

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

$\beta$ -lactams เป็นสารต้านจุลชีพกลุ่มใหญ่ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems และ  $\beta$ -lactamase inhibitors (1) ปัจจุบันยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 เช่น cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime เป็นยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากวงศ์ Enterobacteriaceae แต่ต่อมาพบว่าเชื้อดื้อยาในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยกลไกการผลิตเอนไซม์ extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) (2) หรือ plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) (3) ส่วนยากลุ่ม carbapenems เช่น imipenem และ meropenem เป็นยาที่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเพราะทนต่อเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้หลายชนิดรวมทั้งเอนไซม์ ESBL และ AmpC ดังนั้นยากลุ่ม carbapenems จึงเป็นยาทางเลือกลำดับแรก (drug of choice) ในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายชนิด (multidrug-resistant) เช่น *Pseudomonas aeruginosa* และ *Acinetobacter baumannii* ตลอดจนวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL หรือ AmpC โดยเฉพาะ *Klebsiella pneumoniae* และ *Escherichia coli* อย่างไรก็ตามมีรายงานการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems มากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ซึ่งพบทั่วโลกและเป็นปัญหาอยู่ในขณะนี้เนื่องจากมียาที่ใช้รักษาจำกัดหรือมีทางเลือกน้อยลง ส่วนเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ยังพบการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems น้อย (4)

กลไกหลักในการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems คือการดัดแปลงโปรตีน porins ซึ่งเป็นทางผ่านของยาหรือมีการขาดหายไปของ porin ทำให้ยาเข้าไปในเซลล์ได้น้อยลงร่วมกับเชื้อผลิตเอนไซม์ chromosomal AmpC (cephalosporinase) ในปริมาณที่สูงขึ้น หรือมีการปั๊มยาออกนอกเซลล์มากขึ้น (efflux pump) นอกจากนี้กลไกที่สำคัญอีกกลไกหนึ่งคือเชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase หรือ carbapenemase ซึ่งสลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้โดยตรง เอนไซม์กลุ่มนี้จำแนกตามอนุกรมวิธานโมเลกุลได้เป็น 3 class ได้แก่ class A, B และ D โดยเอนไซม์ class A carbapenemase ส่วนใหญ่พบในวงศ์ Enterobacteriaceae ในขณะที่ class B carbapenemase หรือ metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) ส่วนใหญ่พบใน *P. aeruginosa* อย่างไรก็ตามพบในเชื้ออื่นรวมทั้งวงศ์ Enterobacteriaceae ด้วย ส่วน class D หรือ OXA carbapenemase ส่วนใหญ่พบใน *A. baumannii* ยีนที่กำหนดเอนไซม์เหล่านี้หากพบบนพลาสมิดหรือมี mobile genetic elements เช่น transposon หรือ integron รวมตัวก็มีโอกาสที่ยีนดื้อยาเหล่านี้จะแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียชนิดอื่นได้ (4)

แม้ว่าอัตราการดื้อยาของกลุ่ม carbapenems ในวงศ์ Enterobacteriaceae ยังต่ำมากหรือบางแห่งยังให้ผลไวร้อยละ 100 แต่ในช่วง 10 ปีหลังเริ่มมีรายงานเชื้อวงศ์นี้ดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ กลไกหนึ่งที่สำคัญคือเชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenemase class A หรือ class B ส่วน class D พบน้อยมาก เอนไซม์ class B หรือ MBL ที่พบในวงศ์ Enterobacteriaceae ได้แก่ ตระกูล IMP หรือ VIM ซึ่งส่วนใหญ่พบในยุโรปและเอเชีย เนื่องจากยีนที่กำหนดเอนไซม์ทั้งสองตระกูลนี้พบอยู่บน integron จึงมีโอกาสแพร่กระจายในแบคทีเรียวงศ์เดียวกันหรือต่างวงศ์กันได้ (4) แต่ในช่วง 2-3 ปีหลังนี้มีการแพร่กระจายของเอนไซม์ class A carbapenemase คือเอนไซม์ *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) ในแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (5) เอนไซม์ KPC มีรายงานครั้งแรกใน *K. pneumoniae* จากสหรัฐอเมริกา (6) และพบในสหรัฐอเมริกาเท่านั้น ปัจจุบันพบเอนไซม์ KPC กระจายไปทั่วทุกภูมิภาคของโลก เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน ไคลัมเบีย เปรูโตริโก ฝรั่งเศส อิสราเอล อังกฤษ

สกอตแลนด์ และอเมริกาใต้ นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ KPC ในจีโนมอื่นๆของวงศ์ *Enterobacteriaceae* ด้วย เช่น *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Enterobacter* spp. และ *Serratia marcescens* นอกจากนี้ยีนที่กำหนดเอนไซม์ KPC ยังพบบนพลาสมิดและมี transposon เกี่ยวข้องด้วย (5) เมื่อเร็วๆนี้ได้มีรายงานพบเอนไซม์ MBL ชนิดใหม่คือเอนไซม์ New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1) ใน *K. pneumoniae* และ *E. coli* จากผู้ป่วยชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในสวีเดนและมีประวัติการรักษาที่กรุงนิวเดลี ประเทศอินเดียมาก่อน พบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ NDM-1 คือตัวยาทันจุลชีพเกือบทั้งหมดรวมทั้งยาในกลุ่ม carbapenems (7) และในขณะนี้ได้มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อมีตัวยานี้ไปยังประเทศต่างๆทั่วโลก เช่น อังกฤษ แคนาดา เบลเยียม ฝรั่งเศส เคนยา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ และไต้หวัน (8,9) เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานพบเอนไซม์ class D carbapenemase คือเอนไซม์ OXA-48 ซึ่งพบครั้งแรกใน *K. pneumoniae* จากตุรกี (10) จากประเทศต่างๆมากขึ้น เช่น เบลเยียม เลบานอน สหราชอาณาจักร อินเดีย อาร์เจนตินา ฝรั่งเศส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ OXA-48 ในจีโนมอื่นๆของวงศ์ *Enterobacteriaceae* เช่น *E. cloacae*, *E. coli*, *C. freundii*, *Providencia rettgeri* เป็นต้น ยีนนี้พบอยู่บนพลาสมิดซึ่งมีส่วนช่วยในการระบาดของยีนชนิดนี้ไปยังแบคทีเรียอื่นได้ (11)

มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยโรคติดเชื้อจากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ KPC มีอัตราตายสูงกว่าผู้ป่วยโรคติดเชื้อจากเชื้อที่ไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems และพบว่าเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase อาจให้ผลไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems การแสดงออกของการดื้อยาในกลุ่มนี้อาจชัดเจนมักมีกลไกอื่นร่วมด้วยโดยเฉพาะกลไกการขาดหายไปหรือการดัดแปลง porin ดังนั้นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase แต่ยังไม่ให้ผลไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems จึงไม่สามารถตรวจพบได้ในห้องปฏิบัติการ (5)

ในโรงพยาบาลศรีนครินทร์มีรายงานพบ *P. aeruginosa* ที่ผลิตเอนไซม์ MBL ชนิด VIM ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2001 (12) และจากการสำรวจเพิ่มเติมในปี ค.ศ. 2006 พบ *P. aeruginosa* ที่ผลิตเอนไซม์ MBL ชนิด IMP เพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามพบเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ MBL เพียงร้อยละ 12.2 ของเชื้อที่ดื้อยา imipenem หรือเพียงร้อยละ 3.3 ของเชื้อทั้งหมด (13) ส่วนวงศ์ *Enterobacteriaceae* ยังไวต่อยา imipenem ร้อยละ 100 อย่างไรก็ตามเชื้อวงศ์นี้โดยเฉพาะ *K. pneumoniae* และ *E. coli* ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL พบในอัตราสูงขึ้น เมื่อมีการใช้ยา carbapenems ซึ่งเป็นยาทางเลือกลำดับแรกในการรักษาโรคติดเชื้ออันตรายจากเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ ESBL มากขึ้นก็มีโอกาสเกิดการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดื้อยา (selective pressure) ตามมา เนื่องจากมีรายงานพบเอนไซม์ VIM และ IMP ในโรงพยาบาลแห่งนี้จึงมีโอกาสมองพบในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้ เช่นเดียวกับที่พบในประเทศอื่นๆ หรืออาจพบเอนไซม์ class A carbapenemase ได้เช่นกัน เท่าที่ทราบในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* และเชื้อที่ผลิตเอนไซม์นี้อาจให้ผลไวต่อยาในกลุ่ม carbapenems ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์นี้เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับแพทย์และหน่วยงานควบคุมโรคติดเชื้อในการเฝ้าระวังเชื้อมีตัวยานี้ไม่ให้เกิดการแพร่กระจายและเป็นปัญหาในการรักษาในอนาคตเช่นเดียวกับปัญหาที่กำลังประสบใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii*

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ carbapenemase ในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์

2.2 ตรวจหาชนิดของเอนไซม์ carbapenemase

2.3 ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase

2.4 แยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase

### 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

ตรวจกรองการผลิตเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์จำนวนประมาณ 5,000 ตัวอย่าง ตรวจหายีนที่กำหนดเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี PCR พร้อมทั้งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพต่างๆ และแยกสายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase

### 4. วิธีการดำเนินการวิจัย

- 4.1 เก็บเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่แยกได้จากสิ่งส่งตรวจของผู้ป่วยโรงพยาบาลศรีนครินทร์จากหน่วยจุลชีววิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จำนวนประมาณ 5,000 ตัวอย่าง
- 4.2 ตรวจกรองการผลิตเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อทั้งหมดโดยวิธี disc diffusion
- 4.3 ตรวจยีนยีนเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธีทางพีโนไทป์ ได้แก่ วิธี modified Hodge วิธี phenylboronic acid-carbapenem combined disc และวิธี EDTA-carbapenem combined disc
- 4.4 ตรวจหายีนที่กำหนดเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี PCR และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่พบ
- 4.5 ทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพต่างๆ ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี disc diffusion และตรวจหาค่า MIC ต่อยา imipenem, meropenem และ ertapenem โดยวิธี agar dilution
- 4.6 แยกสายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase โดยวิธี ERIC-PCR

### 5. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องจากเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL มีอัตราความชุกสูงขึ้น และโรงพยาบาลศรีนครินทร์เป็นแหล่งที่มีเชื้อดื้อยาหลายชนิดโดยเฉพาะ *P. aeruginosa* ที่ผลิตเอนไซม์ MBL เมื่อมีการใช้ยาต้านจุลชีพ carbapenems ในการรักษาโรคติดเชื้อจากวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL มากขึ้น จึงมีโอกาสเกิดการคัดเลือกเชื้อดื้อยาได้ หากตรวจพบเชื้อวงศ์นี้คือต่อยาต้านจุลชีพ carbapenems เป็นเรื่องที่ต้องตระหนักอย่างมากเนื่องจากเป็นยาทางเลือกลำดับแรกที่ใช้ในการรักษา ถ้าเชื้อดื้อต่อยาต้านจุลชีพนี้แล้วจะมียาที่ใช้ในการรักษาจำกัดและในอนาคตจะเกิดปัญหาเช่นเดียวกับ *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ดังนั้นการสำรวจเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae จากสิ่งส่งตรวจที่ส่งมายังห้องปฏิบัติการจะเป็นการเฝ้าระวังเบื้องต้นเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับแพทย์และหน่วยงานควบคุมโรคติดเชื้อของโรงพยาบาลต่อไป

### 6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบความชุกของเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อแพทย์ในการเลือกใช้ยาต้านจุลชีพที่เหมาะสมในการรักษาผู้ป่วย และการใช้ยาต้านจุลชีพในโรงพยาบาลเท่าที่จำเป็นเพื่อชะลอการดื้อยาของแบคทีเรีย นอกจากนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังเชื้อหรือยีนดื้อยานี้สำหรับหน่วยงานควบคุมโรคติดเชื้อของโรงพยาบาลต่อไป

### 7. ทบทวนเอกสาร

$\beta$ -lactams เป็นสารต้านจุลชีพกลุ่มหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ยาต้านจุลชีพนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งขั้นตอนสุดท้ายของการสังเคราะห์ peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยยับยั้งกับ penicillin-binding protein (PBP) ซึ่ง

เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สร้างพันธะระหว่างสายของ peptidoglycan เกิดเป็นร่างแห (cross-link) ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง เมื่อยาจับกับ PBP ทำให้ PBP ทำงานไม่ได้เป็นผลทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรงและเซลล์แตกสลายในที่สุด ยากลุ่ม  $\beta$ -lactams แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ penicillins, cephalosporins, monobactams, carbapenems และ  $\beta$ -lactamase inhibitors (1)

ยากลุ่ม cephalosporins รุ่นที่ 3 เช่น cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime ถูกผลิตขึ้นมาเพื่อใช้รักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ที่สลายยารุ่นที่ 1 และ 2 แต่ในปี ค.ศ. 1991 ก็พบเชื้อดื้อยารุ่นที่ 3 โดยกลไกการผลิตเอนไซม์ ESBL และปัจจุบันพบได้ทั่วโลก (2) นอกจากนี้ยังพบเชื้อวงศ์นี้ดื้อต่อยารุ่นที่ 3 โดยกลไกการผลิตเอนไซม์ plasmid-mediated AmpC (pAmpC) ปัจจุบันมีรายงานจากทั่วโลกเช่นเดียวกับเอนไซม์ ESBL (3)

ยากลุ่ม carbapenems เช่น ยา imipenem และ meropenem ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้กว้างที่สุดโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเพราะทนต่อเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ได้หลายชนิดรวมทั้งเอนไซม์ ESBL และ AmpC จึงเป็นยาลำดับแรกในการรักษาโรคติดเชื้อรุนแรงจากแบคทีเรียแกรมลบที่ดื้อต่อยาหลายชนิด เช่น *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ตลอดจนวงศ์ Enterobacteriaceae ที่ผลิตเอนไซม์ ESBL หรือ AmpC โดยเฉพาะ *K. pneumoniae* และ *E. coli* อย่างไรก็ตามมีรายงานการดื้อยากลุ่ม carbapenems มากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะใน *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* ซึ่งพบทั่วโลกและเป็นปัญหาอยู่ในขณะนี้เนื่องจากมียาที่ใช้รักษาจำกัดหรือมีทางเลือกน้อยลง ส่วนเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae ยังพบการดื้อยากลุ่ม carbapenems น้อย (4)

กลไกการดื้อยากลุ่ม carbapenems กลไกแรกคือการเปลี่ยนแปลงหรือขาดหายไปของโปรตีน porin ของแบคทีเรียซึ่งเป็นทางที่ยาจะผ่านเข้าไปในเซลล์ ทำให้ยาเข้าไปในเซลล์ได้น้อยลง ร่วมกับเชื้อผลิตเอนไซม์ AmpC  $\beta$ -lactamases ในปริมาณที่สูงขึ้น กลไกที่สองคือแบคทีเรียดัดแปลง PBP ทำให้ยาจับกับ PBP ได้น้อยลงหรือไม่ได้ ยาจึงออกฤทธิ์ไม่ได้ กลไกนี้พบน้อยในแบคทีเรียแกรมลบ กลไกที่สามคือเชื้อขับยาออกนอกเซลล์ (efflux pump) มากขึ้น และกลไกสุดท้ายคือเชื้อผลิตเอนไซม์  $\beta$ -lactamase ที่สามารถสลายยากลุ่ม carbapenems โดยตรง เรียกชื่อโดยรวมว่า carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase หรือ carbapenemase เอนไซม์ carbapenemase ที่ผลิตโดยวงศ์ Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งที่ไม่หมักยอยน้ำตาล (non-fermentative Gram-negative bacilli หรือ NFB) เช่น *P. aeruginosa* และ *A. baumannii* แบ่งได้เป็น 3 พวกโดยอาศัยการจำแนกทางอนุชีวโมเลกุล ได้แก่ class A, B และ D (4)

class A carbapenemase เป็น serine active site  $\beta$ -lactamase มีคุณสมบัติที่สำคัญคือถูกยับยั้งได้ด้วย clavulanic acid เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ NMC-A, IMI-1, SME-1, SME-2 และ KPC-1 เอนไซม์ NMC-A มีรายงานครั้งแรกใน *E. cloacae* ที่ประเทศฝรั่งเศส (14) เอนไซม์ IMI-1 พบครั้งแรกใน *E. cloacae* ที่สหรัฐอเมริกา (15) เอนไซม์ SME-1 พบครั้งแรกใน *Serratia marcescens* ซึ่งแยกได้ที่ประเทศอังกฤษ (16) ต่อมาพบเอนไซม์ SME-1 และ SME-2 ใน *S. marcescens* ที่สหรัฐอเมริกา (17) ยีนของเอนไซม์เหล่านี้พบอยู่บนโครโมโซม ส่วนเอนไซม์ชนิดสุดท้ายคือ KPC-1 ผลิตโดย *K. pneumoniae* พบในสหรัฐอเมริกา (6) เอนไซม์เหล่านี้ยกเว้นตระกูล KPC มีรายงานจากประเทศที่พบครั้งแรกเท่านั้นและพบเฉพาะในแบคทีเรียวงศ์ Enterobacteriaceae ในระยะ 10 ปีหลังนี้เอนไซม์ตระกูล KPC ซึ่งเดิมพบเฉพาะในสหรัฐอเมริกาเริ่มพบในประเทศอื่นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เช่น อิสราเอล อังกฤษ นอร์เวย์ สวีเดน สาธารณรัฐประชาชนจีน เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบในจีนสัณฐานนอกเหนือจาก *K. pneumoniae* ได้แก่ *E. cloacae*, *E. coli*, *Salmonella cubana*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *S. marcescens* รวมทั้ง *P. aeruginosa* ด้วย นอกจากนี้ยีนที่กำหนดเอนไซม์ KPC ยังพบบนพลาสมิดและมี transposon เกี่ยวข้องด้วย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยในการ

แพร่กระจายของยีนดื้อยาในกลุ่มนี้ (5) เมื่อเร็วๆนี้มีคณะผู้วิจัยหลายกลุ่มได้เสนอวิธีทดสอบเอนไซม์ class A carbapenemase เช่น วิธี modified imipenem-Hodge, วิธี boronic acid เป็นต้น (18,19)

class B carbapenemase หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) เป็นเอนไซม์ที่ต้องการ zinc ในการออกฤทธิ์ มีคุณสมบัติคือไม่ถูกยับยั้งโดย clavulanic acid แต่ถูกยับยั้งโดย EDTA ในธรรมชาติมีเชื้อหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ MBL ได้จึงดื้อต่อยาในกลุ่ม carbapenems (intrinsic resistance) เช่น *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila* เป็นต้น ยีนของเอนไซม์ MBL ที่พบในธรรมชาตินี้มักพบอยู่บนโครโมโซมและยังไม่มีรายงานว่ามี การถ่ายทอดยีนนี้ไปยังแบคทีเรียอื่น ๆ ได้ เอนไซม์ MBL ที่จัดเป็น acquired resistance ที่สำคัญคือตระกูล IMP และ VIM เอนไซม์ IMP-1 พบครั้งแรกใน *P. aeruginosa* และ *S. marcescens* ที่ประเทศญี่ปุ่น ต่อมา มีรายงานพบยีนนี้บนพลาสมิดและยังพบอยู่บน integron ซึ่งเป็นการเตือนว่ายีนนี้อาจจะแพร่กระจายไปยังแบคทีเรียอื่นได้ ซึ่งก็เป็นจริงในเวลาต่อมาเมื่อพบเอนไซม์ IMP-1 ใน *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* และ *Alcaligenes xylosoxidans* โดยพบยีนดื้อยานี้อยู่บน integron เช่นเดียวกับที่พบใน *S. marcescens* การค้นพบนี้แสดงให้เห็นว่า integron มีส่วนช่วยในการแพร่ระบาดของยีนดื้อยา ในช่วงแรกมีรายงานพบเอนไซม์ IMP-1 ในประเทศญี่ปุ่นเท่านั้น จนกระทั่งปี ค.ศ. 1996 จึงพบที่ประเทศสิงคโปร์ หลังจากนั้น มีรายงานเอนไซม์ IMP ชนิดต่างๆทั้งในยุโรปและเอเชีย และพบทั้งใน NFB และวงศ์ *Enterobacteriaceae* ส่วนเอนไซม์ตระกูล VIM มีรายงานพบครั้งแรกใน *P. aeruginosa* จากประเทศอิตาลี ยีนดื้อยาตระกูลนี้พบบน integron เช่นเดียวกัน ปัจจุบันมีรายงานเอนไซม์ตระกูล VIM ทั้งในยุโรปและเอเชีย โดยพบได้ทั้งในวงศ์ *Enterobacteriaceae* และ NFB และมีแนวโน้มพบมากขึ้นเรื่อยๆ (4) ในปี ค.ศ. 2009 มีรายงานเอนไซม์ MBL ชนิดใหม่คือ NDM-1 ใน *K. pneumoniae* ซึ่งแยกได้จากผู้ป่วยโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบชาวอินเดียที่อาศัยอยู่ในสวีเดนและที่มีประวัติพักรักษาในโรงพยาบาลที่เมืองนิวเดลี ประเทศอินเดียมาก่อน (7) และในปลายปี ค.ศ. 2009 พบการกระจายของเอนไซม์ NDM-1 ไปทั่วสหราชอาณาจักร (9) เชื้อที่ผลิตเอนไซม์ NDM-1 ดื้อต่อยาในกลุ่ม penicillins, cephalosporins และ carbapenems เอนไซม์ NDM-1 มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างจากเอนไซม์ MBL ชนิดอื่น และยีนที่กำหนดเอนไซม์ชนิดนี้พบบนพลาสมิดทำให้ถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้ง่าย ปัจจุบันมีรายงานพบเอนไซม์ NDM-1 ในหลายประเทศ เช่น แคนาดา ฝรั่งเศส เบลเยียม เคนยา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ และ ไต้หวัน ซึ่งผู้ป่วยส่วนใหญ่มีประวัติเดินทางกลับจากประเทศอินเดีย ดังนั้นการกระจายของพลาสมิดที่มียีนดื้อยานี้จึงเป็นที่น่าวิตกกังวลในปัจจุบัน (8,9)

class D carbapenemase หรือ OXA carbapenemase เป็น serine active site  $\beta$ -lactamase มีคุณสมบัติคือไม่ถูกยับยั้งทั้งโดย clavulanic acid และ EDTA เอนไซม์ OXA มีหลายชนิดและมีความสามารถในการสลายยาในกลุ่ม  $\beta$ -lactams แตกต่างกันไป เอนไซม์ OXA ที่สลายยาในกลุ่ม carbapenems ได้ หรือเรียกว่า OXA carbapenemases ส่วนใหญ่พบใน *A. baumannii* ปัจจุบันมีรายงานพบเอนไซม์นี้จากประเทศต่างๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆทั้งยุโรปและเอเชีย ซึ่งแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่ม OXA-23, กลุ่ม OXA-24, กลุ่ม OXA-51 และกลุ่ม OXA-58 (20) อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานพบ transposon หรือ integron ที่เกี่ยวข้องกับยีนดื้อยาเหล่านี้ เอนไซม์ OXA carbapenemase ที่มีรายงานในแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* พบว่ามี 2 ชนิดคือ เอนไซม์ OXA-23 ที่ผลิตโดย *Proteus mirabilis* จากฝรั่งเศส (21) และ OXA-48 ซึ่งมีรายงานครั้งแรกใน *K. pneumoniae* ที่แยกได้จากผู้ป่วยในตุรกี (10) เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานเอนไซม์ OXA-48 จากประเทศต่างๆ มากขึ้น เช่น เบลเยียม เลบานอน สหราชอาณาจักร อินเดีย อาร์เจนตินา ฝรั่งเศส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ OXA-48 ในจีโนมอื่นๆของวงศ์ *Enterobacteriaceae* เช่น *E. cloacae*, *E. coli*, *C. freundii*, *Providencia rettgeri* เป็นต้น ยีนดื้อยานี้พบอยู่บนพลาสมิดซึ่งมีส่วนช่วยในการระบาดของยีนชนิดนี้ไปยังแบคทีเรียอื่นได้ (11)

ปัจจุบัน Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (22) ได้แนะนำวิธีตรวจกรองและตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase ของแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* โดยวิธีตรวจกรอง ได้แก่ วิธี disc diffusion ใช้แผ่นยา ertapenem 10 ไมโครกรัมหรือ meropenem 10 ไมโครกรัม (ไม่แนะนำให้ใช้แผ่นยา imipenem เพราะให้ผลไม่ดี) อ่านผลเป็นวงเมื่อให้ขนาด inhibition zone ต่อยา ertapenem อยู่ในช่วง 16-21 มิลลิเมตรและยา meropenem อยู่ในช่วง 14-21 มิลลิเมตร เชื้อที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจกรองนำไปตรวจยืนยันด้วยวิธี modified Hodge โดยใช้แผ่นยา ertapenem 10 ไมโครกรัมหรือ meropenem 10 ไมโครกรัม และใช้ *E. coli* ATCC 25922 เป็น indicator strain การควบคุมคุณภาพใช้ *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 เป็นเชื้อควบคุมผลบวกและ *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1706 เป็นเชื้อควบคุมผลลบ หากพบเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 รอบๆเชื้อที่ทดสอบเจริญเข้าไปใน inhibition zone หรือเห็นเป็นรอยเว้าเข้าไป แสดงว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ carbapenemase ได้ สำหรับเชื้อที่ให้ผลบวกกับวิธีตรวจกรองและวิธี modified Hodge ควรทดสอบค่า MIC ต่อยากลุ่ม carbapenems ก่อนรายงานผล ถ้าเชื้อให้ผลบวกกับวิธี modified Hodge แต่ให้ค่า MIC ในช่วงที่แปลผลว่าไวต่อยาคือให้ค่า MIC ต่อยา ertapenem  $\leq 2$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ต่อยา imipenem หรือ meropenem  $\leq 4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้รายงานค่า MIC ของเชื้อโดยไม่ต้องแปลผลและให้ข้อคิดเห็นว่า “เชื้อนี้ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ได้และยังไม่ทราบประสิทธิภาพของยาในกลุ่ม carbapenems ในการรักษาการติดเชื้อจากวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ผลิตเอนไซม์ carbapenemase ได้แต่เชื้อยังไวต่อยากลุ่มนี้เมื่อทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*)” ส่วนเชื้อที่ให้ผลลบกับวิธี modified Hodge ให้แปลผลค่า MIC ตามเกณฑ์ของ CLSI

การตรวจกรองและตรวจยืนยันเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อวงศ์ *Enterobacteriaceae* ตามวิธีของ CLSI นี้พบว่ามีควาไมและความจำเพาะมากกว่าร้อยละ 90 ในการตรวจหาเอนไซม์ KPC ในเชื้อวงศ์นี้ในสหรัฐอเมริกา ส่วนควาไมและความจำเพาะของการทดสอบนี้สำหรับการตรวจหาเอนไซม์ MBL ที่ผลิตในระดับต่ำๆรวมทั้งการตรวจหาเอนไซม์ carbapenemase ในแบคทีเรียแกรมลบทรงแท่งที่ไม่หมักย่อยกลูโคส (non-fermenting Gram negative bacilli หรือ NFB) ยังไม่มีข้อมูล

อย่างไรก็ตามเมื่อเร็วๆนี้ CLSI ได้กำหนดเกณฑ์ใหม่สำหรับการแปลผลการทดสอบควาไมของแบคทีเรียวงศ์ *Enterobacteriaceae* ต่อยากลุ่ม carbapenems (23) หากห้องปฏิบัติการใช้เกณฑ์ใหม่ก็ไม่จำเป็นต้องทดสอบเอนไซม์ carbapenemase อย่างไรก็ตามการทดสอบเอนไซม์ carbapenemase ในเชื้อเหล่านี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาทางระบาดวิทยาต่อไป

นอกจากวิธีของ CLSI แล้วสามารถทดสอบเอนไซม์ class A carbapenemase โดยอาศัยหลักการคือเอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งด้วย boronic acid ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น combined disc, double disc synergy เป็นต้น (24) ส่วนการทดสอบเอนไซม์ class B carbapenemase หรือ MBL อาศัยหลักการคือเอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งด้วย EDTA ซึ่งทดสอบได้หลายวิธี เช่น combined disc, double disc synergy, MBL Etest เป็นต้น (25) อย่างไรก็ตามวิธีที่ใช้เป็น gold standard สำหรับการทดสอบเอนไซม์เหล่านี้คือการตรวจหาเอนไซม์ที่กำหนดเอนไซม์ carbapenemase โดยใช้เทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล เช่น polymerase chain reaction หรือการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยตรง (26,27)