

การพัฒนาและการประเมินประสิทธิภาพของวิธีที่ใช้คัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนีมจากอุจจาระ

Development and evaluation of screening method for carbapenem-resistant Gram negative bacteria (CR-GNB) in stool cultures

ชยานันท์ พุทธานันท์¹ สรศักดิ์ อินทรสุด²
เสกสรรค์ สโมสรสุข³ วรดา สโมสรสุข^{3*}

Chayanit Phutthanu¹ Sorasak Intorasoot²
Seksun Samosornsuk³ Worada Samosornsuk^{3*}

บทคัดย่อ

ความสำคัญของปัญหา : การสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีมของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบเป็นกลไกที่สำคัญที่ทำให้แบคทีเรียดื้อต่อยาหลายชนิดในกลุ่มเบต้าแลคแตม รวมถึงยากลุ่มคาร์บาเพนีม ผู้ป่วยที่นอนในโรงพยาบาลสามารถตรวจพบเชื้อดื้อยากลุ่มคาร์บาเพนีมได้ในอุจจาระ และสามารถถ่ายทอดเชื้อเหล่านี้จากคนหนึ่งไปยังอีกคนหนึ่งโดยไม่แสดงอาการ การคัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อยากลุ่มคาร์บาเพนีมในตัวอย่างอุจจาระ จะช่วยควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อในโรงพยาบาลได้

วัตถุประสงค์ : งานวิจัยนี้ผู้วิจัยทำการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของวิธี pooled-organisms disk diffusion (PODD) เพื่อใช้คัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนีมจากอุจจาระ

วิธีดำเนินการวิจัย : โดย spike เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีม 23 สายพันธุ์ ในตัวอย่างอุจจาระ และคัดกรองเชื้อกลับมา เปรียบเทียบผลการตรวจกับวิธีการตรวจหาเชื้อดื้อต่อคาร์บาเพนีมด้วยอาหาร chromogenic agar และวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีม 5 ชนิด ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{Vim}*

ผลการศึกษา : ผลการวิจัยพบว่า วิธี PODD เมื่อทดสอบกับ disk imipenem, meropenem และ doripenem ให้ผลความไว (Sensitivity) เท่ากับ 100%, ความจำเพาะ (Specificity) เท่ากับ 100%, Positive Predictive Value (PPV) เท่ากับ 100% และ Negative Predictive Value (NPV) เท่ากับ 100% เช่นเดียวกับ multiplex PCR

สรุป : วิธี PODD เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำวันเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยากลุ่มคาร์บาเพนีมในอุจจาระ

คำสำคัญ : คาร์บาเพนีม, แบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนีม

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) ปทุมธานี
Graduate School, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani

² ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

² Department of Medical Technology, Faculty of Medical Technology, Chiang Mai University, Chiang Mai

³ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี

³ Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University,

*Corresponding Author Email: sworada@hotmail.com

Abstract

Background : Carbapenemases production of Gram-negative bacteria is a major mechanism of multidrug resistance in beta-lactam drugs including carbapenem group. The long stay hospital patients could detect carbapenem resistant Gram-negative bacteria (CR-GNB) in fecal samples, and these strains could transmit from person to person asymptotically. Screening of CR-GNB in fecal samples could control the spread of these strains among patients in the hospital.

Objective : This study aimed to develop and evaluate pooled-organisms disk diffusion method (PODD) for screening CR-GNB in fecal samples

Material and methods : Twenty-three of carbapenemases producing strains were spiked in fecal samples and evaluated their recovery. The result of PODD method was compared with those of chromogenic agar assay and multiplex PCR for *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* and *bla_{VIM}*

Result : The result revealed that the PODD method using imipenem, meropenem and doripenem disk showed 100% sensitivity, 100% specificity, 100% positive predictive value (PPV) and 100% negative predictive value (NPV) like multiplex PCR.

Conclusion : The PODD method is cost effective, simply to apply for screening CR-GNB in fecal samples in routine work.

Keywords : Carbapenems, Carbapenem-Resistant Gram negative bacteria (CR-GNB)

บทนำ

ปัจจุบันมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนีมมีอุบัติการณ์ขึ้นทั่วโลก [1] ผู้ป่วยที่มีเชื้อเหล่านี้เป็นแหล่งสะสมเชื้อ (reservoir) จะสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อไปสู่ผู้อื่นได้เนื่องจากเชื้อดื้อยาดังกล่าวสามารถถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีเมส ผ่านทางพลาสมิดไปยังเชื้ออื่นๆ ปัจจุบัน เอนไซม์คาร์บาเพนีเมถูกแบ่งออกเป็น 3 class ได้แก่ class A (serine carbapenemases, เช่น *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) เป็นต้น, class B (metallo- β -lactamases เช่น IMP, VIM และ NDM เป็นต้น) และ class D (OXA carbapenemases เช่น OXA-23 and OXA-48 เป็นต้น) [2,3] การศึกษาจากประเทศอิสราเอลได้ทำการศึกษาเพื่อคัดกรองและตรวจยืนยันเชื้อแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนีม (Carbapenem – Resistance *Enterobacteriaceae*; CRE) จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยในสถานพยาบาลระดับตติยภูมิ พบว่าคนที่สัมผัสหรือติดต่อกับผู้ป่วยที่เป็นพาหะ CRE มาก่อนมีความเสี่ยงสูงที่จะกลายเป็นพาหะ CRE ในอุจจาระได้ [1] และผู้ป่วยมีประวัติเข้าออกโรงพยาบาลบ่อย จะพบ carbapenemases - producing *Enterobacteriaceae* (CPE) แฝงอยู่ในลำไส้ผู้ป่วย [4]

การศึกษาเชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระมีข้อจำกัดต่างๆ เช่น ผลกระทบจากปริมาณของเชื้อประจำถิ่นในอุจจาระที่มีปริมาณมาก วิธีการตรวจคัดกรองเพื่อหาเชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระมีหลากหลายวิธี ปัจจุบันไม่มีวิธีที่เป็นมาตรฐาน ว่าวิธีใดเหมาะสม สะดวกในการนำไปใช้ในงานประจำวัน และครอบคลุมกับการดื้อยากลุ่มคาร์บาเพนีมของแบคทีเรียแกรมลบ

ในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และ non-fermenter จากการศึกษาการตรวจคัดกรองเชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระ (Fecal carriage) ของ Amos Adler และคณะได้ทำการประเมินวิธีการตรวจคัดกรอง CRE โดยทำ Surveillance rectal swab ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar ที่มี imipenem เทียบกับการคัดกรองอุจจาระลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey agar และวาง imipenem, meropenem และ ertapenem disk พบว่ามีความไวและความจำเพาะไม่ต่างจาก Chromogenic agar ซึ่งมีราคาสูง แต่ยังมีข้อจำกัดในการคัดกรองเชื้อที่ดื้อต่อ Imipenem ในระดับต่ำ รวมถึงเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนีม ด้วยกลไกอื่น แม้จะไม่สามารถแยกโคโลนีที่ดื้อต่อยาออกมาได้เหมือน chromogenic agar แต่ก็สามารถทำการคัดกรองเบื้องต้นได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ [5] ในปี ค.ศ. 2012 Muriel Gazin และคณะ ได้ทำการประเมินวิธีการตรวจคัดกรอง CRE โดยการทำ Surveillance rectal swab โดยเปรียบเทียบ chromogenic media ของแต่ละบริษัท วิธีนี้สามารถแยกแบคทีเรียแกรมลบที่สร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีเมส ออกจากแบคทีเรียที่มีจำนวนมากในอุจจาระได้ แต่ไม่สามารถจำแนกชนิดเอนไซม์ออกเป็นกลุ่มต่างๆ ต้องมีการตรวจยืนยันเพื่อระบุตัวเชื้อและชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีเมส ข้อจำกัดในการคัดกรองด้วยวิธี chromogenic agar นั้นพบว่าเชื้อที่สร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีเมส กลุ่ม OXA-type สามารถให้ผลลบลงได้ นอกจากนี้การทดสอบแต่ละครั้งต้องควบคุมปริมาณเชื้อที่ทำการคัดกรองให้เหมาะสม เพราะถ้าใส่เชื้อที่ไวต่อยาในปริมาณมากก็อาจจะให้ได้

ผลบวกลงได้ [6] ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ทำการตรวจหาชนิดที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์คาร์บาเพนีเมสโดยตรงในอุจจาระ ด้วยวิธีทาง

ชีวโมเลกุล เช่น Lee และคณะ ได้ใช้วิธี multiplex realtime PCR ตรวจหายีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ KPC, NDM และ OXA-48 จาก rectal swab 268 ตัวอย่าง พบ NDM 22 ตัวอย่าง และ OXA-48 1 ตัวอย่าง [7] วิธีการตรวจทางชีวโมเลกุล เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ง่าย อย่างไรก็ตาม ต้องใช้เครื่องมือและน้ำยาที่มีราคาแพง ไม่เหมาะกับงานประจำในโรงพยาบาลทั่วไป ในปี ค.ศ. 2013 Julie Blackburn และคณะ ได้พัฒนาวิธีการตรวจคัดกรอง CRE โดยการทำการ Surveillance rectal swab ด้วยการใช้วิธี Direct carbapenem disk บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MacConkey โดยตรง และใช้ ROC curve หา cut-off ที่เหมาะสมสำหรับใช้คัดกรองเชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมส, กลุ่มที่สร้างเอนไซม์ Extended Spectrum β -lactamases (ESBLs) และกลุ่มที่สร้างเอนไซม์ AmpC- β -lactamases ข้อดีคือสามารถใช้วิธีนี้ในงานประจำวันได้และวิธีการไม่ยุ่งยาก แต่มีข้อจำกัดในการคัดกรองเชื้อดื้อยากรณีมีปริมาณต่ำ ๆ [8] สำหรับงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยทำการออกแบบและประเมินวิธีการคัดกรองที่สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมออกมาได้ทั้งหมดจากตัวอย่างอุจจาระ (Rectal swab) โดยอ้างอิงมาตรฐานของ CLSI

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของวิธี pooled-organisms disk diffusion (PODD) เพื่อใช้คัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมจากอุจจาระ

วิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (เลขที่ 094/2556) เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 21 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เชื้อมาตรฐาน จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 เป็นเชื้อควบคุมที่ไวต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มคาร์บาพีเนม และเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างสิ่งส่งตรวจ (Clinical specimen) จำนวน 23 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) 15 สายพันธุ์ ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* (NDM positive) 7 สายพันธุ์; *Klebsiella* spp. (NDM positive) 1 สายพันธุ์; *E. coli* (NDM positive) 3 สายพันธุ์; *E. coli* (OXA positive) 1 สายพันธุ์; *Enterobacter cloacae* (IMP positive) 2 สายพันธุ์ และ *Enterobacter aerogenes* (NDM positive) 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 carbapenem resistant nonfermentative bacilli (CR-NFB) 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *P. aeruginosa* (IMP positive) 2 สายพันธุ์; *P. aeruginosa* (VIM positive) 3 สายพันธุ์; *Pseudomonas putida* (VIM positive) 1 สายพันธุ์; *Acinetobacter baumannii* (NDM positive) 1 สายพันธุ์ และ *A. baumannii* (IMP positive) 1 สายพันธุ์

2. การคัดกรองอุจจาระที่ไม่มีเชื้อดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมด้วยวิธี Pooled-organisms disk diffusion method (PODD)

นำอุจจาระ (Stool) หรือเชื้อที่แยกได้จากไม้ป้ายบริเวณรอบทวารหนัก (Rectal swab) 25 ตัวอย่าง ซึ่งบ่มเพาะไว้ใน tryptic soy broth (TSB) 3 มล. ที่อุณหภูมิ 35-37

องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส นำมาคัดกรองหาเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ติดต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม โดยการ mix TSB ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่ง TSB ส่วนหนึ่งมาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland ใน 0.45% Normal saline ทำการ spread plate ลงบน Mueller Hinton แล้วนำไปทดสอบกับแผ่นซุบสารต้านจุลชีพกลุ่มคาร์บาพีเนม 3 ชนิด ได้แก่ imipenem (10 g), meropenem (10 g) และ doripenem (10 g) ด้วยวิธี Disk Diffusion นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส, นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เพื่อให้ครอบคลุมเชื้อทุกสายพันธุ์ ผลการคัดกรองอุจจาระด้วยวิธี PODD เป็นลบหรือไม่พบเชื้อดื้อยาในอุจจาระ เมื่อวัดขนาดของ inhibition zone มากกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ โดยกำหนดจาก เกณฑ์มาตรฐานการแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method ตาม Clinical and Laboratory Standards (CLSI) (9,10) (ตารางที่ 1)

3. การคัดกรองเชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระ ด้วยวิธี PODD

ทำได้โดยการนำ TSB suspension อุจจาระผู้ป่วยที่ให้ผลคัดกรองด้วยวิธี PODD เป็นลบ มา ปรับความขุ่น ให้ได้ 0.5 McFarland ด้วย 0.45% normal saline ปริมาตร 3 มล. และดูตาม 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน TSB 3 มล. ทำการ mix ด้วย vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

เตรียมเชื้อเป้าหมายลงไป (Spiked bacteria) ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853 และเชื้อดื้อยาในกลุ่มที่ 1 (CRE) และ กลุ่มที่ 2 (CR-NFB) ทั้งหมด 25 สายพันธุ์ โดยนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ มาเตรียมเป็น suspension ที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland ใน 0.45% NSS ปริมาตร 3 มล. และดูตาม 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน TSB ขนาด 3 มล. ที่มีอุจจาระผู้ป่วย ทำการ mix ด้วย vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกัน บ่มเพาะไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง และแบ่ง TSB mixture จากนั้นทำการปรับความขุ่น เท่ากับ McFarland 0.5 แบ่งเป็น 3 ส่วน ส่วนแรกปริมาณ 1 มล. ไปเตรียม boiled template ส่วนที่ 2 นำไปตรวจคัดกรองเชื้อแกรมลบ ดื้อยา กลุ่ม คาร์บาพีเนม ด้วย Chromogenic agar และส่วนที่ 3 นำไปตรวจคัดกรองเชื้อแกรมลบดื้อยา กลุ่มคาร์บาพีเนม ด้วยวิธี PODD

สำหรับวิธี PODD ทำการ spread plate ลงบน Mueller Hinton agar แล้วนำไปทดสอบกับแผ่นซุบสารต้านจุลชีพ ได้แก่ imipenem (10 g), meropenem (10 g) และ doripenem (10 g) ด้วยวิธี disk diffusion

นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

ผลการคัดกรองอุจจาระด้วยวิธี PODD เป็นลบหรือไม่พบเชื้อดื้อยาในอุจจาระ เมื่อวัดขนาดของ inhibition zone มากกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ

ผลการคัดกรองอุจจาระด้วยวิธี PODD เป็นบวกหรือพบเชื้อดื้อยาในอุจจาระ เมื่อวัดขนาดของ inhibition zone น้อยกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ ถ้าพบว่าผลการทดสอบพบเชื้อดื้อยาในอุจจาระ นำไปทำการทดสอบ recovery ต่อไป

4. การทดสอบ Lower Limit of detection (LODs) ของวิธี PODD

เจือจางเชื้อดื้อยาทดสอบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *E.coli* (*bla*_{NDM}) และ *CR-A.baumannii* แบบ 10 fold serial dilution ตั้งแต่ 10⁸ CFU/ml ถึง 10⁰ CFU/ml เพื่อดูความสามารถของวิธี PODD ในการคัดกรองเชื้อ แล้วเติมแต่ละ dilution 100 ไมโครลิตร ใส่ใน TSB 3 มล. ที่มี stool ที่ถูกปรับเป็น 0.5 McFarland ใน 0.45% NSS จำนวน 100 ไมโครลิตร ใน TSB 3 มล. จากนั้นจึงทำการบ่มเพาะไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง ทำการ spread plate ลงบน Mueller Hinton แล้วนำไปทดสอบกับยา 4 ตัว กับแผ่นซุบสารต้านจุลชีพ ได้แก่ imipenem (10 g), meropenem (10 g) และ doripenem (10 g) ด้วยวิธี Disk Diffusion นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส, นาน 16-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone

ผลการคัดกรองออกจากระดับวิธี PODD เป็นบวกหรือพบเชื้อดื้อยาในออกจากระดับ เมื่อวัดขนาดของ inhibition zone น้อยกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ

ทำการเชยเชื้อแบบ sweep colony เป็นเส้นตรงจากขอบของ inhibition zone ของ disk แต่ละชนิด จนถึงขอบจานอาหาร นำมาแยกให้เป็นเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บนอาหาร MacConkey agar และทำการพิสูจน์ชนิดของเชื้อ ด้วยเครื่อง VITEK II และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพซ้ำอีกครั้ง

5. วิธีการตรวจคัดกรองเชื้อแกรมลบดื้อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ด้วย chromogenic agar

นำ TSB จากขั้นตอนที่ได้เติม spiked organism เรียบร้อยแล้ว 25 ตัวอย่าง เตรียมให้เป็น 0.5 McFarland มาทดสอบด้วยการ streak ลงบน *Brilliance e CRE* agar plate (Oxoid, England) โดยตรง จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส, นาน 16-18 ชั่วโมง โดยถ้าเป็น *K. pneumoniae* NDM-1 จะให้โคโลนีสีฟ้า, *CR-E. coli* จะให้โคโลนีสีชมพู และ *CR-A. baumannii* จะให้โคโลนีไม่มีสีหรือสีครีม ดังนั้นเมื่อพบเชื้อที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ *Brilliance CRE* agar plate นำไปทำการทดสอบ recovery ต่อไป ให้ทำการเชยเชื้อเดี่ยวๆ ทำการพิสูจน์ชนิดของเชื้อ ด้วยเครื่อง VITEK II และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพซ้ำอีกครั้ง สำหรับเชื้อดื้อยาทดสอบกลุ่ม CRE และ CR-NFB จะเพิ่มการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ทั้ง 5 ตัว ด้วยวิธี multiplex PCR

6. การสกัดแยกสารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template)

เตรียมสารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template) จาก stool spiked TSB ที่มีเชื้อดื้อยา โดยการนำ TSB mixture 1 มล. มาปั่นตกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บตะกอน เพื่อนำไปต้มต่อไป

กรณีที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ให้นำมา 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (Oxoid) 3 มล. นำไปบ่มเพาะไว้ที่ 35-37 องศาเซลเซียส 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการดูอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อโตอยู่ในสารนำมาจำนวน 1 มล. ปั่นหนักที่ความเร็วรอบ

13,000 rpm นาน 5 นาที ทำการเก็บตะกอน เพื่อนำไปต้มต่อไป

การเก็บตะกอน เพื่อนำไปต้ม ทำโดย ดูดส่วนใสทิ้งให้หมด เติม 1X TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex mixture ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที เพื่อให้เซลล์แตกแล้ว DNA หลุดออกมาจากเซลล์ จากนั้นจึงรีบแช่น้ำแข็งทันที ทำการปั่นแยกที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสที่มี crude DNA เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ multiplex PCR

7. การทดสอบ multiplex PCR สำหรับตรวจหายีนดื้อยา *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}*

องค์ประกอบของสารละลายสำหรับการทดสอบ PCR 1 ปฏิกริยา ประกอบไปด้วย PCR primers จำนวน 5 คู่ (Doyle *et al*) [11] ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}* ที่มีความเข้มข้นแต่ละคู่เท่ากับ 10 pmol/μl และเติม Quick Taq (TOYOBO CO., LTD, Japan) ตามลงไปจำนวน 10 ไมโครลิตร DNA template 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) มีขั้นตอน ดังนี้ Initial denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย PCR 30 รอบ แต่ละรอบประกอบไปด้วย denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 68 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที และตั้ง final extension ขั้นตอนสุดท้ายของ PCR ที่ 68

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตรวจวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอ (PCR products) โดยวิธี gel electrophoresis บน 2.0% agarose gel ด้วยการย้อมดูแถบ DNA ที่เกิดขึ้นด้วย ethidium bromide (EtBr) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Electrophoresis Gel Documentation System โดยใช้ 100 bp 4 ไมโครลิตร DNA ladder (RBC Bioscience, Taiwan) เป็น marker (ตารางที่ 2)

เชื้อที่ใช้ควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ในการศึกษานี้ ได้แก่ *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1705[™] ซึ่งให้ผลบวกต่อยีน *bla_{KPC}*, *K. pneumoniae* ATCC[®] BAA-1706[™] ซึ่งให้ผลลบต่อยีน *bla_{KPC}* ผลลบ ส่วนเชื้อที่ใช้ตรวจสอบยีน *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}* แยกได้จาก clinical specimens ที่ผ่านการตรวจยืนยันชนิดของยีนจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

8. การทดสอบ recovery ของวิธี PODD, Chromogenic agar และ multiplex PCR

สำหรับวิธี PODD ที่ให้ผลการทดสอบพบเชื้อดื้อยา ให้ทำการเขี่ยเชื้อแบบ sweep colony เป็นเส้นตรงจากขอบของ inhibition zone ของ disk แต่ละชนิด จนถึงขอบจานอาหาร นำมาแยกให้เป็นเชื้อให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร MacConkey agar นำไปทำการแยกพิสูจน์เชื้อและอื่นๆต่อไป

ส่วนวิธี chromogenic agar เมื่อพบเชื้อเจริญบนอาหาร Brilliance CRE agar ให้ทำการเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ นำไปทำการแยกพิสูจน์เชื้อและอื่นๆต่อไป

ทำการแยกพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยเครื่อง VITEK II และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพซ้ำอีกครั้ง สำหรับเชื้อดื้อยาทดสอบ

กลุ่ม CRE และ CR-NFB จะเพิ่มการตรวจหา ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ทั้ง 5 ตัว ด้วยวิธี multiplex PCR สำหรับตรวจหาเชื้อดื้อยา *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}*

ส่วนวิธี multiplex PCR เตรียมสาร พันธุกรรมต้นแบบ (DNA template) จาก stool spiked TSB ที่มีเชื้อดื้อยา นำไปทดสอบ multiplex PCR สำหรับตรวจหา ยีนที่ควบคุม การสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมส ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}*

9. การวิเคราะห์ผล

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ วิธีการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ทั้ง 3 วิธี ได้แก่ PODD Chromogenic agar และ multiplex PCR สำหรับตรวจหา carbapenemase genes จะถูกนำมาคำนวณหา % sensitivity, % specificity, % PPV และ % NPV สำหรับการทดสอบ recovery จะถูกคำนวณเป็น อัตราร้อยละ

ผลการวิจัย

ผลการคัดกรองอุจจาระที่ไม่มีเชื้อดื้อยากลุ่มคาร์บาพีแนมด้วยวิธี Pooled-organisms disk diffusion method (PODD)

ผลการคัดกรองอุจจาระด้วยวิธี PODD เป็นลบหรือไม่พบเชื้อดื้อยาในอุจจาระทั้ง 25 ตัวอย่าง เมื่อวัดขนาดของ inhibition zone ของสารต้านจุลชีพ imipenem (10 g), meropenem (10 g) และ doripenem (10 g) มากกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ โดยกำหนดจากเกณฑ์มาตรฐาน การแปลผลการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method

ตาม Clinical and Laboratory Standards (CLSI) (ตารางที่ 1) อุจจาระที่ผ่านการคัดกรอง เหล่านี้ จะถูกนำไปทำการทดสอบ การคัดกรอง เชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระ ด้วยวิธี PODD

ผลการคัดกรองเชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระ ด้วยวิธี PODD

ผลการคัดกรองเชื้อดื้อยาในอุจจาระ ด้วยวิธี PODD พบว่า ขนาดของ inhibition zone ของ imipenem (10 g), meropenem (10 g) และ doripenem (10 g) ต่อเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ได้ผลไปในทางเดียวกัน คือวัดได้ มากกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ แสดงว่า ผลการคัดกรองอุจจาระด้วยวิธี PODD เป็นลบ หรือไม่พบเชื้อดื้อยาในอุจจาระ

ผลการคัดกรองเชื้อดื้อยาในอุจจาระ ด้วยวิธี PODD พบว่า ขนาดของ inhibition zone ของ imipenem (10 g), meropenem (10 g) และ doripenem (10 g) ต่อเชื้อ ดื้อยากลุ่มที่ 1 (CRE) จำนวน 15 สายพันธุ์และ กลุ่มที่ 2 (CR-NFB) จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้ผล ไปในทางเดียวกันคือวัดได้ น้อยกว่า 22 มม., 22 มม. และ 22 มม. ตามลำดับ แสดงว่า ผลการคัดกรองอุจจาระด้วยวิธี PODD เป็นบวก หรือพบเชื้อดื้อยาในอุจจาระ เชื้อดื้อยาที่พบจะ ถูกนำมาแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว เพื่อทดสอบ recovery ต่อไป

ผลการทดสอบ Lower Limit of detection (LODs) ของวิธี PODD

การตรวจวิเคราะห์หา LODs ของเชื้อ ดื้อยาทดสอบ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* (*bla_{NDM}*) และ *CR-A. baumannii* (*bla_{NDM}*) พบว่า วิธี PODD เป็นบวกหรือพบเชื้อดื้อยาใน

อุจจาระ ตั้งแต่ 10^8 CFU/ml ถึง 10^0 CFU/ml เมื่อนำแต่ละ dilution มาทำการแยกให้เป็นเชื้อให้เป็นโคลนเดี่ยว และพิสูจน์ชนิดของเชื้อ ด้วยเครื่อง VITEK II และทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพกลุ่มคาร์บาเพนิมซ้ำอีกครั้งพบว่า ทุก dilution สามารถแยกชนิด เชื้อ *E. coli* และ *A. baumannii* โดยทั้ง 2 สายพันธุ์คือตัวยากลุ่ม คาร์บาเพนิม ได้แก่ imipenem, meropenem และ doripenem

ประสิทธิภาพการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ตัวยากลุ่มคาร์บาเพนิม ด้วยวิธี PODD กับ Chromogenic agar และ Multiplex PCR สำหรับตรวจหา carbapenemase genes

ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าวิธี PODD มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ตัวยากลุ่มคาร์บาเพนิมได้เป็นอย่างดี มีความไว (Sensitivity) เท่ากับ 100%, ความจำเพาะ (Specificity) เท่ากับ 100%, Positive Predictive Value (PPV) เท่ากับ 100% และ Negative Predictive Value (NPV) เท่ากับ 100% และมีผลเป็นที่น่าพอใจเมื่อเทียบกับการตรวจด้วย multiplex PCR และ multiplex PCR สำหรับตรวจหา carbapenemase genes ซึ่งมีความไว (sensitivity) เท่ากับ 100%, ความจำเพาะ (specificity) เท่ากับ 100%, Positive Predictive Value (PPV) เท่ากับ 100% และ Negative Predictive Value (NPV) เท่ากับ 100% ขณะที่การใช้ chromogenic agar มีความไวเท่ากับ 95.65 %, ความจำเพาะเท่ากับ 100%, Positive Predictive Value (PPV) เท่ากับ 100% และ Negative Predictive Value (NPV) เท่ากับ 95.83 %

ผลการทดสอบ recovery ของวิธี PODD, chromogenic agar และ multiplex PCR

การทดสอบ recovery หลังจากเติมเชื้อแกรมลบตัวยากลุ่มคาร์บาเพนิมลงไป ในอุจจาระจำนวน 23 ตัวอย่าง เมื่อบ่มเพาะแล้ว มาทำการทดสอบด้วยวิธี PODD, chromogenic agar และ multiplex PCR พบว่า ทั้งวิธี PODD และ multiplex PCR ให้ recovery เท่ากับ 100% ขณะที่ วิธี chromogenic agar สามารถ recovery เชื้อกลุ่ม CR-NFB ได้ 100% แต่สามารถ เชื้อ CRE ที่สร้างเอนไซม์ NDM ได้ 11 สายพันธุ์ (91.67%) จากทั้งหมด 12 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4)

ผลการทดสอบด้วยวิธี PODD เมื่อทำการแยกพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยเครื่อง VITEK II พบเชื้อ 23 สายพันธุ์ที่ spiked ลงไป สามารถแยกพิสูจน์กลับมา ดังแสดงในตารางที่ 5 และเมื่อทดสอบความไวของเชื้อตัวยากลุ่มคาร์บาเพนิม ได้แก่ imipenem meropenem และ doripenem พบว่าคือตัวยากลุ่มนี้ และเมื่อทำการตรวจ multiplex PCR สำหรับตรวจหา carbapenemase gene ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}* พบว่าสามารถตรวจหาขึ้นได้อย่างถูกต้องทุกสายพันธุ์ ซึ่งวิธี multiplex PCR สามารถตรวจขึ้นได้อย่างถูกต้องทั้งหมด 23 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับวิธี PODD ขณะที่ วิธี chromogenic agar พบว่า เชื้อ *E. coli* (*bla_{NDM}* positive) ไม่เจริญบนอาหาร Brilliance CRE agar จึงไม่สามารถนำมาทำการตรวจหาขึ้นตัวยาคือได้

ตารางที่ 1 เกณฑ์การแปลผลความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพด้วยวิธี disk diffusion method ตาม CLSI 2017, M100-S27 และ CLSI 2015, M45, 3rd edition

Organism	disc agent (10 µg)	Zone (mm.)		
		S	I	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	ETP	≥22	19-21	≤18
	IMP	≥23	20-22	≤19
	MEM	≥23	20-22	≤19
	DOR	≥23	20-22	≤19
<i>Aeromonas</i> spp.	ETP	≥22	19-21	≤18
	IMP	≥23	20-22	≤19
	MEM	≥23	20-22	≤19
	DOR	≥23	20-22	≤19
<i>Vibrio</i> spp.	IMP	≥23	20-22	≤19
	MEM	≥23	20-22	≤19
<i>P.aeruginosa</i>	IMP	≥19	16-18	≤15
	MEM	≥19	16-18	≤15
	DOR	≥19	16-18	≤15
<i>Acinetobacter</i> spp.	IMP	≥22	19-21	≤18
	MEM	≥18	15-17	≤14
	DOR	≥18	15-17	≤14

ตารางที่ 2 รายละเอียดของ primers ที่ใช้ในการตรวจ multiplex PCR สำหรับตรวจหา carbapenemase genes สำหรับแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาเพนิม

Carbapenemases gene	Primer sequences	Amplicon size (bp)
<i>bla_{KPC}</i>	5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC-3'	900
	5'-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC-3'	
<i>bla_{NDM}</i>	5'-GCA GCT TGT CGG CCA TGC GGG C -3'	782
	5'-GGT CGC GAA GCT GAG CAC CGC AT -3'	
<i>bla_{IMP}</i>	5'-GAA GGC GTT TAT GTT CAT AC -3'	587
	5'-GTA CGT TTC AAG AGT GAT GC -3'	
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	5'-GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC -3'	438
	5'-CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG -3'	
<i>bla_{VIM}</i>	5'-GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC -3'	389
	5'-AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG -3'	

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม (CR-GNB) ด้วยวิธี PODD กับ chromogenic agar และ multiplex PCR สำหรับตรวจหาคาร์บาพีนีเมสียีน

Method	CR-GNB ^a with positive gene (23 strains)						% Sensitivity	% Specificity	% PPV	% NPV
	KPC	NDM	IMP	OXA	VIM	Neg. ^b				
	(0)	(13)	(5)	(1)	(4)	(0)				
PODD	0	13	5	1	4	0	100 (23/23)	100 (23/23)	100 (23/23)	100 (23/23)
Chromogenic agar	0	12	5	1	4	1	95.65 (22/23)	100 (23/23)	100 (23/23)	95.83 (23/24)
Multiplex PCR for carbapenemase genes	0	13	5	1	4	0	100 (23/23)	100 (23/23)	100 (23/23)	100 (23/23)

^a CR-GNB เชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม

^b Neg Negative

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ recovery ของวิธี PODD, chromogenic agar และ multiplex PCR สำหรับการตรวจหาคาร์บาพีนีเมสียีน

Organism (23 strains)	% recovery positive isolate in method.		
	PODD	Chromogenic agar	Multiplex PCR
CRE (15)			
KPC (0)	-	-	-
NDM (12)	100 (12/12)	91.67 (11/12)	100 (12/12)
IMP (2)	100 (2/2)	100 (2/2)	100 (2/2)
OXA (1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)
VIM (0)	-	-	-
CR-NFB (8)			
KPC (0)	-	-	-
NDM (1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)
IMP (3)	100 (3/3)	100 (3/3)	100 (3/3)
OXA (0)	-	-	-
VIM (4)	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)

CRE : Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CR-NFB : Carbapenem resistant nonfermentative Bacilli

อภิปรายผล

ปัจจุบันมีหลายการทดสอบที่สามารถตรวจสอบ carbapenemase-producing ได้ในแบคทีเรียแกรมลบ ไม่ว่าจะตรวจหาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพในกลุ่ม เช่น modified Hodge test (MHT) หรือการถูกยับยั้งด้วยสารบางอย่าง (inhibitor-based methods using metal chelators for MBLs) ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญในการใช้แยกชนิดหรือกลุ่มของเอนไซม์ได้ เช่น MBL E-test, boronic acid for KPCs [12] รวมถึง Carba-NP [13] แต่ในงานประจำวันยังไม่สามารถใช้วิธีการเหล่านี้ในการคัดกรองเชื้อ CRE และ CR-NFB ท่ามกลางเชื้อแบคทีเรียหลายๆสายพันธุ์พร้อมกันได้ อย่างไรก็ตาม ผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องแยกเป็นเชื้อเดี่ยวและปฏิบัติตาม CLSI guideline อย่างเคร่งครัดก่อนรายงานผลไปยังแพทย์และบุคลากรที่เกี่ยวข้องเช่นเดิม

ในงานวิจัยนี้ Inhibition zone criteria ที่นำมาเป็นเกณฑ์ตัดเข้า (Cut-off positive sample) ใช้ criteria zone size ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่ม *Enterobacteriaceae* ซึ่งมี Inhibition zone กว้างที่สุด เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มที่เหลือ ดังนั้นการที่ positive sample ใดพบเชื้อในกลุ่ม Non-fermentative Gram negative bacilli ที่ยังให้ผลไว (Susceptible) ต่อการทดสอบ ก็อาจทำให้เกิดผลบวกปลอมในขั้นตอนของการคัดกรองด้วยวิธี PODD ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดของวิธีนี้ ดังนั้น การแยกพิสูจน์ชนิดของเชื้อและทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาในกลุ่มคาร์บาพีเนมอีกครั้ง จากตัวอย่างอุจจาระที่ให้ผล PODD บวก จึงมีความจำเป็นเพื่อการตรวจยืนยันเชื้อดื้อยา และเพื่อ

ประโยชน์ทางด้านระบาดวิทยา และรายงานผลชนิดของเชื้อดื้อยาให้แพทย์ทราบ

จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อในสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนิเมส ด้วยวิธี multiplex PCR เพื่อตรวจหาชนิด 5 ชนิด ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}* พบว่าให้ sensitivity และ specificity ไม่แตกต่างกับวิธี PODD งานวิจัยนี้ สามารถตรวจหาชนิด carbapenemases ทั้ง 5 ชนิดจากอุจจาระโดยตรงด้วยวิธี multiplex PCR ผลได้เร็วขึ้น ลดระยะลงได้ 2-3 วัน และไม่มี การรบกวนจากแบคทีเรียประจำถิ่นในอุจจาระที่มีจำนวนมากและสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาผู้ป่วยที่เป็นพาหะเชื้อดื้อยาแฝงในอุจจาระได้เช่นเดียวกัน

สำหรับผลที่ไม่สอดคล้องของเชื้อที่ทดสอบบน chromogenic agar เมื่อเทียบกับการทดสอบอื่นๆ อาจมีปัจจัยกระทบจากสาเหตุต่างๆได้ เช่น ความเสถียรของสารต้านจุลชีพที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านแปรไปตามระยะเวลาการเตรียม, การเก็บรักษาก่อนการใช้งาน, ปริมาณของเชื้อที่ต้องปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland ก่อนเพาะเลี้ยงลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และกรณีมีเชื้อที่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลชีพได้ ทำให้เชื้อที่ไวต่อยากลับมาคาร์บาพีเนมก็สามารถเจริญได้แม้ได้รับการทดสอบยืนยันภายหลังว่าไวต่อยานี้ภายหลัง

อย่างไรก็ตาม วิธี PODD สามารถใช้เป็นวิธีคัดกรองเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนม ซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่ถูกกว่าการใช้วิธี multiplex PCR หรือ chromogenic agar นอกจากนี้ยังสะดวกต่อการปฏิบัติงานเหมาะกับการใช้เพื่อทดสอบในโรงพยาบาลของ

รัฐทั่วไป ที่ไม่มีเครื่องมือราคาแพง หรือมีงบประมาณที่จำกัดในการตรวจหาเชื้อเหล่านี้

การวิจัยในคนมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
หนังสือรับรองเลขที่ 094/2556

สรุปผล

วิธี PODD มีความสามารถในการคัดกรองเชื้อไม่แตกต่างจากวิธีคัดกรองอื่นๆ สามารถตรวจเชื้อดื้อยาในกลุ่มคาร์บาเพนีมได้ง่าย ราคาถูก มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะสูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำวัน ครอบคลุมการคัดกรองเชื้อที่ดื้อยาด้วยกลไกของการสร้างเอนไซม์ carbapenemases ได้แก่ *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}* และ *bla_{VIM}* genes ที่เป็นปัญหาในโรงพยาบาลในการติดเชื้อในโรงพยาบาล (Nosocomial Infection) ไม่ว่าจะเป็นการเฝ้าระวังการติดเชื้อนอกลำไส้ของผู้ป่วยที่พบเป็นพาหะเชื้อดื้อแฝงในอุจจาระรวมไปจนถึงการป้องกันการแพร่กระจายไปยังผู้ป่วยรายอื่น

ข้อเสนอแนะ

วิธี PODD ที่ได้พัฒนาจากงานวิจัยนี้สามารถใช้ในการตรวจคัดกรองเชื้อดื้อยาในอุจจาระผู้ป่วยในโรงพยาบาลทั่วไปได้ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง โดยวิธีนี้ให้ผลถูกต้องและมีความจำเพาะสูงไม่แตกต่างไปจากวิธีการตรวจทางชีวโมเลกุล อย่างไรก็ตาม หากผู้ที่สนใจศึกษาชนิดของยีนดื้อยา สามารถใช้วิธีที่ทางชีวโมเลกุลที่ได้นำเสนอไว้ในงานวิจัยนี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก กองทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ งานวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรม

เอกสารอ้างอิง

1. Schechner, V., Straus-Robinson, K., Schwartz, D., Pfeffer, I., Tarabeia, J., Moskovich, R., Chmelnitsky, I., Schwaber, M.J., Carmeli, Y. and Navon-Venezia, S. Evaluation of PCR-Based Testing for Surveillance of KPC-Producing Carbapenem-Resistant Members of the *Enterobacteriaceae* Family. *J Clin. Microbiol* 2009; 47:3261-3265.
2. Queenan, A. and Bush, M. K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases *Clin. Microbiol Rev* 2007; 20:440-458.
3. Miriagou, V., Cornaglia, G., Edelstein, M., Galani, I., Giske, C. and Gniadkowski, M. Acquired Carbapenemases in Gram-Negative Bacterial Pathogens: Detection and Surveillance Issues. *J Clin Microbiol Infect* 2010; 16(2):112-122.
4. Gijón, D., Curiao, T., Baquero, F., Coque, T. M. and Cantón, R. Faecal Carriage of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*: A Hidden Reservoir in Hospitalized and Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50(5):1558-1563.

5. Adler, A., Navon-Venezia, S., Moran-Gilad, J., Marcos, E., Schwartz, D. and Carmeli, Y. Laboratory and Clinical Evaluation of Screening Agar Plates for Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* from Surveillance Rectal Swabs. *J Clin Microbiol* 2011; 49(6):2239-2242.
6. Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H. and Malhotra-Kumar, S. Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* . *J Clin Microbiol* 2012; 50(4):1140-1146.
7. Lee, T. D., Adie, K., McNabb, A., Purych, D., Mannan, K., Azana, R., Ng, C., Tang, P. and Hoang, L. M. N. Rapid Detection of KPC, NDM, and OXA-48-Like Carbapenemases by Real-Time PCR from Rectal Swab Surveillance Samples. *J Clin Microbiol* 2015; 53(8):2731-2733.
8. Blackburn, J., Tsimiklis, C., Lavergne, V., Pilotte, J., Grenier, S., Gilbert, A., Lefebvre, B., Domingo, M. C., Tremblay, C. and Bourgault, A. M. Carbapenem Disks on MacConkey agar in Screening Methods for the Detection of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Rods in Stools. *J Clin Microbiol* 2013; 51(1):331-333.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard; 27th Information Supplement. CLSI document M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2017.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved guideline – third edition. CLSI document M45-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2015.
11. Doyle, D., Peirano, G., Lascols, C., Lloyd, T., Church, D. L. and Pitout, J. D. Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* that Produce Carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12):3877-3880.
12. Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N. and Miriagou, V. Identification and Screening of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5):432-438.
13. Vasoo, S., Cunningham, S. A., Kohner, P. C., Simner, P. J., Mandrekar, J. N., Lolans, K., Hayden, M. K. and Patel, R.

Comparison of a Novel, Rapid
Chromogenic Biochemical Assay,
the Carba NP Test, with the
Modified Hodge Test for Detection
of Carbapenemase-Producing
Gram-Negative Bacilli. J Clin
Microbiol 2013; 51(9):3097-3101.