

Evaluation of carbapenem inactivation method for accurate detection of *pseudomonas aeruginosa* isolates producing carbapenemase enzymes

Beig M¹, Arabestani MR²

1. MSc of Medical Microbiology, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1243-3164

2. Associate Professor of Medical Bacteriology, Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran (Corresponding author), Tel: +98813838077, Email: mohammad.arabestani@gmail.com, ORCID ID:0000-0001-9991-8193

ABSTRACT

Background and Aim: Different phenotypic methods are available for identification of *pseudomonas aeruginosa* isolates producing carbapenemase enzymes. Carbapenem inactivation method (CIM) is a fast and inexpensive way for detection of this enzyme. The purpose of this study was to evaluate the CIM method for accurate identification of carbapenemase producing *pseudomonas aeruginosa* isolates.

Materials and Methods: A total of 97 clinical specimens were collected from the patients in the hospitals of Hamadan from November 2017 to May 2018, in Iran. Antibiotic susceptibility test was performed by disc diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) for imipenem was measured by E-test. Then, CIM test and polymerase chain reaction (PCR) methods were performed. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the CIM test were calculated for each of the genes. Using SPSS16 software, significance of CIM test was evaluated by chi-square test (X²).

Results: In this study, the highest and lowest levels of resistance belonged to cefoxitin 91 (93.8%) and piperacilin/tazobactam 38 (39.2%). Among 97 *P. aeruginosa* clinical isolates, 49 (50.51%) were carbapenemase producer with positive results for CIM test in 44 (89.7%) isolates, and negative results for CIM test in 48 (49.48%) isolates. Therefore, the sensitivity and specificity of the CIM test were 90% and 100%, respectively.

Conclusions: According to the results of this study CIM method is an inexpensive test which can be easily performed and has high sensitivity and specificity for identification of carbapenemase producing *P. aeruginosa* isolates.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, PCR, CIM

Received: Feb 3, 2019

Accepted: July 14, 2019

How to cite the article: Beig M, Arabestani MR. Evaluation of carbapenem inactivation method for accurate detection of *pseudomonas aeruginosa* isolates producing carbapenemase enzymes. SJKU 2019;24(4):103-115.

Copyright © 2019 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی روش غیرفعال کردن کاربایتم جهت تشخیص دقیق ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم‌های کاربایتماز

معصومه بیگ^۱، محمد رضا عربستانی^۲

۱- کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. شناسه اרקید: ۳۱۶۴-۱۲۴۳-۰۰۰۰-۰۰۰۳

۲- دانشیار باکتری شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات بروسولوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۸۱۳۸۳۸۰۷۷، پست الکترونیک: mohammad.arabestani@gmail.com، شناسه اרקید: ۸۱۹۳-۹۹۹۱-۰۰۰۰-۰۰۰۱

چکیده

زمینه و هدف: جهت شناسایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم کاربایتماز، روش‌های فنوتیپی مختلفی وجود دارد. روش غیرفعال کردن کاربایتم (CIM) روش سریع و ارزان به منظور تشخیص این آنزیم می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی روش CIM برای شناسایی دقیق ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم‌های کاربایتماز می‌باشد.

روش بررسی: تعداد ۹۷ نمونه‌ی بالینی از بیمارستان‌های شهر همدان از آبان ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهاري نمونه‌ها نسبت به ایمی‌پنم، با استفاده از نوار E-test انجام گرفت. سپس روش CIM و روش PCR انجام شد. حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی روش CIM برای هر کدام از ژن‌ها محاسبه شد. بررسی معناداری تست CIM نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۶ و آزمون آماری کای دو (X^2) انجام گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین ۹۱ (۹۳/۸٪) و پیراسیلین-تازوباکتام ۳۸ (۳۹/۲٪) بود. از میان ۹۷ ایزوله‌ی بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۴۹ (۵۰/۵۱٪) ایزوله مولد آنزیم‌های کاربایتماز بودند که از میان آن‌ها ۴۴ (۸۹/۷٪) ایزوله تست CIM مثبت و ۴۸ (۴۹/۴۸٪) ایزوله تست CIM منفی داشتند. حساسیت و اختصاصیت تست CIM به ترتیب ۹۰٪ و ۱۰۰٪ بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش CIM یک روش ارزان و آسان و دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی برای شناسایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم‌های کاربایتماز می‌باشد.

کلید واژه‌ها: سودوموناس آئروژینوزا، PCR، CIM

وصول مقاله: ۹۷/۱۱/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۴/۱۲ پذیرش: ۹۸/۴/۲۲

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژن فرصت طلبی است که عفونت‌های مختلفی در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی ایجاد می‌کند (۱). هرچند کاربائیم‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت دارویی چندگانه (MDR) Multi Drug Resistance باقی‌مانده‌اند، اما افزایش میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها موجب شکست‌های درمانی شده است (۲). مکانیسم‌های مقاومت این باکتری‌ها به کاربائیم‌ها، شامل تولید آنزیم‌های کاربائینماز، افزایش ترشح پمپ‌های تراوشی، موتاسیون در پورین‌های غشا خارجی و به دنبال آن کاهش نفوذپذیری غشا خارجی و افزایش تولید آنزیم β -AmpC lactamases می‌باشد. از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به این رده از آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید آنزیم‌های کاربائینماز می‌باشد که توسط عناصر ژنتیکی متحرک می‌توانند به سرعت در میان باکتری‌های گرم منفی به ویژه سودوموناس آئروژینوزا منتقل شده و موجب انتقال مقاومت شوند (۳). برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها روش‌های متعددی وجود دارد که در بین آن‌ها طبقه‌بندی آمبلر و طبقه‌بندی بوش کاربرد بیشتری دارند. در طبقه‌بندی آمبلر که بر اساس توالی آمینواسیدی آنزیم‌ها می‌باشد، ۴ رده‌ی مختلف A, B, C, D وجود دارد. رده‌های A, B, C به وسیله‌ی مکانیسم سرین عمل می‌کنند، در صورتی که رده‌ی B برای فعالیت خود نیازمند عنصر روی می‌باشد (۴). کاربائینمازهای رده‌ی A یک سرین بتالاکتاماز هستند که در جایگاه فعال آن‌ها سرین وجود دارد و برای فعالیت خود نیازمند سرین می‌باشند. کاربائینمازهای رده‌ی A, B و D توالی آمینواسیدی خیلی شبیه به هم دارند. تشابه ساختاری میان این سه کلاس تا اندازه‌ای است که می‌توان آن‌ها را از یک نیای مشترک دانست. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها نظیر کاربائیم‌ها، پنی‌سیلین‌ها و آزترونام را دارا می‌باشند. کاربائینمازهای رده‌ی A, C و D

بوسیله‌ی کلانولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شوند (۵). *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) رایج‌ترین کاربائینماز سرین رده‌ی A می‌باشد و دارای تنوعی از KPC₂ تا KPC₁₃ است، که تنها در توالی‌های آمینواسیدی تفاوت دارند (۶). ژن *bla_{KPC}* بر روی یک پلاسمید قرار دارد و توسط Tn₃ و Tn₄₄₀₁ در میان سویه‌های باکتریایی منتقل می‌شوند. کاربائینمازهای رده‌ی B به‌عنوان metallo-beta-lactamase (MBL) *lactamase* شناخته می‌شوند که در جایگاه فعالیت آن‌ها روی وجود دارد (۷). متالو بتالاکتامازها به دلیل ایجاد مقاومت به کربائیم‌ها که از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی هستند، بسیار قابل توجه می‌باشند. آنزیم‌های MBL داخل اینتگرون واقع شده و توانایی ادغام در پلاسمید یا کروموزوم را دارند و قابلیت انتقال به سایر ایزوله‌های سودوموناس و یا باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند. متالو بتالاکتامازها بر اساس ساختار مولکولی به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند که عبارت‌اند از (IMP) *Veronaimipenemase*, *Imipenemase* metallo- German *imipenemase* (VIM), *(GIM)* Sao Paulo beta-lactamase (SPM), *(NDM)* New Delhi metallo-beta-lactamase, *Imipenemase* Seoul (SIM) که از میان این آنزیم‌ها، IMP در سودوموناس آئروژینوزا بارزتر می‌باشد. رده‌ی C به آنزیم‌های β -AmpC معروف هستند و قادر به هیدرولیز سفومایسین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند (۸). دسته‌ای از بتالاکتامازهای سرین نیز وجود دارند که تشابه اندکی با بتالاکتامازهای رده‌ی A و C دارند و تحت عنوان *OXAcilin-hydrolyzine* (OXA) یا *agrasilinas* نام گذاری می‌شوند. این بتالاکتامازها در رده‌ی D جای گرفته‌اند (۹). هرچند روش‌های مولکولی به‌عنوان روش‌های مرجع برای شناسایی ایزوله‌های مولد کاربائینماز به کار گرفته می‌شوند اما دارای معایب و محدودیت‌هایی

هم چون هزینه‌ی بالا، نیازمندی به افراد متخصص، عدم توانایی در شناسایی ژن‌های کارباپنماز جدید و هم چنین محدودیت در به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌های بالینی می‌باشند. تست‌های فنوتیپی مختلفی با حساسیت و اختصاصیت متفاوت برای شناسایی آنزیم‌های کارباپنماز وجود دارد (۱۰). تست Carbapenem Inactivation Method (CIM) با حساسیت و اختصاصیت بالا از جمله تست‌های فنوتیپی مناسب جهت شناسایی چنین سویه‌هایی می‌باشد. بنابراین یک روش ساده، قابل اعتماد و کم هزینه برای غربالگری ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کرباپنماز جهت کنترل عفونت ضروری می‌باشد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط Pierce و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در آمریکا انجام شد، حساسیت و اختصاصیت روش CIM جهت شناسایی آنزیم‌های کارباپنماز به ترتیب ۹۵٪ و ۱۰۰٪ بود (۱۲). هم چنین در مطالعه‌ای که توسط van der Zwaluw و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در آمریکا انجام شد، نشان داده شد که روش CIM روش فنوتیپی مناسب و کم هزینه جهت شناسایی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد، که حساسیت و اختصاصیت بالای تست CIM را نشان می‌دهد (۱۳). لذا هدف از این مطالعه ارزیابی روش CIM جهت شناسایی سریع ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد.

روش بررسی

جمع‌آوری ایزوله‌های باکتریایی

در طی دوره‌ی ۹ ماهه از آبان ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ نمونه‌های باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های بعثت، بهشتی و سینا شهر همدان جمع‌آوری شدند. سپس ایزوله‌های باکتریایی به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی منتقل شدند. جهت تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رشد در محیط مک کانکی آگار به رنگ قهوه‌ای-سبز،

تست اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، واکنش در محیط تریپل شوگر آیرون آگار به صورت قلبا/قلیا، تست اکسیداسیون-فرمانتاسیون به صورت اکسیداسیون مثبت و فرمانتاسیون منفی، بررسی تحرک که متحرک بوده، رشد در محیط ستریماید آگار مثبت، توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. تمامی محیط‌های کشت مورد استفاده از شرکت مرک کشور آلمان خریداری شدند (۱۴).

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌ها، به روش استاندارد دیسک دیفیوژن و مطابق با روش ۲۰۱۸ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) انجام گرفت (۱۵). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی از شرکت MAST کشور انگلستان خریداری شدند و شامل پیراسیلین ($100 \mu\text{g}$)، پیراسیلین + تازوباکتام ($100/10 \mu\text{g}$)، سفتازیدیم ($30 \mu\text{g}$)، سفوتاکسیم ($30 \mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30 \mu\text{g}$)، آزترونام ($30 \mu\text{g}$)، ایمپنم ($10 \mu\text{g}$)، مروپنم ($10 \mu\text{g}$)، دوری‌پنم ($10 \mu\text{g}$)، آمیکاسین ($30 \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5 \mu\text{g}$) و تتراسایکلین ($30 \mu\text{g}$) بودند. از سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان سویه‌ی کنترل استفاده شد، که از موسسه‌ی تحقیقاتی انستیتو پاستور کشور ایران خریداری شد (۱۶).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ایمپنم

در این روش حداقل غلظت مهارکنندگی برای ایمپنم با استفاده از نوار Epsilon test (E-test) که از شرکت MAST کشور انگلستان خریداری شد، انجام گرفت. به این صورت که ابتدا سوسپانسیون نیم مک‌فارلند ($10^8 \pm 10^5$) از نمونه‌های مورد نظر تهیه شده و سپس بر سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت چمنی کشت داده شد، پس از چند دقیقه نوار E-test ایمپنم بر سطح پلیت قرار گرفت و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

استخراج DNA

در این مطالعه استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد. مطابق با این روش پس از کشت باکتری بر روی محیط بلاد آگار که به مدت یک شبانه روز انکوبه شده بود، با استفاده از لوپ استریل ۲-۳ کلنی از باکتری داخل ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. پس از این مرحله، قسمت رویی مخلوط دور ریخته شده و بر روی ته نشین لوله ۱۰۰ میکرولیتر NaOH میلی مولار اضافه گردید. سپس لوله داخل بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از آن تریس ۲۰ میلی مولار اضافه شد و سپس سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ rpm انجام گرفت و در نهایت قسمت رویی حاوی DNA جدا گردید (۱۹). روش PCR برای ژنهای مولد آنزیمهای SIM, VIM, IMP, SPM, OXA48, AmpC, KPC, GIM برای ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا توسط پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۱ انجام گرفت. طول باندهای مورد نظر بر اساس bp (جفت باز) می‌باشد.

سانتی گراد پلیت‌ها انکوبه شده و نتایج خوانده شد. با توجه به دستورالعمل ۲۰۱۸ CLSI، حداقل غلظت مهارکنندگی ایمنی پنم مساوی و بیشتر از ۸ $\mu\text{g/ml}$ به عنوان مقاوم، ۴ $\mu\text{g/ml}$ به عنوان نیمه حساس و کمتر از ۲ $\mu\text{g/ml}$ به عنوان حساس در نظر گرفته می‌شود (۱۷).

تست CIM

تست فنوتیپی CIM مطابق با ۲۰۱۸ CLSI جهت شناسایی ایزوله‌های مولد آنزیمهای کارباپنماز انجام شد (۱۸). ابتدا یک دیسک مروپنم (۱۰ μg) درون ۲ میکرولیتر محیط تریپتیک سوی براث محتوی ۱ لوپ پر (۱۰ μL) از باکتری مشکوک (باکتری که مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کارباپنم دارد)، تلقیح کرده پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، دیسک مروپنم از سوسپانسیون توسط لوپ استریل خارج شده و روی پلیت مولر هینتون قرار گرفت که قبلاً توسط باکتری اشریشیاکلی ATCC 25922 که فاقد توانایی تولید آنزیم کارباپنماز بوده و به عنوان سویه‌ی کنترل منفی می‌باشد، کشت داده شد. این باکتری از موسسه‌ی تحقیقاتی انستیتو پاستور کشور ایران خریداری گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. نتایج پس از یک شبانه روز انکوباسیون خوانده شدند. در صورتی که باکتری مشکوک مولد آنزیم کارباپنماز باشد، مروپنم توسط این آنزیم، غیر فعال شده و باکتری اشریشیاکلی حساس به دلیل غیر فعال شدن آنتی‌بیوتیک مروپنم، توانایی رشد اطراف دیسک مروپنم را خواهد داشت و در صورتی که باکتری مولد آنزیم کارباپنماز نباشد، باکتری حساس توانایی رشد اطراف دیسک مروپنم را نداشته و هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک مشاهده می‌شود. مطابق با جدول ۲۰۱۸ CLSI هاله‌ی عدم رشد ۱۵-۶ میلی‌متر نشان‌دهنده‌ی سویه‌ی مولد آنزیم کارباپنماز و هاله‌ی عدم رشد >19 میلی‌متر به عنوان سویه‌ی می‌باشد که توانایی تولید آنزیم کارباپنماز را ندارد (۱۱).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

منبع	طول محصولات	توالی نوکلئوتیدی	ژن های مورد مطالعه
(۲۰)	۵۳۸	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	KPC- ^۱ to KPC- ^۵
(۲۱)	۱۸۸	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	IMP
(۲۱)	۳۹۰	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	VIM
(۲۱)	۲۷۱	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	SPM-1
(۲۱)	۵۷۰	TAC AAG GGA TTC GGC ATC G TAA TGG CCT GTT CCC ATG TG	SIM
(۲۱)	۴۷۷	TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC	GIM
(۲۲)	۶۳۰	ATA ACC ACC CAG TCA CGC CAG TAG CGA GAC TGC GCA	AMPC
(۲۰)	۲۸۱	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	OXA48

روش آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار ۱۶ SPSS انجام گرفت. برای بررسی معناداری ارتباط بین تست فنوتیپی CIM و PCR از آزمون کای دو (X^2) استفاده شد. مقادیر $P < 0.005$ به عنوان معنادار در نظر گرفته شدند. حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی با استفاده از فرمول های زیر محاسبه شدند (۲۳، ۲۴).

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{مثبت حقیقی}}$$

$$\text{اختصاصیت} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی}}$$

$$\text{ارزش اخباری مثبت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{مثبت حقیقی}}$$

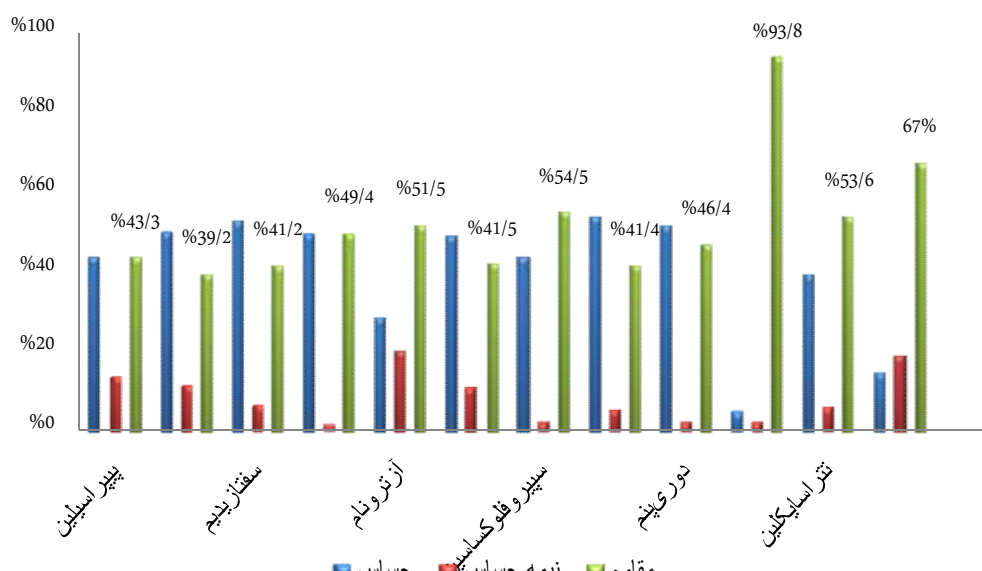
$$\text{ارزش اخباری منفی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{منفی حقیقی}}$$

یافته‌ها

جمع‌آوری ایزوله‌ها و تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی:

تعداد ۱۱۵ باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌های شهر همدان جداسازی شدند، که بر اساس تست‌های تشخیص آزمایشگاهی ۹۷ (۸۴/۳۴٪) ایزوله به عنوان سودوموناس آئروژینوزا مورد تایید قرار گرفتند. تست

حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸ انجام شد. میزان مقاومت سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران بستری در بیمارستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده در نمودار ۱ ذکر شده است.



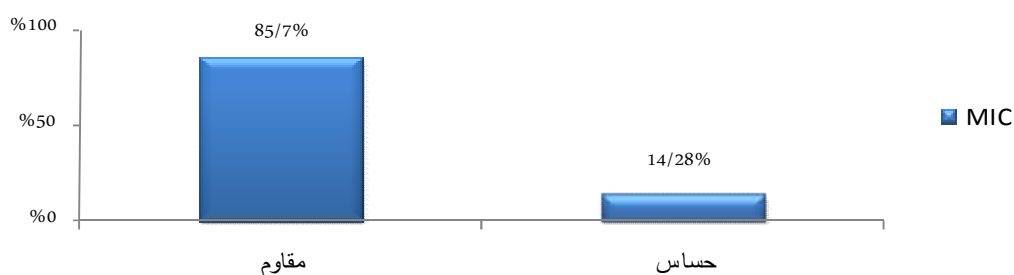
نمودار ۱. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

به عنوان نیمه حساس و کمتر از ۲ µg/ml به عنوان حساس در نظر گرفته می‌شود.

از میان ۴۹ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزای مقاوم و نیمه حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم، ۴۲ (۸۵/۷٪) ایزوله MIC مقاوم و ۷ (۱۴/۲۸٪) ایزوله MIC نسبت به ایمپنم داشته و هیچ ایزوله‌ی دارای MIC حد واسط وجود نداشت (نمودار ۲، تصویر ۱).

با توجه به نتایج نمودار ۱، بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین ۹۱ (۹۳/۸٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پیراسیلین-تازوباکتام ۳۸ (۳۹/۲٪) بود. هم‌چنین بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک مروپنم ۵۲ (۵۳/۶٪) و کمترین میزان حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین ۴ (۴/۱٪) بود.

با توجه به دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸، MIC ایمپنم مساوی و بیشتر از ۸ µg/ml به عنوان مقاوم، ۴ µg/ml

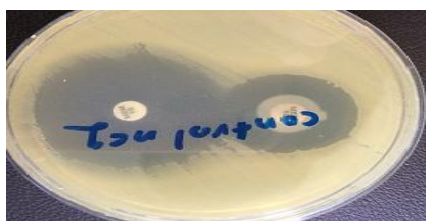


نمودار ۲: نتایج MIC نمونه‌های مقاوم به ایمنی پنم

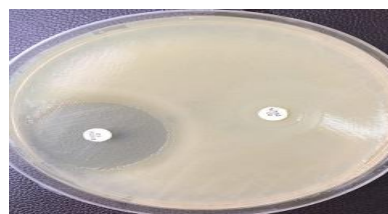


تصویر ۱: نتایج تست MIC ایمنی پنم ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

بر اساس نتایج، از میان ۴۹ ایزوله‌ی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم، ۴۴ (۸۹/۷٪) ایزوله تست CIM مثبت، و ۵ (۱۰/۲٪) ایزوله تست CIM منفی داشتند. از میان ۴۸ (۱۰۰٪) ایزوله که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم حساس بودند، ۴۸ ایزوله تست CIM منفی داشتند. (تصویر ۲).



۲

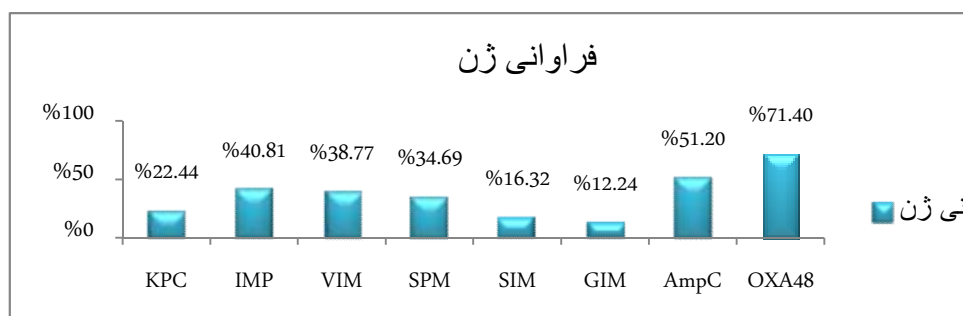


۱

تصویر ۲: نتایج حاصل از تست فنوتیپی CIM ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا. ۱: تست CIM مثبت ۲: تست CIM منفی

۱۷ (٪۳۴/۶۹) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم SPM، ۸ (٪۱۶/۳۲) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم SIM، ۲۵ (٪۵۱/۰۲) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم AMPC، ۳۵ (٪۷۱/۴) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم OXA48 و ۱۱ (٪۲۲/۴۴) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم KPC بودند (نمودار ۳).

تعیین ژنوتیپی سویه‌های مولد آنزیم‌های کاربامپناز توسط از میان ۹۷ ایزوله‌ی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران، ۴۹ ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک کاربامپنم مقاوم بودند که از این میان، ۲۰ (٪۴۰/۸) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم IMP، ۱۹ (٪۳۸/۷۷) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم VIM، ۶ (٪۱۲/۲۴) ایزوله دارای ژن مولد آنزیم GIM،



نمودار ۳: فراوانی ژن‌های MBL و KPC ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

۲۵ ایزوله‌ی مولد آنزیم AmpC و ۳۵ ایزوله‌ی مولد آنزیم OXA48، تست CIM به ترتیب قادر به شناسایی در ۲۲ و ۳۳ ایزوله بود، که حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی تست CIM برای آنزیم AmpC به ترتیب برابر با ۸۹٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۸۸٪ و برای آنزیم OXA48 به ترتیب برابر با ۹۴٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۸۷٪ بود (جدول ۲). هم‌چنین تست CIM جهت شناسایی آنزیم‌های کاربامپناز مختلف نیز در مقایسه با PCR معنادار بود (جدول ۲).

حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی تست CIM برای ژن‌های کاربامپناز مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. از میان ۱۱ ایزوله‌ی مولد آنزیم KPC، ۲۰ ایزوله‌ی مولد آنزیم IMP، ۱۹ ایزوله‌ی مولد آنزیم VIM، ۸ ایزوله‌ی مولد آنزیم SIM، ۱۷ ایزوله‌ی مولد آنزیم SPM و ۶ ایزوله‌ی مولد آنزیم GIM، تمامی ایزوله‌های مولد این آنزیم‌ها توسط روش CIM مورد شناسایی قرار گرفتند و حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی تست CIM برای شناسایی در این ایزوله‌ها ۱۰۰٪ بود. هم‌چنین از میان

جدول ۲: نتایج تعیین حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و معناداری تست CIM برای ژن‌های مولد آنزیم‌های KPC
AmpC, GIM, SIM, SPM, VIM, IMP, ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

آنزیم‌های کارباپنماز	PCR	CIM مثبت	منفی CIM	حساسیت	اختصاصیت	ارزش اخباری مثبت	ارزش اخباری منفی	معناداری (P value)
KPC	۱۱	۱۱	۰	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	P= ۰/۰۰
AmpC	۲۵	۲۲	۳	۸۹%	۱۰۰%	۱۰۰%	۸۸%	P= ۰/۰۰
OXA48	۳۵	۳۳	۲	۹۴%	۱۰۰%	۱۰۰%	۸۷%	P= ۰/۰۰
IMP	۲۰	۲۰	۰	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	P= ۰/۰۰
VIM	۱۹	۱۹	۰	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	P= ۰/۰۰
SIM	۸	۸	۰	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	P= ۰/۰۰۱
SPM	۱۷	۱۷	۰	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	P= ۰/۰۰
GIM	۶	۶	۰	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	P= ۰/۰۰

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، تمام سویه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز، تست CIM مثبت داشتند به جز دو ایزوله که مولد آنزیم OXA48 بودند و سه ایزوله که مولد آنزیم AmpC بودند، اما تست CIM آنها دارای نتایج منفی بوده و حساسیت این تست برای این دو آنزیم به ترتیب ۹۴٪ و ۸۹٪ بود. تست CIM در تمام ایزوله‌هایی که فاقد توانایی تولید آنزیم کارباپنماز بودند، منفی گزارش گردید، که نشان دهنده‌ی حساسیت ۹۰٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ این تست می‌باشد.

از جمله مزایای تست CIM سهولت در اجرای این روش، عدم نیازمندی به تجهیزات و مواد گران قیمت و هزینه‌ی پائین برای به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی می‌باشد (۲۵). یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های این تست نیازمندی به انکوباسیون یک شبانه روز برای خواندن نتایج قطر هاله‌ی عدم رشد اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی برای ایزوله‌های مورد بررسی می‌باشد (۲۶). مطالعات مختلفی جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت این تست انجام شده است. در مطالعه‌ای که توسط Aktas و همکاران در سال ۲۰۱۷ در ترکیه انجام

گرفت، حساسیت و اختصاصیت روش CIM برای شناسایی در ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز، به ترتیب ۷۸٪ و ۱۰۰٪ بود (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر حساسیت تست CIM بالاتر از مطالعه‌ی Aktas و همکاران در سال ۲۰۱۷ بود و اختصاصیت در دو مطالعه‌ی انجام شده مشابه و برابر ۱۰۰٪ بود. که این تفاوت در دو مطالعه برای حساسیت تست CIM، احتمالاً به دلایلی از جمله خطای نیروی انسانی، شرایط محیط آزمایشگاهی و تجهیزات به کار رفته باشد. در مطالعه‌ی دیگری که توسط Aguirre-Quiñonero و همکاران در اسپانیا در سال ۲۰۱۷ انجام گرفت، حساسیت و اختصاصیت روش CIM برای شناسایی ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز، به ترتیب ۸۵/۷٪ و ۹۵/۷٪ بود (۲۸). که نتایج این مطالعه کمی متفاوت با نتایج مطالعه‌ی حاضر بود که اختصاصیت نزدیک به ۱۰۰٪ و حساسیت بالا گزارش شده است که احتمالاً به دلیل تفاوت مناطق جغرافیایی دو مطالعه‌ی انجام گرفته و همچنین تفاوت در الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های دو مطالعه باشد که از مکانیسمی به جز تولید آنزیم‌های کارباپنماز برای مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم استفاده کند. هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Bayraktar

میزان حساسیت و اختصاصیت تغییر کند. همسو با مطالعه‌ی ما، مطالعه‌ی دیگری که توسط Suzuk و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور ترکیه بر روی ۸۳ سویه از خانواده‌ی انتروباکتریاسه جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت روش CIM برای آنزیم OXA-48 انجام گرفت، حساسیت ۹۷/۵٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ برای این تست گزارش گردید (۳۰). هم‌چنین در مطالعه‌ی دیگری که توسط Pediatrics و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور آمریکا بر روی ۱۹۱ سویه از خانواده‌ی انتروباکتریاسه انجام شد، حساسیت روش CIM جهت شناسایی آنزیم‌های XA-48، IMP و KPC به ترتیب برابر ۸۰٪، ۸۳٪ و ۹۱٪ بود (۳۱). در مطالعه‌ی حاضر حساسیت روش CIM برای آنزیم‌های XA-48، IMP و KPC به ترتیب ۹۴٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ بود. KPC از رده‌ی A آنزیمی و محدودیت تعداد سویه‌های مورد بررسی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، به دلیل حساسیت و اختصاصیت بسیار بالای روش CIM و سهولت انجام و سریع بودن این روش می‌توان آن را به‌عنوان روش بسیار مناسبی برای تشخیص ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کاربپنماز در کمترین زمان معرفی و در آزمایشگاه‌های بالینی و تشخیص طبی مورد استفاده قرارداد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاق ۲۷۳. ۱۳۹۷. UMSHA.REC. IR. و شماره طرح ۹۷۰۴۲۶۲۳۹۹ می‌باشد، نویسندگان مراتب تشکر خود را از آن معاونت محترم ابراز می‌دارند.

در ترکیه در سال ۲۰۱۹ انجام گرفت حساسیت و اختصاصیت روش CIM به ترتیب ۹۲/۷٪ و ۱۰۰٪ گزارش شد (۲۵). نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو با مطالعه‌ی فوق بود که به نظر می‌رسد به دلیل نزدیکی دو منطقه‌ی جغرافیایی و تشابه در الگوی مقاومتی ایزوله‌های دو منطقه باشد. ۱ در مطالعه‌ای که توسط Lisiane Rech و همکاران در سال ۲۰۱۸ در کشور برزیل بر روی ۸۳ سویه از خانواده انتروباکتریاسه انجام شد، حساسیت و اختصاصیت تست CIM به ترتیب ۷۴/۴٪ و ۹۷/۵٪ گزارش شد (۲۹). میزان حساسیت در مطالعه‌ی Lisiane Rech و مطالعه‌ی ما تفاوت دارد، که احتمالاً به دلیل تفاوت در تعداد سویه‌های مورد بررسی دو مطالعه باشد، که در مطالعه‌ی حاضر تعداد سویه‌های کمتری مورد بررسی قرار گرفته است که می‌تواند بود که این تفاوت در میزان حساسیت می‌تواند احتمالاً به دلیل تفاوت در تعداد سویه‌های دو مطالعه و هم‌چنین تفاوت دو منطقه‌ی جغرافیایی و تجهیزات آزمایشگاهی و عوامل موثر محیطی باشد. همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، در مطالعه‌ای که توسط Saito و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور ژاپن بر روی ۲۳۳ سویه از خانواده‌ی انتروباکتریاسه انجام گرفت، تست CIM دارای حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۱/۶٪ جهت شناسایی ژن‌های IMP، KPC و OXA-48 بود (۳۲). مطالعه‌ی حاضر، اولین مطالعه در کشور ایران برای تعیین حساسیت و اختصاصیت تست CIM بود. از جمله مزایای مطالعه‌ی بررسی رده‌های آنزیمی A-D از آنزیم‌های کاربپنماز بود که در هیچ مطالعه‌ای تمام کلاس‌های آنزیمی بررسی نشده بودند. از جمله محدودیت‌های مطالعه‌ی انجام شده، عدم بررسی انواع مختلف ژن‌های کاربپنمازی از جمله رده‌های مختلف آنزیم OXA48 و هم‌چنین عدم بررسی آنزیمی غیر از

Reference

1. Potron Poirel L, Nordmann PJ. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:568-85.
2. Wi YM, Greenwood-Quaintance KE, Schuetz AN, Ko KS, Peck KR, Song J-H, et al. Activity of ceftolozane-tazobactam against carbapenem-resistant, non-carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and associated resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;62:pii: e01970-17.
3. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010;54:3072.
4. Hong DJ, Bae IK, Jang I-H, Jeong SH, Kang H-K, Lee KJI, et al. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 2015;47: 97-81.
5. Castanheira M, Rhomberg PR, Flamm RK, Jones RNJAa, chemotherapy. Effect of the β -lactamase inhibitor vaborbactam combined with meropenem when tested against serine-carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:5454-8.
6. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür AJPo. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PLoS One* 2015;10:e0117874.
7. Pathak P, Jaishi N, Yadav BK, Shah PKJM. Prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and metallo beta lactamases (MBL) mediated resistance in gram negative bacterial pathogens. *J Microbiol* 2017;4:561-7.
8. Chika E, Charles E, Ifeanyichukwu I, Chigozie U, Chika E, Carissa D, et al. Phenotypic detection of AmpC beta-lactamase among anal *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Nigerian abattoir. *Archive Clin Microbiol* 2016;7:1-5.
9. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:373-83.
10. McMullen AR, Yarbrough ML, Wallace MA, Shupe A, Burnham C-ADJCC. Evaluation of genotypic and phenotypic methods to detect carbapenemase production in Gram-negative bacilli. *Clin Chem* 2017;63:723-30.
11. Crowe A, Brenton L, Kingston M, Jardine D, Waters MJJP. Comparison of the carbapenem inactivation method (CIM) and modified carbapenem inactivation method (mCIM) for the detection of carbapenemase-producing organisms. *Pathology* 2018;50:764-6.
12. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. The modified carbapenem inactivation method (mCIM) for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2017;55:2321-33.
13. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LMJPO. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *Plos One* 2015;10:e0123690.
14. Galvani AA, Tukmechi AJRHC. Determination of the prevalence of metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical samples by imipenem-EDTA combination disk method in Mottahari and Emam Khomaini hospitals of Urmia. *J Health Qual* 2015;2:58-65.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA, 2018;38-40.
16. Jorgensen JH, Turnidge JD. Manual of Clinical Microbiology; Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. 11 ed nd. Mbio, 2015;1253-73.
17. Humphries RM, Hindler JA, Magnano P, Wong-Beringer A, Tibbetts R, Miller SA. Performance of ceftolozane-tazobactam Etest, MIC test strips and disk diffusion as compared to reference broth microdilution for beta-lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol* 2018;56:e01633-17.
18. Aguirre-Quiñero A, Cano M, Gamal D, Calvo J, Martínez-Martínez L. Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. 2017;88:214-8.

19. Junior JCR, Tamanini R, Soares BF, de Oliveira AM, de Godoi Silva F, da Silva FF, et al. Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semin Cienc Agrar* 2016;37:3069-78.
20. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:490-5.
21. Wang TH, Leu YS, Wang NY, Liu CP, Yan TR. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018;7:2-8.
22. Schill F, Abdulmawjood A, Klein G, Reich F. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *J Food Microbiol* 2017;257:58-66.
23. Baratloo A, Hosseini M, Negida A, El Ashal G. Part 1: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity. *Emerg (Tehran)* 2015;3:48-9.
24. Safari S, Baratloo A, Elfil M, Negida A. Evidence Based Emergency Medicine Part 2: Positive and negative predictive values of diagnostic tests. *Emerg (Tehran)* 2015;3:87-8.
25. Bayraktar B, Barış A, Malkoçoğlu G, Erdemir D, Kına NJMDR. Comparison of carba NP-direct, carbapenem inactivation method, and β -CARBA tests for detection of carbapenemase production in Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 2019;25:97-102.
26. Kuchibiro T, Komatsu M, Yamasaki K, Nakamura T, Nishio H, Nishi I, et al. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Infect Chemother* 2018;24:262-6.
27. Aktas E, Malkocoglu G, Otlu B, Copur Cicek A, Kulah C, Comert F, et al. Evaluation of the carbapenem inactivation method for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in comparison with the rapidec carba NP. *Mi Microb Drug Resist* 2017;23:457-61.
28. Aguirre-Quiñonero A, Cano M, Gamal D, Calvo J, Martínez-Martínez LJDm, disease i. Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting carbapenemase activity in enterobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;88:214-8.
29. Pancotto LR, Nodari CS, Rozales FP, Soldi T, Siqueira CG, Freitas AL, et al. Performance of rapid tests for carbapenemase detection among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Microbiol* 2018;49:914-8.
30. Yildiz SS, Kaskatepe B, Avcikucuk H, Ozturk S. Performance of CarbaNP and CIM tests in OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2017;64:9-16.
31. Tamma PD, Opene BN, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2017;55:1046-55.
32. Saito K, Nakano R, Suzuki Y, Nakano A, Ogawa Y, YonekawaS, et al. Suitability of carbapenem inactivation method (CIM) for detection of IMP metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2017;55:1220-2.