์ตรวจทานต้นฉบับและเก็บเชื้อตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

1. Hawkey PM. Resistance to carbapenems. J Med Microbiol 1997;46:451-4.
2. Nordman P, Naas T, and Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Entero-bacteriaceae: Class a Carbapenemases. Emerging Infectious Diseases 2011;17:1791-8.
3. Chen LF. Division of Infectious Diseases and International Health, Duke University, Durham, North Carolina. Klebseilla pneumoniae Carbapenemase: Extended-Spectrum beta-Lactamase Continues to Go Global. Medscape Infectious Disease @ 2009 Medscape. Available from : http//www.medscape.com.
4. Nordmann P, Naas T, PoirelL. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011;17:1791–8
5. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents. 2010.36:205-10
6. Nordmann P, Poirel L, Dortet L.. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg. Infect. Dis. 2012;18:1503–1507
7. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes.DiagnMicrobiol Infect Dis. 2011;70: 119-23.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100–S25. Wayne (PA): the Institute; 2015.
9. Keynan S, Hooper NM, Felici A, Amicosante G, Turner AJ. The renal membrane dipeptidase (dehydropeptidase I) inhibitor, cilastatin, inhibits the bacterial metallo-beta-lactamase enzyme

CphA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995;39(7):1629-1631.

10. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing Pseudomonas spp. J. Clin. Microbiol.50:3773–3776
11. NataroJP., CA. Bopp, PI. Fields, JB. Kaper, and NA. Strockbine. 2007. Escherichia, Shigella, and Salmonella. In PR. Murray editor. Manual of Clinical Microbiology 9thedn., Washington DC: ASM Press. p.670-687.
12. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. ClinMicrobiol Rev. 2007 Jul;20(3):440-58
13. SchwaberMJ, CarmeliY. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat.JAMA. 2008;300:2911–3.
14. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. 2013. Evaluation of the

Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceaeand Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 57:4578–4580.

15. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. 2014. Reply to “Further proofs of concept for the Carba NP test”. Antimicrob. Agents Chemother. 58:1270.

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์และขนาดของ PCR product

ชื่อไพร์เมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์(5'-3')	ขนาด PCR product (bp)
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232
IMP-R	GGTTTAAYAAAACAACCACC	
OXA48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
OXA48-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTC	621
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
KPC-F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798
KPC-R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	
MCR-F	GGGTGTGCTACCAAGTTTGC	1,126
MCR-R	CATTGGCGTGATGCCAGTTT	

ตารางที่ 2 ชนิดของgene ที่ตรวจโดยวิธี multiplex PCR

Organism (จำนวน)	ชนิด gene ดื้อยา Carbapenem โดยวิธี multiplex PCR			รวม
	bla_{NDM}	$bla_{OXA48\text{-}like}$	bla_{NDM} + $bla_{OXA48\text{-}like}$	
E. coli (12)	5	6	1	12
K. pneumonia (72)	30	40	8	78
Enterobacter spp. (5)	3	2	0	5
รวม	38	48	9	95

ตารางที่ 3 ผลความไวต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม Carbapenems**โดยวิธี** Dick Diffusion **เทียบกับชนิด**Gene **ดื้อยา โดยวิธี** Multiplex PCR

Organisms	**ชนิด**gene**ดื้อยา** Carbapenem **โดยวิธี** multiplex PCR	% Resistance (Disk diffusion)		
		Imipenem	Ertapenem	Meropenem
E. coli (n=12)	bla_{NDM} (n = 5)	100	100	100
	OXA48-like (n = 6)	0	66.7	50
	bla_{NDM} +OXA48-like (n = 1)	100	100	100
K. pneumoniae (n=78)	bla_{NDM} (n = 30)	94.7	100	94.7
	OXA48-like (n = 40)	96.3	100	92.6
	bla_{NDM} +OXA48-like (n = 8)	100	100	100
Enterobacter sp. (n=5)	bla_{NDM} (n=3)	66.7	100	66.7
	OXA48-like (n=2)	100	100	100

ตารางที่ 4 แสดงผลชนิดgene**ดื้อยา** Carbapenem **โดยวิธี** multiplex PCR **ของเชื้อ** *E.coli* **เทียบกับวิธีมาตรฐาน** Carba NP

Gene โดยวิธี multiplex PCR (N = 18)		Carba NP	
		Positive (%)	Negative (%)
bla_{NDM} (N = 5)	Positive	5 (100)	0
	Negative	0	0
$bla_{Oxa48\text{-}like}$ (n = 6)	Positive	4 (66.7)	2 (33.3)
	Negative	0	0
bla_{NDM} + $bla_{Oxa48\text{-}like}$ (n = 1)	Positive	1 (100)	0
	Negative	0	0
Negative for 5 genes (n = 6)	Positive	0	0
	Negative	0	6 (100)

ตารางที่ 5 แสดงผลชนิดgeneดื้อยา Carbapenemโดยวิธี multiplex PCR ของเชื้อ *K. pneumoniae* เทียบกับวิธีมาตรฐาน Carba NP

Gene โดยวิธี multiplex PCR N = 88		Carba NP	
		Positive (%)	Negative (%)
bla_{NDM} (N = 30)	Positive	29 (96.7)	1 (3.3)
	Negative	0	0
$bla_{Oxa48\text{-}like}$ (N = 40)	Positive	31 (77.5)	9 (22.5)
	Negative	0	0
bla_{NDM} + $bla_{Oxa48\text{-}like}$ (N = 8)	Positive	8 (100)	0
	Negative	0	0
Negative for 5 genes (N = 10)	Positive	0	0
	Negative	3 (30)	7 (70)

ตารางที่ 6 แสดงผลชนิดgeneดื้อยา Carbapenemโดยวิธี multiplex PCR ของเชื้อ *Enterobacter spp.* เทียบกับวิธีมาตรฐาน Carba NP

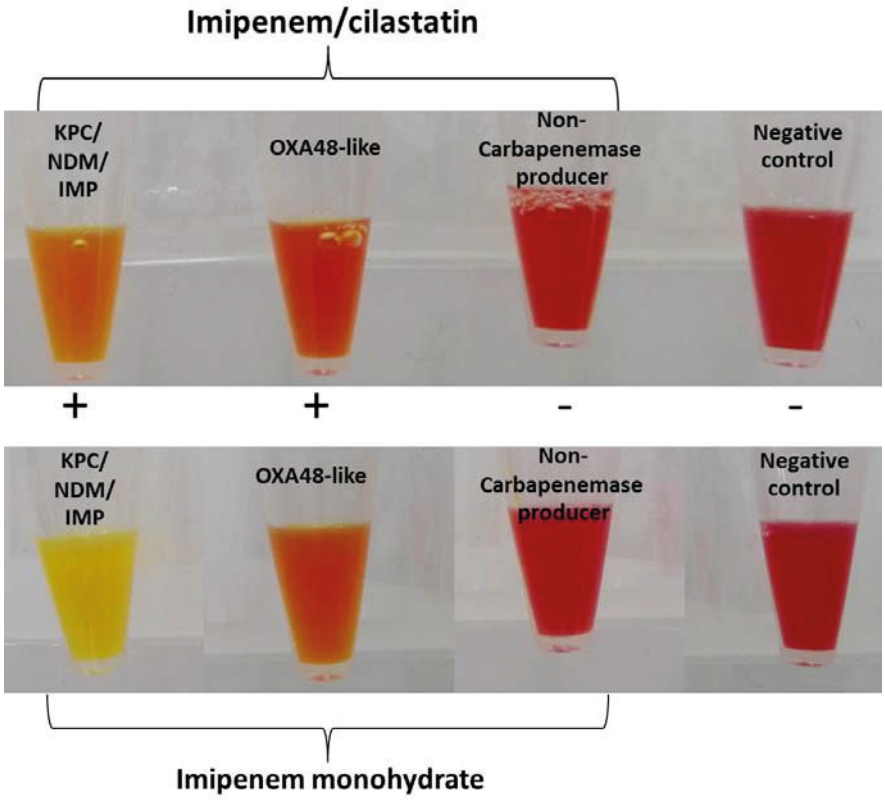
Gene โดยวิธี multiplex PCR (N = 5)		Carba NP	
		Positive (%)	Negative (%)
bla_{NDM} (N = 3)	Positive	3 (100)	0
	Negative	0	0
$bla_{Oxa48\text{-}like}$ (N = 2)	Positive	0	2 (100)
	Negative	0	0

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิธี Carba NPประยุกต์ ในความเข้มข้นต่างที่ใช้

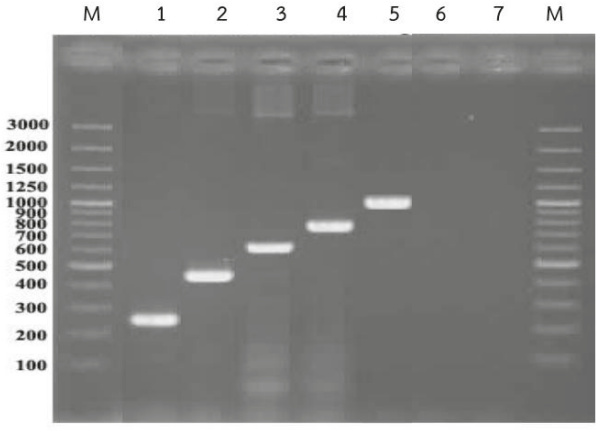
Carba NP มาตรฐาน (จำนวนทดสอบ)	ผลบวกของวิธี Carba NPประยุกต์		
	3 mg.	6 mg.	8 mg.
Positive (84)	0	84	84
Negative (27)	27	27	27
% Positive	0	100	100

ตารางที่ 8 แสดงผลวิธี Carba NP มาตรฐาน วิธี Carba NP ประยุกต์

วิธี Carba NP มาตรฐาน (ราย)	วิธี Carba NP ประยุกต์ (ราย)		
	Positive	Negative	Total
Positive	84	0	84
Negative	0	27	27
Total	84	27	111



ภาพที่ 1 แสดงผลของการทดสอบ Carba NP แบบประยุกต์(Imipenem/cilastatin)และแบบมาตรฐาน (Imipenem monohydrate)



ภาพที่ 2 แสดงขนาดของ PCR product ของยีนดื้อยาจากวิธี multiplex PCR โดยเลน1= bla_{IMP} gene เลน 2= $bla_{OXA48\text{-}like}$ gene เลน 3= bla_{NDM} gene เลน 4= bla_{KPC} gene เลน 5= MCR-1 gene เลน 6 และ 7= negative control