ความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ Carbapenemase-producing *Enterobacterales* ในโรงพยาบาลสมุทรปราการ

มานพ สุทธิประภา (ทพ.ม.)[1] วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ (วท.ม.)[2] และพัชรี กัมมารเจษฎากุล (ปร.ด.)[2]

[1]กลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก โรงพยาบาลสมุทรปราการ สมุทรปราการ ประเทศไทย
[2]คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ สมุทรปราการ ประเทศไทย

บทคัดย่อ

บริบท ปัจจุบันเชื้อ Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) ถือเป็นภัยคุกคามเร่งด่วนที่แพร่กระจายไปทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยด้วย โดยมีกลไกการดื้อยาที่พบมากที่สุดคือการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสหลากหลายชนิด

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยในโรงพยาบาลสมุทรปราการ

วิธีการศึกษา เก็บเชื้อ *Enterobacterales* จากสิ่งส่งตรวจในช่วงเดือน สิงหาคม - ตุลาคม 2562 พิสูจน์เชื้อและทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติว่าเป็น CRE จำนวน 67 สายพันธุ์ จากนั้นตรวจหา CPE ด้วยวิธี modified carbapenem inactivation method, EDTA carbapenem inactivation method และตรวจหาความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสด้วยวิธี multiplex PCR

ผลการศึกษา เชื้อ CRE 67 สายพันธุ์ จำแนกเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* และ *Enterobacter cloacae* ร้อยละ 85.07, 8.96 และ 5.97 ตามลำดับ พบว่าเป็น CPE ร้อยละ 89.55 เชื้อมียีนดื้อยา 3 ชนิด ได้แก่ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$, bla_{NDM} และ bla_{KPC} ร้อยละ 70.00, 56.67 และ 3.33 ตามลำดับ โดยพบเชื้อมียีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ร้อยละ 30.00 ในการศึกษานี้พบว่าความไวต่อยาต้านจุลชีพมีความสัมพันธ์กับชนิดของยีน เชื้อที่มียีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ไวต่อยา imipenem, meropenem, doripenem, amikacin และ tigecycline เชื้อที่มียีน bla_{NDM} ไวต่อยา amikacin และ tigecycline เชื้อที่มียีน bla_{KPC} ไวต่อยา tigecycline ส่วนเชื้อที่มียีน $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ไวต่อยา gentamicin, amikacin และ tigecycline เชื้อ CPE และ non-CPE ทั้งหมดยังไวต่อยา colistin

สรุป ความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสและผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นทางด้านระบาดวิทยาเพื่อใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลสมุทรปราการ

คำสำคัญ Carbapenemase-producing *Enterobacterales* ยีนคาร์บาพีนีเมส โรงพยาบาลสมุทรปราการ

ผู้นิพนธ์ที่รับผิดชอบ วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์
คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
สมุทรปราการ ประเทศไทย
E-mail: watcharin.rang@gmail.com

Carbapenemase gene diversity in Carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Samutprakan Hospital

Manop Suttiprapha (M.MT.)[1], Watcharin Rangsipanuratn (M.Sc.)[2] and
Patcharee Kammarnjassadakul (Ph.D.)[2]

[1]Department of Medical Technology and Clinical Pathology, Samutprakan Hospital, Samut Prakan, Thailand
[2]Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan, Thailand

Abstract

Context: Currently, Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE), are an urgent, worldwide threat and have spread to every country including Thailand.The major of CRE's drug resistant mechanism is due to the production of various carbapenemase enzymes.

Objective: To study the diversity of carbapenemase genes in Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE), as isolated from clinical specimens taken at Samut Prakan Hospital.

Material and methods: A total of 67 CRE strains were collected from clinical specimens between August and October, 2019, and identified through machine automation. CPE underwent a modified carbapenem inactivation method and an EDTA carbapenem inactivation method. Carbapenemase gene diversity was determined by multiplex PCR.

Results: Of the 67 CRE strains, *Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli*, and *Enterobacter cloacae* were 85.07%, 8.96%, and 5.97%, respectively. The percentage of CPE was 89.55%. Three carbapenemase genes were $bla_{\text{OXA-48-like,}}$ $bla_{\text{NDM,}}$ and bla_{KPC} at 70.00%, 56.67%, and 3.33%, respectively. In addition, the combination of $bla_{\text{OXA-48-like}}$ and bla_{NDM} was found at 30.00%. In this study, the antimicrobial susceptibility of CPE was found to be correlated with gene types. CPE carrying the $bla_{\text{OXA-48-like}}$ gene were susceptible to imipenem, meropenem, doripenem, amikacin and tigecycline. CPE carrying the bla_{NDM} gene were susceptible to amikacin, and tigecycline. CPE carrying the bla_{KPC} gene were susceptible to tigecycline alone. The CPE carrying $bla_{\text{OXA-48-like}}$ and bla_{NDM} genes were susceptible to gentamicin, amikacin, and tigecycline. All CPE and non-CPE were also susceptible to colistin.

Conclusions: Carbapenemase gene diversity and antimicrobial susceptibility results are used as epidemiological data for infection control and monitoring the spread of drug-resistant bacteria in Samutprakan Hospital.

Keywords: Carbapenemase-producing *Enterobacterales*, Carbapenemase gene, Samutprakan Hospital

Corresponding author: Watcharin Rangsipanuratn
Faculty of Medical Technology, Huachiew Chalermprakiet University,
Samut Prakan, Thailand
E-mail: watcharin.rang@gmail.com

Received: March 10, 2023 Revised: August 22, 2023 Accepted: August 31, 2023

การอ้างอิง

มานพ สุทธิประภา วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และ พัชรี กัมมารเจษฎากุล. ความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ Carbapenemase-producing *Enterobacterales* ในโรงพยาบาลสมุทรปราการ. บูรพาเวชสาร. 2566; 10(2): 13-25.

Citation

Suttiprapha M, Rangsipanuratn W and Kammarnjassadakul P. Carbapenemase gene diversity in Carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Samutprakan Hospital. Bu J Med. 2023; 10(2): 13-25.

บทนำ

การติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพกำลังเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก เพราะอัตราการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียหลายชนิดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ขณะที่ยาต้านจุลชีพขนานใหม่กลับมีน้อยลง การติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพมีผลกระทบทั้งด้านสุขภาพและเศรษฐกิจ การติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจประมาณร้อยละ 0.4 ถึง 1.6 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมของประเทศ (Gross Domestic Product, GDP) สำหรับประเทศไทยพบว่า การติดเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญ โดยพบคนไทยติดเชื้อแบคทีเรียดื้อยาปีละมากกว่า 100,000 ราย เสียชีวิตอย่างน้อย 30,000 ราย ใช้เวลารักษาตัวอยู่ในโรงพยาบาลรวมกันนานขึ้นอย่างน้อย 3 ล้านวัน และมูลค่ายาต้านจุลชีพที่ใช้รักษาการติดเชื้อดื้อยาอย่างน้อย 6,000 ล้านบาท ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทรัพยากรจากการติดเชื้อดื้อยามากกว่า 40,000 ล้านบาท หรือประมาณร้อยละ 0.6 ของผลิตภัณฑ์มวลรวมของประเทศไทย[1]

Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* (CRE) เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งในอันดับ (order) *Enterobacterales* ที่พบประจำถิ่นในลำไส้และดื้อยากลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาต้านจุลชีพขั้นสุดท้ายที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบดื้อยา เชื้อนี้สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาที่อยู่บนพลาสมิดข้ามสายพันธุ์ได้ ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยามากขึ้น และเป็นสาเหตุสำคัญของโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล จากรายงานการจัดระดับแบคทีเรียดื้อยาขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) พบว่ามีแบคทีเรียดื้อยารุนแรงที่ต้องการยาต้านจุลชีพชนิดใหม่อย่างเร่งด่วนหรือ Superbugs 3 ระดับ โดย CRE จัดอยู่ในกลุ่มรุนแรงระดับวิกฤต (critical)[2] กลไกการดื้อยากลุ่ม carbapenems ที่สำคัญได้แก่ การสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (carbapenemase) มาทำลายโครงสร้างของยา เรียกเชื้อที่สร้างเอนไซม์นี้ว่า Carbapenemase-producing *Enterobacterales* (CPE) โดยกลไกนี้จะถูกควบคุมโดยยีน *bla* ที่มีหลายชนิดบนพลาสมิด เช่น bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP} และ $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ เป็นต้น และกลไกอื่น ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ extended spectrum beta-lactamase (ESBL) หรือ AmpC ร่วมกับการกลายพันธุ์ของโปรตีนพอริน (porin mutation) ทำให้ยาผ่านเข้าไปในเซลล์ไม่ได้ เรียกเชื้อกลุ่มนี้ว่า non-CPE วิธีการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส ประกอบด้วย วิธีทางฟีโนไทป์ ได้แก่ modified carbapenem inactivation method (mCIM) และ EDTA-carbapenem inactivation method (eCIM) และตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมสด้วยวิธีทางจีโนไทป์ ได้แก่ multiplex PCR

เอนไซม์คาร์บาพีนีเมสแบ่งตามโครงสร้างโมเลกุลหรือ Ambler classification เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ serine-carbapenemase (ได้แก่ class A, และ class D) และ metallo-beta-lactamase (ได้แก่ class B) ตัวอย่างเอนไซม์ใน class A ได้แก่ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), class B ได้แก่ New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), imipenemase (IMP), Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase (VIM) และ class D ได้แก่ oxacillinase-48-like (OXA-48-like) เป็นต้น จากรายงานของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในปี พ.ศ. 2561 พบว่า CRE ในประเทศไทยเป็น CPE ถึงร้อยละ 95.6 โดยใช้วิธี multiplex PCR และพบยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ NDM และ OXA-48-like เท่านั้น เชื้อส่วนใหญ่เป็น *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* และพบว่า CRE ในประเทศไทยจัดเป็น emerging superbug ที่สร้างเอนไซม์ NDM สูงสุด ซึ่งไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยการใช้ยาหลายชนิดร่วมกัน (combination drug)[3] โดย NDM-1 นั้น

พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2551 ปัจจุบันมีรายงานการพบ NDM หลายชนิดในหลายประเทศทั่วโลก[4] เชื้อที่สร้างเอนไซม์นี้จะดื้อต่อยากลุ่ม beta-lactams ในระดับสูงรวมถึงยากลุ่ม carbapenems และมักจะดื้อต่อยากลุ่มอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น fluoroquinolones และ aminoglycosides

โรงพยาบาลสมุทรปราการเป็นโรงพยาบาลประจำจังหวัดสมุทรปราการที่มีจำนวนเตียงผู้ป่วย 385 เตียง และพบเชื้อ CRE จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยเช่นกัน รายงานสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อ CRE จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก โดยการเก็บข้อมูลสถิติย้อนหลังเป็นเวลา 5 ปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2557-2561 มีสิ่งส่งตรวจทั้งหมด 150,281 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ CRE 1,618 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 1.07 ของตัวอย่างทั้งหมด โดยพบการกระจายตัวของเชื้อ CRE ในเสมหะมากที่สุด ร้อยละ 47.49 รองลงมาคือ ปัสสาวะ หนอง เลือด และอื่นๆ (สารน้ำในร่างกายและชิ้นเนื้อ) ร้อยละ 40.78, 7.82, 2.79 และ 1.12 ตามลำดับ และพบว่าเป็นเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* สูงสุดร้อยละ 73.05 รองลงมาคือเชื้อ *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii* และ *Proteus mirabilis* ร้อยละ 20.58, 4.08, 1.85 และ 0.43 ตามลำดับ แต่ยังไม่มีรายงานสาเหตุหรือกลไกที่ทำให้เกิดการดื้อยา ปัจจุบันมีรายงานความชุกของ CRE และความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสใน CPE จากหลายโรงพยาบาลในประเทศไทย[5-11] แต่ยังไม่มีข้อมูลจากโรงพยาบาลสมุทรปราการ ดังนั้นถ้ามีข้อมูลนี้ร่วมกับการทดสอบความไวกับยาต้านจุลชีพจะเป็นข้อมูลที่สำคัญทางด้านระบาดวิทยา เพื่อใช้ในการควบคุมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลสมุทรปราการต่อไป

วัตถุประสงค์

ศึกษาความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ CPE ด้วยวิธี multiplex PCR ในโรงพยาบาลสมุทรปราการ

วิธีการศึกษา

รูปแบบการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงพรรณนาแบบภาคตัดขวาง (cross-sectional descriptive study)

ตัวอย่างเชื้อ CRE

เก็บตัวอย่างเชื้อ *Enterobacterales* จากสิ่งส่งตรวจ 9,843 ตัวอย่าง (เสมหะ ปัสสาวะ หนอง เลือด สารน้ำในร่างกาย และชิ้นเนื้อ) ในโรงพยาบาลสมุทรปราการ ระหว่างเดือนสิงหาคม - ตุลาคม 2562 โดยทำการจำแนกชนิดเชื้อ และทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพกลุ่ม carbapenems ได้แก่ ertapenem, imipenem, meropenem และ doripenem และยากลุ่มอื่น ได้แก่ amoxicillin/clavulanate, amikacin, cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, colistin, ciprofloxacin, gentamicin, levofloxacin, piperacillin/tazobactam, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tigecycline โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ MicroScan WalkAway96 plus (Beckman Coulter, USA) ทั้งหมด 1,240 สายพันธุ์ โดยมีเกณฑ์คัดเข้าคือ เลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียในอันดับ *Enterobacterales* ที่ดื้อยากลุ่ม carbapenems อย่างน้อย 1 ชนิดและแยกจากผู้ป่วยแบบไม่ซ้ำราย สำหรับเกณฑ์คัดออก คือ เชื้อแบคทีเรียในอันดับ *Enterobacterales* และกลุ่มอื่นที่ไวต่อยากลุ่ม carbapenems จากเกณฑ์ที่คัดเข้าได้เชื้อ CRE จำนวน 67 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Klebsiella pneumoniae* 57 สายพันธุ์ *Escherichia coli* 6 สายพันธุ์ และ *Enterobacter cloacae* 4 สายพันธุ์ จากปัสสาวะ 32 ตัวอย่าง เสมหะ 29 ตัวอย่าง หนอง 4 ตัวอย่าง และเลือด 2 ตัวอย่าง และ

เก็บเชื้อใน 10% glycerol tryptic soy broth ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสด้วยวิธี modified carbapenem inactivation method (mCIM) และ EDTA-carbapenem inactivation method (eCIM) และตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมส ด้วยวิธี multiplex PCR

การตรวจหาเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสด้วยวิธีทางฟีโนไทป์ : Modified carbapenem inactivation method (mCIM) และ EDTA-carbapenem inactivation method (eCIM)

ตรวจหาเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสด้วยวิธี mCIM โดยเพาะเชื้อ CRE บน blood agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปมาตรฐานขนาด 1 ไมโครลิตร เขี่ยเชื้อมาละลายใน tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นใช้ปากคีบปราศจากเชื้อคีบแผ่นยา meropenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม (Oxoid, UK) ใส่ในหลอด โดยกดให้จมในอาหารทั้งแผ่นยา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศปกติเป็นเวลา 4 ชั่วโมง±15 นาที จากนั้นใช้ลูปมาตรฐานขนาด 10 ไมโครลิตรเขี่ยแผ่นยา meropenem ขึ้นมาจาก TSB และพักวางที่ผนังด้านในของหลอดเพื่อกำจัดอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เกินออกไป จากนั้นใช้ปากคีบคีบแผ่นยามาวางบนผิวหน้าอาหาร Mueller Hinton Agar ที่เพาะเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 ที่ปรับความขุ่นเทียบกับ McFarland standard No. 0.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศปกติเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เชื้อแบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 6-15 มิลลิเมตร หรือ 16-18 มิลลิเมตรที่มีโคโลนีขนาดเล็ก (pinpoint colonies) ภายในวงใส แสดงว่า เชื้อสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (carbapenemase detected) และถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส ≥ 19 มิลลิเมตร แสดงว่า เชื้อไม่มีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (carbapenemase not detected) แต่ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 16-18 มิลลิเมตร หรือมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 19 มิลลิเมตร แต่มีโคโลนีขนาดเล็กภายในวงใส ไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส (indeterminate)

นำเชื้อที่สร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสมาทำการจำแนกชนิดเอนไซม์ต่อด้วยวิธี eCIM โดยทำเช่นเดียวกับวิธี mCIM แต่เติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงในหลอด TSB อ่านผลโดยนำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของ meropenem จากหลอดที่มี EDTA มาลบกับหลอดที่ไม่มี EDTA ถ้าผลต่างมากกว่าหรือเท่ากับ 5 มิลลิเมตร เป็น metallo-beta-lactamase ถ้าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 มิลลิเมตรเป็น serine carbapenemase

การทดสอบใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 และ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพผลบวกและผลลบตามลำดับ[12]

การตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมส ด้วยวิธีทางจีโนไทป์ : multiplex PCR

เพาะเชื้อ CRE บน blood agar เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปเขี่ยเชื้อ CRE 3-5 โคโลนีใส่ในน้ำกลั่น ปรับความขุ่นให้เทียบเท่ากับ McFarland standard No. 0.5 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาทำการตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมส 6 ชนิดได้แก่ bla_{NDM}, bla_{KPC}, $bla_{OXA-48-like}$, $bla_{OXA-23-like}$, bla_{VIM}, bla_{IMP} ด้วยวิธี multiplex polymerase chain reaction (mPCR) และใช้ชุดไพรเมอร์ (ตารางที่ 1) โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dNTP ที่ความเข้มข้น 2 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, ไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 2 mM, DNA Taq polymerase ที่ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร และดีเอ็นเอแม่

แบบปริมาตร 2 ไมโครลิตร สำหรับสภาวะพีซีอาร์ที่ใช้ประกอบด้วย initial denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที annealing ที่ 61 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 33 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที จากนั้นนำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 2 (w/v) และมีขนาดผลิตผลพีซีอาร์ ตามตารางที่ 1[13] การทดสอบใช้เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 และ *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 เป็นเชื้อควบคุมคุณภาพผลบวกและผลลบตามลำดับ

ตารางที่ 1 ชุดไพรเมอร์สำหรับตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมส 6 ชนิด และขนาดของผลิตผลพีซีอาร์[13]

Gene	Primer	Sequence	PCR Product size (bp)
bla_{NDM}	NDM-F	TAGTGCTCAGTGTCGGCATC	640
	NDM-R	CATTAGCCGCTGCATTGAT	
bla_{KPC}	KPC-F	GGAACCATTCGCTAAACTCG	310
	KPC-R	GGCGGCGTTATCACTGTATT	
$bla_{OXA-48-like}$	OXA48-F	GCTGTGTTTTTGGTGGCATC	755
	OXA48-R	TTGAGCACTTCTTTTGTGATGG	
$bla_{OXA-23-like}$	OXA23-F	TCGGATTGGAGAACCAGAA	390
	OXA23-R	GCCCAACCAGTCTTTCCAAA	
bla_{VIM}	VIM-F	GATGSTGATGAGTTGCTTYTKAT	470
	VIM-R	TCYGGRTAGYGTTKTTGAAT	
bla_{IMP}	IMP-F	YGACAGYACRGGNGGAATWG	246
	IMP-R	GGYTTAAYAAARCAMCCACC	

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ร้อยละ

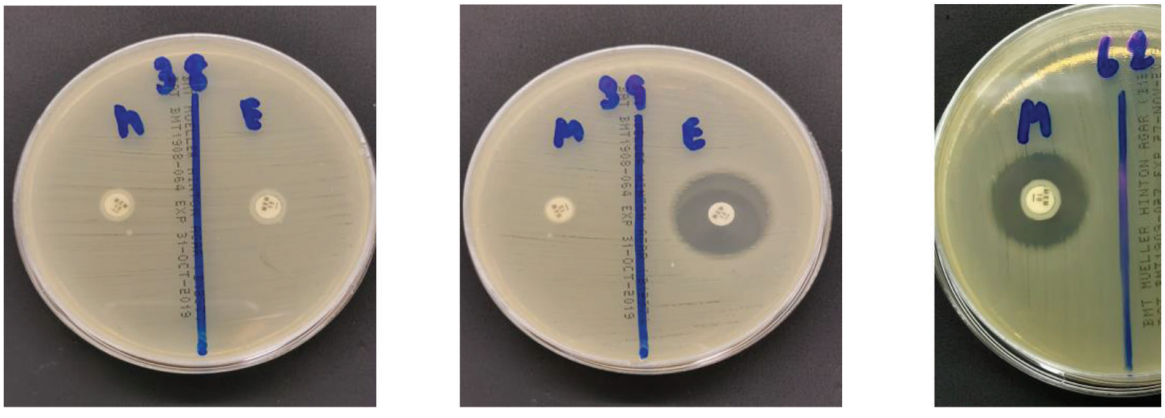
ผลการศึกษา

เชื้อ CRE ทั้งหมด 67 สายพันธุ์ จำแนกเป็นเชื้อ *K. pneumoniae*, *E. coli* และ *E. cloacae* ร้อยละ 85.07, 8.96, 5.97 ตามลำดับ ผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพพบว่า เชื้อไวต่อยา colistin, tigecycline, amikacin, gentamicin, imipenem, meropenem, doripenem, tetracycline, sulfamethoxazole/ trimethoprim, ciprofloxacin, levofloxacin, piperacillin/tazobactam ร้อยละ 100, 88.06, 82.09, 50.75, 31.34, 31.34, 31.34, 22.39, 13.43, 1.4, 1.4, 1.4 ตามลำดับ และดื้อต่อยา amoxicillin/clavulanate, cefazolin, cefotaxime, ceftazidime, ertapenem ทุกสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาเฉพาะผลการทดสอบความไวต่อยากลุ่ม carbapenems สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ เชื้อที่ดื้อต่อยา ertapenem เพียงชนิดเดียว 21 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 31.34 และดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems ทุกชนิดที่นำมาศึกษา 46 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 68.66

ผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสด้วยวิธี mCIM (รูปที่ 1) พบเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส 60 สายพันธุ์ และไม่พบเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส 7 สายพันธุ์ แสดงว่าเป็น CPE ร้อยละ

89.55 (60/67) และ non-CPE ร้อยละ 10.45 (7/67) เมื่อจำแนกชนิดของ CPE โดยทดสอบต่อด้วยวิธี eCIM (รูปที่ 1) ให้ผลบวก 23 สายพันธุ์ แสดงว่าเป็น metallo-beta-lactamase ร้อยละ 38.33 (23/60) และ serine carbapenemase ร้อยละ 61.67 (37/60) พบว่าเชื้อที่ดื้อยา ertapenem เพียงชนิดเดียวให้ผลลบต่อการทดสอบ eCIM ทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมส 6 ชนิด ด้วยวิธี multiplex PCR ให้ผลบวกกับเชื้อ CRE 60 สายพันธุ์ ตรงกับวิธี mCIM คิดเป็นร้อยละ 89.55 พบว่าเชื้อมียีน 3 ชนิด ได้แก่ $bla_{\text{OXA-48-like}}$, bla_{NDM} และ bla_{KPC} ชนิดเดียว ร้อยละ 40.00 (24/60), 26.67 (16/60) และ 3.33 (2/60) ตามลำดับ เชื้อมียีน 2 ชนิดร่วมกันได้แก่ $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ร้อยละ 30.00 (18/60) เมื่อจำแนกความชุกของแต่ละยีนจะพบ $bla_{\text{OXA-48-like}}$ มากที่สุด ร้อยละ 70.00 (42/60) รองลงมา ได้แก่ bla_{NDM} และ bla_{KPC} ร้อยละ 56.67 (34/60) และ 3.33 (2/60) ตามลำดับ โดยเชื้อที่ดื้อต่อยา ertapenem เพียงชนิดเดียวจำนวน 21 สายพันธุ์ พบ CPE ที่มียีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ 15 สายพันธุ์ และไม่พบยีนดื้อยา 6 สายพันธุ์ ส่วนเชื้อดื้อต่อยาทุกชนิด 46 สายพันธุ์พบ CPE 45 สายพันธุ์ที่มียีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$, bla_{NDM}, bla_{KPC}, $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ร่วมกับ bla_{NDM} 9, 16, 2, 18 สายพันธุ์ ตามลำดับ และไม่พบยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ *E. cloacae* 1 สายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบความไวต่อสารต้านจุลชีพพบว่า เชื้อที่มียีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ไวต่อยา imipenem, meropenem, doripenem, amikacin และ tigecycline เชื้อที่มียีน bla_{NDM} ไวต่อยา amikacin และ tigecycline เชื้อที่มียีน bla_{KPC} ไวต่อยา tigecycline เพียงชนิดเดียว ส่วนเชื้อที่มียีน $bla_{\text{OXA-48-like}}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ไวต่อยา gentamicin, amikacin และ tigecycline นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้ง CPE และ non-CPE ให้ผลการทดสอบไวต่อยา colistin ทุกสายพันธุ์

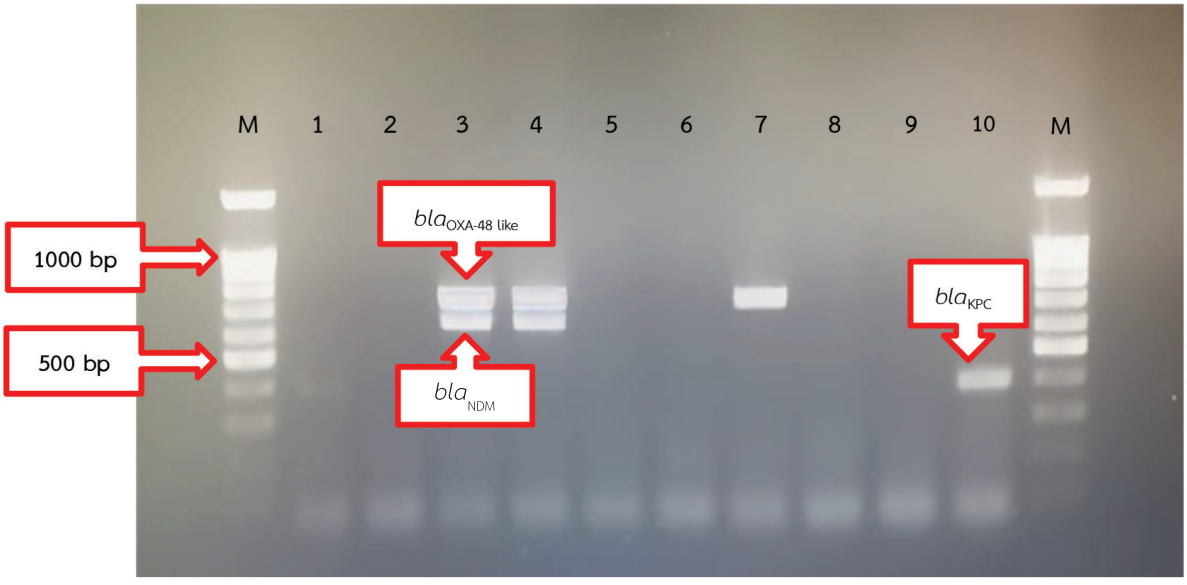


รูปที่ 1 ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสด้วยวิธี mCIM และ eCIM

38 : mCIM ให้ผลบวก eCIM ให้ผลลบ สรุปเป็น CPE ที่ผลิตเอนไซม์ serine carbapenemase

39 : mCIM ให้ผลบวก eCIM ให้ผลบวก สรุปเป็น CPE ที่ผลิตเอนไซม์ metallo-beta-lactamase

62 : mCIM ให้ผลลบ สรุปเป็น non-CPE



รูปที่ 2 ผลการตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมสโดยวิธี multiplex PCR และ agarose gel electrophoresis M = DNA ladder marker, เลน 3-4 = ตัวอย่าง CPE ที่พบ bla_{NDM} ร่วมกับ $bla_{OXA-48-like}$, เลน 7 = ตัวอย่าง CPE ที่พบ $bla_{OXA-48-like,}$ เลน 2,5,6,8,9 = ตัวอย่างที่ไม่พบยีนคาร์บาพีนีเมส เลน 10 = ตัวอย่าง CPE ที่พบ bla_{KPC}

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหา Carbapenemase Producing *Enterobacterales* (CPE) ทางฟีโนไทป์

ผลการทดสอบความไวต่อยากลุ่ม carbapenems	จำนวน	ผลการตรวจหา CPE ทางฟีโนไทป์			
		mCIM+	mCIM +		mCIM-
			eCIM +	eCIM -	
CRE ดื้อยา ertapenem ชนิดเดียว	21	15	0	15	6
-*K. pneumoniae*	18	14	0	14	4
-*Ent. cloacae*	3	1	0	1	2
CRE ดื้อยากลุ่ม carbapenems	46	45	23	22	1
-*K. pneumoniae*	39	39	17	22	0
-*E. coli*	6	6	6	0	0
-*Ent. cloacae*	1	0	0	0	1
CRE รวม (%)	67	60 (89.55)	23 (38.33)	37 (61.67)	7 (10.45)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหา Carbapenemase Producing *Enterobacterales* (CPE) ทางจีโนไทป์

ผลการทดสอบความไวของ CRE ต่อยากลุ่ม carbapenems	จำนวน	ผลการตรวจหายีนคาร์บาพีนีเมส โดยวิธี multiplex PCR				
		$bla_{OXA-48-like}$	bla_{NDM}	bla_{KPC}	$bla_{OXA-48-like}$+bla_{NDM}	Neg*
CRE ดื้อยา ertapenem ชนิดเดียว	21	15	0	0	0	6
- *K. pneumoniae*	18	14	0	0	0	4
- *Ent. cloacae*	3	1	0	0	0	2
CRE ดื้อยากลุ่ม carbapenems	46	9	16	2	18	1
- *K. pneumoniae*	39	9	10	2	18	0
- *E. coli*	6	0	6	0	0	0
- *Ent. cloacae*	1	0	0	0	0	1
CRE รวม (%)	67	60 (89.55)			7(10.45)	
CPE รวม (%)	60	24 (40.0)	16 (26.67)	2 (3.33)	18 (30.00)	

หมายเหตุ *Neg: ตรวจไม่พบยีน bla_{NDM}, bla_{KPC}, $bla_{OXA-48-like}$, $bla_{OXA-23-like}$, bla_{VIM}, bla_{IMP}

วิจารณ์

การจำแนกเชื้อ CRE 67 สายพันธุ์ พบว่าเป็นเชื้อ *K. pneumoniae* มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *E. coli* และ *Ent. cloacae* คิดเป็นร้อยละ 85.07, 8.96 และ 5.97 ตามลำดับ และแยกได้จากตัวอย่างเสมหะมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาอุบัติการณ์การติดเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลมุกดาหาร[5] โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี[6] โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์[7] โรงพยาบาลพระปกเกล้า[8] โรงพยาบาลพุทธชินราช[9] โรงพยาบาลในกรุงเทพมหานคร[10] และโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมา[11]

งานวิจัยนี้ใช้วิธี mCIM ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานทางฟีโนไทป์ที่ได้รับการรับรองจาก Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI)[12] ในการตรวจหา CPE กับวิธี multiplex PCR พบว่าให้ผลการตรวจที่ตรงกันทุกสายพันธุ์ คือตรวจพบเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสและยีนร้อยละ 89.55 และตรวจไม่พบเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส ร้อยละ 10.45 วิธี mCIM มีความไว และความจำเพาะสูง เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ราคาถูก ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ทั่วไปที่มีในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิก กรณีให้ผลตรวจพบเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสสามารถนำมาตรวจต่อด้วยวิธี eCIM เพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์ได้ การศึกษาครั้งนี้พบว่าเป็นเอนไซม์ metallo-beta-lactamase ร้อยละ 38.33 และ serine carbapenemase ร้อยละ 61.67 ในขณะที่วิธี CarbaNP ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับการรับรองจาก CLSI เช่นกันจะมีข้อดีคือ อ่านผลได้รวดเร็วภายในเวลา 2 ชั่วโมง แต่มีข้อจำกัด คือ มีความไวต่ำในการตรวจหา CPE ที่มีเอนไซม์กลุ่ม OXA-48-like ต้องเตรียมน้ำยาพิเศษที่มีราคาสูง และต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง ทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติงานประจำ[9,12] วิธี mCIM มีความไว และความจำเพาะสูงมากกว่าร้อยละ 99 ในการตรวจหาเชื้อ CPE ที่มีเอนไซม์ KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, SME และ OXA-type และยังเป็นวิธีที่มีความไวมากกว่าร้อยละ 97 และความจำเพาะร้อยละ 100 ในการตรวจหา *Pseudomonas aeruginosa* ที่มีเอนไซม์ KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM และ OXA-type อีกด้วย แต่ยังไม่ได้รับการรับรองในการตรวจหาเอนไซม์คาร์บาพีนีเมสในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* และอาจให้ผลลบปลอมกับเอนไซม์ OXA-232[14] ส่วน CRE ที่ให้ผลการทดสอบการมีคาร์บาพีนีเมสเป็นลบหรือ non-CPE อาจเกิดจากการดื้อยาด้วยกลไกอื่น เช่น การสร้างเอนไซม์ ESBL หรือ AmpC-beta-lactamase

(ทั้ง chromosomal และ plasmid-mediated) ร่วมกับการกลายพันธุ์ของโปรตีนพอริน (porin loss) หรือการขับยาออก (efflux)[7-9]

การตรวจหา CPE ด้วยวิธี multiplex PCR พบยีน $bla_{OXA-48-like}$ สูงที่สุดร้อยละ 70.00 รองลงมาคือ bla_{NDM} และ bla_{KPC} ร้อยละ 56.67 และ 3.33 ตามลำดับ ในจำนวนนี้พบ $bla_{OXA-48-like}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ร้อยละ 26.67 สอดคล้องกับรายงานการตรวจหายีนในเชื้อ *K. pneumoniae* จากโรงพยาบาลพระพุทธชินราช 160 สายพันธุ์ พบยีน $bla_{OXA-48-like}$, bla_{NDM}, bla_{IMP} ร้อยละ 80.62, 52.50, 3.13 ตามลำดับ และพบ $bla_{OXA-48-like}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ร้อยละ 34.38[9] แต่แตกต่างกับการศึกษาเชื้อ CRE จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ที่พบ bla_{NDM} สูงสุดร้อยละ 43.4[8] การศึกษาเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลในกรุงเทพฯ พบ bla_{NDM} สูงสุดคือร้อยละ 71.75 รองลงมาได้แก่ $bla_{OXA-48-like}$ ร้อยละ 50.22 และ $bla_{OXA-48-like}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ร้อยละ 25.11[10] และการศึกษาเชื้อ CRE ในโรงพยาบาลมหาราชนครราชสีมาที่พบ bla_{NDM} สูงสุดร้อยละ 60[11] ความแตกต่างของความชุกของยีนแต่ละชนิดอาจเกิดจากลักษณะทางภูมิศาสตร์ของสถานที่ ช่วงระยะเวลาที่เก็บเชื้อที่แตกต่างกันของแต่ละรายงาน รวมถึงการเดินทางระหว่างประเทศที่มีอุบัติการณ์ของยีนนั้นๆ โดยการแพร่กระจายของยีนสามารถเกิดขึ้นได้ระหว่างโรงพยาบาล ชุมชน และสิ่งแวดล้อม ในการศึกษานี้ตรวจพบเชื้อ *K. pneumoniae* ที่มียีน bla_{KPC} ร้อยละ 3.33 เป็นยีนที่พบในแถบประเทศสหรัฐอเมริกา และจีน[15] แต่พบน้อยมากในประเทศไทย[16] ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีมาตรการที่เข้มงวดเพื่อเฝ้าระวัง และควบคุมการแพร่กระจายของยีนดื้อยาต่อไป

เชื้อ CRE มีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ขณะที่ยาต้านจุลชีพขนานใหม่กลับมีน้อยลงทำให้มีทางเลือกอย่างจำกัดในการรักษาโรคติดเชื้อ CRE โดยมียาต้านจุลชีพเพียงไม่กี่ชนิดที่ยังพอใช้ได้ เช่น colistin, tigecycline, fosfomycin และ aminoglycosides เป็นต้น และยาใหม่ที่มีศักยภาพในการรักษา ได้แก่ ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam, plazomicin, eravacycline[17] การศึกษานี้พบว่า เชื้อ CPE ทุกชนิดจะดื้อต่อยา ertapenem (ร้อยละ 100) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของศิริลักษณ์ ธีระภูธร และคณะ[9] และข้อมูลจาก CLSI 2023 ที่ระบุว่า การดื้อยา ertapenem เป็นตัวบ่งชี้ (sensitive indicator) ว่าเชื้อดื้อยาด้วยกลไกการมีเอนไซม์คาร์บาพีนีเมส[14] นอกจากนี้ยังพบว่าความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อ CRE มีความสัมพันธ์กับชนิดของยีนที่ตรวจพบในแต่ละเชื้อ พบว่าเชื้อที่มียีน $bla_{OXA-48-like}$ ยังไวต่อยา imipenem, meropenem, doripenem, amikacin และ tigecycline เชื้อที่มียีน bla_{NDM} ให้ผลการทดสอบที่ไวต่อยาเพียง amikacin และ tigecycline เชื้อที่มียีน bla_{KPC} ให้ผลการทดสอบที่ไวต่อยา tigecycline เพียงชนิดเดียว ส่วนเชื้อที่มียีน $bla_{OXA-48-like}$ ร่วมกับ bla_{NDM} ให้ผลการทดสอบที่ไวต่อยา gentamicin, amikacin และ tigecycline แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Singkham-in et al. พบว่าเชื้อที่มียีน $bla_{OXA-48-like}$ เพียงอย่างเดียวมีรูปแบบความไวต่อยากลุ่ม carbapenems ที่หลากหลาย[18] ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อทั้ง CPE และ non-CPE ยังให้ผลการทดสอบไวต่อยา colistin ทุกสายพันธุ์

สรุป

การตรวจทางห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและอณูชีววิทยาเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการตรวจหาเชื้อดื้อยาที่ได้ผลถูกต้องแม่นยำ ข้อมูลความหลากหลายของยีนคาร์บาพีนีเมสในเชื้อ CPE และผลการทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นทางด้านระบาดวิทยา เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมและเฝ้าระวังการแพร่กระจายของเชื้อดื้อยาในโรงพยาบาลสมุทรปราการต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.วีระพงศ์ ปรัชชญาสิทธิกุล และ รศ.ดร.รัตนา ลาวัง คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนการทำวิจัยด้านอณูชีววิทยา

ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการโรงพยาบาลสมุทรปราการ หัวหน้ากลุ่มงานเทคนิคการแพทย์และพยาธิวิทยาคลินิก ตลอดจนเจ้าหน้าที่งานจุลชีววิทยาคลินิกทุกท่าน และพยาบาลกลุ่มงานป้องกันและควบคุมโรคติดเชื้อ คุณอภิรดี เจริญจรรยากุล และคุณณัฐทิรา ชุ่มชูจันทร์ ที่ส่งเสริมช่วยเหลือ และให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. วิษณุ ธรรมลิขิตกุล. คู่มือการควบคุมและป้องกันแบคทีเรียดื้อยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาล. โครงการควบคุมและป้องกันการดื้อยาต้านจุลชีพในประเทศไทย. 2558
2. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. 2017 [accessed October 1, 2022]. Available from: https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed
3. วันทนา ปวีณกิตติพร, อรชุดา กูบกระโทก, สมชาย แสงกิจพร, อนุศักดิ์ เกิดสิน, Biedron C, Chea N, และคณะ. ระบาดวิทยาระดับโมเลกุลของเชื้อดื้อยา Superbug ในประเทศไทย. การประชุมวิชาการและมหกรรมแสดงผลงาน 100 ปี การสาธารณสุขไทย กระทรวงสาธารณสุข; วันที่ 18-20 กรกฎาคม 2561; ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี จังหวัดนนทบุรี. นนทบุรี: กระทรวงสาธารณสุข; 2561.
4. Khan AU, Maryam L, and Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi metallo-β-lactamase (NDM): A threat to public health. BMC Microbiology. 2017; 17: 101.
5. อรวรรณ โอษฐิเวช. ความชุกของเชื้อ Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* ในโรงพยาบาลมุกดาหาร. วารสารวิชาการกรมสนับสนุนบริการสุขภาพ. 2563; 16: 47-56.
6. ชลดา ผิวผ่อง. อุบัติการณ์การติดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ที่ดื้อต่อยา Carbapenem โรงพยาบาลสุราษฎร์ธานี. วารสารวิชาการแพทย์ เขต 11. 2559; 30: 1-12.
7. ศิรประภา มินาผล, สุรศักดิ์ แว่นรัมย์, จิราภรณ์ นิลสกุล, มารุตพงศ์ ปัญญา, ภาวนา พนมเขต. ความชุกของแบคทีเรียวงศ์เอ็นเทอโรแบคทีเรียซีอีที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ในโรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด. 2562; 31: 105-13.
8. วีวรรณ อาชีวะ. ความชุกของเอนไซม์ดื้อยากลุ่ม carbapenems ที่แยกได้จากเชื้อดื้อยา Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* ในโรงพยาบาลพระปกเกล้า ปี พ.ศ 2555-2556. วารสารศูนย์การศึกษาแพทยศาสตร์คลินิก โรงพยาบาลพระปกเกล้า. 2559; 33: 314-25.
9. ศิริลักษณ์ ธีระภูธร, จิรวัฒน์ วิมลจริยาบูลย์, ปริญญา เพ็งคง, ภานุพงษ์ ตาลาน. ความชุกของยีน carbapenemase ในเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ที่ไม่ไวต่อยากลุ่มคาร์บาพีเนมที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก. วารสารเทคนิคการแพทย์. 2564; 49: 7615-24.

10. Laolerd W, Akeda Y, Preeyanon L, Ratthawongjirakul P and Santanirand P. Carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Bangkok, Thailand, and their detection by Carba NP and modified carbapenem inactivation method tests. Microb Drug Resist. 2018; 24: 1006-11.
11. นิตยา สิงห์พลทัน. อุบัติการณ์การดื้อยาโคลิสตินในเชื้อ *Enterobacteriaceae* สายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา carbapenems. วารสารเทคนิคการแพทย์. 2563; 48: 7394-406.
12. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th ed. supplement M100. Wayne PA, 2019.
13. Chuong LV. Molecular identification of broad spectrum β-lactam resistant *Enterobacteriaceae* and *Neisseria gonorrhoeae* [dissertation]. Nakhonpathom: Mahidol University; 2016.
14. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 33rd ed. supplement M100. Wayne PA, 2023.
15. Halat DH and Moubareck CA. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among Gram-negative bacteria. Antibiotics. 2020; 9: 186.
16. Netikul T and Kiratisin P. Genetic characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST340 at a university hospital in Thailand. PLoS One. 2015; 10: e0139116.
17. Sheu CC, Chang Y, Lin S, Chen Y, Hsueh P. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: An update on therapeutic options. Front Microbiol. 2019; 10: 80.
18. Singkham-in U, Muhummudaree N, Chatsuwan T. *In vitro* synergism of azithromycin combination with antibiotics against OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. Antibiotics. 2021; 10: 1551.