دستورالعمل و راهنمای انجام تست تاییدی فنوتیپی مقاومت به واسطه امپ سی به روش فنیل برونیک اسید

Instructions and guidelines for conducting phenotypic confirmatory test of resistance by AmpC by phenylbronic acid method

نویسنده:

دکتر فرهاد نیکخواهی

هیئت علمی و رئیس مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

مقدمه

امروزه جهت درمان عفونت های باکتریال اغلب از آنتی بیوتیک های دسته ی بتالاکتام استفاده می کنند. مصرف بیش از حد و خودسرانه ی این داروها باعث شده است تا باکتری ها با تولید آنزیم هایی به نام بتالاکتامازها در برابر این داروها از خود مقاومت نشان دهند(1). شایع ترین بتالاکتاماز های شناسایی شده در آزمایشگاه های تشخیصی آنزیم های بتالاکتامازهای AmpC و بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) هستند. اهمیت بالینی بتالاکتامازهای AmpC در این است که آنها به سفالوسپورین های نسل ۱ و ۳ مثل سفتازیدیم و سفوتاکسیم، سفامایسین ها، پنی سیلین ها و مهارکننده های بتالاکتاماز همچون کلاولانیک اسید و تازوباکتام که سویه های ESBL به آنها حساس می باشند و همچنین آزترئونام ها مقاوم می باشند(4–2). آنزیم های بتالاکتاماز AmpC که به واسطه پلاسمید ایجاد می شوند می توانند تمام داروهای دسته بتالاکتام، به جز سفپیم و کارباپنم ها را هیدرولیز کنند و معمولا با مقاومت های چند دارویی مرتبط می باشند(3). بتالاکتامازهای AmpC پلاسمیدی در سویه هایی مثل کلبسیلا اکسی توکا، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا، پروتئوس میرابیلیس و اشرشیا کلی وجود دارند(5). ژن های پلاسمیدی AmpC به دلیل توانایی انتقال افقی بین میکروارگانیسم های مختلف بسیار حائز اهمیت می باشند(6). اکثر آزمایشگاه های تشخیصی تولید بتالاکتامازهای AmpC را توسط سویه های ایجادکننده عفونت را مورد بررسی قرار نمی دهند در صورتی که برای درمان این سویه ها انتخاب های درمانی محدودی وجود دارد، و با به کاربردن درمان آنتی بیوتیکی نادرست می تواند منجر به ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی شود. بنابراین تشخیص و تفسیر دقیق فعالیت AmpC و ESBL برای متخصصان مراقبت های بهداشتی برای انجام درمان موثر و مناسب حیاتی است. با این حال، هیچ دستورالعمل موسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) برای تشخیص مقاومت با واسطه AmpC در ایزوله‌های بالینی گرم منفی وجود ندارد و معمولاً به دلیل نتایج گمراه‌کننده، به ویژه در آزمایش‌های فنوتیپی، مشکل ایجاد می کند(7). اگرچه چندین روش فنوتیپی که عمدتاً از یک سفالوسپورین با یک مهارکننده بتالاکتاماز (مانند کلاوولانات) یا یک مهارکننده غیر بتالاکتاماز (مانند بورونیک اسید) استفاده می‌کنند، وجود دارند. به کار بردن این روش های فنوتیپی به همراه آزمایشات مولکولی می توانند به تشخیص بتالاکتاماز های AmpC کمک کنند(8).

مواد و روش انجام آزمایش:

غربالگری اولیه جهت شناسایی سویه های مشکوک به تولید آنزیم های بتالاکتاماز AmpC:

جهت انجام این تست ابتدا از کشت تازه باکتری ها سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه می شود. سپس با استفاده از سواپ استریل از سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط مولرهینتون آگار به صورت چمنی کشت داده می شود. پس از تلقیح باکتری یک دیسک سفوکسیتین μg-۳۰ در مرکز محیط تلقیح شده قرار داده و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه می شود. پس از گذشت این زمان ایزوله هایی که قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۸ میلی متر دارند، جهت انجام تست های تاییدی انتخاب می شوند.

تست های تاییدی فنوتیپی

تست تاییدی فنیل برونیک اسید:

پس از تلقیح سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند باکتری بر روی محیط مولر هینتون آگار، دو دیسک سفوکسیتین - ۳۰μg به فاصله ۳۰ میلی متر از یکدیگر، روی محیط تلقیح شده قرار داده می شود. سپس به یکی از دیسک های سفوکسیتین به میزان μl-۲۰ فنیل برونیک اسید* اضافه شد. پس از جذب فنیل برونیک اسید اضافه شده، به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه می شود. پس از گذشت این زمان قطر هاله مهاری بین دیسک آنتی بیوتیک حاوی برونیک اسید و دیسک آنتی بیوتیک به تنهایی مقایسه می شود. سویه ایی که افزایش معناداری(5-≤mm) در قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک آنتی بیوتیک با افزودن اسید بورونیک را نشان داد، تولید کننده AmpC در نظر گرفته می شود.

* ۱۵۰ میلی گرم فنیل برونیک اسید را در ۱۰ سی سی آب مقطر استریل حل کنید. از این محلول به عنوان استوک ۱۵ μg/μl استفاده کنید. استوک تهیه شده را در°C ۴- نگهداری کنید.

منابع:

1. Manouchehri M, Ahanjan M. Detection of CTX beta-lactamase Gene in Escherichia Coli Isolated from Urinary Tract Infection Using Polymerase Chain Reaction. J Mazandaran Univ Med Sci [Internet]. 2015 Oct 10 [cited 2024 Jan 28];25(129):36–45. Available from: http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-6290-en.html

2. Estaleva CEL, Zimba TF, Sekyere JO, Govinden U, Chenia HY, Simonsen GS, et al. High prevalence of multidrug resistant ESBL- and plasmid mediated AmpC-producing clinical isolates of Escherichia coli at Maputo Central Hospital, Mozambique. BMC Infect Dis [Internet]. 2021 Jan 6 [cited 2024 Jan 28];21(1):16. Available from: https://doi.org/10.1186/s12879-020-05696-y

3. Gupta G, Tak V, Mathur P. Detection of AmpC β Lactamases in Gram-negative Bacteria. J Lab Physicians. 2014 Jan;6(1):1–6.

4. Palmieri M, Schicklin S, Pelegrin AC, Chatellier S, Franceschi C, Mirande C, et al. Phenotypic and Genomic Characterization of AmpC-Producing Klebsiella pneumoniae From Korea. Ann Lab Med [Internet]. 2018 Jul [cited 2024 Jan 28];38(4):367–70. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5895867/

5. Gupta V, Kumarasamy K, Gulati N, Garg R, Krishnan P, Chander J. AmpC β-lactamases in nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae from India. Indian J Med Res. 2012 Aug;136(2):237–41.

6. Lan NPH, Hien NH, Le Thi Phuong T, Thanh DP, Thieu NTV, Ngoc DTT, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of ESBL and AmpC producing organisms associated with bacteraemia in Ho Chi Minh City, Vietnam. Antimicrob Resist Infect Control [Internet]. 2017 Oct 16 [cited 2024 Jan 28];6:105. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5644090/

7. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC Disk Test for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β-Lactamases in Enterobacteriaceae Lacking Chromosomal AmpC β-Lactamases. J Clin Microbiol [Internet]. 2005 Jul [cited 2024 Jan 28];43(7):3110–3. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169113/

8. Jacoby GA. AmpC β-Lactamases. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2009 Jan [cited 2024 Jan 28];22(1):161–82. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620637/