วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

ความชุกชนิดของยีน OXA-type ในเชื้อ Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤตโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า

พิราภรณ์ จันทนาวิวัฒน์[1], สุดาลักษณ์ ธัญญาหาร[2], อัญชลี วิศวโภคา[3], วรดา สโมสรสุข[4],
เสกสรรค์ สโมสรสุข[4*]

Received: *April 8, 2016*
Revised & Accepted: *June 7, 2016*

บทคัดย่อ

เชื้อ carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) เป็นแบคทีเรียที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems และเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาลโดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอผู้ป่วยวิกฤต ที่เพิ่มมากขึ้นทั่วโลก จากการที่เชื้อกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ carbapenemase ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ oxacillinases (OXA) เพื่อใช้ทำลายยา ในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความชุกชนิดของยีน OXA-type ที่กำหนดเอนไซม์ oxacillinases ในเชื้อ CRAB ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจต่างๆจากผู้ป่วยหอวิกฤตในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ในช่วงปีพ.ศ. 2555-2556 จำนวน 334 ตัวอย่าง พบว่า เสมหะเป็นสิ่งส่งตรวจที่พบ CRAB มากที่สุดถึงร้อยละ 53 ทุกตัวอย่างดื้อต่อยาเกือบทุกชนิด แต่ยังให้ผลไวต่อยา tigecycline และ colistin ในอัตราร้อยละ 98.5 และ 97.3 ตามลำดับ สำหรับการดื้อต่อยากลุ่ม carbapenems พบว่าทุกตัวอย่างสร้างเอนไซม์ carbapenemase จากการทดสอบด้วยวิธี modified Hodge และทุกตัวอย่างไม่สร้าง metallo-β-lactamases (MBLs) จากการทดสอบด้วยวิธี EDTA combined disk ผลการตรวจหาชนิดของยีน bla_{OXA} ด้วยวิธี multiplex PCR และยีน MBLs ด้วยวิธี PCR พบเชื้อ CRAB ทุกตัวอย่าง มียีน $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ และส่วนใหญ่มีมากกว่า 1 ชนิด แต่ไม่พบยีน MBLs ($bla_{IMP\text{-}type}$, $bla_{VIM\text{-}1\text{-}type}$, $bla_{VIM\text{-}2\text{-}type}$) สามารถจัดเป็นกลุ่ม OXA–type ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มียีน $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$ กับ $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$, กลุ่มที่ 2 มียีน $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ กับ $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ กลุ่มที่ 3 มียีน $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$, $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ และ $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ และกลุ่มที่4 มียีน $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$ เพียงอย่างเดียวโดยมีอัตราการพบร้อยละ 97, 1.2, 0.9 และ 0.9 ตามลำดับ ในการศึกษานี้ไม่พบยีน $bla_{OXA\text{-}24\text{-}like}$ จึงสรุปได้ว่าการสร้างเอนไซม์ oxacillinases โดยยีน ชนิด $bla_{OXA\text{-}23\text{-}like}$, $bla_{OXA\text{-}51\text{-}like}$, $bla_{OXA\text{-}58\text{-}like}$ น่าจะเป็นกลไกที่สำคัญในการดื้อยากลุ่ม carbapenem ในครั้งนี้

คำสำคัญ: *Acinetobacter baumannii*, Carbapenemase, Carbapenems, Oxacillinases

[1] นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคนิคการแพทย์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี
[2] คณะเทคนิคการแพทย์ วิทยาลัยนครราชสีมา นครราชสีมา
[3] ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า กรุงเทพมหานคร
[4] ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี
* ผู้รับผิดชอบบทความ

วารสาร
เทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด
JOURNAL OF MEDICAL TECHNOLOGY AND PHYSICAL THERAPY

นิพนธ์ต้นฉบับ
ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of OXA–type carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in intensive care unit at Phramongkutklao Hospital

Piraporn Juntanawiwat[1], Sudaluck Thunyaharn [2], Unchalee Visawapoka[3], Worada Samosornsuk[4], Seksun Samosornsuk [4*]

Abstract

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) is an important multidrug resistant bacterium. CRAB has been increasingly reported worldwide as a significant causative organism of nosocomial infection, especially for hospitalized patients in intensive care unit (ICU) due to its producing carbapenemase, which mostly consists of oxacillinases for hydrolyzing carbapenem. This study aimed to investigate the prevalence of oxacillinases (OXA)–type carbapenemase genes in CRAB isolates from patients in ICU at Phramongkutklao Hospital from the year 2012 to 2013. Of the 334 isolates, sputum was the most common specimen accounted for 53%. All isolates were detected for carbapenemase production by a modified Hodge test (MHT). All CRAB isolates were MHT-positive. However, these CRAB isolates showed negative results for MBLs detection by EDTA combined disk method and for confirmatory by PCR amplification of MBLs genes ($bla_{\text{IMP-type}}$, $bla_{\text{VIM-1-type}}$, and $bla_{\text{VIM-2-type}}$). Genotyping of OXA–type carbapenemase genes by multiplex PCR revealed 3 OXA-types $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, and $bla_{\text{OXA-58-like}}$ were detected. Most CRAB isolates harbored more than one type of bla_{OXA}. From this study, the CRAB isolates were classified into 4 groups: group 1 (harboring both $bla_{\text{OXA-23-like}}$ and $bla_{\text{OXA-51-like}}$), group 2 (harboring both $bla_{\text{OXA-51-like}}$ and $bla_{\text{OXA-58-like}}$), group 3 (harboring $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, and $bla_{\text{OXA-58-like}}$) and group 4 (harboring only $bla_{\text{OXA-51-like}}$) with the percentages of isolates 97, 1.2, 0.9 and 0.9 respectively. However, $bla_{\text{OXA-24-like}}$ was not found in any isolated. In conclusion, all CRAB isolated were able to produce oxacillinases by the expression of $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ and $bla_{\text{OXA-58-like}}$, which is used as main mechanism for carbapenem resistance.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, carbapenemase, carbapenems, oxacillinases

[1] Graduate School, Thammasat University (Rangsit Campus), Pathumthani
[2] Faculty of Medical Technology Nakhon Ratchasima College, Nakhon Ratchasima
[3] Department of Biochemistry, Phramongkutklao College of Medicine
[4] Faculty of Allied Health Sciences, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathumthani
[*] Corresponding author: (e-mail: seksun@hotmail.com)

บทนำ

Acinetobacter baumannii เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบได้ตามธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดิน น้ำ เชื้อนี้สามารถเติบโตได้ในร่างกายมนุษย์ ทั้งผิวหนัง คอหอย เสมหะ ปัสสาวะ สารคัดหลั่งจากช่องคลอดและอุจจาระ จึงสามารถก่อโรคได้หลากหลายระบบ[1] ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นโรคที่เกิดได้ในผู้ป่วยวิกฤต[2-3] พบว่าเชื้อนี้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และปัจจุบันทั่วโลกกำลังประสบปัญหาเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *A. baumannii* ที่ดื้อยาหลายชนิด (MDR- *A. baumannii*) ผู้ป่วยที่ติดเชื้อชนิดนี้มีอัตราเสี่ยงต่อการเสียชีวิตสูงมาก โดยเฉพาะผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดพบมีอัตราเสี่ยงสูงถึงร้อยละ 29.0[4] จากรายงานสถานการณ์เชื้อดื้อยาของศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาแห่งชาติ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย (National Anti-microbial Resistant Surveillance Center Thailand; NARST) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544-2556 พบ MDR- *A. baumannii* มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุกปี โดยเฉพาะการดื้อยาต้านจุลชีพในกลุ่ม carbapenems ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์แรงที่สุดและเป็นยาขนานท้ายๆสำหรับรักษาการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ พบมีอัตราเพิ่มสูงขึ้นถึงร้อยละ 64.7 ในปีพ.ศ.2556[5] ข้อมูลความไวของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ปี พ.ศ. 2555 พบว่าความไวของเชื้อ *A. baumannii* ต่อยา imipenem, cefoperazone/sulbactam, ceftazidime, piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin และ amikacin อยู่ในระดับร้อยละ19 - 33 ซึ่งถือว่ามีความไวต่ำมาก และพบว่ายังคงมีความไวต่อ tigecycline และ colistin ร้อยละ 97 และ 99 ตามลำดับ ดังนั้น การรักษาการติดเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อยา carbapenems จึงต้องกลับไปใช้ยา colistin ซึ่งเป็นยาเก่าเมื่อ 50 ปีก่อนและเป็นยาที่มีพิษและในปัจจุบันการทดสอบความไวต้องหาค่าเป็น MIC ตามวิธีมาตรฐาน[6]

กลไกการดื้อยาที่พบใน *A. baumannii* มีทั้งหมด 4 กลไก ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ทำลายยา การลดการนำยาเข้าเซลล์โดยลดการสร้าง porin การขับยาออกจากเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายในการจับของยาโดยกลไกการดื้อยาในเชื้อตัวหนึ่งๆ อาจเกิดจากเพียงกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือ อาจเกิดขึ้นพร้อมๆ กันหลายกลไกก็เป็นได้[7] อย่างไรก็ตามการสร้างเอนไซม์ carbapenemase ถือเป็นกลไกหลักของการดื้อยาในเชื้อนี้ โดยเอนไซม์นี้สามารถทำลายยาในกลุ่ม carbapenems (imipenem และ meropenem) ซึ่งเป็นยากลุ่ม β-lactam เชื้อที่ดื้อต่อยากลุ่มนี้มีชื่อเรียกว่า carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) นอกจากจะทำลายยาในกลุ่ม carbapenems แล้ว carbapenemase ยังทำลายยากลุ่ม β-lactam ชนิดอื่น ๆ เช่น ceftazidime, cefoperazone, cefepime, piperacillin[7-8] carbapenemase ที่พบใน *A. baumannii* ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามลักษณะโครงสร้างโมเลกุลและ co-factors ที่ใช้ต่างกัน ได้แก่ OXA-type carbapenemase และ metallo-β-lactamases (MBLs) OXA-type carbapenemase เป็นเอนไซม์ β–lactamase ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม D ตามโครงสร้างทางโมเลกุล หรือ 2d ตามชนิด substrate ของเอนไซม์ ในปัจจุบันพบมากกว่า 45 type[8,9] โดยพบว่า OXA-type ที่สร้างจาก *A. baumannii* มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ตัวอย่างเช่น Valenzuela และคณะพบเชื้อ CRAB ที่ผลิต $bla_{\text{OXA-23-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ในประเทศออสเตรเลีย[10] นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบ $bla_{\text{OXA-51-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ในประเทศอิตาลี [13] และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ในประเทศกรีซ[8] ส่วน $bla_{\text{OXA-40-like}}$ มีรายงานการพบในประเทศสหรัฐอเมริกา[12] สำหรับประเทศไทยส่วนใหญ่พบ $bla_{\text{OXA-23-like}}$[13-16] มีรายงาน $bla_{\text{OXA-72}}$ และ $bla_{\text{OXA-58- like}}$ แต่พบน้อย[17,18]

เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกหลักในการดื้อยาของเชื้อ *A. baumannii* ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาชนิดของยีน OXA-type ที่พบได้บ่อยและมีรายงานทั้งในประเทศและต่างประเทศได้แก่ $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24-like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ในเชื้อ carbapenem-resistant *A. baumannii* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในหอผู้ป่วยวิกฤตโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ซึ่งในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ MBLs ได้แก่ ยีน $bla_{\text{IMP-type}}$, $bla_{\text{VIM-1-type}}$, และ $bla_{\text{VIM-2-type}}$ ควบคู่ไปกับยีน OXA-type ด้วย

วัสดุและวิธีการศึกษา

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ CRAB ทุกตัวอย่าง ที่ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenem โดยไม่ซ้ำในสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ จากผู้ป่วยหอวิกฤตในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ช่วงเวลาตั้งแต่เดือนมกราคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556 จำนวน 334 สายพันธุ์ ซึ่งถูกเก็บรักษาใน 20% glycerol trypticase soy broth

ในตู้เย็น -70°C ได้ถูกทำการพิสูจน์เชื้อซ้ำโดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตามมาตรฐานของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและทดสอบการดื้อยากลุ่ม carbapenem ได้แก่ imipenem, meropenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม อีกครั้ง โดยวิธี disk diffusion ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) 2013 โดยทุกตัวมีค่า inhibition zone น้อยกว่า 16 มิลลิเมตร [6,7]

เชื้อแบคทีเรียควบคุมผลบวกที่ใช้ในการศึกษายีน OXA-type ได้แก่ *A. baumannii* A288 ($bla_{OXA-51-like}$, $bla_{OXA-23-like}$)[17], *A. baumannii* A300 (bla_{OXA-72}, $bla_{OXA-58-like}$, $bla_{OXA-51-like}$)[17,18], *K. pneumoniae* ($bla_{IMP-14a}$)[19] และ *Ps. aeruginosa* P11 (bla_{VIM-2})[17]

การทดสอบความไวของเชื้อ CRAB ต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวของเชื้อ CRAB จำนวน 334 สายพันธุ์ ต่อยาต้านจุลชีพ จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin, cefepime, imipenem, meropenem, piperacillin-tazobactam และ tigecycline ตามลำดับด้วยวิธี agar disk diffusion (Kirby-Bauer) และ สำหรับการทดสอบความไวต่อยา colistin ทำการทดสอบหาค่าความไวต่ำสุดของเชื้อต่อสารต้านจุลชีพ minimum inhibitory concentration (MIC) โดยวิธี E-test ตามมาตรฐานของ CLSI MI100-S23 แปลผลตามตารางมาตรฐานของ CLSI MI100-S23 / 2013[7]

การตรวจกรองเอนไซม์ carbapenemases ในแบคทีเรียโดยวิธี modified Hodge test (MHT)[20]

ทดสอบโดยวางแผ่นยา imipenem ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่มีเชื้อ *Escherichia coli* ATCC 25922 ซึ่งถูกเจือจางลง 10 เท่าจาก 0.5 McFarland จากนั้นลากเชื้อที่ต้องการทดสอบเป็นเส้นตรงจากขอบยาจนถึงขอบจาน บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง อ่านผลบวก โดยสังเกตรอยเว้าของ inhibition zone ของเชื้อ *E. coli* รอบๆเชื้อที่ทดสอบแสดงว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenemases ได้

การตรวจหาการสร้างเอนไซม์ MBLs ด้วยวิธี EDTA combined disk[21]

การทดสอบโดยวางแผ่นยา imipenem 10 ไมโครกรัม และแผ่นยา imipenem 10 ไมโครกรัม ที่เติม ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 750 ไมโครกรัม (imipenem-EDTA) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar ที่มีเชื้อ CRAB ความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarland หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เปรียบเทียบความกว้างของ inhibition zone ของแผ่นยาทั้งสอง ถ้าผลิตเอนไซม์ MBLs ได้ จะได้ค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 17 มิลลิเมตร และถ้าไม่ผลิตเอนไซม์ MBLs จะให้ขนาด inhibition zone ของ imipenem-EDTA น้อยกว่าหรือเท่ากับ 14 มิลลิเมตร

การศึกษาชนิดของ ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ OXA carbapenemases (OXA-type) ด้วยวิธี multiplex PCR และ MBLs ด้วยวิธี PCR[22,23]

เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยสกัดเชื้อ CRAB ด้วยวิธี heat lysis โดยละลายเชื้อใน alkaline lysis buffer (0.25% SDS ใน 0.05 M NaOH) แล้วแช่ใน heat block ที่อุณหภูมิ 95 °C นาน 15 นาที เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแล้วปั่นด้วยความเร็ว 10,000 rpm. ดูดส่วนน้ำใส เก็บรักษาไว้ใน -20 °C

การเตรียม PCR mixture (20 µl) ประกอบด้วย KAPA2G Fast HotStart (2X), KAPA2G Fast HotStart PCR Buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl 2X (KAPA Biosystems, USA), forward primer และ reverse primer **(ตารางที่ 1)** ความเข้มข้น 10 µmol/ µl อย่างละ 0.2 µl และดีเอ็นเอของแบคทีเรียตัวอย่าง 2 µl ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง PCR/Thermal cycler (Aeris™ , Singapore) ปฏิกิริยา PCR เริ่มต้นด้วย predenature ที่ 95 °C 3 นาที จากนั้นทำ PCR ต่ออีก 35 รอบ โดย denature ที่ 95 °C 30 วินาที, annealing ที่ 52 °C 30 วินาที, extension ที่ 72 °C 1 นาที และ final extension ที่ 72 °C 6 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ 2 % agarose gel ใน 0.5X Tris-borate-EDTA (TBE) buffer และย้อมด้วย SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) วิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นมาตรฐาน (100 bp DNA ladder, New England Biolabs) และดูด้วยเครื่อง UV illumination (ChemiDoc™ MP System BIO-RAD, USA)

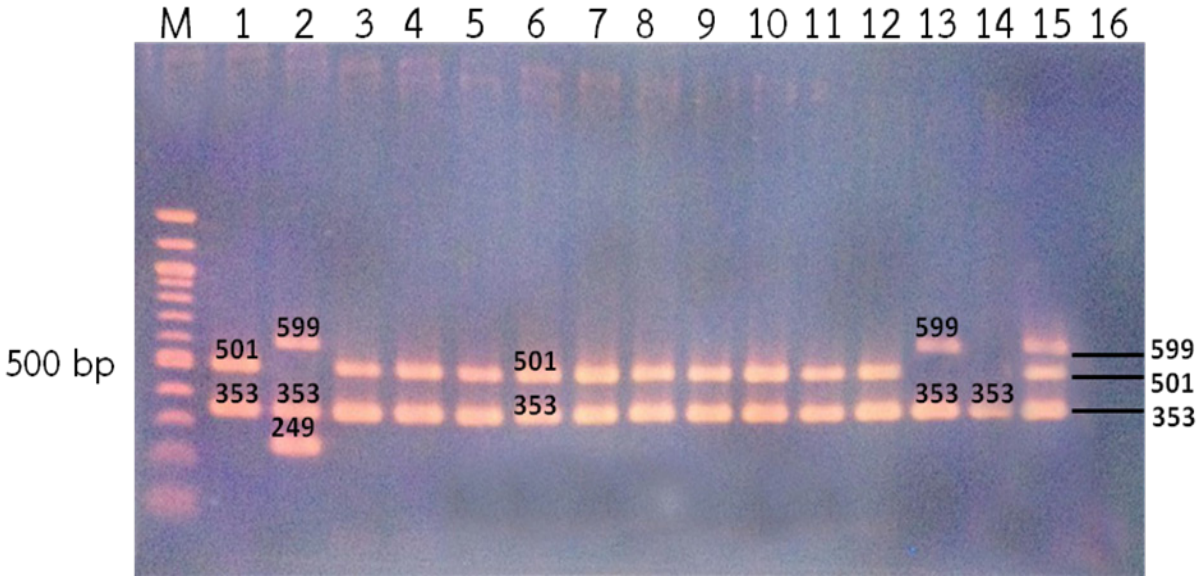
ตารางที่ 1 รายละเอียดไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ OXA carbapenemases และ metallo β-lactamases ของเชื้อ CRAB

Gene	Primer name	Primer sequences (5' to 3')	Product size	Reference
$bla_{\text{OXA-23-like}}$	OXA23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	501	22
	OXA23-R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
$bla_{\text{OXA-24-like}}$	OXA24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	249	22
	OXA24-R	AGTTGAGCCAAAAGGGGATT		
$bla_{\text{OXA-51-like}}$	OXA51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353	22
	OXA51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
$bla_{\text{OXA-58-like}}$	OXA58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	22
	OXA58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
$bla_{\text{IMP-like}}$	IMP-F	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	488	23
	IMP-R	ATAATTTGGCGGACTTTGGC		
$bla_{\text{VIM 1-like}}$	VIM 1-F	ATGTTAAAAGTTATTAGTAGT	801	23
	VIM 1-R	CTACTCGGCGACTGAGCGAT		
$bla_{\text{VIM 2-like}}$	VIM 2-F	ATGTTCAAACTTTTGAGTAAG	801	23
	VIM 2-R	CTA CTCAAC GACTGAGCGAT		

ผลการศึกษา

อัตราการพบเชื้อ *A. baumannii* ที่ดื้อต่อยากลุ่ม carbapenem CRAB จำนวน 334 ตัวอย่างในสิ่งส่งตรวจต่าง ๆ จากผู้ป่วย พบเชื้อในเสมหะ (sputum) มากที่สุดถึงร้อยละ 53 (n=177) รองลงมาพบเชื้อในเลือด (blood) ร้อยละ 21.9 (n=73) ในแผล หนอง น้ำจากส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (pus and body fluid) ปัสสาวะ (urine) และน้ำจากไขสันหลัง (CSF) พบร้อยละ 17.3 (n=58), 6.9 (n=23) และ 0.9 (n=3) และพบว่าเชื้อ CRAB ทุกตัวอย่างไม่ไวต่อยากลุ่ม carbapenem (imipenem, meropenem), piperacillin-tazobactam และ ciprofloxacin ในร้อยละ100 และให้ผลไวน้อยมากต่อยา cefepime, levofloxacin, gentamicin และ amikacin ในร้อยละ 0.6, 2.7, 3.9 และ 6.3 ตามลำดับ แต่ยังให้ผลไวมากต่อยา colistin และ tigecycline ในร้อยละ 97.3 และ 98.5 ส่วนการทดสอบหาค่าความไวต่ำสุดของเชื้อ CRAB ต่อยา imipenem, meropenem และ colistin โดยวิธี E-test พบว่าทุกตัวอย่างมีระดับค่า MICs ต่อยา imipenem และ meropenem สูง คือมากกว่า 256 μg/ml ซึ่งมีความสอดคล้องกันในยาทั้งสองชนิด และค่า MICs ต่อยา colistin มีค่าอยู่ในช่วง 0.094 - $\geq$ 256 μg/ml นอกจากนั้นค่า MIC50 และ ค่า MIC90 ต่อยา colistin มีค่าเท่ากับ 0.38 μg/ml และ 1.5 μg/ml ตามลำดับ สำหรับการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ carbapenemases โดยวิธี MHT พบทุกตัวอย่างให้ผลบวก แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ carbapenemase ได้แก่ metallo-β-lactamases (MBLs) หรือ oxacillinases แต่อย่างไรก็ตามผลการตรวจหาการสร้างเอนไซม์ MBLs โดยวิธี EDTA combined disk ให้ผลลบทุกตัวอย่าง ซึ่งแสดงว่าเชื้อทั้งหมดนี้ไม่สร้างเอนไซม์ MBLs ผลการตรวจหายีน 4 ยีน ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ OXA carbapenemases ได้แก่ $bla_{\text{OXA23-like}}$, $bla_{\text{OXA-24 -like}}$, $bla_{\text{OXA-}}$

$_{51\text{-like}}$ และ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ โดยวิธี multiplex PCR ของเชื้อ CRAB จำนวน 334 ตัวอย่าง พบว่าส่วนใหญ่เชื้อ CRAB มียีน OXA มากกว่าหรือเท่ากับ 1 ชนิด สามารถจัดรูปแบบตามจำนวนและชนิดของยีน OXA ที่พบในเชื้อ ได้เป็น 4 กลุ่ม OXA–type ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มียีนสองชนิด คือ $bla_{\text{OXA-23- like}}$ กับ $bla_{\text{OXA-51-like,}}$ กลุ่มที่ 2 มียีนสองชนิด คือ $bla_{\text{OXA-51-like}}$ กับ $bla_{\text{OXA-58-like}}$ กลุ่มที่ 3 มียีนสามชนิด คือ $bla_{\text{OXA-23- like}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ และ กลุ่มที่4 มียีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ เพียงอย่างเดียว ดังแสดงใน**รูปที่ 1** โดยพบในอัตราร้อยละ 97, 1.2, 0.9 และ 0.9 ตามลำดับ ในขณะเดียวกันเชื้อ CRAB ทุกตัวอย่าง พบยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ แต่ไม่พบยีน $bla_{\text{OXA-24-like}}$



รูปที่ 1 ผลการตรวจยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ OXA carbapenemases ในเชื้อ CRAB

Lane M : ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด 100 bp
Lane 1 : เชื้อควบคุมบวก ของยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$ (A288 : *A. baumannii* ขนาด 353 กับ 501 bp)
Lane 2 : เชื้อควบคุมบวก ของยีน $bla_{\text{OXA-72}}$, $bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ (A300 : *A. baumannii* ขนาด 249, 353 และ 599 bp)
Lane 3-12 : เชื้อที่ทดสอบตรวจพบยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ขนาด 353, 501 bp
Lane 13 : เชื้อที่ทดสอบตรวจพบยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ขนาด 353, 599 bp
Lane 14 : เชื้อที่ทดสอบตรวจพบยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ขนาด 353 bp
Lane 15 : เชื้อที่ทดสอบตรวจพบยีน$bla_{\text{OXA-51-like}}$, $bla_{\text{OXA-23-like}}$, $bla_{\text{OXA-58-like}}$ขนาด 353, 501 และ 599 bp
Lane 16 : negative control

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ CRAB จากผู้ป่วยหออภิบาลผู้ป่วยวิกฤตในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ส่วนใหญ่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจเสมหะมากที่สุดถึงร้อยละ 53 และรองลงมาพบเชื้อในเลือดร้อยละ 21.9 ซึ่งสอดคล้องกับที่เชื้อมักก่อโรคทางเดินหายใจ ได้แก่ โรคปอดบวม (pneumonia) ชนิด ventilator-associated ที่พบบ่อยที่สุดในหอผู้ป่วยหนักที่เคยมีรายงานจากโรงพยาบาลในระดับตติยภูมิในประเทศไทย เช่น โรงพยาบาลรามาธิบดี โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และโรงพยาบาลศรีนครินทร์[17,24,25] โดยเชื้อที่พบมักมีการดื้อเป็นแบบ MDR (multidrug resistance) คือ ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 3 กลุ่มขึ้นไป ได้แก่ ยา piperacillin- tazobactam, ciprofloxacin, cefepime, levofloxacin, gentamicin และ amikacin จากการศึกษาหาค่าความไวต่ำสุดของเชื้อ CRAB

ในกลุ่ม XDR มีค่า MIC ต่อยา imipenem และ meropenem สูงมาก คือมีค่ามากกว่า หรือ เท่ากับ 256 μg/ml จึงทำให้มีความยากลำบากในการเลือกใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาภาวะติดเชื้อนี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพบว่าร้อยละ 2.4 ของเชื้อเหล่านี้มีการดื้อยาหลายขนานเพิ่มขึ้นเป็นแบบ (extreme drug resistant : XDR) แต่ยังให้ผลไวมากต่อยา colistin และ tigecycline ในร้อยละ 97.3 และ 98.5 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบเชื้อ CRAB ที่ดื้อต่อสารต้านจุลชีพทุกขนาน (pan drug resistant: PDR) และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานความไวของเชื้อในช่วงเวลา 10 ปีที่ผ่านมาของโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าพบว่าเชื้อกลุ่มนี้มีแนวโน้มความไวต่อยาลดลง

สำหรับการตรวจการสร้างเอนไซม์ carbapenemases ของเชื้อ CRAB ด้วยวิธี MHT พบว่าให้ผลบวกทุกตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ MBLs ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เชื้อดื้อยา carbapenem ได้ในระดับสูงมากอย่างที่มีรายงานในต่างประเทศ[26] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อ CRAB ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้น่าจะใช้กลไกการสร้างเอนไซม์ OXA carbapenemases ในการดื้อยากลุ่ม carbapenem ซึ่งมีรายงานส่วนใหญ่พบในเชื้อ *A. baumannii* โดยมียีนที่ควบคุมการสร้างจัดอยู่ใน $bla_{\text{OXA family}}$ [27] ในการศึกษาครั้งนี้พบยีน $bla_{\text{OXA-51-like}}$ ในเชื้อ CRAB ทุกสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Turton และคณะในปี พ.ศ.2542 ซึ่งยีนนี้สามารถพบได้โดยกำเนิดใน *A. baumannii* และได้มีการนำไปใช้ในการพิสูจน์เชื้อ[28] สำหรับยีน $bla_{\text{OXA-23-like}}$ ที่พบมากที่สุดครั้งนี้มีรายงานพบครั้งแรกใน *A. baumannii* ที่สก็อตแลนด์ต่อมามีการรายงานจากประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ได้แก่ บราซิล สาธารณรัฐประชาชนจีน สิงคโปร์ ฝรั่งเศส อังกฤษ เกาหลี และอเมริกาใต้รวมทั้งในประเทศไทยด้วย[24,25] นอกจากนี้ยังพบยีน $bla_{\text{OXA-58-like}}$ ในเชื้อ CRAB ได้แต่เป็นจำนวนน้อย แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่พบว่าชนิดของ OXA type มีบทบาททำให้การดื้อยากลุ่ม carbapenem แตกต่างกันซึ่งเหมือนกับที่มีรายงานของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์[25]

ดังนั้นสถานการณ์การดื้อยาของเชื้อ CRAB ในโรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและแนวโน้มของการดื้อยาที่ใช้ในการรักษาเชื้อนี้ เช่น colistin ที่เพิ่มมากขึ้น จะเป็นข้อมูลให้แก่แพทย์และบุคลากรทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องให้ ตระหนักในการเลือกใช้ยาในการรักษา และข้อมูลที่ได้นี้ จะเป็นแนวทางในควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ ไปสู่แบคทีเรียชนิดอื่นในโรงพยาบาล เนื่องจากยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์สามารถเคลื่อนที่ไปสู่แบคทีเรียตัวอื่นทำให้ได้รับยีนดื้อต่อยาเช่นกันจึงทำให้เกิดการดื้อยาของเชื้อเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการทดสอบหายีนด้วยเทคนิค PCR ยังมีความจำเป็นเพื่อใช้ในการยืนยันผล แต่มีข้อจำกัดเรื่องเวลาและค่าใช้จ่าย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร. อรุณวดี ชนะวงศ์ กลุ่มวิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ รศ.ดร.นพ.ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ที่อนุเคราะห์เชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และ สำนักงานพัฒนาวิจัย โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้าและวิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า

เอกสารอ้างอิง

1. ชาญวิทย์ ตรีพุทธรัตน์, เชิดศักดิ์ ธีระบุตร และสมหวัง ด่านวิจิตร. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการการศึกษากลไกการดื้อยากลุ่ม carbapenems ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii* ที่ก่อโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ; 2546. รหัสโครงการที่ MRG4680064.
2. Dejsirilert S, Tienggrim S, Sawanpanyalert P, Aswapokee N, Malathum K. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumann*ii: Six years of National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) J Med Assoc Thai 2009; 92 (Suppl 4): S34-45.
3. Wisplinghoff H, Edmond MB, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP, Seifert H. Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in United States Hospitals: Clinical features, molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis 2000; 31: 690-7.
4. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing treat in hospital: multidrug-resistant *Acinetobacter*

baumannii. Nat Rev Microbiol 2007; 5: 939-51.

5. กระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ศูนย์เฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ คณะกรรมการโครงการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพ.(2556) รายงานการเฝ้าระวังเชื้อดื้อยาต้านจุลชีพแห่งชาติ. แหล่งที่มา: http://naest.dmsc.moph.go.th (2 พฤษภาคม 2556).
6. Vaneechoutte M. *Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. Manual of Clinical Microbiology. 10th ed. Washington, D.C. ASM Press 2011; 714-38.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third information supplement. M100-S23. CLSI, Wayne, PA. 2013; 30.
8. Falagas ME, Koletsi PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 2006; 55: 1619-29.
9. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 826 – 36.
10. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148-65.
11. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 373-83.
12. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell. Horizontal gene transfer in apolyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Clinl Microbiol 2007; 45: 453-60.
13. Zarrilli R, Casillo R, Di Popolo A, Tripodi MF, Bagattini M, Cuccurullo S, et al. Molecular epidemiology of a clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Italy. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 481-9.
14. Lolans K, Rice TW, Munoz-Price LS, John PQ. Multicity outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2941-5.
15. Saranjit D. In vitro antibacterial activity of imipenem in combination with amikacin or with ciprofloxacin against imipenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Chulalongkorn University 2005.
16. พรทิพย์ พึ่งม่วง, วัชรินทร์ รังสีภาณุรัตน์, พัชรี กัมมาร เจษฎากุล, ปัญจพร นิ่มมณี, สุทัศน์ บุญยงค์ และอิสยา จันทร์วิทยานุชิต. ความชุกของ*เชื้อ Acinetobacter baumannii* สายพันธุ์ดื้อยา imipenem ที่สร้างเอนไซม์ metallo-beta-lactamase และ carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamase จากผู้ป่วยโรงพยาบาลนครปฐม. วารสารเทคนิคการแพทย์ 2554; 39: 3909-20.
17. อรุณวดี ชนะวงศ์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการการตรวจหาเอนไซม์เบตาแลกตาเมสที่สลายยากลุ่ม carbapenems ในแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์. สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2545 รหัสโครงการ MRG4580046.
18. เบศจมาศ โสภะถา, อลิสา บุญพาวรรณ. การตรวจหายีน bla_{OXA-58} และยีน ISA*ba* ใน *Acinetobacter baumannii* ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase จากโรงพยาบาลศรีนครินทร์. ภาคนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2552.
19. Rimrang B, Chanawong A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Sribenjalux P, et al. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing Enterobacteriaceae in Thailand. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 2626-30.

20. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 88-91.
21. Yum JH, Yi K, Lee H. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla_{VIM-2} gene cassettes. J Antimicrob Chemother 2002; 49: 837-40.
22. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27: 351-353.
23. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, et al. Novel acquired metallo lactamase gene, bla_{SIM}-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 4485-91.
24. ศิริลักษณ์ อภิวาณิชย์, วาทินี คัชมาตย์, บรรณจง วรรณยิ่ง. การเฝ้าระวังโรคปอดบวมจากการใช้เครื่องช่วยหายใจของผู้ป่วยอายุรกรรมในโรงพยาบาลรามาธิบดี. จุลสารชมรมควบคุมโรคติดเชื้อในโรงพยาบาลแห่งประเทศไทย 2000; 10: 33-41.
25. นภาวรรณ ปุณกบุตร. การตรวจหายีนที่สร้างเอนไซม์ carbapenemases ในเชื้อ *Acinetobacter baumannii.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางการแพทย์ (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551.
26. Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP ribosyltransferase (arr-2) and metallo- β -lactamase (bla_{IMP-4}) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1382-90.
27. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 196-9.
28. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the $bla_{OXA-51-like}$ carbapenemase gene intrinsic to this species. J Clin Microbiol 2006; 44: 2974-6.