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

Beig M[1], Arabestani MR[2]

1. MSc of Medical Microbiology, Depatment of Medical Microbioloy, 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 aeroginosa 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 aeroginosa 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.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / مهرو آبان ۱۱۵/۱۳۹۸-۱۰۳

بررسی روش غیرفعال کردن کاربانپنم جهت تشخیص دقیق ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد آنزیم‌های کاربانپنماز

معصومه بیگ [۱]، **محمد رضا عربستانی** [۲]

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

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

چکیده

زمینه و هدف: جهت شناسایی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* مولد آنزیم کاربانپماز، روش‌های فنوتیپی مختلفی وجود دارد. روش غیرفعال کردن کاربانپنم (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 کاربانپماز 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 مهاری 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 وکمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفوکسیتین ۹۱ (۹۳/۸٪) و پیپراسیلین-تازوباکتام ۳۸ (۳۹/۲٪) بود. از میان ۹۷ ایزوله‌ی بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* ، ۴۹ (۵۰/۵۱٪) ایزوله مولد آنزیم‌های کاربانپماز 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 کاربانپماز می‌باشد.

کلید واژه ها: *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 فرصت‌طلبی است که عفونت‌های مختلفی در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی ایجاد می‌کند (۱). هرچند کاربا‌پنم‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* با مقاومت دارویی چندگانه Multi Drug Resistance (MDR) باقی‌مانده‌اند، اما افزایش میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها موجب شکست‌های درمانی شده است (۲). مکانیسم‌های مقاومت این باکتری‌ها به کاربا‌پنم‌ها، شامل تولید آنزیم‌های کاربا‌پنماز، افزایش ترشح پمپ‌های تراوشی، موتاسیون در پورین‌های غشا خارجی و به دنبال آن کاهش نفوذپذیری غشا خارجی و افزایش تولید آنزیم AmpC beta-lactamases (AmpC) می‌باشد. از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت نسبت به این رده از آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید آنزیم‌های کاربا‌پنماز 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، درصورتی‌که رده‌ی B برای فعالیت خود نیازمند عنصر روی می‌باشد (۴). کاربا‌پنمازهای رده‌ی A یک سرین بتالاکتاماز هستند که در جایگاه فعال آن‌ها سرین وجود دارد و برای فعالیت خود نیازمند سرین می‌باشند. کاربا‌پنمازهای رده‌ی A, B و D توالی آمینواسیدی خیلی شبیه به هم دارند. تشابه ساختاری میان این سه کلاس تا اندازه ای است که می توان آنها را از یک نیای مشترک دانست. این آنزیم‌ها توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از بتالاکتام‌ها نظیر کاربا‌پنم‌ها، پنی‌سیلین‌ها و آزترونام را دارا می‌باشند. کاربا‌پنمازهای رده‌ی A, C و D بوسیله‌ی کلاولانیک اسید و تازوباکتام مهار می‌شوند (۵).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) رایج‌ترین کاربا‌پنماز سرین رده‌ی A می‌باشد و دارای تنوعی از KPC_2 تا KPC_{13} است، که تنها درتوالی‌های آمینو اسیدی تفاوت دارند (۶). ژن bla_{KPC} بر روی یک پلاسمید قرار دارد و توسط Tn_3 و Tn_{4401} در میان سویه‌های باکتریایی منتقل می‌شوند. کاربا‌پنمازهای رده‌ی B به‌عنوان metallo-beta-lactamase (MBL) شناخته می‌شوند که در جایگاه فعالیت آن‌ها روی وجود دارد (۷). متالو بتالاکتاماز‌ها به دلیل ایجاد مقاومت به کربا‌پنم‌ها که از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی هستند، بسیار قابل‌توجه می‌باشند. آنزیم‌های MBL داخل اینتگرون واقع‌شده 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. متالوبتالاکتاماز‌ها بر اساس ساختار مولکولی به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند که عبارت‌اند از (IMP) Imipenemase، Veronaimipenemase (VIM)، German imipenemase metallo-beta-lactamase (GIM)، Sao Paulo (SPM)، NewDelhi metallo-beta-lactamase (NDM)، Seoul Imipenemase (SIM) که از میان این آنزیم‌ها، IMP در *سودوموناس آئروژینوزا* بارزتر می‌باشد . رده‌ی C به آنزیم‌های 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 اگزاسیلینازها نام‌گذاری می‌شوند. این بتالاکتاماز‌ها در رده‌ی D جای گرفته‌اند (۹). هرچند روش‌های مولکولی به‌عنوان روش‌های مرجع برای شناسایی ایزوله‌های مولد کاربا‌پنماز به کار گرفته می‌شوند اما دارای معایب و محدودیت‌هایی

هم‌چون هزینه‌ی بالا، نیازمندی به افراد متخصص، عدم توانایی در شناسایی ژن‌های کارباپنماز جدید و هم‌چنین 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). هم‌چنین 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 وکم 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 بیمارستان های بعثت، بهشتی و سینا شهر همدان جمع آوری شدند. سپس ایزوله‌های باکتریایی به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی منتقل شدند. جهت تأیید ایزوله های *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 قلیا/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 آنتی بیوتیکی 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 کشورانگلستان خریداری شدند و شامل پیپراسیلین (۱۰۰µg)، پیپراسیلین + تازوباکتام (۱۰۰/۱۰ µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، آزترونام (۳۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، مروپنم (۱۰µg)، دوری‌پنم (۱۰µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg) و تتراسایکلین (۳۰µg) 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، MinimumInhibitory Concentration (MIC) ایمی‌پنم

در این روش حداقل غلظت مهارکنندگی برای ایمی‌پنم با استفاده از نوار Epsilometer test (E-test) که از شرکت MAST کشور انگلستان خریداری شد، انجام گرفت. به این صورت که ابتدا سوسپانسیون نیم مک‌فارلند ($1/5*10^8$) 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 ایمی‌پنم بر سطح پلیت قرار گرفت و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

سانتی‌گراد پلیت‌ها انکوبه شده و نتایج خوانده شد. با توجه به دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸، حداقل غلظت مهارکنندگی ایمی‌پنم مساوی و بیشتر از ۸ µg/ml به‌عنوان مقاوم، ۴ µg/ml به‌عنوان نیمه‌حساس و کمتر از ۲ µg/ml به‌عنوان حساس در نظر گرفته می‌شود (۱۷).

تست CIM

تست فنوتیپی CIM مطابق با CLSI ۲۰۱۸ 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 (۱۰µL) از باکتری مشکوک (باکتری که مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به کارباپنم دارد)، تلقیح کرده پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، دیسک مروپنم از سوسپانسیون توسط لوپ استریل خارج شده و روی پلیت مولر هینتون قرار گرفت که قبلا توسط باکتری اشریشیاکلی ATCC 25922 که فاقد توانائی تولیدآنزیم کارباپنماز بوده و به عنوان سویه‌ی کنترل منفی می‌باشد، کشت داده شد. این باکتری از موسسه‌ی تحقیقاتی انستیتو پاستورکشور ایران خریداری گردید. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 CLSI ۲۰۱۸ هاله‌ی عدم رشد ۱۵-۶ میلی‌متر نشان‌دهنده‌ی سویه‌ی مولد آنزیم کارباپنماز و هاله‌ی عدم رشد ۱۹< میلی‌متر به عنوان سویه‌ای می‌باشد که توانایی تولید آنزیم کارباپنماز را ندارد (۱۱).

استخراج DNA

در این مطالعه استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد. مطابق با این روش پس از کشت باکتری بر روی محیط بلادآگار 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 سانتی‌گراد 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.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

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

روش آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۶ انجام گرفت..برای بررسی معناداری ارتباط بین تست فنوتیپی CIM و PCR از آزمون کای دو (X^2) استفاده شد. مقادیر $P<۰/۰۰۵$ به عنوان معنادار در نظر گرفته شدند. حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند (۲۳، ۲۴).

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

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

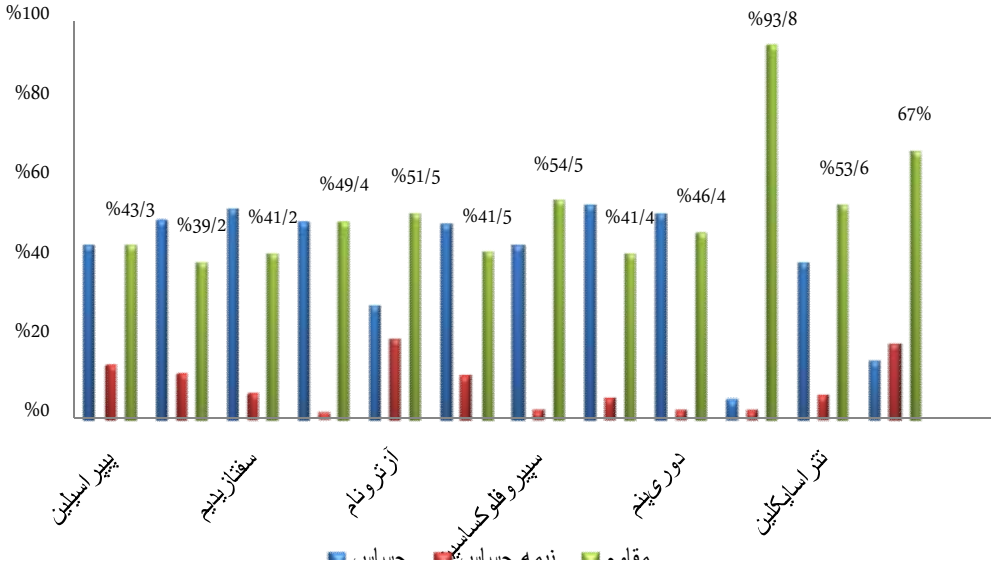
$$\text{ارزش اخباری مثبت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{مثبت حقیقی}}$$

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

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 CLSI۲۰۱۸ انجام شد. میزان مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران بستری در بیمارستان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بررسی‌شده در نمودار ۱ ذکرشده است.

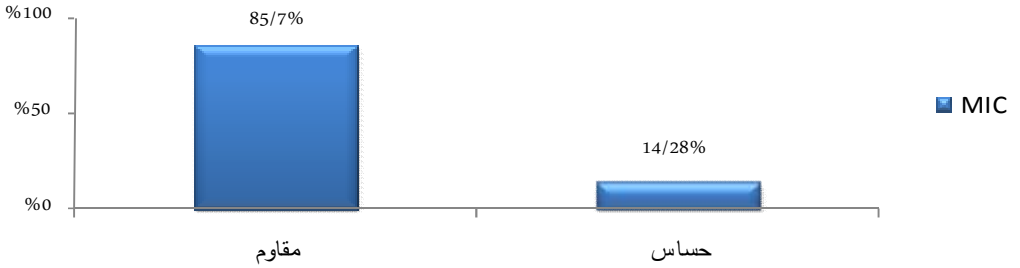


نمودار ۱. نتایج مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

با توجه به نتایج نمودار ۱، بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین ۹۱ (۹۳/۸٪) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پیپراسیلین-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 ایمی‌پنم مساوی و بیشتر از ۸ µg/ml به‌عنوان مقاوم، ۴ µg/ml به‌عنوان نیمه‌حساس و کمتر از ۲ µg/ml به‌عنوان حساس در نظر گرفته می‌شود.

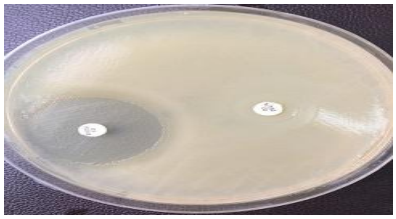
از میان ۴۹ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم و نیمه‌حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم، ۴۲ (۸۵/۷٪) ایزوله MIC مقاوم و ۷ (۱۴/۲۸٪) ایزوله MIC حساس نسبت به ایمی‌پنم داشته و هیچ ایزوله‌ی دارای MIC حدواسط وجود نداشت (نمودار ۲، تصویر ۱).



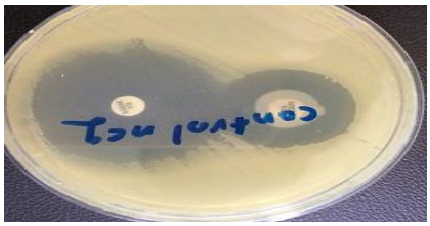
نمودار۲: نتایج MIC نمونه‌های مقاوم به ایمی‌پنم

تصویر۱: نتایج تست MIC ایمی‌پنم 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).



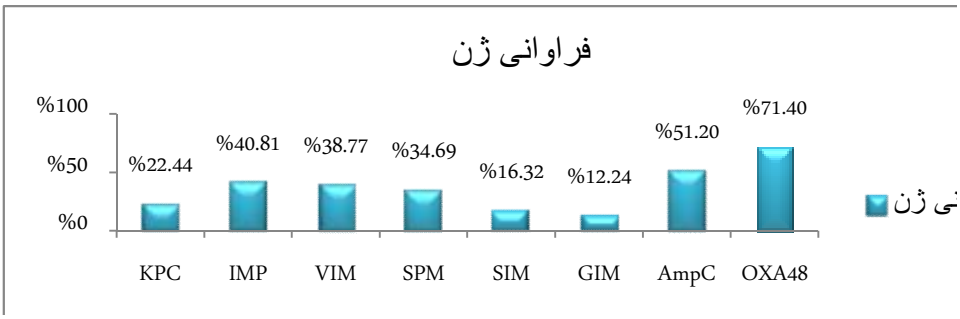
۱



۲

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

تعیین ژنوتیپی سویه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز توسط از میان ۹۷ ایزوله‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* جداشده از بیماران، ۴۹ ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک کارباپنم 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، 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).



نمودار ۳: فراوانی ژن‌های *MBL* و *KPC* ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا*

حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی تست CIM برای ژن‌های کارباپنماز 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 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 کارباپنماز مختلف نیز در مقایسه با PCR معنادار بود (جدول ۲).

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 P,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 ایزوله‌هائی که فاقد توانائی 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 گرن قیمت و هزینه‌ی پائین برای به کارگیری این روش در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی 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 تستCIM, احتمالا 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 احتمالا به دلیل تفاوت مناطق جغرافیائی 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

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 جغرافیائی و تشابه در الگوی مقاومتی ایزوله‌های دو منطقه باشد. ا 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 احتمالا 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 احتمالا به دلیل تفاوت در تعداد سویه‌های دو مطالعه و هم‌چنین تفاوت دو منطقه‌ی جغرافیائی و تجهیزات آزمایشگاهی و عوامل موثر محیطی باشد. همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، در مطالعه‌ای که توسط Saito و همکاران در سال ۲۰۱۷در 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 کارباپنماز بود که در هیچ مطالعه‌ای تمام کلاس‌های آنزیمی بررسی نشده بودند. از جمله محدودیت‌های مطالعه‌ی انجام شده، عدم بررسی انواع مختلف ژن‌های کارباپنمازی از جمله رده‌های مختلف آنزیم OXA48 و هم‌چنین عدم بررسی آنزیمی غیر از 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٪ 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 اختصاصت بسیار بالای روش CIM و سهولت انجام و سریع بودن این روش می‌توان آن را به‌عنوان روش بسیار مناسبی برای تشخیص ایزوله‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز 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 اخلاق۲۷۳. ۱۳۹۷ .IR. UMSHA.REC و شماره طرح ۹۷۰۴۲۶۲۳۹۹ می‌باشد، نویسندگان مراتب تشکر خود را از آن معاونت محترم ابراز می‌دارند.

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 Healthc 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-Quiñonero 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.