مروری بر روش‌های رایج آزمایشگاهی شناسایی کارباپنمازها در باسیل‌های گرم منفی

ابراهیم کوهساری: دانشجوی دکترای تخصصی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. ebrahim.msph@gmail.com
عابد زاهدی بیالوائی: دانشجوی دکترای تخصصی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. abedzahedi@gmail.com
سارا عباسیان: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران . sabassian460@gmail.com
هاشم فخر یاسری: متخصص گوارش، استادیار، گروه طب داخلی، بیمارستان فیروزگر، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
حسین صمدی کفیل: دکترای تخصصی، استادیار، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. ebrahim1340@yahoo.com
رخساره محمد زاده: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. rmohamadi@gmail.com
***محمد رهبر**: دکترای تخصصی، استاد، گروه میکروب شناسی، آزمایشگاه مرجع سلامت ،وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). rahbar.reflab@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

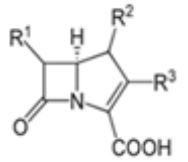
چکیده

شیوع انتروباکتریاسه تولیدکننده کارباپنماز در طی یک دهه‌ی گذشته با افزایش چشمگیری روبه رو بوده است. شناسایی این دسته از باکتری‌ها بدلیل اینکه همیشه یک میزان حداقل غلظت مهاری برای کارباپنم‌ها در طیف مقاومتشان نشان نمی‌دهند، اهمیت دارد. به همین دلیل شناسایی این باکتری‌ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی یک موضوع با اهمیت برای انتخاب طرح درمانی مناسب و اجرای اقدامات کنترل عفونت است. غربالگری باکتری‌های تولیدکننده کارباپنماز با استفاده از روش‌های مختلف فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌گیرد، با این حال هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند. هدف از این مطالعه مروری بررسی و معرفی روش‌های رایج موجود جهت شناسایی کارباپنماز ها می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: کارباپنماز، انتروباکتریاسه ، مقاومت آنتی بیوتیکی، شناسایی، کنترل عفونت

مقدمه

کارباپنم‌ها به‌عنوان مثال، مروپنم (MEM) و ایمی‌پنم (IPM) با طیف فعالیت ضد باکتریایی گسترده، یک کلاس از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام متفاوت از پنی‌سیلین هستند. ساختار کارباپنم در شکل ۱ آورده شده است. کارباپنم‌ها اولین بار در سال ۱۹۸۰ میلادی معرفی شدند. آن‌ها معمولاً به‌عنوان آخرین انتخاب در درمان عفونت‌های جدی ناشی از سویه‌های مقاوم چند دارویی باسیل‌های گرم منفی استفاده می‌شوند. مقاومت به کارباپنم‌ها در میان باکتری‌های گرم منفی (MDR-GNB) عمدتاً مرتبط با تولید کارباپنمازها می‌باشد. بخاطر ارتباط کارباپنمازها در مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سایر کلاس‌های آنتی‌بیوتیک‌ها، مانند فلوروکینولون‌ها، کوتریموکسازول و آمینوگلیکوزیدها، این مسئله در حال حاضر به یک نگرانی فزاینده در مراکز بهداشتی درمانی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱-۳). بر اساس طبقه‌بندی آمبلر (Ambler)، آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کارباپنم به سه گروه مجزا A، B و D تقسیم می‌شوند. از انواع مهم کلاسA این گروه شامل نوع KPC (بیشتر در سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه) و نوع GES (بیشتر در اسینتو بومانی) می‌باشد. این کلاس عمدتاً به‌صورت کروموزومی کدگذاری می شود و شامل کارباپنمازهای حساس به مهارکننده کلاولانیک اسید هستند. کلاس B آمبلر، متالو-



شکل ۱- ساختار یک کارباپنم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

بتالاکتامازهـــایی (beta lactamase Metallo: MBL) را شامل می‌شوند که عمدتاً متشکل از انواع GIM، IMP، VIM و NDM مـی‌باشـد. در آخـر، کلاس D آمبلر شامل کارباپنمازهای انـواع OXA-23، OXA-24/40، OXA-58 و OXA-143 در گونه‌های اسینتوباکتر و نوع OXA-48 در بـاکتری هـای انتروباکتریاسـه مـی‌باشـند. وجـود تغییـرات پورینی در کارباپنمازهای کلاس D اغلـب مقاومـت بیشـتر را ایجـاد مـی‌کننـد. بـر اسـاس مطالعـات مولکولی، آنزیم‌های هیدرولیز کننده کاربـاپنم مـی تواند به دو گروه طبقه‌بندی شوند: آنزیم‌های سرین کارباپنماز و متالوبتالاکتاماز. آنزیم سرین کارباپنماز دارای یک سرین در سـایت فعـال خـود می‌باشـد. متالوبتالاکتامازها برای فعالیت نیازمند کاتیون‌هـای دو ظرفیتی مثـل روی، بـه‌عنوان کوفـاکتور فلـزی است. ژن‌های کارباپنمازها عمـدتاً بـر روی عناصـر ژنتیکی بسیار متحرک نظیـر پلاسـمیدهـای قابـل انتقال قرار دارند، بنابراین می‌توانند بـه سـرعت در بین باکتری های مختلف منتشـر و سـبب تشـدید مقاومت شـوند. ایـن پتانسـیل انتشـار مقاومـت در چندین شیوع با مرگ و میر بالا گزارش شده است. مراکـز کنتـرل و پیشـگیری بیمـاری (CDC) غربـالگری پـری رکتـال و جداسـازی از بیمـاران کلـونیزه شـده و یـا آلـوده بـه انتروباکتریاسـه تولیدکننده کارباپنماز را توصیه می‌کند (۴-۷).

سرین کارباپنمازها متعلق به کلاس A یا کـلاس D هستند. خصوصیات بیشـتر ایـن کـلاس هـا در جدول ۱ آورده شده است. ایـن گـروه از آنـزیم هـا معمولاً سبب مقاومت به کارباپنم در انتروباکتریاسه و یا گونه های اسینتوباکتر می‌شـوند. مقاومـت بـه کارباپنم‌ها به دلایل مختلفی از قبیل کـاهش بیـان پـروتئین هـای غشـای خـارجی، افـزایش فعالیـت سیســـتم Efflux و تولیـــد بتـــا لاکتامازهـــای کارباپنمازی که مـی‌تواننـد کارباپنم‌هـا را بـا عمـل هیدرولیز غیر فعال کنند، مرتبط می‌داننـد. ظهـور مقاومت به آنتی‌بیوتیـک کاربـاپنم نظیـر ژن‌هـای bla_{KPC}بـر روی عناصـر متحـرک ژنتیکـی نظیـر پلاسمیدها واقع شده است که سبب تسهیل انتقال آنها در میـان ایزولـه هـای بـالینی انتروباکتریاسـه بخصوص کلبسیلا پنومونیه می‌شوند. ظهور مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان انتخاب آخـر درمـان آنتی‌بیـــوتیکی، درمـــان عفونت‌هـــای ناشـــی از پاتوژن‌های مقاوم به دارو (باکتری‌های گرم منفـی) را پیچیده‌تر کرده است (۱،۸،۹).

باکتری‌های گرم منفی تولیـد کننـده کارباپنمـاز می‌توانند عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها، از جملـه بـــاکتریمی، انـــدوکاردیت، عفونت‌هـــای زخـــم، عفونت‌های دستگاه ادراری و پنومونی بیمارسـتانی باشند. این عفونت‌ها اغلب با میزان مرگ و میر بالا، شکست درمان و بستری شـدن طـولانی مـدت در بیمارستان مرتبط هستند؛ بنابراین، بـرای انتخـاب طرح درمان آنتی‌بیوتیکی، بـه ویـژه در بخش‌هـای

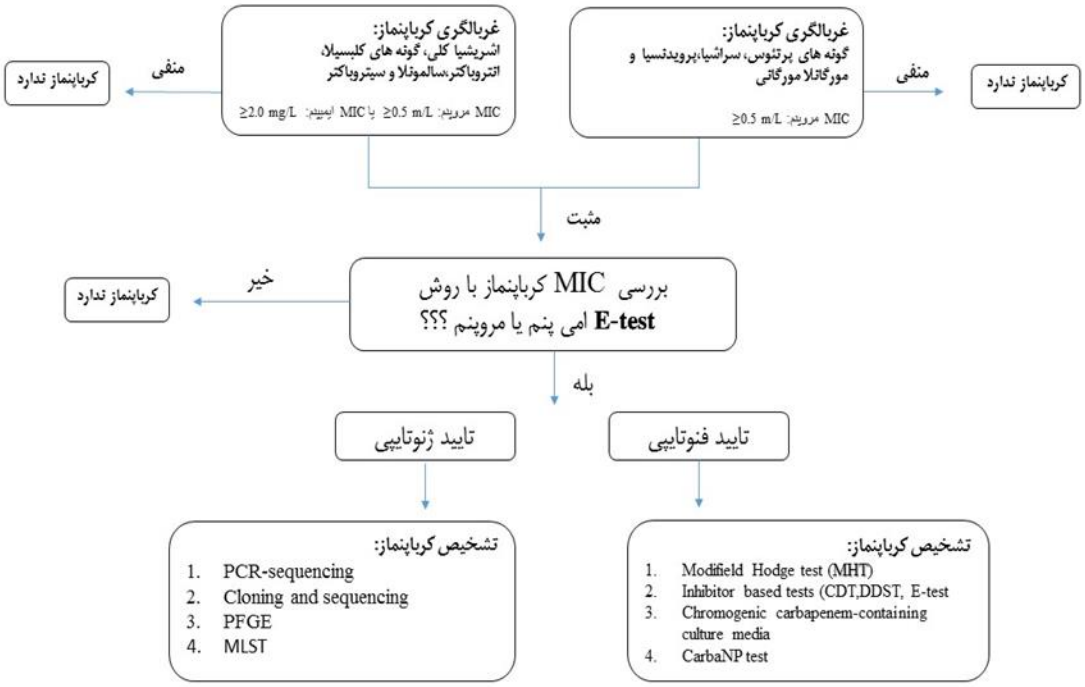
جدول ۱- سوبسترا و پروفایل‌های مهاری کارباپنماز ها

کلاس‌های مولکولی	گروه‌های عملکردی		پروفایل هیدرولیز				پروفایل مهاری	
		آنزیم	پنی سیلین ها	سفالوسپورین ها	آزترونام	کارباپنم ها	EDTA	کلاولانیک اسید
		NMC	+	+	+	+	_	+
A	2f	IMI	+	+	+	+	_	+
		SME	+	+	+	+	_	+
		KPC	+	+	+	+	_	+
		GES	+	+	_	±	_	+
		IMP	+	+	_	+	+	_
B	3	VIM	+	+	_	+	+	_
		GIM	+	+	_	+	+	_
		SPM	+	+	_	+	+	_
D	2d	OXA	+	+	_	±	_	±

+: هیدرولیز قوی، ±: هیدرولیز ضعیف، _: بدون هیدرولیز

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, NMC: Not metallo enzyme carbapenemase, SME: *Serratia marcescens* enzyme, KPC: K. pneumonia carbapenemases, GES: Guiana extended spectrum, VIM: Verona integron-encoded metallo-beta-lactamases, GIM: German imipenemase, SPM: Sao Paulo metallo-beta-lactamases.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]



شکل ۲- طرح تشخیص کارباپنماز های در انتروباکتریاسه. قطر هاله نقطه انفصال غربالگری برای مروپنم در ≥ ۲۳ میلی متر با دیسک ۱۰ میکروگرم و برای اشرشیاکلی، گونه‌های کلبسیلا و انتروباکتر قطر هاله نقطه انفصال غربالگری برای ایمی پنم با دیسک ۱۰ میکروگرم ≥ ۲۱ میلی متر تنظیم شده است(۷).

مراقبت‌های ویژه (ICU) و اجرای اقدامات کنترل عفونت، تشخیص دقیق و سریع بیماران در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی یک موضوع با اهمیت هستند. تشخیص این میکروارگانیسم ها با مشکلاتی همراه است، بطوری که روش‌های شناسایی کارباپنمازها هنوز به خوبی استاندارد نشده اند. سنجش ایده آل شناسایی کارباپنماز باکتری‌های گرم منفی مقاوم به دارو برای اطمینان از اجرای به موقع اقدامات کنترل باید در زمان کوتاه انجام شود و قابلیت تشخیص هیدرولیز کارباپنم که توسط کلاس‌های مختلف از آنزیم انجام می‌شود را داشته باشد. این مسئله می‌تواند توسط مشکلاتی که شناسایی ایزوله‌های تولید کننده کارباپنماز بهمراه دارد، چالش برانگیز باشد. از آنجایی که حداقل غلظت‌های بازدارنده (MICs) کارباپنم‌ها می‌تواند بالا باشد، اما رنج حساسیت در اسینتو بومانی و انتروباکتریاسه پایین است؛ بنابراین، تصور می‌شود که تشخیص فعالیت این آنزیم‌ها عملکرد بسیار مهمی در بسیاری از مراکز پزشکی است و به منظور کنترل انتشار آنها نیازمند روش‌های قوی غربالگری استاندارد برای تشخیص مؤثر باکتری های تولید کننده کارباپنماز است. شناسایی باکتری‌های تولید کننده KPC به دلیل بیان ناهمگن مقاومت β-لاکتامی می‌تواند چالش برانگیز باشد. برای تشخیص، چندین روش غیر مولکولی مطالعه شده است که عمدتاً بر اساس استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی است. تکنیک‌های مولکولی روش‌های استاندارد تشخیص کارباپنماز نیز موجود می باشند. طرح تشخیص کلی شامل یک مرحله غربالی است که توسط یک مرحله فنوتیپی و ژنتیکی در شکل ۲ آورده شده است تأیید می‌شود (۱ و ۷ و ۱۰ و ۱۱).

هدف از ارائه این مقاله مروری، فراهم نمودن خلاصه‌ای از روش‌های موجود در شناسایی کارباپنمازها به همراه شرح نقاط ضعف و قوت هر یک از این روش‌ها می‌باشد.

چالش‌های شناسایی تشخیص آزمایشگاهی کارباپنمازها

شناسایی ایزوله‌های تولید کننده KPC به خصوص در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی مسئله چالش برانگیز است. حضور KPC همیشه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

مربوط به مقاومت سطح بالا به کاربا‌پنم‌ها نبوده، ولی ممکن است سبب نوسانات MIC در محدوده حساس و یا متوسط شود. این افزایش MIC ممکن است توسط پرسنل آزمایشگاه مورد توجه قرار نگیرد مگر اینکه آزمایش‌های تأییدی فنوتیپی به کار گرفته شوند. عوامل شناخته شده مداخله کننده با تشخیص کاربا‌پنماز شامل ماده تلقیح شده ناکافی مورد استفاده در تست حساسیت و تغییرات روزانه در مقادیر MIC می باشند. با مقایسه روش‌های شناسایی، به نظر می‌رسد که روش مرجع میکرودایلوشن بالاترین حساسیت. (۹۰٪) را دارد، در حالی که سیستم‌های خودکار متغیرترین نتایج را ارائه می‌کنند. تشخیص نادرست KPC ممکن است در بیماران منجر به درمان ناموفق شود (۱۲-۱۵). با وجود پیشرفت های صورت گرفته در روش‌های کشت و محیط‌های کشت غربالی، این روش‌ها هنوز هم نیاز به انکوباسیون طولانی مدت دارند. روش‌های بیوشیمیایی زمان انجام کوتاهتر و حساسیت و اختصاصیت بالاتر دارند، اما نمی‌تواند بین انواع و ورایانت‌های مختلف کاربا‌پنمازها افتراق قائل شوند. روش اسپکتروفتومتری ارزان و کارآمد هستند، اما در بسیاری از مراکز بالینی غیر معمول‌اند، در حالی که MALDI-TOF MS برای تشخیص گونه‌ها، تایپینگ و شناسایی ژن مقاومت پیشنهاد می‌شود. تکنولوژی next generation sequencing (NGS) پلتفرم بهتری را جهت تشخیص و تعیین ویژگی باکتری‌های مقاوم به کاربا‌پنم را فراهم می‌کند. حساسیت، اختصاصیت و زمان انجام آزمایش در مطالعات متفاوتی به نفع استفاده از تست‌های بیوشیمیایی (Carba NP) جهت تشخیص ایزوله‌های تولیدکننده کاربا‌پنماز گزارش شده است. MALDI-TOF MS و یا روش‌های مولکولی مانند میکروآری، LAMP و real-time PCR multiplex در آزمایشگاه مرجع انجام می‌شود. NGS نیز ممکن است برای مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی پیشرفته استفاده شود. خلاصه‌ای از ویژگی‌های عملکردی روش‌های شناسایی کاربا‌پنماز در جدول ۲ آورده شده است (۱۷،۱۶).

شناسایی کاربا‌پنماز توسط روش‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی

اگر چه روش‌های جدید مولکولی و فنوتیپی برای تشخیص کاربا‌پنماز در پاتوژن‌های گرم منفی معرفی شده‌اند، اما هنوز نیاز به تست‌های ساده و مطمئن تر است. اولین گام در تشخیص کاربا‌پنماز،

جدول ۲- ویژگی‌های عملکردی تمامی روش‌های شناسایی کاربا‌پنمازی (۹).

تست/ روش	زمان انجام	گونه‌های مورد نظر	کاربا‌پنماز های مورد هدف	حساسیت (٪)	اختصاصیت (٪)	PPV	NPV
	۱۸-۲۴	گونه‌های سودوموناس	MBL	۱۰۰	۹۵,۷	ND	ND
دیسکEDTA-IMI	ساعت	اسینتوباکتر	MBL	۹۱	۱۰۰	ND	ND
تست دیسک ترکیبی	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B	۹۴,۸	۱۰۰	۱۰۰	۹۴,۸
تست دیسک ازتاپنم	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	KPC	۸۳	۷۳,۸	۵۹,۱	۹۰,۵
دیسک دیفیوژن	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B OXA-48	۹۵-۱۰۰	۹۶-۱۰۰	ND	ND
تست دیسک OXA-48	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	OXA-48	۹۶,۳	۹۷,۷	ND	ND
AVI-DDST	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	OXA-48 و کلاس A	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND
MAST-CDS	۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B	۹۱	۱۰۰	ND	ND
ChromID ESBL	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A،B و D	۸۷,۷	۲۴,۲	ND	ND
CHROMagar KPC	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A،B و D	۴۰,۳-۷۶,۶	۷۵,۷ -۸۵,۵	۵۹	۸۷,۶
Brilliance ™	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B	۵۹-۹۸,۸	۳۴-۱۰۰	۱۶	ND
ChromID CARBA	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A،B و D	۱۰۰	۹۸	۹۱	ND
			OXA-48	۳۰>	۶۷,۵	ND	ND

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

ادامه جدول ۲

ChromID OXA-48	۱۸–۲۴ ساعت			۹۱,۲ –۹۶,۵	۹۶,۵	ND	ND
SUPERCARBA	۱۸–۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های B،A و D	۹۳–۱۰۰	۵۲,۵	ND	ND
REMEL SPECTRA	۱۸ ساعت	انتروباکتریاسه	KPC	۹۷,۸	۸۶,۴	۷۶,۷	۹۸,۹
Rapid Carb Screen Kit	۵–۱۸۰ دقیقه	انتروباکتریاسه و سودموناس آئروژینوزا	کلاس‌های B،A و D	۷۳,۳–۹۸,۷	۸۷,۷–۱۰۰	۸۴,۶	۸۸,۷
Carba NP test	۵–۱۲۰ دقیقه	انتروباکتریاسه و سودموناس آئروژینوزا	کلاس‌های B،A و D	۷۲,۵–۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۹,۲–۹۲,۲
CarbAcineto NP test	۵–۱۲۰ دقیقه	اسینتوباکتر بومانی	کلاس‌های B،A و D	۹۴,۷	۱۰۰	ND	ND
Spectrophotometry	۱–۳ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های B،A و D	۱۰۰	۹۸,۵	ND	ND
MALDI-TOF MS	۷۵ دقیقه – ۱۲ ساعت	باسیل گرم منفی	کلاس‌های B،A و D	۱۰۰	۸۹,۹–۱۰۰	ND	ND
Real-time multiplex PCR	۶۰–۱۲۰ دقیقه	باسیل گرم منفی	کلاس‌های B،A و D	۱۰۰	۸۹,۹–۱۰۰	–۱۶,۶ ۴۶,۶	۱۰۰
Check-MDR Carba assay	۴,۵–۵ ساعت	انتروباکتریاسه و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	NDM, VIM, IMP, OXA-48, KPC	۹۰,۵–۱۰۰	۸۷,۷–۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
Check-Direct CPE	<۱۸۰ دقیقه	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	KPC, VIM, NDM, OXA-48	۹۷,۱–۱۰۰	۹۴–۱۰۰	۱۰۰	۰ –۷۰
LAMP/Eazyplex superbug complete A	۲۵–۶۰ دقیقه	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	KPC, VIM, NDM, OXA-48	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND
TaqMan PCR	<۱۲۰ دقیقه	انتروباکتریاسه	کلاس‌های B،A و D	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND
NucliSENSEasyQKPC	<۱۲۰ دقیقه	انتروباکتریاسه	KPC	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND
Carba-R kit Xpert	۵۲ دقیقه	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	KPC, VIM, NDM, OXA-48	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND
Microarray	۲–۸ ساعت	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	کلاس‌های B،A و D	۹۸,۲	۹۷,۴	ND	ND
Xpert MDRO assay	<۱ ساعت	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	KPC, NDM, VIM	۱۰۰	۹۹–۹۹,۴	۸۱,۸–۹۳	۱۰۰
Next generation sequencing platforms	<۸ ساعت	همه‌ی باکتری‌ها	کلاس‌های B،A و D	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND

AVI-DDST, avibactam-double disc synergy test; CPE, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae; CRE, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; LAMP, Loop-mediated isothermal amplification; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MBL, metallo-b-lactamases; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value; MBL: Metallo beta lactamase

استفاده از روش‌های شناسایی بر اساس آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی است. این روش‌ها شامل دیسک دیفیوژن، میکرودایلوشن براث، روش‌های گرادیان ضد میکروبی (به‌عنوان مثال نوارهای E-test) و چندین سیستم خودکار تجاری موجود به‌عنوان مثال، سیستم‌های VITEK شرکت بیومریکس (Marcy L'Etoile, France)، سیستم میکروب‌شناسی خودکار Phoenix سیستم‌های BD Diagnostics و MicroScan WalkAwayشرکت زیمنس (Dade Behring, West Sacramento, CA) می باشند (۱۸).

دستیابی به نتایج دقیق تست حساسیت برای داروهای کاربا‌پنم اغلب در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی چالش برانگیز است. ارزیابی صحیح ژن مقاومت در مورد طغیان‌های بیمارستانی در تعیین مسیر انتشار و استفاده از مناسب‌ترین تدابیر مهار، مهم و اساسی تلقی می شود. با توجه به دستورالعمل ها، نقاط انفصال (breakpoints) برای مروپنم (MEM) و ایمی‌پنم (IPM) در ≥۱ میلی گرم/ لیتر حساس و در ≤۴ میلی گرم/ لیتر مقاوم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

است و برای ارتاپنم در ≥۰٫۵ میلی گرم/ لیتر حساس و در ≤ ۲ میلی گرم/ لیتر مقاوم می‌باشد. تشخیص ایزوله‌های تولید کننده کارباپنماز تنها بر اساس مقادیر MIC اختصاصیتی ندارد. با این حال، برای تشخیص بسیاری از آنها، به نظر می‌رسد ارتاپنم ETP، بدلیل اینکه به طور کلی مقادیر MIC بالاتر از سایر کارباپنم‌ها دارد، کاندید خوبی است (۱۹-۲۱). روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودایلوشن براث برای شناسایی تمامی انواع مقاومت مرتبط با کارباپنماز مطمئن‌تر می‌باشند. هدف روش‌های آگار میکرودایلوشن و براث میکرودایلوشن تعیین MIC عامل ضد میکروبی مورد سنجش است که تحت شرایط مشخصی مانع از رشد باکتری مورد بررسی می‌شود. در روش براث میکرودایلوشن که توسط CLSI نیز توصیه شده، زمان انکوباسیون برای تعیین حساسیت ضد میکروبی باکتری‌های پاتوژن بین ۱۶ و ۲۰ ساعت تنظیم شده است. با توجه به دستورالعمل CLSI برای غربالگری فنوتیپی کارباپنماز انتروباکتریاسه، MICs برایETP ، IPM وMEM به ترتیب ۲، ۴-۲ و ۴-۲ میکروگرم / میلی لیتر است (و یا یک قطر هاله عدم رشد ETP و یا MEM ≥۲۱ میلی متر در در روش دیسک دیفیوژن) ممکن است تولید کارباپنماز توسط ایزوله‌ها را نشان دهد و این فنوتیپ باید توسط روش‌های اختصاصی تأیید شود (۲۳،۲۲).

روش‌های تست حساسیت خودکار، به دلیل سهولت در انجام و کارایی بالا، به طور گسترده‌ای در مراکز پزشکی استفاده می‌شود. با توجه به توصیه‌های CLSI، شناسایی فنوتیپی ارگانیسم‌های تولید کننده KPC بر اساس کاهش حساسیت به MEM یا ETP است. روش‌های تست حساسیت خودکار نیز برای شناسایی مقاومت مرتبط با KPC قابل اعتماد نیستند؛ با این حال، بسیاری از سیستم‌های خودکار بطور صحیح ایزوله‌های KPC حساس به MEM را گزارش می‌کنند. بسیاری از این سیستم‌های خودکار از روش‌های کالیمتری، کدورت سنجی و یا فلورسنت استفاده می‌کنند. در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی برای کاهش زمان انجام کار معمولاً از سیستم‌های خودکار تست حساسیت ضد میکروبی، مانند Vitek و یا Phoenix استفاده می‌شود (۲۶،۲۵،۲۴).

سیستم Vitek در دهه ۱۹۸۰ میلادی معرفی شد و در مطالعات متعددی ارزیابی شده است، این سیستم به طور خودکار تشخیص سریع و حساسیت ضد میکروبی برای کوکسی های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی را در عرض ۳ ساعت ممکن می‌سازد. البته سیستم Vitek II نیز در سال ۱۹۹۹ میلادی معرفی شد که اساساً متفاوت از سیستم قبلی VITEK است. سیستم Vitek II می تواند با اطمینان برای شناسایی مقاومت در برابر چندین عامل ضد میکروبی مهم بالینی استفاده شود. در مقابل آگار دیلوشن و E-test برای شناسایی تولیدکنندگان کارباپنماز با سطح مقاومت پایین‌تر به کارباپنم، سیستم Vitek II موثرتر است (۲۹،۲۸،۲۷).

سیستم میکروبیولوژی خودکار PHOENIX ™ (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) یکی دیگر از سیستم‌های خودکار است که در سال ۲۰۰۳ معرفی شد و برای شناسایی سریع باکتری در سطح گونه و تعیین دقیق تست حساسیت ضد میکروبی پاتوژن‌های باکتریایی مهم بالینی طراحی شده است. غربال گری بر اساس MIC کارباپنم ≤۲ میکروگرم/ میلی لیتر (MEM برای VITEK II؛ ETP در ترکیب با IPM یا MEM برای Phoenix) نسبت به سیستم غربالگری توسط کارشناس آزمایشگاهی، حساس‌تر و در معرض تفسیر اشتباه کمتر قرار دارد. آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی بطور معمول جهت تأیید حساسیت IPM از سیستم خودکار MicroScan استفاده می‌کنند که بایست از یک روش مستقل از تست حساسیت ضد میکروبی نیز استفاده نمایند (به جهت نتایج غیر قابل قبول که در شناسایی حساسیتIPM دارند (میزان خطای بیشتر در حساسیت IPM) (۳۲-۳۰).

روش‌های فنوتیپی شناسایی کارباپنمازها

در حالی که برخی از آزمایشات ممکن است برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده‌ی کارباپنماز استفاده شوند، در سال‌های اخیر شش روش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

فنوتیپی بطور فزاینده‌ای در بسیاری از آزمایشگاه های میکروبیولوژی بالینی بکار گرفته می‌شود. از جمله این روش‌ها MHT، آزمون هم افزایی دیسک - مهارکننده، محیط کشت غربالی کروموژنیک و غیر کروموژنیک، روش‌های بیوشیمیایی، اسپکتروفتومتری، MALDI-TOF. شناسایی فنوتیپی به تست‌های غربالگری و تشخیصی تقسیم می‌شوند. محیط کشت‌های غربالی برای شناسایی ویژگی ایزوله‌های تولید کننده کارباپنماز استفاده می‌شوند. برای تشخیص فعالیت کارباپنماز، چندین روش آزمایشگاهی فنوتیپی تجاری موجود توصیف شده است. برخی از تست‌ها دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی هستند؛ اما هیچ یک از آنها نزدیک به ۱۰۰٪ نمی‌باشد.

روش MHT تنها روش تشخیصی و فنوتیپی کارباپنماز است که توسط CLSI توصیه می‌شود. اصل مهم این روش غیر فعال سازی کارباپنم توسط سلول‌ها یا عصاره سلولی ارگانیسم‌های تولید کننده کارباپنماز است. این تست برای شناسایی مکانیسم، حساس و مناسب است. با این حال، در این روش جزئیات نوع کارباپنماز ارائه نمی شود. علاوه بر این، نتایج مثبت کاذب که با کاهش نفوذپذیری غشای خارجی توسط سویه‌های تولید کننده CTX-M ایجاد می‌شود یک نقطه ضعف این روش است (۳۳،۷،۳۴).

Modified Hodge test

آزمون MHT یک نسخه اصلاح شده آزمون Hodge است که توسط CLSI در سال ۲۰۰۹ معرفی شد. آزمون MHT، یک تست غربالگری فنوتیپی برای باکتری‌های حساس به کارباپنم است و دارای حساسیت و اختصاصیت بالا (۹۰٪ <) در شناسایی کارباپنماز های آمبلر کلاس A نوع KPC و کلاس D (OXA-48) تولید شده در بین اعضای انتروباکتریاسه است. با این حال، این روش در شناسایی متالوبتالاکتامازها دارای حساسیت پایین، و برای شناسایی سرین کارباپنمازها اختصاصیتی ندارد و زمان بر است. اما، راه حل این مشکلات، اضافه کردن عنصر روی به محیط کشت است، که حساسیت روش MHT را در تشخیص کارباپنمازهای کلاس A، B و D بالا می‌برد. هر چند انجام این روش در آزمایشگاه بالینی نسبتاً آسان و عملی است، ولی تفسیر نتایج آن نیاز به فرد با تجربه دارد (۳۷-۳۵).

این تست و روش‌های مشابه مانند روش Masuda (MAS) مستقیماً فعالیت کارباپنماز را به ترتیب در سلول‌های سالم و آنزیم عصاره‌های خام آنزیمی مورد ارزیابی قرار می‌دهد. برای شناسایی باکتری تولید کننده کارباپنماز، انجام این روش‌ها نسبت به روش‌های معمول فنوتیپی به ویژه هنگامی که مکانیسم‌های ترکیبی حضور دارند، بهتر است. مطالعات نشان می‌دهد کهMHT مورد تایید مراکز کنترل و پیشگیری بیماری ها (CDC) و CLSI بوده و اختصاصیت پایین‌تری نسبت به آزمون کارباپنماز غیر مستقیم (ICT) در شناسایی کارباپنماز تولیدی توسط ایزوله‌های غیر کلبسیلایی انتروباکتریاسه تولیدکننده KPC دارد. آزمون کارباپنماز غیر مستقیم می‌تواند به آزمایشگاه‌های بالینی در شناسایی دقیق اشریشیا کلی، سیتروباکترفروندی، انتروباکتر و ایزوله‌هایی که ژنKPC bla را ندارند کمک کند (۳۸).

MHT در شناسایی فعالیت کارباپنماز ایزوله‌ها می‌تواند در گام نخست استفاده شود. علاوه بر این، انجام این روش برای ارزیابی فعالیت کارباپنماز به‌عنوان بخشی از فرایند کنترل عفونت در طغیان‌های ناشی از تولیدکنندگان کارباپنماز مفید است. شناسایی اشتباه تولید کارباپنماز در روش MHTممکن است در گونه‌هایی از انتروباکتریاسه، از جمله کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی و همچنین AmpCبتالاکتاماز کروموزومی سراشیا و انتروباکترکلوآکه رخ دهد. این نتایج مثبت کاذب احتمالاً از سطح پایین فعالیت کارباپنم توسط ESBLو آنزیم‌های AmpC، یا از دست دادن پورین‌ها نشات می گیرد (۳۹،۷).

MHT ممکن است بیان کارباپنماز عملکردی را شناسایی کند و توسط برخی آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، زمان لازم برای شناسایی ۲۴-۴۸ ساعت است و تنها برای شناسای تیپ KPC توسط CDC توصیه می‌شود (۴۰).

برای هر ایزوله نامشخص و یا مثبت در MHT،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

معمولا آزمایشگاه انجام آزمون دیسک ترکیبی را درخواست می‌کند که اساساً تست حساسیت دیسک دیفیوژن معمول با یک کارباپنم، به همراه همان دیسک کاربـاپنم محتوی مهارکننده‌ی کارباپنماز های کلاس A و کلاس B به ترتیب با بورونیک اسید و EDTA می‌باشد. آزمون MHT برای شناسایی فنوتیپی آنزیم‌های KPC در بیمارستان‌هایی که در آن این بتالاکتامازها اندمیک هستند مفید است (۴۱).

Pasteran و همکارانش جهت بهینه سازی MHT و نتایج قابل اعتماد تر و دقیق‌تر این روش در شناسایی کارباپنماز تولیدی در سودوموناس از یک سویه شاخص جدید K. *pneumoniae* ATCC 700603بجای E. *coli* ATCC 25922استفاده کردند؛ بنابراین، آن را آزمایش سودوموناس MHT (PAE-MHT) نامیدند. این آزمون آزمایشگاه‌های معمول را قادر می‌سازد کارباپنماز تولیدی سودوموناس مانند کارباپنم حساس به MBLs و KPCs؛ که از مهم‌ترین چالش‌های اپیدمیولوژیک است را شناسایی کنند (۴۲).

روش‌های مبتنی بر مهارکننده‌ها

اگر چه، برای کارباپنماز های OXA-48 ، هیچ روش تشخیصی فنوتیپی خاصی موجود نمی‌باشد، شناسایی حساس و اختصاصی کارباپنماز های کلاس A و B ممکن است با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن مهاری کارباپنماز (آزمون هم افزایی) انجام بگیرد. با این حال، برای شناسایی MBL، هیچ دستورالعمل استانداردی در دسترس نیست. در نتیجه، استاندارد سازی یک روش فنوتیپی برای غربالگری ایزوله‌های تولید کننده MBL از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. چندین روش غربالگری برای شناسایی باکتری‌های تولید کننده MBL بر پایه ممانعت از فعالیت MBL توسط عوامل شلاته کننده همچون EDTA، دیپیکولنیک اسید و ۲- مرکاپتوپروپیونیک اسید معرفی شده است. آزمون های دیسک مبتنی بر مهارکننده با مهارکننده‌های MBL در ترکیب با کارباپنم‌ها می‌تواند برای اسینتوباکتر بومانی و سودوموناس به دلیل تأثیر غیر اختصاصی مهارکننده‌ها بر سلول باکتری اختصاصیت داشته باشد. EDTA، مانند بسیاری شلاته کننده های فلزی دیگر، سبب افزایش نفوذپذیری غشای خارجی می‌شود که به طور بالقوه سبب نتایج مثبت کاذب آزمون MBL می‌شوند (۴۵-۴۳).

اطلاعات قبلی پیشنهاد می‌کنند که دیسک DPA–IPM (دیپیکولنیک اسید – امی پنم) و تست‌های سینرژیسم دیسک DPA (D-DST) برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده MBL می تواند بدلیل کارایی بالا و نسبتاً آسان یک روش غربال گری مفید باشد. در میان روش‌های شناسایی فنوتیپی که تا کنون معرفی شده، آزمون دیسک DPA-IPM بهترین روش غربالگری برای شناسایی فنوتیپی در گونه‌های کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر و پسودوموناس تولید کننده MBL (انواع VIM-2 و IMP-1) می‌باشد (۴۷).

از طرفی دیگر، موگزالاکتام، یک سفامایسین وسیع الطیف، درDST موگزالاکتام – EDTA (MOX-EDTA) می‌تواند به‌عنوان یک روش تاییدی جهت افتراق تولید MBL و نفوذ ناپذیری غشای خارجی استفاده شود. این روش با توجه اینکه به معرف‌های ارزان نیاز دارد برای غربالگری اختصاصی MBL در کشورهای با منابع محدود مناسب است. در ارزیابی مقایسه‌ای دیسک‌های مهارکننده -MEM و محیط کشت آگار کرموژنیک برای شناسایی کارباپنماز در انتروباکتریاسه روش دیسک‌های مهارکننده، با وجود محدودیت در اینکه قادر به تشخیص کارباپنماز های کلاس D نمی‌باشد، نسبت به روش‌های دیگر حساستر و اختصاصی‌تر می باشند (۴۹،۴۸).

روش مبتنی بر بورونیک اسید

روش‌های فنوتیپی بر اساس فعالیت مهاری ترکیبات بورونیک اسید بسیار راحت انجام و تفسیر می‌شوند و ممکن است از روز نخست از ایزولاسیون انتروباکتریاسه مقاوم مشکوک اعمال شوند. این تست هنگامی که به همراه ایمی‌پنم، مروپنم و سفپیم انجام می‌شود، تست حساس و اختصاصی در تشخیص KPC در کلبسیلا پنومونیه است (۳۴).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

ترکیبات بورونیک اسید مهارکننده‌های نوع سرینی بتالاکتاماز اند که در اوایل ۱۹۸۰ میلادی معرفی شدند و به‌عنوان مهارکننده‌های سریع و برگشت پذیر آنزیم‌های AmpC متعلق به بتالاکتامازهای کلاسC شناخته شده‌اند (مهار آنها بر اساس ساختار بتالاکتام نمی‌باشد). کارباپنماز های کلاسA ، مانندKPC ، می‌تواند به‌صورت سینرژیسم با بورونیک اسید غربالگری شوند؛ اما نتایج مثبت کاذب آزمون سینرژیسم در صورت تولید بتالاکتامازهایAmpC می تواند رخ می‌دهد. اخیراً پیشنهاد شده است که ترکیبات بورونیک اسید می‌تواند در تست‌های سینرژیسم دیسک استفاده شوند و بطور مؤثر قادر به افتراق تولیدکنندگان KPC از تولیدکنندگان MBL یا دیگر بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌باشند. به تازگی، یک روش مبتنی بر بورونیک اسید، با استفاده از دیسک ترکیبی ۳ – آمینوفنیل بورونیک اسید (APBA)و IPM در شناسایی حضور کارباپنماز های کلاس A با حساسیت و اختصاصیت بالاتر از MHT مشاهده شده است (۷، ۵۱،۵۰).

نوار E-test MBL

E-Test یک روش کمی برای تعیین MIC عوامل ضد میکروبی در برابر میکروارگانیسم‌ها و برای شناسایی مکانیسم‌های مقاومت است. نوار E-test MBL [IPM-IPM + EDTA (IP-IPI) یکی از روش‌های پیشنهادی برای شناسایی انواع متالوبتالاکتاماز هایIMP و VIM بر اساس مهار فعالیت MBL توسط EDTA است.

E-test MBL در شناسایی ارگانیسم‌های تولیدکننده MBL با مقاومت بالا مؤثر است، اما ممکن است قادر به شناسایی ارگانیسم‌های تولیدکننده MBL با سطح مقاومت پایین به IPM نباشد. اگرچه انجام این آزمایش ساده است، ولی پر هزینه بوده و از نظر شناسایی ارگانیسم‌های دارای MBL حساس به کاباپنم (میکروگرم / میلی لیتر MIC ≤4) بسیار غیر حساس است. با توجه به این نقایص، بسیاری از آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی از روش‌های غربالگری جایگزین از قبیل سنجش دیسک ترکیبی (CD) و آزمون سینرژیسمی دو دیسک (DDST) استفاده می کنند. بیشترین مزیت تست‌های KPC E-test و MBL E-testو Carba NP تمایز سریع بین تولید کنندگان کارباپنماز های کلاس A و B می‌باشد (۵۴،۵۳،۵۲).

تست دیسک ترکیبی

قبلاً از آزمایشات دیسک ترکیبی (CDT) با استفاده از مقادیر مختلف EDTA برای شناسایی کارباپنماز های MBL استفاده می گردید. آزمایشات دیسک سینرژیسم ترکیبی، به دلیل هزینه کم و سهولت انجام، به طور گسترده ای استفاده می‌شوند. با این حال، عملکرد این تست‌ها ممکن است با توجه به تغییرات در جمعیت باکتریایی تولیدکننده کارباپنماز دچار نقص شود. تست‌های دیسک ترکیبی بر اساس مهار آنزیم‌های MBLتوسط DPA یا EDTA، منجر به تفاوت در قطر هاله دیسک‌های کارباپنم با یا بدون مهارکننده می‌شوند. به تازگی آزمایشات دیسک ترکیبی مختلفی به ویژه آزمایشاتی که از مروپنم استفاده می‌کنند، برای تمایز کلاس A و MBL معرفی شده است. این روش، تشخیص سریع و قابل اعتماد کارباپنماز را در سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه ارائه می‌کند می‌تواند در کار روزانه بسیار عملی باشد (۵۶،۵۵،۷).

تست دیسک دوتایی سینرژیسمی (DDST)

تست دیسک دوتایی سینرژیسمی روشی برای غربالگری بتالاکتامازهایی است که توسط مهارکننده‌هایی مانند کلاولانیک اسید (بتالاکتامازهای آمبلر کلاس A، به خصوص بتالاکتاماز های وسیع الطیف ESBL) غیر فعال می‌شوند. آزمون دیسک دوتایی سینرژیسمی به آسانی انجام می‌شود و می‌تواند به صورت معمول در کار روزانه آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی که از دیسک دیفیوژن به‌عنوان روش آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌کنند، گنجانده شود. همچنین، برای غربال کردن حضور سویه‌های تولید کننده MBL جهت اهداف بالینی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

و مراقبتی، این روش ممکن است مفید باشد. تشخیص متالوبتالاکتاماز ها به طور کلی مبتنی بر تست‌های سینرژیسمی کاربـاپنم-EDTA در فرمت‌های مختلف استوار است. با توجه به قطر هاله مهاری سوبسترا و دیسک‌های مهارکننده، در DDST نیاز به اصلاح فاصله بین دیسک‌هاست. در مقایسه روش‌های دیسک دوتایی با روش E-test و دیسک ترکیبی، روش دیسک دوتایی ۲-مرکاپتوپروپیونیک اسید، با استفاده از سفپیم و CAZ با یا بدون کلاولانات بیشترین حساسیت (۱۰۰٪) را در شناسایی MBL در باکتریهای گرم منفی دارد. اگر چه DDST و تست دیسک ترکیبی بی دردسر و ارزان‌تر از روش E-test MBL، بسته به روش کار بکار گرفته شده است، مهارکننده‌های MBL (IMBL) و سوبستراهای بتالاکتام نتایج ناسازگار را نشان داده‌اند (۵۸،۵۷).

شناسایی کاربـاپنماز با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت

در حال حاضر، محیط غربالی که بتواند تمامی انواع کاربـاپنماز هایی را با حساسیت و اختصاصیت بالا شناسایی کند، وجود ندارد (۳۴). چندین روش کشت برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کاربـاپنم، از جمله روش‌هایی که از محیط کشت‌های انتخابی مانند تریپتیک سوی آگار (TSA) یا مک کانکی آگار حاوی یک دیسک ۱۰ میکروگرم کاربـاپنم و یا محیط کشت‌های آگار کروموژنیک تجاری، مانند CHROMagar KPC، ChromID ESBL، ChromID CARBA، Brilliance™ CRE Agar و SUPERCARBA موجود است. در حال حاضر، کشت سواب اطراف مقعد و یا نمونه رکتال بر روی پلیت آگار انتخابی و افتراقی مانند مک کانکی آگار، روش استاندارد برای غربالگری بیماران کلونیزه شده با ارگانیسم‌های تولید کننده کاربـاپنماز است. محیط‌های کرموژنیک به طور گسترده‌ای برای غربالگری و تشخیص سریع باکتری‌های گرم منفی مقاوم در برابر کاربـاپنم استفاده می‌شود (۶۰،۵۹). اخیراً محیط کرموژنیک جدید CHROMagar KPC معرفی شده است. این یک محیط مناسب برای غربالگری سویه‌های با سطح بالای مقاومت به کاربـاپنم‌ها (< ۱۶ میکروگرم / میلی لیتر) می‌باشد؛ اما برای غربالگری سویه با سطوح پایین مقاومت در برابر کاربـاپنم‌ها کمتر حساس است. ویژگی فنوتیپی در CHROMagar KPC اجازه تمایز آسان کلنی‌های باکتریایی را می‌دهد. علاوه بر این، این محیط بدون نیاز به ساب کالچر اجازه تشخیص ایزوله‌های مقاوم به ارتاپنم و حساس به کاربـاپنم‌ها دیگر را می‌دهد (۶۲،۶۱).

ChromID CARBA یکی دیگر از محیط های کشت آگار کروموژنیک برای تشخیص کاربـاپنماز طراحی شده است که با عوامل اختصاصی که رشد گرم مثبت و غیر کاربـاپنمازی را مهار می‌کند غنی شده است. این محیط بهترین حساسیت و اختصاصیت را نشان می‌دهد و به خوبی Brilliance CRE و CHROMagar KPC برای تشخیص سویه‌های انتروباکتریاسه تولید کننده کاربـاپنماز است (۶۳،۷).

ارزیابی مقایسه‌ای این محیط کشت کرموژنیک با SUPERCARBA و chromID CARBA نشان می‌دهد که chromID محیط OXA-48 و SUPERCARBA بالاترین حساسیت را برای انتروباکتریاسه تولید کننده OXA-48 (۹۱٪ و ۹۳٪) نسبت به chromID CARBA (۲۱٪) دارند (۶۴).

Brilliance™ CRE agar محیط کرموژنیک تجاری جدید است که جهت مهار رشد باکتری‌های حساس به کاربـاپنم با یک کاربـاپنم غنی شده است. این روش، یک برای تشخیص اعضای انتروباکتریاسه تولیدکننده MBL و KPC روشی مناسب، ساده و حساس است؛ بنابراین، می‌تواند یک روش جایگزین با مصرف وقت کمتر تلقی شود که توسط CDC توصیه شده است (۶۵).

با توجه به اطلاعات موجود، Brilliance™ CRE agar می‌تواند محیط انتخابی مناسب باشد زیرا اجازه رشد اغلب قریب به اتفاق (۹۲،۶٪) از ایزوله‌های انتروباکتریایی غیر حساس به کاربـاپنم را می‌دهد در حالی که مانع از رشد اغلب ایزوله‌های حساس به کاربـاپنم (۸۵،۱٪) می شود (۶۶).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

شناسایی کارباپنمازها مبتنی بر روش‌های بیوشیمیایی

روش‌های اسپکتروفتومتری: بر اساس آنالیز هیدرولیز ایمی‌پنم، یک روش اسپکتروفتومتری معرفی شده است که کارباپنمازها را از غیر کارباپنمازها متمایز می‌کند. هیدرولیز در حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها (به‌عنوان مثال، EDTA برای MBL، اسید تازوباکتام یا کلاولانیک برای KPC) انجام می‌شود. این روش ارزان و مناسب، شناسایی کننده سویه‌های تولید کننده کارباپنماز است و ممکن است در سطح جهانی در هر آزمایشگاه مرجع اجرا شود. این روش می‌تواند گونه‌های کارباپنماز را از آنهایی که بدلیل مکانیسم غیرمستقل کارباپنماز، مانند مکانیسم مقاومت ترکیبی (به‌عنوان مثال مهار ESBL توسط کلاولانیک اسید، نقص نفوذ پذیری غشاء خارجی، بیان بالای سفالوسپورینازها) ایجادشدند و همچنین گونه‌های ESBL بدون فعالیت کارباپنمازی را متمایز سازد. سنجش اسپکتروفتومتری زمانبر بوده، نیاز به نیروی کار و متخصص فنی و معمولاً مقاصد پژوهشی دارد، از این رو در آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌شود (۷). در سال‌های اخیر، آنالیز طیفی Raman برای تایپ کردن گونه‌های مختلف باکتریایی تأیید شده است. اسپکتروفتومتری Raman یک تکنولوژی نوری بر اساس پراکندگی بدون ارتجاعی نور توسط مولکول‌ها است (۶۸،۶۷).

سنجش اسپکتروفتومتری UV: این روش در چند مرحله انجام می‌گیرد: (الف) کشت ۱۸ ساعت (که در برخی از موارد به ۸ ساعت کاهش می‌یابد (ب) یک مرحله برای استخراج پروتئین و (ج) اندازه گیری هیدرولیز IMP با استفاده از اسپکتروفتومتر UV. این تکنیک بطور مؤثر می تواند برای ارگانیسم‌های تولید کننده SIM، IMP، VIM و بتالاکتاماز کلاس D و تولیدکنندگان NDM که شناسایی آن ها دشوار می‌باشد، استفاده شود (۶۷،۶۹).

تست Carba NP: اخیراً، نوردمن و همکاران تست کارباپنماز(Nordmann-Poirel (Carba NP را به‌عنوان یک نوع تست سریع و آسان در انجام و تفسیر، با حساسیت و اختصاصیت بالا نه تنها در تشخیص فعالیت کارباپنماز بلکه انواع کارباپنماز های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه معرفی کردند. این روش مبتنی بر شناسایی بیوشیمیایی هیدرولیز حلقه بتالاکتام مولکول کارباپنم و به دنبال آن تغییر رنگ معرف فنل رد (قرمز به زرد یا نارنجی) بدون نیاز به تجهیزات خاصی می‌باشد. آزمون Carba NP یک تکنیک مقرون به صرفه و دقیق است که با تکنیک‌های مولکولی مانند PCR تأیید می شود. به استثنای برخی از تولید کننده‌های نوع GES، آزمون Carba NPقادر به تمایز ایزوله‌های مقاوم به کاربا‌پنم (بدلیل مکانیسم‌های غیر وابسته به کارباپنماز) از گونه های حساس به کارباپنم می‌باشد، همچنین برای غربالگری سویه‌های کارباپنماز هایی که در طغیان شرکت دارند مفید است و به سرعت تولیدکنندگان کارباپنمازی (مقاومت قابل انتقال) و غیر کارباپنمازی (مقاومت غیر قابل انتقال) را افتراق می‌دهد (۷۴،۷۳).

شناسایی بر اساس روش‌های طیف سنجی جرمی

روش طیف سنجی جرمی برای تشخیص بتالاکتاماز کاتالیز شده (به‌عنوان مثال، پنی‌سیلین هیدرولیز شده و کارباپنم) بکار می‌رود. بسیاری از این ارزیابی‌ها بطور کیفی وجود محصولات هیدرولیز شده را شناسایی می‌کند، اما غلظت آنها را اندازه گیری نمی‌کنند و در نتیجه ارزیابی کمی فعالیت بتالاکتاماز در میان سلول‌های مختلف باکتریایی امکان پذیر نمی‌باشد. در سال‌های اخیر، روش‌های مبتنی بر تکنولوژی طیف سنجی جرمی (MS) مشخص شده است که قادر به تشخیص باکتری تواید کننده کارباپنماز هستند. برخی از این روش‌ها UPLC-MS/MS و MALDI-TOF MS می‌باشند. اخیراً، برای شناسایی هیدرولیز حلقه بتالاکتام، MALDI-TOF در میکروب شناسی بالینی برای تشخیص گونه‌ها معرفی شده است. این روش ارزان، بسیار دقیق و سریع بوده که قادر به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

شناسایی انواع زیادی از ایزوله‌های باکتریایی است. در MALDI-TOF MS مواد در یک اتاقک پر از خلاء یونیزه شده و در میدان الکتریکی شتاب دار می‌شوند. این روش اجازه می‌دهد تا تشخیص و تأیید بسیار سریعی از فعالیت کارباپنمازهای کلاس Aو B صورت گیرد و می‌تواند توسط ماتریس استاندارد انجام شود. این روش معمولاً برای تشخیص مستقیم فنوتیپ های مقاومت و تشخیص پروتئین خاص مسئول این مقاومت مناسب نیست. با توجه به مطالعات قبلی، عملکرد (LC-MS)، MALDI-TOF MS و سنجش هیدرولیز درشناسایی فعالیت کارباپنماز های کلاسA (GES-5 و KPC-2) و B(GIM-1،IMP-1 IMP-10، SPM-1،VIM-1 وNDM-1) عالی است (حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪). سنجش MALDI-TOF حساسیت و اختصاصیت بالاتر نسبت به دیگر روش‌های تشخیص کارباپنماز مرسوم مانند MHT و 3-D bioassay در VIM-2، IMP-6، KPC-1، NDM-1،SIM-1 و OXA-23/-51. کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های اسینتوباکتر دارد (۷۲-۷۰).

روش‌های مولکولی برای شناسایی ژن‌های کارباپنماز

تکنیک‌های مولکولی بدلیل سرعت انجام، دقت و حساسیت جهت تشخیص ژن‌های کارباپنماز بکار می‌روند. با توجه به محدودیت‌های آزمون‌های فنوتیپی کارباپنماز، استاندارد طلایی تشخیص کارباپنمازها بر اساس تکنیک‌های مولکولی می‌باشد. این تکنیک ها نسبتاً پیچیده و نیازمند تجهیزات گران قیمت هستند. روش‌هایMultiplex PCR و میکروآری DNA اختصاصی‌ترین تکنیک‌های مولکولی هستند. روش‌های مبتنی بر PCR و سکانسینگ برای تشخیص ژن‌های مقاومتی مناسب هستند و روش‌های مبتنی بر سکانسینگ مناسب برای تشخیص ژن‌های مقاومت است، اگرچه گران‌ترند، اما بسیار تکرار پذیرند. سکانسینگ ژن‌ها عمدتاً برای اهداف اپیدمیولوژیک و پژوهش استفاده می شود. با وجود مزایای این روش‌ها، تکنیک‌های مولکولی به دلیل معظلات در تنوع آللی در ژن‌های هدف، ناکامی در تشخیص ژن‌های جدید تشخیص داده نشده، واکنش‌های متقاطع پرایمر، نیاز به پرسنل با تجربه و هزینه بالا ممکن است عملکرد کمی داشته باشند. سیمپلکس و مولتی پلکس PCR، real-time PCR، تکنیک هیبرید DNA و سکانسینگ معمولاً برای تشخیص ژن‌های کارباپنماز (*bla* KPC) در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و مرجع استفاده می‌شود. امروزه، برخی از آزمایشگاههای بالینی به طور معمول از این روش‌های مولکولی برای اجتناب از مشکلات شناسایی فنوتیپی ارگانیسم‌های تولیدکننده کارباپنماز استفاده می‌شود. سنجش اسپکتروفتومتری برای تشخیص هیدرولیز یک کارباپنم و به دنبال آن PCR برای شناسایی ژن *bla* KPC روشی استاندارد طلایی جهت تأیید KPC است (۱۲،۷ و ۱۶).

سنجش‌های Real-time PCR، Sequencing و LAMP

Multiple real-time PCR قادر به تشخیص KPC و یا NDM-1 می‌باشد، علاوه بر این، برای غربالگری حضور شایع ترین ژن‌های، *bla* IMP، *bla* VIM، *bla* OXA چندین پروتکل real-time PCR معرفی شده است. روشReal-time PCR کمّی (qPCR) تکنیک PCR استانداردی است که میزان DNA بعد از هر سیکل را با استفاده از رنگ‌های فلورسنت یا پروب الیگونوکلئوتیدی فلورسنتی شناسایی می‌کند. این روش به احتمال زیاد زمان تشخیص کارباپنماز، به خصوص در مورد *bla* OXA-48 را از ۴۸ ساعت به ۴ ساعت کاهش می دهد.

PCR-Pروش دیگری است که متشکل از یک PCR کمّی طولانی قطعه (LF-qPCR) جدید برای شناسایی تمام طول *bla* NDM-1 در ایزوله‌های بالینی است. اخیراً، برای غربال کردن ایزوله‌های دارای ژن KPC، یک سنجش real-time PCR کنترل شده مبتنی بر رنگ سایبر گرین که برای گونه‌های بالینی معرفی شده است. حساسیت و اختصاصیت تکنیک‌های مولکولی و شناسایی *bla* KPCبا استفاده از تست‌های real-time nucleic

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

acid amplification و میکـرواری DNA بـر ایـن مشکلات غلبه می‌کند و ممکن است قادر بـه ارائـه نتایج در همان روز شود که موجب اقدامات سـریع نظارتی بر عفونت مـی‌شـود. در مقابـل، تشـخیص KPCبا آزمون‌های فنوتیپی مـی‌توانـد پـر زحمـت باشد؛ همچنین، برای به دست آوردن کامل نتیجه، زمان طولانی بـیش از ۷۲ سـاعت نیـز مـورد نیـاز اسـت. روش دیگـر بـرای تشـخیص KPC bla روش EasyQ KPC است که روش real-time مبتنی بـر تکثیـر اسـید نوکلئیـک (NASBA) اسـت. روش KPC EasyQ بـرای غربـالگری نظـارت نمونـه‌های انتروباکتریاسه KPC مثبـت حسـاس و اختصاصـی است. در کل، در مقایسه با آنالیز اسـتاندارد تـوالی DNA، آزمـونEasyQ KPC بـا دقـت و سـرعت، به‌صـورت مقـرون بـه صـرفه‌ای ایزولـه‌های انتروباکتریاسه تولیدکننده KPC را شناسـایی مـی کند که سبب صرف جویی در وقت و زمـان انجـام خواهد شد.

روش مـولتی پلکـس PCR چنـدین مزیـت دارد. اولاً، قادر به تشخیص پنج کارباپنمـاز شـایع اسـت. دوما، عملکرد خـوب ایـن روش جهـت شناسـایی کارباپنمازها در سواب های بـالینی مناسـب اسـت. اخیراً، یک مولتی پلکـس real-time PCR معرفـی شـده اسـت کـه تنهـا در یـک واکـنش، قـادر بـه تشخیص شـایع‌ترین نـوع سـرین کارباپنمـاز هـا و متالوبتالاکتاماز ها (KPC, GES, OXA-48, IMP, VIMو1-NDM) در باکتری‌هـای انتروباکتریاسـه اسـت. Check-Direct CPE یـک روش جدیـد مولتی پلکس real-time PCR است کـه هـدف آن NDM، KPC، VIMو OXA-48 مـی‌باشـد. ایـن روش، ابرازی حساس بوده که قادر به تمایز ژن‌های کارباپنمـازی در عـرض ۳ سـاعت اسـت. Hyplex Multiplex PCR-ELISAروش تشخیصی جدیـد بـرای تشـخیص مسـتقیم ژن‌هـای MBL از انـواع IMP و VIM در نمونه‌های بالینی اسـت. در میـان روش‌هـای تجـاری در دسـترس، Hyplex PCR-ELISA مناسب تشـخیص پاتوژن‌هـای باکتریـایی مختلف از کشت خون و مکانیسم‌های مقاومـت در انتروباکتریاسه مـی‌باشـد. اطلاعـات نشـان دهنـده آنست که این روش ممکن است یک تست تکمیلی مفید در آزمایشگاه بالینی در مـورد KPCو MBL (bla_{VIM} و bla_{NDM}) به جهت تشخیص به موقـع و حساسـیت (۹۸٪) و اختصاصـیت (۹۸,۶٪) باشـد (۸۱-۷۵).

تکنیک LAMP (isothermal Loop-mediated amplification) روشی نسبتاً ساده است. این روش برای تشخیص بالینی و تشخیص انگل‌ها و بـاکتری هـای دخیـل در بیمـاری‌هـای اپیـدمی بـه طـور گسترده‌ای استفاده می‌شود. مزایای اصلی اسـتفاده از این روش، سادگی و سـهولت عملکـرد، خودکـار بودن و زمان آنالیز کوتاه‌تر اسـت. حمـام آب تنهـا تجهیزات مورد نیاز برای استفاده از روش LAMP است. در نهایت، سیستم Eazyplex در ترکیب بـا LAMPو تشخیص فتومتریک real-time، ژن‌های کد کننده کارباپنماز را سریع و ساده تشخیص مـی دهد. این روش اجازه می‌دهد تا تکثیر و تشـخیص ژن‌های هـدف در یـک مرحلـه در دمـای ثابـت در عرض<۱۵ دقیقه بدست آید (۸۲،۷).

روش‌های مبتنی بر میکروواری

تکنولوژی‌های اسیدنوکلئیک میکـرواری درمیـان روش‌های مرسوم در تعیـین ویژگـی‌هـای ژن‌هـای مقاومتی و اپیدمیولوژی مولکولی بسـیار مهـم مـی باشـند. فـن آوری هیبریداسـیون میکـرواری روش پیشنهادی جهت تشخیص تعداد کثیری از ژن‌های مختلف به طور همزمان در یک کوتـاه دوره زمـانی است. این روش دارای مزایای قابل تـوجهی نسـبت بـه روش‌هـای سـنتی اسـت و اجـازه مـی‌دهـد تـا تشخیص سریع پلـی مورفیسـم تـک نوکلئوتیـدی (SNP) و آنالیز چند پـارامتری صـورت گیـرد کـه زمان و هزینه مورد نیاز برای کسب نتایج را کاهش می‌دهـد. بـرای تشـخیص مقاومـت در جنس‌هـای مختلف باکتری‌ها، چنـدین روش میکـرواری ارائـه شده است. با بهینه سازی تکثیر، ژن‌های کارباپنماز از کلاس‌های مولکولیA ، B و D در یـک واکـنش multiplex PCRکه حدود ۴۰ دقیقـه طـول مـی کشد، می تواند تکثیر یابد. با این حال، تمام مراحل تجزیه و تحلیـل هیبریداسـیون کمتـر از ۴ سـاعت طول می‌کشد و مـی‌توانـد در آزمایشـگاه میکـروب شناسی بالینی بـرای بیـان تشـخیص مقاومـت بـه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

آنتی‌بیوتیک‌های ناشی از تولید کارباپنماز استفاده شود. میکروواری عوامل مکانیسم‌های مختلف مقاومت مانند اصلاحات آنزیمی، افزایش بیان ژن توسط تغییرات پروموتور، غیر فعال سازی آنزیمی آنتی‌بیوتیک‌ها، جهش سایت‌های هدف و جهش در ژن تنظیمی را پوشش دهد. Check-MDR CT102 DNA میکروواری یک آزمون تشخیصی مولکولی جدید است که قادر به تشخیص ژن‌های خانواده ESBL (SHV، TEM و CTX-M) و شایع‌ترین کارباپنماز ها (IMP، KPC، VIM، NDM و OXA-48) می‌باشد. اگر چه میکروواری برای اپیدمیولوژی ژن‌های ESBL به نظر می‌رسد کمتر مناسب باشد ولی این روش یک تکنیک قوی است و دارای اختصاصیت و حساسیت (۱۰۰٪) برای اغلب ایزوله‌های باکتریایی است (۸۵،۸۴،۸۳).

(NGS) Next generation sequencing

فن آوری NGS به موجب سکانسینگ مقرون به صرفه و سریع کل ژنوم، انقلابی در تحقیقات زیست پزشکی بوجود آورده است. با اجتناب از استفاده از کلون‌های باکتریایی، فن آوری NGS قادر به توالی یابی DNA با کتابخانه‌های خاص پلتفرم که به‌صورت مداوم قبل از سکانسینگ به‌صورت ایزوترمال تکثیر می‌یابند و یا به طور مستقیم و بدون یک مرحله تکثیر در عرض چند ساعت با هزینه نسبتاً کمی انجام می‌گیرد. NGS ابزاری برای میکروب شناسی بالینی جهت توالی یابی DNA تک سلولی و DNA باکتری غیر قابل کشت از تمام نمونه‌های بالینی بدون یک مرحله کشت را فراهم می‌آورد، در نتیجه به طور مؤثر در زمان مورد نیاز برای کشت و پس از آن PCR و تعیین توالی صرفه جویی می‌کند. به‌عنوان یک نتیجه توالی یابی کل ژنوم (WGS) از طریق NGS، خصوصیات مبتنی بر PCR کارباپنماز ها، محیط ژنتیکی‌شان و عناصر متحرک ژنتیکی (اینتگرون، ترانسپوزون ها و پلاسمیدها) را می‌توان در یک واکنش واحد با چند PCR پر زحمت، هضم آنزیم‌های محدودالاثر و مراحل ژل الکتروفورز مقایسه کرد. علاوه بر این، فن آوری NGS اطلاعاتی را برای تایپینگ سویه‌ها، شناسایی گونه‌ها و اطلاعاتی در مورد کل ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویرولانس ایزوله را فراهم می‌کند، در نتیجه یک دید مولکولی جامع از ایزوله تحت بررسی را ارائه می‌کند. در نتیجه، مطالعات اپیدمیولوژی و مطالعات مکانیسم‌های مقاومت کارباپنم در حال حاضر در یک واکنش انجام می شود و تک کارباپنماز هایی که نمی‌توانند با روش PCR مشخص شوند، به راحتی توسط WGS شناسایی و مشخص می‌شوند.WGS ، بر خلاف تمام روش‌هایی دیگر که در بالا توضیح داده شد، قادر به شناسایی انواع کارباپنمازها، شناخته شده و یا ناشناخته، در عرض ۸ ساعت، با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ است. اشکال عمده WGS عدم وجود یک پلتفرم آنالیز داده‌های جهانی جهت سهولت در مقایسه، آنالیز و به اشتراک گذاری اطلاعات در جامعه علمی جهانی است. این مشکل ناشی از تفاوت جزئی در سیستم عامل‌های NGS است. برای حل این مشکل می توان مجموعه ای از اطلاعات را به یک پایگاه اطلاعاتی مرکزی اضافه نمود، بهینه سازی داده های NGS با داده‌های قدیمی‌تر انجام گیرد و از یک نرم افزار بیوانفورماتیک استاندارد جهت آنالیز تمام WGS فعلی و اطلاعات توالی قدیمی‌تر استفاده نمود (۱۶).

نتیجه‌گیری

سویه‌های تولید کننده کارباپنماز به دلیل مقاومت‌های MDR و PDR (Pan-drug resistance) و همچنین بدلیل عدم وجود روش‌های شناسایی مؤثر و استاندارد بالینی بجز MHT در تشخیص اولیه، مرتبط با مرگ و میر بالایی در بیماران می‌باشند. درمان مناسب و کنترل عفونت مرتبط به تشخیص به موقع و مؤثر باکتری‌های مقاوم به کارباپنم و نیز مکانیسم‌های مقاومت کاربا‌پنمی است. ناکامی در شناسایی کارباپنماز ها، وابسته به انتشار غیر قابل کنترل و شکست‌های درمانی آن‌هاست. کارباپنماز ها باید بطور معمول در آزمایشگاه‌های بالینی با استفاده از روش‌های مناسب شناسایی شوند و جهت اجرای صحیح استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به پزشکان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

گزارش شود. با این حال، روش‌های فنوتیپی بسیار حساس نمی‌باشند. شناسایی ارگانیسم‌های تولیدکننده KPC وMBL ممکن است مبتنی بر خواص مهاری مولکول‌های متعدد (به ترتیب بورونیک اسید و (EDTA باشد. شناسایی مولکولی ژن‌های کارباپنماز یک روش جایگزین دیگر است، اما نیاز به تخصص و هزینه بالا دارد که آن را برای آزمایشگاه‌های غیر تخصصی غیرممکن می‌کند. اختصاصی‌ترین روش‌های مولکولی که برای تشخیص کارباپنماز معرفی شده است، روش‌های Multiplex PCR و سنجش میکروارای DNA هستند. با این حال، به منظور جلوگیری از گسترش طغیان‌های بیمارستانی، شناسایی ارگانیسم‌های تولید کننده کارباپنماز بطور جدی باید بدنبال درمان آنتی‌بیوتیکی مؤثر و جداسازی باکتریهای عامل عفونت از بیماران صورت گیرد. در نهایت، برای سویه آلودکننده، آزمون Carba NP با حساسیت و اختصاصیت کمتر نسبت به دیگر روش‌ها به کارباپنم‌ها، می‌تواند توصیه شود. در موارد مثبت، روش مولکولی را می‌توان به‌عنوان یک روش تاییدی که به طور عمده مربوط به عوامل اپیدمیولوژیک است استفاده شود؛ اما در مورد غربالگری حاملین، محیط کرموژنیک SUPERCARBA و به دنبال آن تست Carba NP دارای اهمیت زیادی هستند.

منابع

1. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh B. Carbapenemases: A Review. Int J Adv Health Sci 2015;2(4):11-17.
2. Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. Two decades of imipenem therapy. J Antimicrob Chemother 2006;58:916-29.
3. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases Clin Microbiol Rev 2007; 20(3): 440-58.
4. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among Pseudomonas aeruginosastrains isolated from cancer patients. Biomed Res Int. 2014;2014.
5. Rahbar M, Monnavar KM, Vatan KK, Fadaei-haq A, Shakerian F. Carbapenem resistance in gram-negative bacilli isolates in an Iranian 1000-bed Tertiary Hospital. Pak J Med Sci 2008;24(4):537-40.
6. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. Biomed Res Int. 2014;2014:1–12.
7. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. J Chemotherapy. 2016 Jan 2;28(1):1-9.[Persian]
8. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005;18:306-25.
9. Azimi L , Rastegar Lari AA, Talebi M, Ebrahimzadeh Namvar AM,Soleymanzadeh Moghadam S. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of Klebsiellae Pneumoniae Carbapenemase Producing K. pneumoniae in Tehran, Iran. J Med Bacteriol. 2013; 2 (3, 4):pp. 26-31. .[Persian]
10. Lari AR, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghehbandan R. Phenotypic detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase among burns patients: first report from Iran. Burns. 2013 Feb 28;39(1):174-6.
11. Bialvaei AZ, Kouhsari E, Salehi-Abargouei A, Amirmozafari N, Ramazanzadeh R, Ghadimi-Daresajini A, Sedighi M. Epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii strains in Iran: a systematic review and meta-analysis. Journal of Chemotherapy. 2017 Jun 17:1-1.
12. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2010 Apr 8:dkq108.
13. Bratu S, Landman D, Haag Ret al. Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniaein New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium.Arch Intern Med2005;165: 1430 – 5
14. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP et al. Carbapenem resistance in Klebsiella pneumoniaenot detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis2006;12: 1209 – 13.
15. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemases.J Clin Microbiol2009;47: 785 – 6.
16. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. Journal of applied microbiology. 2015 Nov 1;119(5):1219-33.
17. Bertelli, C. and Greub, G. (2013) Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology.Clin Microbiol Infect19, 803–813.
18. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

and instruments for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. in Manual of commercial methods in medical microbiologyedited by Allan L. Truant. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2002; p. 413–29.

31. Thomson KS, Robledo IE, Vázquez GJ, Moland ES. KPC screening by updated BD Phoenix and Vitek 2 automated systems. J Clin Microbiol. 2011;49(9):3386–7.

32. Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in Acinetobacter baumanniiby automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. BMC Infect Dis. 2009;9(1):30.

33. Morsi / Phenotypic and genotypic detection of carbapenem resistant K. pneumoniae, Volume 25 / No. 1 / January 2016 109-116.

34. Haji Hashemi B, Farzanehkhah M, Dolatyar A, Imani M, Farzami MR, Rahbar M, Hajia MA. A study on prevalence of KPC producing from Klebsiella pneumoniae using Modified Hodge Test and CHROMagar in Iran. Ann Biol Res. 2012;3(12):5659-64.

35. Riazipour M, Tavakoli HR, Fooladi AAI. Assessment of carboxyl esterase activity in clinical isolates of Candida albicans. Jundishapur J Microbiol. 2011;4(1):43–8. [Persian]

36. Hung KH, Yan JJ, Lu JJ, Chen HM, Wu JJ. Characterization of the modi□ed Hodge test-positive isolates of Enterobacteriaceae in Taiwan. J Microbiol Immunol Infect. 2013;46(1):35–40.

37. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modi□ed Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2012;50(2):477–9.

38. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of Enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. J Clin Microbiol. 2010;48(4):1323–32.

39. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identi□cation and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):432–8.

40. Peaper DR, Kulkarni MV, Tichy AN, Jarvis M, Murray TS, Hodsdon ME. Rapid detection of carbapenemase activity through monitoring ertapenem hydrolysis in Enterobacteriaceae with LC-MS/MS. Bioanalysis. 2013;5(2):147–57

41. Janice Y. Laboratory diagnosis of NDM-1 and other carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Med Bull. 2011;16:4

42. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in Pseudomonas aeruginosaby use of a novel indicator the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. J Antimicrob Chemother.2013;68(12):2710–7

19. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identi□cation and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):432–8.

20. Institute CaLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S21. Wayne, PA: CLSI; 2012.

21. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis S, Daikos G, Bou Casals J, Tzouvelekis L. Combined disc methods for the detection of KPC-and/or VIM-positive Klebsiella pneumoniae: improving reliability for the double carbapenemase producers. Clin Microbiol Infect. 2013;19(9):E412–5

22. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. 2008;3(2):163–75.

23. Bialvaei AZ, Ka□l HS. Colistin Mechanisms and prevalence of resistance. Cur Med Res Opin. 2015;31:707–721. [Persian]

24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. CLSI Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.

25. Raghunathan A, Samuel L, Tibbetts RJ. Evaluation of a real-time PCR assay for the detection of the Klebsiella pneumoniae carbapenemase genes in microbiological samples in comparison with the modied Hodge test. Am J Clin Pathol. 2011;135(4):566–71

26. Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of Enterobacteriaceae? J Clin Microbiol. 2011;49(2):697–701

27. De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identi□cation and susceptibility testing with the Vitek 2 system. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3734–8.

28. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras J-M, et al. Ability of the VITEK 2 advanced expert system to identify ß-lactam phenotypes in isolates of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. 2000;38(2):570–4.

29. Pailhories H, Cassisa V, Lamoureux C, Chesnay A, Lebreton C, Lemarie C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of ertapenem for Enterobacter cloacae: Vitek 2 system versus Etest and agar dilution methods. Int J Infect Dis. 2014;18:94–6.

30. Evangelista AT, Truant AL. Rapid systems

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

Chen Y-G, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-ß-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosastrains in China. J Clin Microbiol. 2009;47(4):1136–42

55. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis S, Daikos G, Bou Casals J, Tzouvelekis L. Combined disc methods for the detection of KPC-and/or VIM-positive Klebsiella pneumoniae: improving reliability for the double carbapenemase producers. Clin Microbiol Infect. 2013;19(9):E412–5.

56. Peter S, Lacher A, Marschal M, Hölzl F, Buhl M, Autenrieth I, et al. Evaluation of phenotypic detection methods for metallo-ß-lactamases (MBLs) in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014;33(7):1133–41

57. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum ß-lactamases in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):2990–5.

58. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo-ß-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. J Clin Microbiol. 2008;46(6):2028–37

59. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. J Clin Microbiol. 2012;50(6):1841–6.

60. Tenover FC, Canton R, Kop J, Chan R, Ryan J, Weir F, et al. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3780–7

61. Carrer A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1913–4.

62. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2008;46(9):3110–1

63. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. J Clin Microbiol. 2012;50(6):1841–6

64. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;77(4):296–300

65. Bracco S, Migliavacca R, Pini B, Corbo N, strain, Klebsiella pneumoniaeATCC 700603. J Clin Microbiol.2011;49(12):4301–3

43. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenylboronic acid, dipicolinic acid and temocillin. Clin Microbiol Infect. 2014;20(4):345–9.

44. Yan J-J, Wu J-J, Tsai S-H, Chuang C-L. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo-ß-lactamases in gram-negative bacilli. Diagn Microbiol Infect Dis. 2004;49(1):5–11.

45. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo-beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosaand Acinetobacter baumannii. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(4):486–8.

47. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo-ß-lactamase-producing Pseudomonasspp. and Acinetobacterspp. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(1):102–5

48. Pluquet E, Arlet G, Bingen E, Drieux L, Mammeri HA. Sensitive and speci□c phenotypic assay for metallo-ß-lactamases detection in enterobacteria using moxalactam disk supplemented with EDTA (MOX-EDTA disk method). J Clin Microbiol. 2011;49(7):2667–70.

49. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modi□ed Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2011;49(5):1965–9

50. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. J Antimicrob Chemother. 2010;65(7):1319–21.

51. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley S, Jaurin B, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. Biochem J. 1983;209:229–33

52. Shivaprasad A, Antony B, Shenoy P. Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase and carbapenemase production in Acinetobacter baumannii. J Clin Diagn Res. 2014;8(5):DC05–DC08.

53. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmstrom A, Qwarnstrom A, et al. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of Pseudomonasspp. and Acinetobacterspp. J Clin Microbiol. 2005;43(2):942–4

54. Qu T-T, Zhang J-L, Wang J, Tao J, Yu Y-S,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

Nucleo E, Brigante G, et al. Evaluation of Brilliance CRE Agar for the detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. New Microbiol. 2013;36(2):181–6

66. Kotsakis SD, Petinaki E, Scopes E, Siatravani E, Miriagou V, Tzelepi E. Laboratory evaluation of Brilliance™ CRE Agar for screening carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: performance on a collection of characterised clinical isolates from Greece. J Glob Antimicrob Resist. 2013;1(2):85–90

67. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(1):88–90.

68. Willemse-Erix D, Bakker-Schut T, Slagboom-Bax F, Jachtenberg JW, Lemmens-den Toom N, Papagiannitsis CC, et al. Rapid typing of extended spectrum ß-lactamase and carbapenemase producing Escherichia coliand Klebsiella pneumoniaeisolates using SpectraCellRA®. J Clin Microbiol. 2012;50(4):1370–5

69. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identi□cation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2013;68(3):487–9

70. Wang M, Shen Y, Turko NelsonDC IV, Li S. Determining carbapenemase activity with 18O labeling and targeted mass spectrometry. Anal Chem. 2013;85(22):11014–9.

71. Carricajo A, Verhoeven PO, Guezzou S, Fonsale N, Aubert G. Detection of carbapenemase-producing bacteria by using an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):1231–4.

72. Vogne C, Prod'Hom G, Jaton K, Decosterd L, Greub G. A simple, robust and rapid approach to detect carbapenemases in Gram negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: validation with triple quadripole tandem mass spectrometry, microarray and PCR. Clin Microbiol Infect. 2014;20(12):O1106–12.

73. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and in Pseudomonas aeruginosa isolates. J Clin Microbiol. 2014;52(8):3060–3.

74. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1503–7.

75. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906–9.

76. Zheng F, Sun J, Cheng C, Rui Y. The establishment of a duplex real-time PCR assay for rapid and simultaneous detection of blaNDM and blaKPC genes in bacteria. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013;12:30.

77. Bisiklis A, Papageorgiou F, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S. Speci□c detection of blaVIM and blaIMP metallo-ß-lactamase genes in a single real-time PCR. Clin Microbiol Infect. 2007;13(12):1201–3

78. Huang L, Hu X, Zhou M, Yang Y, Qiao J, Wang D, et al. Rapid detection of New Delhi metallo-beta-lactamase gene and variants coding for carbapenemases with different activities by use of a PCR-based in vitro protein expression method. J Clin Microbiol. 2014;52(6):1947–53

79. Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of Klebsiella pneumoniaecarbapenemase genes (blaKPC). J Clin Microbiol. 2012;50(8):2783–5

80. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, et al. Rapid and direct real-time detection of blaKPC and blaNDM from surveillance samples. J Clin Microbiol. 2013;51(11):3609–15.

81. Ambretti S, Gaibani P, Berlingeri A, Cordovana M, Tamburini MV, Bua G, et al. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in Enterobacteriaceae. Microb Drug Resist. 2013;19(3):212–5

82. Cheng C, Zheng F, Rui Y. Rapid detection of bla NDM, bla KPC, blaIMP, and bla VIM carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal ampli□cation. Microb Drug Resist. 2014;20(6):533–8

83. Ulyashova CE, Khalilova YI, Rubtsova CE, Edelstein CE, Alexandrova Icapital AC, Egorov CA. Oligonucleotide microarray for the identi□cation of carbapenemase genes of molecular classes a, B, and d. Acta Nat. 2010;2(3):101–9.

84. Peter H, Berggrav K, Thomas P, Pfeifer Y, Witte W, Templeton K, et al. Direct detection and genotyping of Klebsiella pneumoniaecarbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. J Clin Microbiol. 2012;50(12):3990–8.

85. Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-Van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray. J Med Microbiol. 2012;61(Pt 6):809–12

86. Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods.Annu Rev Genomics Hum Genet9, 387–402.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]

A review on common laboratory methods for detection of carbapenemase gram-negative bacilli

Ebrahim Kouhsari, PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ebrahim.msph@gmail.com
Abed Zahedi bialvaei, PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. abedzahedi@gmail.com
Sara Abbasian, MSc student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. sabassian460@gmail.com
Hashem Fakhre Yaseri, MD, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Firouzgar Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Hossein Samadi Kafil, PhD, Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. ebrahim1340@yahoo.com
Rokhsare Mohamadzade, MSc student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. rmohamadi@gmail.com
***Mohammad Rahbar**, PhD, Professor, Department of Microbiology, Iranian Reference Health Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran (*Corresponding author). rahbar.reflab@gmail.com

Abstract

The prevalence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* has increased dramatically over the past decade. Identification of these bacteria because of its variation in minimum inhibitory concentration for carbapenem resistance is important. Therefore, identification of the bacteria in the clinical microbiology laboratory is a major matter for the selection and implementation of infection control measures and appropriate treatment plan. The screening of carbapenemase-producing bacteria could be done with different phenotypic, biochemical and molecular methods; however, each of these methods has its own advantages and disadvantages. The aim of this study is to investigate and introduction of common available methods to detect carbapenemase.

Keywords: Carbapenemase, Enterobacteriaceae, Antibiotic resistance, Identification, Infection control

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-16]