●مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان،دوره بیست‌وسوم، شماره۳،ص ۴۰۵-۳۸۰،۱۳۹۵

مقاله مروری

اهمیت آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف گسترده در باسیل‌های انتریک گرم منفی و روش‌های شناسایی فنوتیپی این آنزیم‌ها

داود کلانتر نیستانکی[۱]، اکبر میرصالحیان[۲]، محمد ایمان عینی[۳]، فرشته جبل عاملی[۴]، مهدی فتاحی بافقی[۵]، شهلا منصوری[۶*]

خلاصه

تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، یکی از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باسیل‌های گرم منفی انتریک می‌باشد. شناسایی باکتری‌های تولید کننده بتالاکتاماز با طیف اثر گسترده با استفاده از روش‌های فنوتیپی، نقش مهمی در درمان عفونت‌های حاصل از آن‌ها دارد. .هدف از انجام این مطالعه، مرور آخرین مطالعات و راهنمایی‌های لازم جهت شناسایی آنزیم‌های بتالاکتاماز در باسیل‌های گرم منفی شایع در نمونه‌های کلینیکی می‌باشد.

کلمات کلیدی: باسیل‌های انتریک، آنزیم‌های بتالاکتاماز با طیف گسترده، روش‌های فنوتیپی

مقدمه

بتالاکتام‌ها یکی از پرکاربردترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های باکتریایی می‌باشند که با مهار آنزیم‌های ترانس پپتیداز، باعث اختلال در سنتز دیواره سلولی و در نهایت مرگ باکتری‌ها می‌شوند (۲، ۱). آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بر اساس ساختار در شش گروه پنام‌ها (Penams) مانند بنزیل پنی‌سیلین، سفام‌ها (Cephems) مانند سفالوسپورین‌های نسل اول تا چهارم، سفامیسین‌ها (Cephamycins) مانند سفوکسیتین و سفوتتان، مونوباکتام‌ها (Monobactams) مانند آزترونام و پنم‌ها (Penem) مانند فاروپنم و کاربا‌پنم‌ها (Carbapenem) مانند ایمی‌پنم و مروپنم قرار می‌گیرند (۲). باکتری‌ها از طریق تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین‌ها (Penicillin binding proteins یا PBPs)، جهش در پورین‌ها و افزایش فعالیت افلاکس پمپ‌ها، به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌شوند (۳).

۱- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. ۲- استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۳- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۴- استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۵- استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ، یزد، ایران ۶- استاد، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

*نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: smansouri@Kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۴/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۷

هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام توسط آنزیم‌های بتالاکتاماز، یکی از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های گرم منفی به شمار می‌رود (۴). مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در باکتری‌های گرم مثبت از طریق تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز، از اهمیت کمتری برخوردار است. اغلب باکتری‌های گرم مثبت از طریق تولید بتالاکتامازهای با طیف اثر محدود مانند پنی‌سیلینازها، قادر به ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها می‌باشند و به طور معمول بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (Extended spectrum beta-lactamase یا ESBLs) در باکتری‌های گرم مثبت مشاهده نمی‌شوند. از باکتری‌های گرم مثبت تولید کننده پنی‌سیلیناز می‌توان به استافیلوکوک اورئوس، برخی گونه‌های انتروکوک، استرپتوکوک پنومونیه و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اشاره کرد (۹-۴). از آن‌جایی که پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کاربا‌پنم‌ها از شایع‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در رژیم‌های درمانی بیماری‌های عفونی ایجاده شده توسط باکتریهای گرم منفی می‌باشند، حضور و نوع این آنزیم‌ها، نقش کلیدی در انتخاب رژیم درمانی مناسب دارد (۵).

تاکنون بیش از ۸۹۰ نوع مختلف از آنزیم‌های بتالاکتاماز شناسایی شده و به ثبت رسیده‌اند (۵). گروهی از بتالاکتامازها تحت عنوان بتالاکتامازهای دارای طیف اثر گسترده (وسیع‌الطیف) شناخته می‌شوند. این بتالاکتامازها دارای سه فنوتیپ به نام بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs)، متالوبتالاکتامازها (Metallo-beta-lactamase یا MBLs) و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpCمی‌باشند (۶، ۵، ۲). برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها چند معیار لحاظ می‌گردد که می‌توان به نوع سوبسترا، طیف ضد میکروبی، پروفایل مهار کنندگی آنزیم‌ها، نقطه ایزوالکتریک، نقطه ایزوالکتریک و توالی اسید آمینه‌ای آن‌ها اشاره نمود (۸، ۷). طبقه‌بندی Ambler، بر اساس توالی اسیدهای آمینه این آنزیم‌ها می‌باشد (۹، ۸). در این طبقه بندی، آنزیم‌های بتالاکتاماز به چهار گروه A، B، C و D تقسیم می‌شوند. گروه‌هایA، C و D شامل بتالاکتامازهای وسیع‌الطیفی هستند که در جایگاه فعال خود اسید آمینه سرین دارند و گروه B متالوبتالاکتامازهایی هستند که حداقل دارای یک یا دو اتم روی (Zn) در جایگاه فعال خود هستند (۹-۷). در یک طبقه‌بندی دیگر که برای اولین بار توسط Bush و Jacoby در سال ۱۹۸۹ معرفی شد (۵)، آنزیم‌های بتالاکتاماز بر اساس عملکرد تقسیم‌بندی شدند. در این طبقه‌بندی آنزیم‌های بتالاکتاماز از لحاظ عملکرد و سوبسترا در کنار هم قرار می گیرند (۷، ۵) (جدول ۱).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs

ESBLsگروهی از آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشند که اغلب پلاسمیدی بوده ، و در گروه A و D از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند و شامل طیف متنوعی از سفالوسپورینازها و کاربا‌پنمازها با طیف اثرگسترده هستند (۹، ۵). بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs اولین بار در سال ۱۹۸۰ گزارش شدند. در مورد این آنزیم‌ها هیچ تعریف دقیق و توافق کلی وجود ندارد و به طور کلی می‌توان گفت که ESBLs دسته‌ای از بتالاکتامازها هستند که می‌توانند باکتری‌های گرم منفی را در برابر پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌های نسل اول، دوم، سوم، چهارم و آزترونام (به غیر از سفامایسین‌ها) از طریق هیدرولیز نمودن آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مقاوم کنند (۱۲). در اصل ESBLs دسته‌ای از بتالاکتامازهای پلاسمیدی و کروموزومی می‌باشند که از بتالاکتامازهای اولیه و با اثر محدود مانند TEM-1، TEM-2 و SHV-1 مشتق شده‌اند (۱۲). این آنزیم‌ها به طور معمول توسط گونه‌های کلبسیلا و اشریشیاکلی تولید می‌شوند، اما ممکن است در سایر باکتری‌های گرم منفی تخمیری و غیر تخمیری مانند گونه‌های انتروباکتر، سالمونلا، پروتئوس، سیتروباکتر، پسودوموناس آئروژینوزا، و اسینتوباکتر بومانی نیز مشاهده گردند. (۹، ۷).

جدول ۱. طبقه‌بندی آنزیم‌های بتالاکتاماز (۲۰۰۵)

طبقه بندی بوش-جاکوبی	زیر کلاس های اصلی	طبقه بندی آمبلر	CA[A]	Inhibited by TZB[B] or EDTA	خصوصیات آنزیمی براساس سوبسترا	برخی از آنزیم های شناخته شده
Group 1, cephalosporinases	1	C (cephalosporinases)	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins.	(AmpC) ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 GC1, CMY-37
	1e		No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino-β-lactams.	
Group 2, penicillinases (clavulanic acid susceptible)	2a	A	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins.	PC1
	2b	A	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A		Yes No	Increased hydrolysis of oxyimino-β-lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam).	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
	2br	A		No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam and tazobactam.	TEM-30, SHV-10
	2ber	A		No		TEM-50
	2c	A				
	2ce	A		Yes No	Increased hydrolysis of oxyimino-β-lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam and tazobactam .	PSE-1, CARB-3
	2d	D (oxacillin-hydrolyzing)		Yes No		RTG-4
	2de				Increased hydrolysis of carbenicillin.	OXA-1, OXA-10
	2df	D	V[C]	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime and cefpirome.	OXA-11, OXA-15
	2e	D	V	No		OXA-23, OXA-48
	2f	A	V	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin.	CepA
		A		Yes No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino-β-lactams.	KPC-2, IMI-1, SME-1
				V No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems.	
					Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam. Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino-β-lactams and cephamycins.	
Group 3, metallo-beta-lactamase	3a	B(B1)		No Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B3				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
	3b	B(B2)		No Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems.	CphA, Sfh-1
Group 4		Not classified				

A: CV: clavulanic acid, B: TZB: tazobactam, C: V: Variable.

اولین گزارش‌ها مبنی بر این که بتالاکتامازهای پلاسمیدی می‌توانند سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف را هیدرولیز کنند، در سال ۱۹۸۳ منتشر شد (۱۲). سایر بتالاکتامازها نیز به سرعت کشف شدند که این بتالاکتامازها با TEM-1 و TEM-2 ارتباط تنگاتنگی داشتند، اما در مقایسه با آن‌ها قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف بودند. بنابراین، آن‌ها را بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (ESBLs) نامیدند (۱۳، ۱۲). تا مدت‌ها تصور می‌شد که ESBLs توانایی هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها را ندارند، اما امروزه ESBLs هیدرولیز کننده کاربا‌پنم‌ها مانند KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) و GES (Guiana extended-spectrum) به طور گسترده‌ای در میان باسیل‌های گرم منفی مشاهده می‌شوند (۱۴، ۶).

آنزیم‌های ESBLs اغلب توسط پلاسمیدهای بزرگ که حامل عوامل مقاومت‌های دارویی چندگانه از جمله مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین‌ها، کلرامفنیکل و تری‌متوپریم هستند، حمل می‌شوند و از این طریق بین باکتری‌ها منتقل می‌گردد (۹). این آنزیم‌ها توسط مهار کننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام مهار می‌شوند. این ویژگی، ESBLs را از بتالاکتامازهای نوع AmpC (گروه C) و متالوبتالاکتامازها متمایز می‌کند (۱۵). کلاولانیک اسید قادر به مهار متالوبتالاکتامازها و بتالاکتامازهای نوع AmpC نمی‌باشد (۱۵، ۹).

ارگانیسم‌های تولید کننده ESBLs، از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌روند و بسیاری از بیمارستان‌ها تجربه شیوع این ارگانیسم‌ها را گزارش نموده‌اند. بیشتر آنزیم‌های ESBLs توسط کلاولانیک اسید مهار می‌شوند (۱۲). باکتری‌های تولید کننده ESBLs، با افزایش میزان بیماری و مرگ و میر به خصوص در بیماران بخش‌های مراقبت ویژه ارتباط دارند (۱۳، ۱۲).

وجودESBLs در این ارگانیسم‌ها از لحاظ درمانی مشکلات زیادی را ایجاد کرده است؛ به طوری که این باکتری‌ها علاوه بر بتالاکتام‌ها به خانواده دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها همچون آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها نیز مقاوم می‌گردند. بنابراین، تشخیص آزمایشگاهی صحیح این آنزیم‌ها در جلوگیری از شکست کلینیکی که در نتیجه درمان ضد میکروبی نامناسب به وجود می‌آید، حایز اهمیت فراوانی است (۱۶، ۱۵). از شایع‌ترین بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی انتریک ، می‌توان SHV، TEM، CTX-M، PER، GES، KPC و OXA را نام برد (۲)، ژن‌های کد کننده این آنزیم‌ها اغلب پلاسمیدی می‌باشند که به طور مختصر در ادامه به شرح این گروه از آنزیم‌ها پرداخته شد.

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع SHV : منظور از SHV، حضور گروه متغیر سولفیدریل (Sulfydryl variable) در این آنزیم‌ها است. این گروه از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف، در گروه A از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند و ممکن است بیش از سایر انواع ESBLs در نمونه‌های کلینیکی مشاهده شوند. ESBLs نوع SHV در دامنه وسیعی از گونه‌های انتروباکتریاسه شناسایی شده و امروزه در میان دیگر باسیل‌های گرم منفی مانند پسودوموناس آئروژینوزا نیز منتشر شده‌اند (۴، ۲).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع TEM : بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع TEM در واقع مشتقات TEM-1 و TEM-2 می‌باشند. اولین بارTEM-1 در سال ۱۹۶۵ در یک ایزوله اشریشیاکلی که از بیماری به نام Temoneira در آتن یونان جدا شده بود، گزارش گردید و آن را به نام TEM نامگذاری نمودند. این آنزیم پلاسمیدی است و شیوع فراوانی دارد و سفالوسپورین‌های نسل اول، سفاماندول و سفوپرازون و تمام پنی‌سیلین‌های ضد باکتری‌های گرم منفی به استثنای تموسیلین را هیدرولیز می‌کند. سفامایسین‌ها، منوباکتام‌ها و

کارباپنم‌ها نسبت به عمل این آنزیم مقاوم می‌باشند (۱۲). آنزیم TEM به کلاس مولکولی A از طبقه‌بندی Ambler تعلق دارد و هم اکنون معمول‌ترین بتالاکتامازی است که به فراوانی در اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه یافت می‌شود (۱۷). تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع بتالاکتاماز نوع TEM شناسایی شده است که بخش اعظم آن‌ها از نظر توانایی جزء بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشند. گروه دیگری از آنزیم‌های TEM گزارش شده‌اند که به کلاولانیک اسید مقاوم هستند. انواعی از آنزیم TEM مقاوم به مهار کننده‌ها، که به تازوباکتام حساس می‌باشند، به نام IRT (Inhibitor-resistant TEM) شناخته می‌شوند (۹).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع CTX-M : این گروه از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در گروه A از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند (۹، ۷). در اواخر دهه ۸۰ و اوایل دهه ۹۰ میلادی، باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای با طیف گسترده جدید به وجود آمدند که نسبت به سفوتاکسیم در مقایسه با سفتازیدیم مقاومت بیشتری ایجاد می‌کردند و به طور هم‌زمان، در ایزوله‌هایی از اشریشیاکلی از آلمان و فرانسه و از سالمونلا تیفی موریوم در آرژانتین گزارش شدند (۱۸). این بتالاکتامازهای به علت دارا بودن فعالیت بالا بر ضد سفوتاکسیم، سفوتاکسیماز (CTX-M-ase) یا بتالاکتامازهای CTX-M نامیده شدند. CTX-M-ase با آنزیم‌های نسل TEM و SHV متفاوت هستند و کمتر از ۴۰ درصد شباهت با این آنزیم‌ها دارند و همچنین، غیر وابسته به بتالاکتامازهای TEM و SHV می‌باشند (۴). این آنزیم‌ها تأثیر چندانی بر روی حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد (Minimum inhibitory concentration یا MIC) سفتازیدیم نمی‌گذارند و اغلب MIC ایجاد شده توسط آن‌ها علیه سفتازیدیم در محدوده حساس (۸-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر) است؛ در حالی که MIC سفوتاکسیم در محدوده مقاوم (بیش از ۶۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. اگرچه گزارش‌هایی مبنی بر این نکته وجود دارد که جابه‌جایی آمینو اسیدی در حلقه امگای جایگاه فعال این آنزیم‌ها، فعالیت آن‌ها را بر ضد سفتازیدیم افزایش داده است. ESBLهای نوع CTX-M بیشتر در اعضای خانواده انتروباکتریاسه به خصوص اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه یافت می‌شوند، اما به‌تازگی در باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری مانند اسینتوباکتر بومانی و به تعداد محدود در پسودوموناس آئروژینوزا و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا نیز گزارش شده اند (۱۹، ۷، ۴).

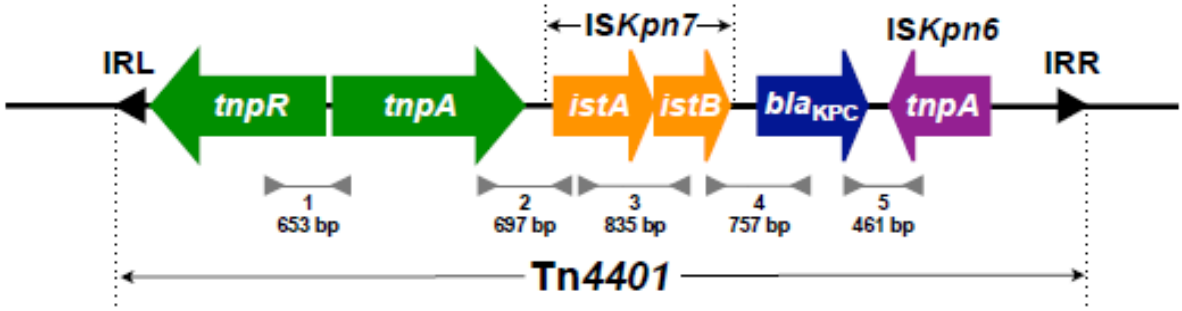
بتالاکتاماز وسیع‌الطیف نوع PER-1 : این گروه از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در گروه A از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند (۵). آنزیم PER-1 برای اولین بار در یک جدایه پسودوموناس آئروژینوزا تولید کننده ESBLs در سال ۱۹۹۱ در فرانسه، از یک بیمار مبتلا به عفونت ادراری شناسایی شد. در آن زمان ژن این آنزیم بر روی کروموزوم قرار داشت، اما بعدها در سال ۱۹۹۸ پلاسمید دارای ژن آنزیم PER-1 توسط Nordman و Guibert گزارش شد. امروزه پلاسمیدها نقش مهمی در انتشار این ژن در بین باسیل‌های گرم منفی دارند. این بتالاکتامازها در جدایه‌های پسودوموناس آئروژینوزا ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در ترکیه، ایران، ایتالیا، بلژیک و بسیاری از کشورهای دیگر دنیا مشاهده شده اند (۱۲، ۹، ۴). آنزیم PER-1 قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌باشد و توسط مهار کننده‌های ESBLs مهار می‌شود (۱۲، ۹، ۴).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع GES : این آنزیم‌ها در کلاس A طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند و برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ در یک جدایه بالینی کلبسیلا پنومونیه در گویان فرانسه شاسایی شد (۱۴، ۷). از سال ۲۰۰۰ تاکنون بیش از ۱۵ نوع از آنزیم‌های GES در نقاط مختلفی از جهان و باسیل‌های گرم منفی دیگر مانند پسودوموناس آئروژینوزا

گزارش شده است (۵). اولین نوع از GES که در پسودوموناس آئروژینوزا گزارش گردید، GES-2 در آفریقای جنوبی بود و سال‌های بعد نیز GES-8 و GES-9 به ترتیب در یونان و فرانسه در این باکتری گزارش شد. ژن‌های GES اغلب بر روی اینتگرون‌هایی که بر روی پلاسمیدها قرار دارند، حمل می‌شوند. این گروه از آنزیم‌های بتالاکتاماز قادر به هیدرولیز ایمی‌پنم و سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف می‌باشند (۱۲، ۲).

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع KPC : KPCیک آنزیم بتالاکتاماز از گروه A در طبقه‌بندی Ambler(۵) و قادر به هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم مانند سفوتاکسیم و سفتازیدیم می‌باشد. آنزیم KPC اولین بار در سال ۱۹۹۶در یک جدایه بالینی کلبسیلا پنومونیه در کارولینای شمالی در ایالات متحده آمریکا گزارش شد (۲۰، ۵). سپس با گذشت زمان، این آنزیم به سرعت در بیمارستان‌های آمریکا منتشر گردید و در نهایت در سال ۲۰۰۷ جدایه‌های دارای KPC در اسکاتلند، برزیل، کانادا، ایتالیا، کره جنوبی، بلژیک، کلمبیا و چین گزارش شد (۲).

امروزه این آنزیم علاوه بر کلبسیلا پنومونیه، در دیگر باسیل‌های گرم منفی مانند پسودوموناس آئروژینوزا و اسینتوباکتر بومانی گزارش شده است (۲۱). باسیل‌های گرم منفی دارای KPC، نه تنها به کاربا‌پنم‌ها بلکه به دیگر کلاس‌های آنتی‌بیوتیکی نیز مقاوم هستند. در بعضی از بیمارستان‌ها تنها آنتی‌بیوتیک مؤثر جهت درمان جدایه‌های دارای KPC، کولیستین است (۲۲، ۲۱، ۲). از دیگر چالش‌ها در مورد جدایه‌های تولید کننده KPC، هم‌زمانی حضور آن‌ها با دیگر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد. شایع‌ترین بتالاکتامازهای همراه با KPC، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف CTX-M, SHV و در برخی مواقع VIM می‌باشد (۲۳، ۲۲). ژن bla_{KPC} در بیشتر مواقع داخل یک ترانسپوزون به نام *Tn4401* و بر روی یک پلاسمید حمل می‌شود (۲۳-۲۱). از عواملی که توانایی آنزیم KPC را در مقاومت دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام افزایش می‌دهند، می‌توان افزایش بیان و یا تعداد پلاسمیدهای موجود در جدایه‌ها و جهش در ناحیه بین istB و bla_{KPC} در *Tn4401* را نام برد (شکل ۱) (۲۳، ۲۲، ۲).



شکل ۱. *ساختار ترانسپوزون Tn4401*

بر اساس افزایش یا کاهش تعداد نوکلئوتیدهای بین bla_{KPC} و istB، انواع ایزوفرم‌های این ترانسپوزون تعیین می‌شود (۲۲).

بر اساس جهش‌های ایجاد شده در ناحیه بین istB و ژن bla_{KPC}، تاکنون چهار ایزوفرم از این ترانسپوزون گزارش شده است (۲۳، ۲۲)؛ ۱- ترانسپوزون *Tn4401a* که ۱۰۰جفت باز (bp) از ناحیه بین istB و ژن bla_{KPC} در آن حذف شده است. ۲- ترانسپوزون *Tn4401b* که هیچ حذف‌شدگی در ناحیه istB و ژن bla_{KPC} ندارد. ۳- دو ایزوفرم که به ترتیب دارای ۲۱۵ و ۲۵۵ جفت بازی حذف‌شدگی در ناحیه istB و ژن bla_{KPC} می‌باشند.

بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع OXA: آنزیم‌های نوع OXA به خصوص OXA-10، OXA-2 و OXA-18 اغلب در خانواده باسیل‌های غیر تخمیری مانند پسودوموناس آئروژینوزا یافت می‌شوند و به طور گسترده‌ای باعث مقاومت به اکسیموسفالوسپورین‌ها (مانند سفتازیدیم) در این باکتری می‌گردند، اما برخی از انواع آنزیم‌های OXA مانند OXA-45، باعث مقاومت به چندین نوع بتالاکتام مانند سفالوسپورین‌های نسل سوم، چهارم و آزترونام می‌شوند. OXA-31 در پسودوموناس آئروژینوزا نیز تنها باعث مقاومت به سفپیم شده، اثری بر سفتازیدیم ندارد (۲۳، ۵). تعداد محدودی از آنزیم‌های OXA دارای فعالیت علیه کارباپنم‌ها می‌باشند که می‌توان به OXA-48، OXA-40، OXA-23 و OXA-54 اشاره کرد که در اعضای خانواده انتروباکتریاسیه و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری در ایالات متحده آمریکا، خاورمیانه و شرق دور گزارش شده‌اند. این گروه از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در گروه D از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند (۲۴، ۹).

مهار کننده‌های ESBLs

کلاولانیک اسید، سولباکتام و تازوباکتام از مهار کنندگان بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs می‌باشند که از آن‌ها جهت درمان به صورت ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند آموکسی‌سیلین/ کلاولانیک اسید و پیپراسیلین/ تازوباکتام استفاده می‌شود. همچنین، از آن‌ها به ویژه کلاولانیک اسید، جهت شناسایی ESBLs استفاده می‌گردد (۲۶، ۲۵).

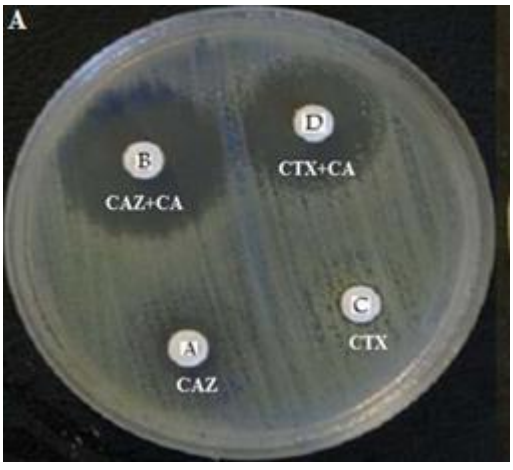
شناسایی ESBLs

ارگانیسم‌هایی که حساسیت آن‌ها نسبت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم و یا سفپودوکسیم کاهش پیدا کرده باشند، باید از نظر داشتن ESBLs مورد بررسی قرار گیرند (۱۸). مطابق استاندارد CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)، اگر ایزوله‌های کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسی‌توکا و اشریشیاکلی دارای افزایش مقاومت یا کاهش حساسیت به بیشتر یا مساوی۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سفپودوکسیم و دارای کاهش حساسیت به بیشتر یا مساوی ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سفتریاکسون، سفتازیدیم، سفوتاکسیم و آزترونام باشند، باید از نظر تولید ESBLs با تست‌های تأییدی مورد بررسی قرار گیرند (۲۷). همچنین، ایزوله‌های پروتئوس میرابیلیس دارای کاهش حساسیت به سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودکسیم به بیشتر یا مساوی با ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز باید از نظر حضور ESBLs با تست‌های تأییدی بررسی شوند (۲۷). در حالت کلی، آزمایشگاها باید حساسیت تمام جدایه‌های بالینی اشرشیاکلی و گونه‌های کلبسیلا را نسبت به سفوتاکسیم و سفتازیدیم بررسی نمایند (۱۸). مقاومت به سفتازیدیم شاخص مناسبی برای بررسی حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع TEM و SHV و مقاومت به سفوتاکسیم شاخص مناسبی برای بررسی حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع CTX-M می‌باشد، اما مقاومت به سفپودکسیم از این جهت اهمیت دارد که نشان دهنده حضور تمامی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در نمونه بالینی می‌باشد (۱۸).

تست‌های تأییدی جهت شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف: از چندین روش مختلف فنوتیپی می‌توان جهت شناسایی ESBLs در باسیل‌های گرم منفی انتریک استفاده کرد. برخی از این روش‌ها مانند روش دیسک ترکیبی، مورد

تأیید CLSI می‌باشند و از حساسیت خوبی جهت شناسایی ESBLs برخوردارند (۲۷). روش‌هایی مانند روش هم‌افزایی دیسکی (Synergy disc)، اگرچه روش خوبی جهت شناسایی ESBLs است و از آن در بسیاری از آزمایشگاها و بررسی‌های اپیدمیولوژی جهت شناسایی ESBLs استفاده می‌شود، اما مورد تأیید CLSI نمی‌باشند (۲۷، ۱۸، ۱۲). باید به این نکته توجه داشت که در اغلب موارد روش دیسک ترکیبی و هم‌افزایی دیسکی جهت شناسایی ESBLs در اشریشیاکلی و گونه‌های کلبسیلا استفاده می‌شود (۲۱). روش دیسک ترکیبی روش بهتری جهت شناسایی ESBLs می‌باشد (۲۷). هیچ کدام از این روش‌ها جهت شناسایی ESBLs در دیگر اعضای انتروباکتریاسه مانند انتروباکتر، سیتروباکتر و سراشیا مناسب نیست و CLSI به وضوح استفاده از آن‌ها را در تشخیص ESBLs در سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه نادرست دانسته است. اگرچه در بسیاری از تحقیقات به علت عدم وجود استاندارد تشخیصی، از این روش هنوز جهت شناسایی ESBLs در سایر اعضای خانواده انتروباکتریاسه استفاده می‌شود (۲۷، ۷).

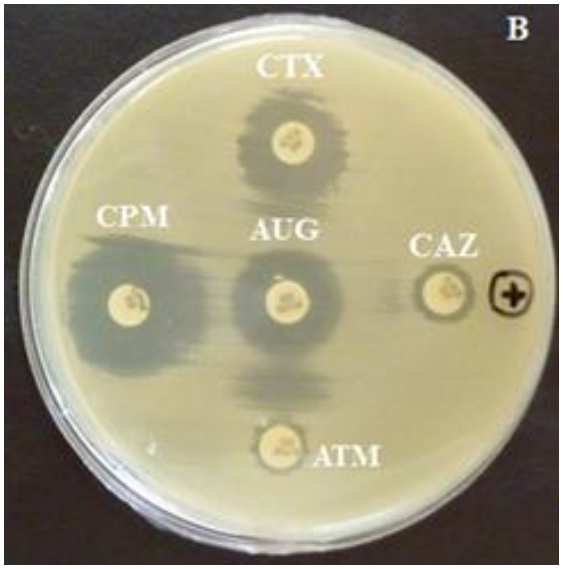
شناسایی ESBLs با استفاده از روش دیسک ترکیبی: جهت انجام این روش، ابتدا از نمونه بالینی مورد نظر، استاندارد ۰/۵ McFarland تهیه و به صورت چمنی بر روی محیط Mueller-Hinton agar کشت داده می شود. سپس دیسک های سفتازیدم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم با غلظت ۳۰ میکروگرم، به فاصله ۲۰ میلی‌متر از دیسک حاوی سفتازیدم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم حاوی ۱۰ میکروگرم اسید کلاولانیک بر روی باکتری‌های کشت داده شده در محیط فوق قرار داده می شود. جدایه‌هایی که قطر هاله عدم رشد آن‌ها در اطراف هر یک از دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید نسبت به دیسک‌های فاقد کلاولانیک اسید بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر باشد، به عنوان باکتری‌های تولید کننده ESBL در نظر گرفته می شوند. (شکل ۲) (۲۸). در این روش از کلبسیلاپنومونیه ATCC 700603 تولید کننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، به عنوان کنترل مثبت و از اشریشیاکلی ATCC 25922 به عنوان کنترل منفی استفاده می شود. همه دیسک‌های مورد استفاده در این روش‌ها به صورت تجاری موجود هستند (۲۷، ۱۸).



شکل ۲. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید [CAZ (سفتازیدیم)، CTX (سفوتاکسیم) و CA(کلاولانیک اسید)]

A: جدایه تولید کننده ESBLs. کلاوولانیک اسید با مهار آنزیم‌های ESBLs، باعث افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های CTX و CAZ حاوی کلاولانیک اسید می‌شود. افزایش قطر هاله عدم رشد بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر در اطراف هر یک از دیسک‌های CTX و CAZ دارای کلاولانیک اسید در مقابل دیسک‌های CTX و CAZ فاقد کلاولانیک اسید، نشان دهنده حضور ESBLs می‌باشد (۲۹).

شناسایی ESBLs با استفاده از روش هم‌افزایی دیسکی (Synergy disc): در این روش نیز مانند روش دیسک ترکیبی، باکتری در محیط Mueller-Hinton agar کشت داده می‌شود و یک دیسک آگمنتین(حاوی ۲۰ میکروگرم آموکسی‌سیلین و ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید) در مرکز پلیت قرار می‌گیرد. سپس به فاصله ۲/۵ تا ۳ سانتی‌متر از مرکز دیسک آگمنتین و در اطراف آن، دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم) و سفپیم (۳۰ میکروگرم) قرار داده می‌شود. افزایش هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌های سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام و سفپیم به سمت دیسک آگمنتین، نشان دهنده تولید ESBLs می‌باشد (شکل ۳) (۲۹). در این روش نیز از سویه‌های استاندارد مورد استفاده در روش دیسک ترکیبی به عنوان کنترل مثبت و منفی استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که این روش را با دو دیسک آنتی‌بیوتیکی سفتازیدیم و سفوتاکسیم نیز می‌توان انجام داد، اما جهت افزایش حساسیت، بهتر است آزمایش با چهار دیسک سفتازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام و سفپیم در اطراف آگمنتین انجام گیرد (۲۵، ۱۸).



شکل ۳. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف به روش هم‌افزایی دیسکی [CAZ (سفتازیدیم)، CTX (سفوتاکسیم)،AUG (آگمنتین) و CPM (سفپیم)]. افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌های مورد استفاده به سمت دیسک AUG، نشان دهنده حضور آنزیم‌های ESBLs می‌باشد (۲۹).

روش E test :استفاده از نوارهای E test روش ساده‌تری برای شناسایی جدایه‌های تولید کننده ESBLs می‌باشد. این نوارها به صورت تجاری با غلظت‌های مشخص از یک سفالوسپورین در یک طرف نوار و سفالوسپورین به همراه کلاولانیک اسید در طرف دیگر وجود دارد. شناسایی ESBLs با این نوارها مطابق دستورالعمل شرکت‌های سازنده انجام می‌شود (۱۸).

نکاتی که در تشخیص ESBLs با روش‌های فنوتیپی باید به آن‌ها توجه داشت:

در تشخیص بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع ESBLs باید به حضور هم‌زمان دیگر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مانند MBLs ، بتالاکتامازهای نوع AmpC و دیگر مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند عدم نفوذ و فعالیت افلاکس پمپ‌ها توجه داشت (۳۰، ۲۵). حساسیت تست‌های تأییدی ESBLs زمانی که جدایه بالینی تولید

کننده، AmpC و MBLs باشد، کاهش می‌یابند؛ چرا که کلاولانیک اسید قادر به مهار این نوع از بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نیست (۳۱). همچنین، کلاولانیک اسید یکی از عوامل القا کننده بتالاکتامازهای نوع AmpC به شمار می‌رود. در این موارد، القای بتالاکتامازهای نوع AmpC در برخی جدایه‌های بالینی حاوی بتالاکتامازهای نوع ESBLs، برخلاف انتظار باعث کاهش قطر هاله عدم رشد یا فقدان آن در اطراف دیسک‌های حاوی کلاولانیک اسید در تست‌های تأییدی ESBLs می‌شود (۳۲، ۱۵). فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC، MBLs و حضور ESBLs مقاوم یا غیر حساس به کلاولانیک اسید، از عوامل مختل کننده تست‌های تأییدی ESBLs و نتایج منفی کاذب در آن‌ها می‌باشد (۳۱). در این حالت جهت افزایش حساسیت تست‌های تأییدی ESBLs، استفاده از سفپیم در این روش‌ها پیشنهاد می‌گردد؛ چرا که بتالاکتامازهای نوع AmpC به طور جزیی باعث هیدرولیز این آنتی‌بیوتیک می‌شوند. همچنین، می‌توان از تست‌های کروموژنیک مانند Cica-Beta test (شرکت MAST، انگلستان) و یا افزودن کلوگزاسیلین و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) جهت مهار بتالاکتامازهای نوع AmpC و MBLs (به ترتیب) به محیط Mueller-Hinton agar استفاده نمود (۲۵).

بتالاکتامازهای نوع AmpC

بتالاکتامازهای نوع AmpC از نوع سرین بتالاکتامازها می‌باشند و در گروه C از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند (۵) (جدول ۱). این بتالاکتامازها بر خلاف ESBLs و MBLs که اغلب پلاسمیدی می‌باشند، کروموزومی هستند (۲). به طور کلی، بتالاکتاماز AmpC یک لوکوس کروموزومی در بسیاری از باکتری‌های گرم منفی است که در ساخت و ساز پپتیدوگلیکان نقش دارد و بتالاکتامازهای پلاسمیدی AmpC یا pAmpC از لوکوس کروموزومی AmpC مشتق شده‌اند (۳۲). لوکوس کروموزومی AmpC در حالت طبیعی در سطح پایینی بیان شده است و تحت کنترل عوامل تنظیمی می‌باشد (۳۳)، اما pAmpC فاقد عناصر تنظیمی می‌باشد و به طور دایمی و در سطح بالایی بیان می‌گردد (۳۲). در صورت جهش در لوکوس کروموزومی AmpC و ژن‌های تنظیمی آن در یک باکتری، تولید بتالاکتامازهای نوع AmpC افزایش می‌یابد که اغلب به چنین باکتری‌های تولید کننده سطح بالای AmpC یا AmpC overproducer گفته می‌شود (۳۴، ۳۳). همچنین، بر خلاف دیگر بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف که به صورت دایمی بیان می‌شوند، بتالاکتامازهای نوع AmpC هم به صورت دایمی و هم قابل القا بیان می‌گردند. از عواملی که باعث القای بتالاکتامازهای نوع AmpC می‌شود، می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سفوکسیتین، ایمی‌پنم و کلاولانیک اسید اشاره کرد (۳۶، ۳۵، ۳۳).

بتالاکتامازهای نوع AmpC، بتالاکتامازهای وسیع‌الطیفی می‌باشند که قادر به هیدرولیز سفالوسپورین‌های نسل سوم، مونوباکتام‌ها، پنی‌سیلین‌ها و سفومایسین‌ها می‌باشند (۱۵). همچنین، به طور ضعیفی قادر به هیدرولیز سفپیم هستند و در صورتی که سطح تولید آن‌ها افزایش یابد، باعث افزایش مقاومت به کارباپنم‌ها مانند ایمی‌پنم و دوریپنم نیز می‌شوند (۳۳، ۱۵).

بسیاری از باسیل‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی، پسودوموناس آئروژینوزا، سراشیا مارسنس و مورگانلا مورگانی، دارای لوکوس کروموزومی AmpC می‌باشند، اما برخی از باسیل‌های گرم منفی مانند سالمونلا انتریکا، شیگلا فلکسنری، شیگلا دیسانتری، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابیلیس، فاقد لوکوس کروموزومی AmpC هستند (۳۲).

اولین مدرک دال بر حضور بتالاکتامازهای نوع AmpC بر روی پلاسمیدها، توسط Papanicolaou و همکاران گزارش شد (۳۷). Knothe و همکاران در سال ۱۹۸۳ یک سویه سراشیا مارسنس را که قادر بود مقاومت به سفوکسیتین را به دیگر باکتری‌ها مانند گونه‌های سالمونلا

انتقال دهد، شناسایی کردند (۳۸).Bauernfeind و همکاران در سال ۱۹۸۹ یک سویه کلبسیلا پنومونیه را در کره جنوبی گزارش نمودند که توانایی انتقال مقاومت به سفوکسیتین و سفوتتان را به اشرشیاکلی داشت. به دلیل این که آنزیم فوق باعث هیدرولیز و مقاومت به سفومایسین‌ها می‌شود، CMY-1 نامیده شد (۳۹). نامگذاری بتالاکتامازهای پلاسمیدی AmpC نیز مشابه با ESBLs، وابسته به محل شناسایی، نام بیمار و نوع سوبسترا می‌باشد. به طور مثال، بتالاکتامازهای پلاسمیدی AmpC که باعث هیدرولیز و مقاومت به سفوکسیتین می‌شوند، FOX و بتالاکتامازهای پلاسمیدی AmpC که باعث هیدرولیز و مقاومت به موگزالاکتام می‌شوند، MOX نام دارند. نوعی از بتالاکتامازهای پلاسمیدی AmpC که اولین بار از بیمارستانی در عربستان سعودی گزارش شد، DHA (Dhahran Hospital in Saudi Arabia) نام گرفت (۳۲). امروزه این پلاسمیدها در کشورهای مختلف دنیا یافت و گزارش می‌شوند. تاکنون انواع مختلفی از بتالاکتامازهای پلاسمیدی نوع AmpC گزارش شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به CMY، DHA، MOX، BIL، FOX، LAT و ACT اشاره کرد (۳۳). مانند دیگر آنزیم‌های بتالاکتاماز، این آنزیم‌ها نیز چندین نوع دارند. به طور مثال، ژن کد کننده آنزیم CMY بیش از ۳۷ نوع دارد (۵). پلاسمیدهای نوع AmpC به طور دایمی و پیوسته بتالاکتامازهای نوع AmpC را بیان می‌کنند، اما در بین آن‌ها DHA قابل القا می‌باشد (۳۳، ۳۲).

شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای نوع AmpC

روش‌های متعددی جهت شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای نوع AmpC ارایه شده است، اما هیچ کدام از آن‌ها توسط CLSI تأیید نشده‌اند (۴۰). دو خصوصیت مهم فنوتیپی که در ادامه آمده است، می‌تواند در افتراق بتالاکتامازهای نوع AmpC از ESBLs کمک کننده باشد:

الف. بر خلاف ESBLs معمول، بتالاکتامازهای نوع AmpC قادر به هیدرولیز سفومایسین‌ها (سفوکسیتین و سفوتتان) نیز می‌باشند (۲۹). افزایش MIC به میزان بیشتر یا مساوی ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سفوکسیتین و یا بیشتر از ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سفوتتان، نشان دهنده فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC می‌باشد (۳۱).

ب. بتالاکتامازهای نوع AmpC به طور معمول توسط مهار کننده‌های ESBLs مانند کلاولانیک اسید، تازوباکتام و سولباکتام مهار نمی‌شوند (۲۹).

از عوامل مهار کننده بتالاکتامازهای نوع AmpC، می‌توان به کلوگزاسیلین و فنیل برونیک اسید اشاره کرد که در بسیاری از روش‌های فنوتیپی، جهت شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC استفاده می‌شود (۴۱). مقاومت به سفوکسیتین به همراه مقاومت به اکسیموسفالوسپورین‌ها مانند سفتازیدیم در انتروباکتریاسه در صورتی که به سفپیم حساس باشد، بیانگر فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC می‌باشد (۳۰). همچنین، فقدان مهار مقاومت به سفالوسپورین‌هایی مانند سفتازیدیم، سفوتاکسیم و سفپودوکسیم در روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید، می‌تواند تا حدودی نشان دهنده فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC در انتروباکتریاسه باشد (۳۱، ۳۰)، اما باید به این نکته توجه داشت که عدم مهار توسط کلاولانیک در این روش‌ها، ممکن است به دلیل حضور بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف مقاوم به کلاولانیک اسید مانند IRT (Inhibitor-resistant TEM) و برخی بتالاکتامازهای نوع OXA باشد (۳۱، ۳۰). همچنین، برخی مواقع عدم مهار در روش دیسک ترکیبی با کلاولانیک اسید، می‌تواند به دلایلی مانند افزایش فعالیت افلاکس پمپ‌ها، کاهش نفوذ دارو به دلیل جهش در پورین‌ها و افزایش تولید بتالاکتامازها باشد (۳۰). یکی دیگر از شاخص‌های فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC، میزان یا سطح MIC به سفالوسپورین‌های نسل چهارم مانند

سفپیم و سفپیروم است. بتالاکتامازهای نوع AmpC فعالیت چندانی علیه سفپیم و سفپیروم ندارند. بنابراین، نقشی در افزایش سطح MIC نسبت به این آنتی‌بیوتیک‌ها ایفا نمی‌کنند (۳۶، ۳۵، ۳۲، ۳۰). در نتیجه، مقاومت به سفتازیدیم و عدم مقاومت به سفپیم یا MIC کمتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سفپیم، می‌تواند نشان دهنده فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC باشد (۳۰).

مقاومت به سفومایسین‌ها مانند سفوکسیتین، شاخص مناسبی جهت شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC می‌باشد، اما در بسیاری از مواقع علت مقاومت به این آنتی‌بیوتیک، جهش در پورین‌ها و عدم نفوذ دارو به درون سلول باکتری ذکر شده است (۳۱، ۳۰). همچنین، باکتری‌های گرم منفی غیر تخمیر کننده لاکتوز به طور ذاتی به سفومایسین‌ها مقاوم هستند. بنابراین، مقاومت به سفوکسیتین در این باکتری‌ها، شاخص خوبی جهت فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC نیست (۴۰، ۳۰) (شکل ۴).

شکل ٤. شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC به روش دیسک ترکیبی با فنیل برونیک اسید

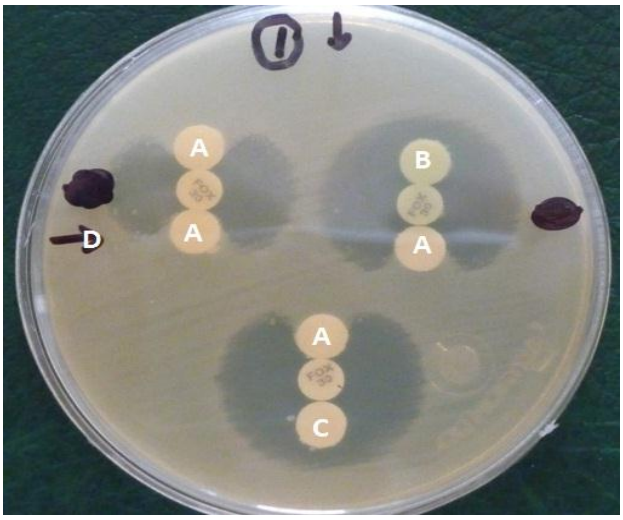
فنیل برونیک اسید (BA) باعث مهار مقاومت به سفوکسیتین (FOX) نشده است. یکی از عوامل مقاومت به سفوکسیتین، جهش در پورین‌ها و عدم نفوذ دارو به داخل سلول باکتری بیان شده است. به علت فراوانی بالای مقاومت به علت جهش در پورین‌ها نسبت به سفوکسیتین، اغلب جهت شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC با روش‌های مهاری، از چند سفالوسپورین استفاده می‌شود (۱۷).

برخی از کارباپنمازها نیز توانایی هیدرولیز سفومایسین‌ها را دارند. در نتیجه، در باکتری‌های تولید کننده کارباپنماز، مقاومت به سفوکسیتین تا حدودی ممکن است به دلیل حضور کارباپنمازها باشد (۴۰). بنابراین، جهت کاهش نتایج مثبت کاذب بهتر است از چند آنتی‌بیوتیک جهت شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای نوع AmpC استفاده شود (۴۰، ۲۹). از دیگر مشکلات تکنیکی جهت شناسایی فنوتیپی بتالاکتامازهای نوع AmpC، این است که هیچ کدام از روش‌های موجود قادر به تمایز بتالاکتامازهای AmpC کروموزومی از پلاسمیدی نیستند و تمامی روش‌ها اغلب تنها در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه استفاده شده‌اند و کاربرد دارند (۴۲).

روش‌های شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC

روش AmpC disk test: اساس این تست بر اساس حضور و ترشح بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف در فضای پری‌پلاسمیک باسیل‌های گرم منفی است (۴۰، ۳۰). در این روش ابتدا مقداری بافر (EDTA و Tris) TE 100X به نسبت برابر (۱/۱) با سرم فیزیولوژی رقیق می‌شود. سپس ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل به دیسک‌های بلانک (فاقد آنتی‌بیوتیک) اضافه می‌گردد و پس از خشک شدن دیسک‌ها در دمای اتاق، از آن‌ها استفاده می‌شود. در ادامه، یک سویه حساس به سفوکسیتین (اشرشیاکلی ATCC 25922) در محیط Mueller-Hinton agarبه روش چمنی کشت داده می‌شود. سپس یک دیسک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) بر روی محیط قرار داده می‌شود. در قسمت بالا و پایین دیسک سفوکسیتین، دیسک‌های بدون آنتی‌بیوتیک حاوی TE قرار می‌گیرند. کلونی‌های باکتری به هر یک از دیسک‌های حاوی TE اضافه می‌گردد. بافر TE موجود در این دیسک‌ها موجب تخریب غشای خارجی و آزاد شدن آنزیم‌های بتالاکتاماز به محیط کشت می‌شود. در صورت وجود بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC در جدایه بالینی، سویه حساس که در محیط کشت داده شده است، می‌تواند به سمت دیسک دارای سفوکسیتین رشد کند (۴۳) (شکل ۵). این روش دارای حساسیت ۱۰۰ درصد و اختصاصیت ۹۰ درصد در مقایسه با

ایزوالکتروفوکوسینگ و Multiplex PCR (Multiplex polymerase chain reaction) دارد (۳۰). تخریب غشای خارجی در این روش، باعث حذف مکانیسم‌های مقاومت به بتالاکتام‌های ناشی از فعالیت افلاکس پمپ‌ها و عدم نفوذ از طریق جهش در پورین‌ها می‌شود (۴۰، ۳۰).



شکل ۵. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC به روش AmpC disk test با استفاده از دیسک سفوکسیتین

A: جدایه‌های بالینی تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC، B: کنترل منفی (اشرشیاکلی ATCC 25922)، C : جدایه بالینی فاقد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC و D: اشرشیاکلی ATCC 25922 حساس به سفوکسیتین (۲۹)

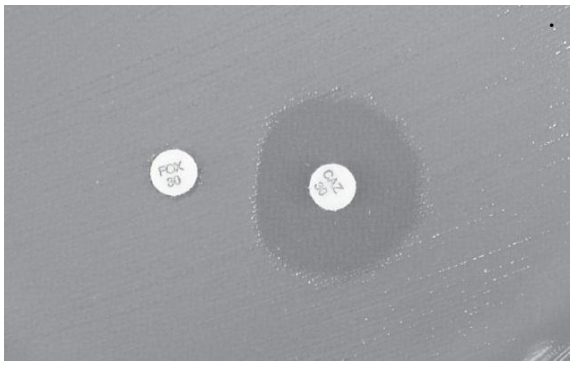
روش دیسک ترکیبی با فنیل برونیک اسید: در این روش ابتدا سوسپانسیون میکروبی حاوی استاندارد 0.5 MCFarland به صورت چمنی بر سطح محیط Mueller-Hinton agar کشت داده می‌شود. سپس دیسک‌های سفتازیدم، سفتازیدیم/ فنیل برونیک اسید؛ سفوتاکسیم، سفوتاکسیم/ فنیل برونیک اسید؛ سفپودوکسیم، سفپودوکسیم/ فنیل برونیک اسید و سفوکسیتین، سفوکسیتین/ فنیل برونیک اسید بر روی محیط قرار می‌گیرند. فاصله دیسک‌های ترکیبی از یکدیگر باید بین ۲۰ تا ۳۰ میلی‌متر باشد .غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در دیسک‌ها برابربا ۳۰ میکروگرم و غلظت فنیل برونیک اسید ۴۰۰ میکروگرم است. افزایش قطر هاله عدم رشد در اطراف هر یک از دیسک‌های حاوی فنیل برونیک اسید نسبت به دیسک‌های فاقد فنیل برونیک اسید، به اندازه بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر (شکل ۶)،نشان دهنده حضور بتالاکتامازهای نوع AmpC می‌باشد (۴۴، ۴۱، ۳۱، ۲۹، ۲۸). لازم به ذکر است که فنیل برونیک اسید باعث مهار آنزیم KPC نیز می‌شود (۴۵، ۳۱). در نتیجه، ممکن است در روش دیسک ترکیبی به دلیل وجود این آنزیم در جدایه‌های مورد بررسی، نتایج مثبت کاذب حاصل شود. برای جلوگیری از این نتایج، بهتر است حساسیت جدایه‌ها به کاربا‌پنم‌ها مانند ایمی‌پنم و مروپنم نیز بررسی گردد.

شکل ٦. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC به روش دیسک ترکیبی با فنیل برونیک اسید

فنیل برونیک اسید (BA) باعث مهار مقاومت به سفوکسیتین (FOX) شده است. افزایش قطر هاله عدم رشد به اندازه بیشتر یا مساوی ۵ میلی‌متر در اطراف دیسک سفوکسیتین حاوی فنیل برونیک اسید در مقابل دیسک سفوکسیتین فاقد فنیل برونیک اسید، نشان دهنده حضور و فعالیت بتالاکتامازهای نوع AmpC می‌باشد (۲۹).

روش دیسک ترکیبی با کلوگزاسیلین: در این روش نیز مانند روش دیسک ترکیبی، باکتری در محیط Mueller-Hinton agar کشت داده می‌شود. تنها تفاوت آن با روش دیسک ترکیبی، نوع مهار کننده و غلظت آن می‌باشد. غلظت کلوگزاسیلین در این روش بر روی هر دیسک ۲۰۰ میکروگرم است (۴۶، ۳۱).

تست‌های القایی (Induction test): یکی از تست‌های شناسایی AmpC القایی، استفاده از روش آنتاگونیسمی سفتازیدم با ایمی‌پنم (Ceftazidime-Imipenem antagonism test یا CIAT) است (۳۱). این روش جهت شناسایی AmpCهای قابل القا در بین اعضای خانواده انتروباکتریاسه به کار می‌رود. اساس این تست، القای AmpC توسط سفوکسیتین و ایمی‌پنم می‌باشد. جهت انجام این تست، بعد از کشت باکتری بر روی محیط Mueller-Hinton agar مشابه با روش‌های قبلی، ابتدا یک دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) را در مرکز قرار داده، سپس در فاصله ۲ سانتی‌متری آن، یک دیسک سفوکسیتین (۳۰ میکروگرم) یا ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) قرار می‌گیرد. در صورت وجود AmpC قابل القا، هاله عدم رشد در اطراف دیسک سفتازیدیم از سمت دیسک ایمی‌پنم یا سفوکسیتین از حالت دایره خارج شده، باکتری به سمت دیسک سفتازیدیم رشد می‌کند (شکل ۷) (۱۵). به این تست، تست D نیز گفته می‌شود؛ چرا که هاله عدم رشد در اطراف سفتازیدیم به شکل D مشاهده می‌شود (۳۱، ۱۵). همچنین، در این روش می‌توان از دیسک آگمنتین [آموکسی‌سیلین (۲۰ میکروگرم) و کلاولانیک اسید (۱۰ میکروگرم)] نیز به جای ایمی‌پنم و سفوکسیتین استفاده کرد (۳۱).



شکل ۷. شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC به روش االقایی

سفوکسیتین (FOX) باعث القای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC و مقاومت به سفتازیدیم (CAZ) شده است. القای بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف نوع AmpC باعث حرکت ناحیه مهاری به سمت دیسک سفتازیدیم و ایجاد شکل D در اطراف سفتازیدیم شده است (۱۵).

Etest: از نوارهای Etest نیز جهت شناسایی جدایه‌های تولید کننده بتالاکتامازهای نوع AmpC استفاده می‌شود. این نوارها به صورت تجاری با غلظت‌های مشخص از یک سفالوسپورین در یک طرف نوار و سفالوسپورین به همراه فنیل برونیک اسید یا کلوگزاسیلین در طرف دیگر تشکیل شده است. شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC با این نوارها مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام می‌گیرد. حساسیت و اختصاصیت این روش ۸۸ تا ۹۳ درصد گزارش شده است (۴۶، ۴۵).

دیگر روش‌های شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC: چندین روش دیگر جهت شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC وجود دارد. از جمله این روش‌ها می‌توان به Double-disk synergy test، Three-dimensional test و Cefoxitin-agar اشاره کرد (۳۱). همان‌گونه که پیش‌تر نیز گفته شد، یکی از معایب روش‌های فنوتیپی، شناسایی بتالاکتامازهای نوع AmpC و عدم توانایی آن‌ها در افتراق بتالاکتامازهای نوع AmpC پلاسمیدی از کروموزومی می‌باشد. برای افتراق بتالاکتامازهای نوع AmpC پلاسمیدی از کروموزومی، تنها باید از روش Multiplex PCR استفاده کرد؛ چرا که روش Gold standard جهت افتراق بتالاکتامازهای نوع AmpC پلاسمیدی از کروموزومی می‌باشد. در این روش از ۷ جفت پرایمر استفاده می‌شود (۴۰، ۳۱، ۳۰).

کاربا‌پنمازها

کاربا‌پنم‌ها مانند ایمی‌پنم، مروپنم و دوریپنم، آنتی‌بیوتیک‌های مهمی جهت درمان عفونت‌های شدید ناشی ازباسیل‌های گرم منفی دارای مقاومت‌های چندگانه و تولیدکننده ESBLs وبتالاکتامازهای نوع AmpC به شمار می‌روند (۲۴، ۹). معرفی کاربا‌پنم‌ها به دنیای پزشکی به دلیل طیف وسیع فعالیت وپایداری آن‌ها دربرابربسیاری ازآنزیم‌های بتالاکتاماز، یک موفقیت بزرگ دردرمان عفونت‌های جدی باکتریایی مقاوم به بتالاکتام‌ها محسوب می‌گردد (۴۷، ۲۴)، اما برو زمقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها بین باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گرم منفی ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی وفرصت‌طلب، یک تهدید جدی دردرمان عفونت‌ها یحاصل ازآن‌ها به شمار می‌رود (۴۸، ۴۱). از شایع‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به کاربا‌پنم‌ها در باسیل‌های گرم منفی (مانند اعضای انتروباکتریاسه) و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری (مانند پسودوموناس آئروژینوزا)، تولید آنزیم‌های کاربا‌پنماز می‌باشد (۴۸). کاربا‌پنمازها بر اساس ساختار آنزیمی خود در دو گروه MBLs و ESBLs قرار می‌گیرند (۵).

MBLs: متالوبتالاکتامازها دارای ساختمان متفاوتی نسبت به دیگر آنزیم‌های بتالاکتاماز می‌باشند. این آنزیم‌ها در گروه B از طبقه‌بندی Ambler قرار می‌گیرند (۹). بر خلاف سرین، بتالاکتامازها در جایگاه فعال خود نیاز به عنصر روی (Zn) دارند (۵). توانایی کمی در هیدرولیز مونوباکتام‌ها دارند و توسط کلاولانیک اسید و تازوباکتام مهار نمی‌شوند، اما توسط شلاتور کننده یون‌های فلزی مانند EDTA و

دی‌پیکولینیک اسید مهار می‌شوند (۴۷، ۵). از لحاظ عملکرد، به صورت اولیه از طریق توانایی در هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها شناسایی می‌گردند (۴۷). شایع‌ترین ژن‌های متالوبتالاکتاماز، bla_{VIM} و bla_{IMP} هستند و در بسیاری از کشورهای جهان گزارش شده‌اند (۲۳). این ژن‌ها اغلب در باکتری‌های غیر تخمیری و همچنین، انتروباکتریاسه یافت می‌شوند. در سال ۱۹۸۰، Ambler برای اولین بار متالوبتالاکتامازها را از سرین بتالاکتامازها متمایز نمود (۹، ۵). در سال ۱۹۸۹، Bush و Jacoby این گروه از آنزیم‌های بتالاکتاماز را بر اساس نوع سوبسترا، حساسیت به EDTA و عدم مهار آن‌ها توسط مهار کننده‌های سرین (جدول ۱)، به سه گروه تقسیم‌بندی کردند. آنان بر اساس هیدرولیز ایمی‌پنم و دیگر بتالاکتام‌ها، تغییراتی در طبقه‌بندی MBLs ایجاد نمودند (۵). گروه 3a گروهی از MBLs می‌باشند که پنی‌سیلین‌ها را بسیار سریع‌تر از ایمی‌پنم هیدرولیز می‌کنند و با سرعت کمتری باعث هیدرولیز سفالوسپورین‌ها می‌شوند. گروه 3b به طور اختصاصی باعث هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها می‌شوند و گروه 3c فعالیت زیادی علیه سفالوسپورین‌ها دارند (۲۴، ۹، ۵).

متالوبتالاکتامازهای نوع IMP: این گروه از متالوبتالاکتامازها اولین بار در سال ۱۹۸۸ در ژاپن، در یک پلاسمید قابل انتقال در یک سویه پسودوموناس آئروژینوزا گزارش شدند. سه سال بعد این ژن در سراشیا مارسنس در اوکازاکی ژاپن گزارش گردید. ژن این آنزیم بر روی اینتگرون کلاس یک پلاسمید ۱۲۰کیلوبازی (kb) قرار داشت (۵۰، ۴۹، ۲۳). در سال‌های بعد این آنزیم در دیگر باکتری‌های گرم منفی مانند اعضای خانواده انتروباکتریاسه و باسیل‌های غیر تخمیری گزارش شد و تاکنون بیش از ۴۴ نوع از ژن bla_{IMP} در بسیاری از باسیل‌های گرم منفی به ویژه پسودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده است (۵۰، ۴۹، ۲۳).

متالوبتالاکتامازهای نوع VIM: این نوع از آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز کمتر از ۴۰ درصد شباهت در ردیف اسیدهای آمینه خود با متالوبتالاکتاز IMP دارند، اما از لحاظ هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، الگوی مشابهی با IMP دارند (۴۹). این آنزیم اولین بار در پسودوموناس آئروژینوزا در کشور ایتالیا گزارش شد و تاکنون بیش از ۳۸ نوع از این ژن گزارش شده است (۲۶). ژن این آنزیم اغلب بر روی اینتگرون کلاس یک قرار دارد (۴۹، ۲۳). این آنزیم نیز مانند ژن bla_{IMP}، با گذشت زمان در دیگر باسیل‌های گرم منفی مانند اعضای خانواده انتروباکتریاسه به سرعت گسترش پیدا کرد. به طور مثال، ژن bla_{VIM-2} اولین بار در سال ۱۹۹۶ در فرانسه گزارش شد و امروزه شایع‌ترین ژن متالوبتالاکتاماز در پسودوموناس آئروژینوزا به شمار می‌رود (۴۹، ۲۳).

متالوبتالاکتامازهای نوع SPM: یکی از ژن‌های متالوبتالاکتاماز جدید می‌باشد که در سال ۱۹۹۷در سائوپائولو برزیل گزارش شد. این ژن از لحاظ توالی ژن بیشترین شباهت را با ژن bla_{IMP-1} دارد و اغلب بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار می‌گیرد. این آنزیم مشابه IMP-1 و VIM-1، قادر به هیدرولیز کلاولانیک اسید و آزترونام نیست (۴۹، ۲).

متالوبتالاکتامازهای نوع GIM: ژن bla_{GIM} در سال ۲۰۰۲، در ۵ جدایه پسودوموناس آئروژینوزا که از ۵ بیمار مختلف جمع‌آوری شده بود، شناسایی شد. این جدایه‌ها فقط به پلی‌میکسین حساس بودند. توالی ژن bla_{GIM} بیشترین تشابه را با bla_{IMP-4}، bla_{IMP-1} و bla_{IMP-6} دارد. این ژن مانند اکثر ژن‌های آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز، بر روی اینتگرون‌های کلاس یک حمل می‌شود (۴۹، ۲۴).

متالوبتالاکتامازهای نوع SIM : این آنزیم برای اولین بار در باکتری اسینتوباکتر بومانی در کره جنوبی گزارش شد. این گروه از متالوبتالاکتامازها در زیرگروه B1 از آنزیم‌های

متالوبتالاکتاماز قرار دارند و دارای تشابه ۶۹-۶۴ درصدی با ژن bla_{IMP} می‌باشند. بیان ژن کلون شده این آنزیم نشان داده است که این آنزیم‌ها قادر به هیدرولیز طیف گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها و کارباپنم‌ها هستند (۴۹، ۲۴، ۲۳).

متالوبتالاکتامازهای نوع AIM : متالوبتالاکتامازهای نوع AIM برای اولین بار در پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از یک بیمار دچار ضعف سیستم ایمنی در استرالیا شناسایی شد. از لحاظ توالی نوکلئوتیدی، ژن bla_{AIM} بیشترین تشابه را با زیرگروه B3 از آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز و کمترین شباهت را با ژن‌های bla_{IMP}، bla_{VIM}، bla_{SPM} و bla_{GIM} دارد (۴۹). این ژن در ایران نیز گزارش شده است (۴۸).

متالوبتالاکتامازهای نوع NDM: متالوبتالاکتاماز نوع NDM-1 در سال۲۰۰۸ شناسایی گردیدند که از آن سال تا به حال در بسیاری از کشورها مانند انگلستان، ایالات متحده آمریکا، کانادا، استرالیا، خاورمیانه و... گزارش شده است (۴۹). ژن این آنزیم بر روی یک پلاسمید حمل می‌گردد و علاوه بر ژن bla_{NDM-1} که باعث مقاومت به کاربا‌پنم‌ها می‌شود، دارای ژن‌های مقاومت به آمینوگلیکوزیدها، ریفامپیسین، سولفامتوکسازول و آزترونام می‌باشد. بر خلاف دیگر کاربا‌پنمازها مانند OXA-48 که مقاومت سطح پایین به کاربا‌پنم‌ها ایجاد می‌کنند، جدایه‌های دارای ژن bla_{NDM-1} مقاومت سطح بالایی نسبت به کاربا‌پنم‌ها ایجاد می‌نمایند. این ژن اغلب در کلبسیلا پنومونیه مشاهده شده، اما امروزه در دیگر اعضای خانواده انتروباکتریاسیه و گونه‌های اسینتوباکتر نیز گزارش شده است (۲۴، ۲۳، ۲).

کاربا‌پنمازهای نوع ESBLs (کلاس A و D از طبقه‌بندی Ambler)

از کاربا‌پنمازهای کلاس A می‌توان به آنزیم‌های KPC و GES اشاره کرد. همچنین، تعداد زیادی از بتالاکتامازهای کلاس D مانند برخی آنزیم‌های گروه OXA، توانایی هیدرولیز کاربا‌پنم‌ها را دارند. در مورد این آنزیم‌ها در قسمت ESBLs پیش‌تر بحث شده است (۹، ۵).

شناسایی کاربا‌پنمازها

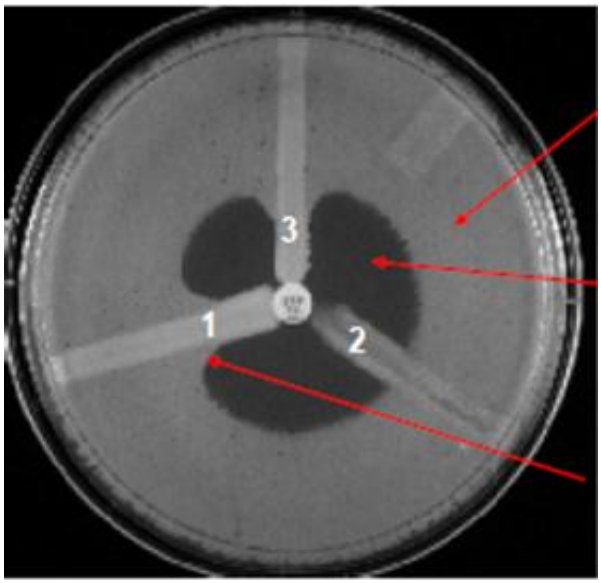
تنها روش مورد تأیید CLSI جهت شناسایی کاربا‌پنمازها، روش MHT (Modified Hodge Test) است. این روش جهت شناسایی کاربا‌پنمازها در اعضای خانواده انتروباکتریاسه استفاده می‌شود (۵۱). دیگر روش‌های موجود مانند روش مهاری با استفاده از EDTA مورد تأیید CLSI نمی‌باشند (۵۱، ۳۱). غربالگری کاربا‌پنمازها در باسیل‌های گرم منفی بر اساس کاهش حساسیت آن‌ها به کاربا‌پنم‌ها می‌باشد (۵۱، ۳۱)؛ به طوری که انتروباکتریاسه‌هایی که دارای حساسیت بیشتر یا مساوی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مروپنم هستند، باید از نظر حضور کاربا‌پنمازها بررسی شوند (۴۹). میزان MIC به کاربا‌پنم‌ها در سویه‌های تولید کننده کاربا‌پنمازها به نوع و میزان بیان ژن کاربا‌پنماز، گونه باکتری، حضور دیگر بتالاکتامازها مانند بتالاکتامازهای نوع AmpC، کاهش نفوذ دارو و افزایش فعالیت افلاکس پمپ‌ها بستگی دارد (۳۱). اغلب جهت شناسایی کاربا‌پنمازها در تست‌های تأییدی از سه آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم، مروپنم و ارتاپنم استفاده می‌شود (۵۲، ۴۷). ارتاپنم به تنهایی برای شناسایی آنزیم KPC به خصوص در جدایه‌هایی که AmpC overproducer هستند، مناسب است و جهت شناسایی سایر کاربا‌پنمازها مناسب نمی‌باشند (۳۱، ۲۳). همچنین، روش‌های فنوتیپی شناسایی کاربا‌پنمازها بر حسب نوع باکتری و نوع ژن کاربا‌پنماز بسیار متفاوت است (۳۱).

روش‌های شناسایی کاربا‌پنمازها

روش MHT : این روش جهت شناسایی کاربا‌پنمازها در انتروباکتریاسه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵۱) و دارای

حساسیت ۹۵-۹۳ درصدی برای شناسایی کارباپنمازهای کلاس A می‌باشد (۵۱، ۳۱). از مشکلات روش MHT می‌توان به وقت‌گیر بودن، مشکل بودن تفسیر و عدم توانایی آن در افتراق کارباپنمارهای مختلف از یکدیگر اشاره نمود. از آن‌جایی که KPC در ایالات متحده آمریکا شایع‌ترین کارباپنماز بین اعضای انتروباکتریاسه می‌باشد، مثبت شدن MHT در این کشور تا حدود زیادی نشان دهنده آنزیم KPC است (۵۲)، اما این تست توسط دیگر کارباپنمازها مانند متالوبتالاکتامازها و کارباپنمازهای کلاس A و D نیز مثبت می‌شود (۵۲). بنابراین، مثبت شدن تست MHT در دیگر کشورها (مانند کشور ما)، بیانگر حضور KPC نیست (۵۲، ۵۱، ۳۱).

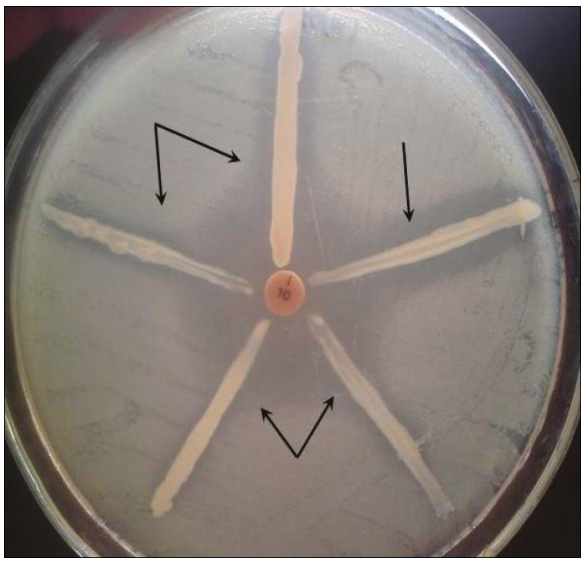
جهت انجام این تست، از یک سویه حساس به ارتاپنم (اشرشیاکلی ATCC 25922) استاندارد ۰/۵ McFarland تهیه و سپس به نسبت ۱ به ۱۰ آن را با سرم فیزیولوژی رقیق ودر محیط Mueller-Hinton agar به روش چمنی کشت داده می‌شود. سپس یک دیسک ارتاپنم (۱۰ میکروگرم) بر روی مرکز محیط قرار داده و جدایه‌های بالینی به صورت یک خط از کناره پلیت تا کناره دیسک ارتاپنم کشت داده می‌شوند (شکل ۸). اگر جدایه بالینی تولید کننده کارباپنماز باشد، آنزیم کارباپنماز در محیط ترشح و باعث تجزیه ارتاپنم می‌شود و در این صورت سویه حساس ATCC 25922 توانایی رشد به سمت دیسک ارتاپنم را در کنار جدایه بالینی پیدا می‌کند. در صورت نبود ارتاپنم، می‌توان از مروپنم استفاده کرد (۵۱).



شکل ۸ شناسایی جدایه‌های تولید کننده کارباپنماز به روش MHT (Modified Hodge Test)، قسمت ۱: کنترل مثبت (تولید کننده کارباپنماز)، قسمت ۲: کنترل منفی و قسمت ۳: جدایه تولید کننده کارباپنماز

نوک پیکان‌ها نشان دهنده سویه استاندارد حساس به ارتاپنم(اشرشیاکلی ATCC 25922) می‌باشد. اگر جدایه بالینی تولید کننده کارباپنماز باشد (شماره‌های ۱ و۳)، سویه حساس به ارتاپنم در اطراف خط کشت نمونه بالینی به سمت دیسک ارتاپنم رشد می‌کند و منجر به ایجاد حالت برگ شبدری در اطراف دیسک ارتاپنم می‌شود، اما در صورتی که جدایه بالینی تولید کننده کارباپنماز نباشد (شماره ۲)، تغییری در هاله عدم رشد ایجاد نمی‌شود (۵۱).

میزان تلقیح نمونه حساس به ارتاپنم بسیار مهم و تأثیرگذار است. تلقیح نمونه به طور قطع باید بر اساس دستورالعمل CLSI صورت گیرد (۵۱). جهت کاهش نتایج مثبت کاذب و افتراق کارباپنمازهای کلاس A از دیگر کارباپنمازها، می‌توان از روش تغییر یافته Pasteran و همکاران در شناسایی کارباپنمازها با روش MHT استفاده کرد (۵۳). همچنین، تولید باکتریوسین و رنگدانه منجر به نتایج منفی کاذب در این روش می‌شود (۵۴، ۳۰) (شکل۹).

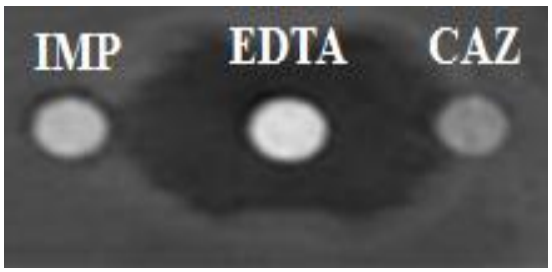


شکل ۹. تولید باکتریوسین توسط جدایه‌های بالینی

تولید باکتریوسین توسط جدایه‌های بالینی مانع رشد سویه حساس به ارتاپنم در اطراف جدایه‌های مورد بررسی شده (نوک پیکان‌ها)، منجر به نتایج منفی کاذب و اخلال در روش MHT (Modified Hodge Test) می‌گردد (۵۴).

شناسایی متالوبتالاکتامازها در انتروباکتریاسیه با روش CDDST (Combined double-disk synergy test) به همراه ایمی‌پنم:

در این روش بعد از تلقیح نمونه بر روی محیط Mueller-Hinton agar، یک دیسک ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) و یک دیسک حاوی ۱۰ میکروگرم از EDTA (۱۰۰ میلی‌مولار) به فاصله یک سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده می‌شوند (شکل ۱۰). افزایش هاله عدم رشد به سمت دیسک حاوی EDTA نشان دهنده حضور متالوبتالاکتامازها می‌باشد. این روش دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد در شناسایی متالوبتالاکتامازها در انتروباکتریاسه می‌باشد و باید با روش مولکولی تأیید شود (۵۸-۵۵، ۳۰).



شکل ۱۰. روش CDDST جهت شناسایی متالوبتالاکتامازها (جدایه تولید کننده متالوبتالاکتاماز) توسط ایمی‌پنم (IPM) و سفتازیدیم (CAZ)

در صورتی که جدایه بالینی، تولید کننده متالوبتالاکتاماز باشد، باعث افزایش هاله عدم رشد از سمت سفتازیدیم و ایمی‌پنم به سمت دیسک حاوی EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) می‌شود (۵۸).

شناسایی متالوبتالاکتامازها با روش CDDST به همراه سفتازیدیم در پسودوموناس آئروژینوزا

در این روش بعد از تلقیح نمونه بر روی محیط Mueller-Hinton agar، یک دیسک سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) و یک دیسک حاوی ۸ میکروگرم از EDTA (۱۰۰ میلی مولار) به فاصله یک سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده می‌شوند (شکل ۱۰). افزایش هاله عدم رشد به سمت دیسک حاوی EDTA، نشان دهنده حضور متالوبتالاکتامازها است. این روش دارای حساسیت ۹۶ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد در شناسایی متالوبتالاکتامازها در پسودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۵۶). این روش باید با روش مولکولی تأیید شود (۵۸-۵۵، ۳۰).

شناسایی متالوبتالاکتامازها در گونه‌های اسینتوباکتر با روش CDDSTبه همراه ایمی‌پنم

در این روش بعد از تلقیح نمونه بر روی محیط Mueller-Hinton agar، یک دیسک ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم) و یک دیسک حاوی ۵ میکرولیتر EDTA (۱۰۰ میلی مولار) به فاصله یک سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده می‌شوند. افزایش هاله عدم رشد به سمت دیسک حاوی EDTA، بیان کننده حضور متالوبتالاکتامازها می‌باشد. این روش دارای حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی کمتر از ۳۳ درصد در شناسایی متالوبتالاکتامازها در اسینتوباکتر می‌باشد (شکل ۱۰) (۵۶). این روش نیز باید با روش مولکولی تأیید گردد (۵۸-۵۵،۳۰).

روش Etest

از نوارهای Etest نیز جهت شناسایی جدایه‌های تولید کننده MBLs استفاده می‌شود. این نوارها به صورت تجاری با غلظت‌های مشخص از یک کارباپنم در یک طرف نوار و کارباپنم به همراه EDTA در طرف دیگر تشکیل شده است. شناسایی MBLs با این نوارها مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام می‌شود (۵۹، ۳۰).

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع باسیل‌های گرم منفی دارای مقاومت چندگانه، در سراسر دنیا در حال افزایش می‌باشد. عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها، باعث افزایش میزان مرگ و میر و همچنین، افزایش هزینه‌های درمانی شده است. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف نسل سوم و کارباپنم‌ها، از جمله مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط باسیل‌های گرم منفی به خصوص در بیماران بستری در بیمارستان می‌باشند. در نتیجه، شناسایی باسیل‌های گرم منفی تولید کننده آنزیم‌های بتالاکتاماز، نقش مهمی در کاهش شیوع آن‌ها و تصمیم‌گیری در درمان مناسب عفونت‌های حاصل از آن‌ها دارد. همچنین، آموزش صحیح کارکنان بخش میکروب‌شناسی در آزمایشگاه‌های بالینی نیز جهت تشخیص صحیح این باکتری‌ها بسیار حایز اهمیت است.

در طی دو دهه گذشته روش‌های فنوتیپی مختلفی جهت غربالگری باکتری‌های گرم منفی در آزمایشگاه‌های بالینی و بررسی‌های اپیدمیولوژی توسعه یافته‌اند، اما این که کدام یک از روش‌ها جهت شناسایی انتخاب شود، بسیار مهم است. در انتخاب هر یک از روش‌ها باید به نوع و گونه باکتری، هدف از شناسایی و نوع بتالاکتاماز توجه نمود. از آن‌جا که این آزمایش‌ها به طور معمول در آزمایشگاه‌ها انجام نمی‌شوند، لازم است تا پزشکان محترم هنگام درمان عفونت‌های جدی در بیماران عفونی که پاسخ درمانی خوبی ندارند، با آزمایشگاه‌ها هماهنگی نمایند تا آزمایشگاه‌ها بتوانند با اطلاعات به دست آمده جهت شناسایی و یافتن آنتی‌بیوتیک مناسب، با پزشک همکاری نمایند. شناسایی و

گزارش موارد مثبت از آنزیم‌های نوپدید می‌تواند در درمان عفونت‌های میکروبی تهدید کننده حیات با این باکتری‌ها و جلوگیری از گسترش آن‌ها در جامعه و بیمارستان ارزشمند باشد و ضروری است که مسؤولین آزمایشگاه‌ها به این نکات توجه نمایند و پزشکان جهت درمان باکتری‌های مقاوم با آزمایشگاه‌ها هماهنگی نمایند.

References

1. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collin JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8(6): 423-35.
2. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300(6): 371-9.
3. Saga T, Yamaguchi K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *JMAJ* 2009; 52(2): 103-8.
4. Jacoby G, Munoz-Price LS. The new ß-lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352(380): 91.
5. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of ß-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969-76.
6. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol 2*009; 58(Pt 9): 1133-48.
7. Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7(5): 459-69.
8. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(8): 2385-92.
9. Poole K. Resistance to ß-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(17): 2200-23.
10. Samaha-Kfoury JN, Araj GF. Recent developments in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. *BMJ* 2003; 327(7425): 1209-13.
11. Bush K. Characterization of ß-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33(3): 259-63.
12. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum ß-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657-86.
13. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 557-84.
14. Weldhagen GF. GES: an emerging family of extended spectrum ß-lactamases. *Clinical Microbiology Newsletter* 2006; 28(19): 145-9.
15. Sundin D. Hidden ß-lactamases in the enterobacteriaceae – dropping the extra disks for detection, part II. *Clinical Microbiology Newsletter* 2009; 31(7): 47-52.
16. Denton M. Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(Suppl 3): S9-S22.
17. Kalantar D, Mansouri S. Emergence of multiple ß-lactamases produced by *Escherichia coli* clinical isolates from

hospitalized patient in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2010; 3(4): 137-45.

18. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Detection of extended-spectrum b-lactamases (ESBLs) in *E. coli* and *Klebsiella* species [Online]. [Cited 2012]; Available from: URL: http://bsac.org.uk/wp-content/uploads/ 2012/ 02/*Ecoli klebsiella*.
19. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β-lactamases. *Can J Microbiol* 2004; 50(3): 137-65.
20. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. *Clinical Microbiology Newsletter* 2009; 31(8): 55-62.
21. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(7): 3027.
22. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(10): 4201-7.
23. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(Suppl 3): S8-14.
24. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2011; 2: 65.
25. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009; 73(4): 345-54.
26. Shlaes DM. New beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations in clinical development. *Ann N Y Acad Sci* 2013; 1277: 105-14.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
28. Mansouri S, Kalantar D, Asadollahi P, Taherikalani M, Emaneini M. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended spectrum beta-lactamases and AMPC type beta-lactamases isolated from hospitalized patients in Kerman, Iran. *Roum Arch Microbiol Immunol* 2012; 71(2): 81-6.
29. Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Nourijelyani K, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M, et al. Detection of AmpC-beta-lactamases producing isolates among carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolated from burn patient. *Iran J Microbiol* 2014; 6(5): 306-10.
30. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases. *Int J Infect Dis* 2007; 11(3): 191-7.
31. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging beta-lactamases in Gram-

negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41(2): 99-109.

32. Shahid M, Sobia F, Singh A, Khan HM, Hawkey PM, Huq A. AmpC β-lactamases and bacterial resistance: an updated mini review. *Reviews in Medical Microbiology* 2009; 20(3): 41-55.
33. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 582-610.
34. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(11): 4783-8.
35. Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(1): 2-4.
36. Li J, Cheng J, Yin J, Zhang X, Gao F, Zhu Y, et al. Progress on AmpC ß-lactamases. *Current Bioinformatics* 2009; 4(3): 218-25.
37. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA. Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella* pneumoniae. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(11): 2200-9.
38. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11(6): 315-7.
39. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection* 1989; 17(5): 316-21.
40. Jacoby GA. AmpC ß-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-82.
41. Mansouri S, Neyestanaki DK, Shokoohi M, Halimi S, Beigverdi R, Rezagholezadeh F, et al. Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of ß-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing Extended Spectrum ß-lactamases in Kerman, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(2): e8756.
42. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, and Proteus mirabilis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 4163-7.
43. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3110-3.
44. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum ß-lactamases by using boronic acid as an AmpC ß-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4): 1180-4.
45. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing

Klebsiella pneumoniae isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2009; 47(2): 362-7.

46. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Bottger EC, et al. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(8): 2924-32.

47. Kalantar D, Mansouri S, Razavi M. Emergence of imipenem resistance and presence of metallo-ß-lactamases enzymes in multi- drug resistant gram negative bacilli isolated from clinical samples in Kerman, 2007-2008. *J Kerman Univ Med Sci* 2010; 17(3): 208-14. [In Persian].

48. Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emaneini M. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* 2014; 40(8): 1556-61.

49. Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17(2): 131-43.

50. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shimojima M, Kirikae T. IMP-43 and IMP-44 metallo-beta-lactamases with increased carbapenemase activities in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(9): 4427-32.

51. Iraz M, Duzgun AO, Cicek AC, Bonnin RA, Ceylan A, Saral A, et al. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78(3): 292-4.

52. Kalantar D, Jabalameli F, Emaneini M. The modified Hodge test for identification of Klebsiella pneumoniae carbapenemase producing isolates. *Burns* 2013; 39(2): 370-1.

53. 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.

54. Rai S, Manchanda V, Singh NP, Kaur IR. Zinc-dependent carbapenemases in clinical isolates of family Enterobacteriaceae. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(3): 275-9.

55. Miriagou V, Papagiannitsis CC, Tzelepi E. Detecting VIM-1 production in *proteus mirabilis* by an imipenem-dipicolinic acid double disk synergy test? *J Clin Microbiol* 2010; 48(2): 667-8.

56. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and Acinetobacter spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62(1): 102-5.

57. Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP- or VIM- type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53(3): 241-4.

58. Pandya NP, Prajapati SB, Mehta SJ, Kikani KM, Joshi PJ. Evaluation of various methods for detection of metallo-β-lactamase (mbl) production in gram negative bacilli. *Int J Biol Med Res* 2011; 2(3): 775-7.

59. Mirsalehian A, Akbari Nakhjavani F, Bahador A, Jabal Ameli F, Bigverdi R, Goli H. Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran Univ Med J* 2011; 68(10): 563-9. [In Persian].

The Importance of Extended-Spectrum β-lactamases in Gram-Negative Enteric Bacilli and the Phenotypic Methods of detection

Davood Kalantar-Neyestanaki Ph.D.[1], Akbar Mirsalehian Ph.D.[2], Mohammad Emaneini Ph.D.[3], Fereshteh Jabalameli Ph.D.[4], Mehdi Fatahi-Bafghi Ph.D.[5], Shahla Mansouri Ph.D.[6*]

1.Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2.Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3.Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4.Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

5 Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

6. Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

*Corresponding author; e-mail: *smansouri@kmu.ac.ir*

(Received: 11 Jan 2015 Accepted: 28 July 2015)

Abstract

The production of β-lactamase enzymes is the main mechanism of resistance to β-lactam antibiotics in gram-negative bacilli. Therefore, it is important to identify the β-lactamases-producing bacteria for the treatment of caused infections. This article aimed to review the recent literature and guidelines regarding phenotypic detection of β-lactamases in common gram-negative bacilli in clinical samples.

Key words: Enteric gram-negative bacilli, β-lactamase enzymes, Phenotypic methods

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(3): 145-170