

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Metode Deteksi *Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*

Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae Detection Methods

(Suatu Kajian Pustaka)

¹Ni Wayan Eka Putri Gayatri Kastawa, ^{1,2}Yan Ramona, ³N.N. Dwi Fatmawati.

¹Program Studi Biologi FMIPA, Universitas Udayana, Bukit Jimbaran Bali

²UPT Lab. Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana

³Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Udayana

Email : yan_ramona@unud.ac.id

INTISARI

Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae (CRE) merupakan kelompok bakteri *Enterobacteriaceae* yang resisten terhadap antibiotik golongan Carbapenem (Imipenem, Ertapenem, Meropenem, Doripenem). Salah satu spesies *Enterobacteriaceae* yang sering menunjukkan sifat resisten terhadap Carbapenem adalah *Klebsiella pneumoniae*. Deteksi dini dengan menggunakan uji fenotip dan genotip diperlukan untuk mengetahui keberadaan CRE. Uji fenotip yang dapat dilakukan adalah *Modified Hodge Test* (MHT), Carba Nordmann-Poirel (Carba NP), dan *Modified Carbapenem Inactivation Method* (MCIM). Sementara itu, keberadaan gen penyandi enzim carbapememase dapat dilakukan dengan uji genotip menggunakan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Kata kunci : *Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae* (CRE), Fenotip, Genotip, Modified Carbapenem Inactivation Method (MCIM), Modified Hodge Test (MHT), Carba NP, *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

ABSTRACT

Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae (CRE) is a group of *Enterobacteriaceae* resistant to Carbapenem antibiotics (Imipenem, Ertapenem, Meropenem, Doripenem). One species of *Enterobacteriaceae* frequently showing resistant characteristic to Carbapenem is *Klebsiella pneumoniae*. Early detection methods on the CRE existence (phenotypically or genetically) are urgently needed. The methods should be able to detect carbapenemases or genes encoding these types of enzymes. In the recent years, phenotypic characteristics can be done by applying methods, such as Modified Hodge Test (MHT), Carba Nordmann-Poirel (Carba NP), or Modified Carbapenem Inactivation Method (MCIM). To detect the presence of genes encoding production of carbapenemases, Polymerase Chain Reaction (PCR) is the most reliable method available in the recent years.

Keywords: Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae (CRE), Phenotype, Genotype, Modified Carbapenem Inactivation Method (MCIM), Modified Hodge Test (MHT), Carba Nordmann-Poirel, Polymerase Chain Reaction (PCR).

PENDAHULUAN

Dalam dekade terakhir, semakin banyak bakteri Gram negatif yang menunjukkan sifat resisten terhadap sebagian besar antibiotik (Odonkor and Addo, 2011). Munculnya *Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae* (CRE) menjadi ancaman global, karena carbapenem merupakan antibiotik pilihan terakhir dalam terapi untuk menanggulangi berbagai infeksi (Magiorakos *et al.*, 2012). Konsekuensi logis yang muncul akibat munculnya fenomena ini adalah meningkatnya kematian pada pasien, meningkatnya masa rawat inap, serta meningkatnya biaya perawatan (Queenan and Bush, 2007). Fenomena CRE ini tentu saja merupakan ancaman yang terjadi di seluruh dunia (mengglobal).

Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae (CRE) merupakan kelompok *Enterobacteriaceae* yang menunjukkan sifat resisten terhadap antibiotik golongan Carbapenem (Imipenem, Ertapenem, Meropenem, dan Doripenem), dan *Klebsiella pneumoniae* merupakan contoh spesies CRE penyebab infeksi saluran kemih dan sepsis pada pasien yang sistem imunnya mengalami penurunan, terutama pada pasien usia lanjut (Queenan and Bush, 2007).

Penyebaran karakteristik CRE dapat terjadi melalui transfer gen horizontal yang dimediasi oleh plasmid atau transposon (Meletis, 2016). Munculnya kasus penyakit yang disebabkan oleh infeksi CRE dapat disebabkan oleh penggunaan alat kesehatan yang tidak steril (kateter intravena, ventilator, kateter urin), penggunaan antibiotik yang tidak bijak, atau pengendalian infeksi yang tidak dijalankan sesuai *standard operational procedure* atau SOP (Kenneley, 2013). *Escherichia coli* merupakan salah satu isolat CRE pertama yang ditemukan di rumah sakit pelatihan Huashan. Isolat ini diisolasi dari urin pasien yang dirawat di bangsal medis rumah sakit tersebut pada bulan Maret 2002. Penemuan ini kemudian diikuti oleh diisolasinya strain resisten Carbapenem, seperti *Citrobacter freundii* dan *K. pneumoniae* (Queenan and Bush, 2007). Menurut WHO

(2014), sifat resisten *K. pneumoniae* terhadap antibiotik Carbapenem sudah menyebar ke seluruh belahan dunia dan enzim carbapenemase pertama yang terindikasi dihasilkan oleh *Enterobacteriaceae* (NmcA) terdeteksi pada tahun 1993. Setelah deteksi pertama kalinya, berbagai macam Carbapenemase yang dihasilkan oleh *Enterobacteriaceae* menjadi semakin banyak jenisnya. Saat ini terdapat 3 kelas β -laktamase (kelas Ambler A, B, dan D β -laktamase) yang telah dilaporkan (Queenan and Bush, 2007).

Mekanisme pasti penyebaran CRE saat ini masih belum banyak diteliti. Oleh karena itu, pengembangan metoda deteksi dini keberadaan CRE merupakan salah satu prioritas yang harus dilakukan, sehingga penyebaran infeksi oleh CRE dapat dikurangi (Queenan and Bush, 2007). Cara-cara yang dapat dilakukan antara lain dengan menyediakan tempat dan metoda perawatan khusus untuk pasien-pasien yang terinfeksi CRE dan penggunaan antibiotik yang bijak (Gazin *et al.*, 2012). Saat ini keberadaan CRE dapat diketahui melalui deteksi fenotip dan genotip pada isolat patogen (Perez and van Duin, 2013).

KLASIFIKASI MOLEKULER ENZIM CARBAPENEMASE

β -Laktamase Kelas A

Pembentukan beberapa enzim β -Laktamase kelas A disandi oleh gen-gen, seperti seperti NmcA (*Non-metalloenzyme Carbapenemase A*), SME (*Serratia marcescens enzyme*), IMI-1 (*Imipenem-hydrolysing β -lactamase-1*), dan SFC-1 (*Serratia fonticola Carbapenemase-1*) (Nordmann *et al.*, 2011). Sementara itu, enzim carbapenemase juga dapat disandi oleh plasmid yang membawa gen-gen, seperti gen-gen *Klebsiella pneumoniae carbapenemases* atau gen-gen KPC (KPC-2 sampai KPC-13), IMI (IMI-1 hingga IMI-3), derivatif (GES-1 hingga GES-20) dan GES (*Guiana Extended-spectrum*) (Benedic *et al.*, 2014). Semua enzim yang dihasilkan dapat secara aktif menghidrolisis carbapenem dan sebagian dari enzim-enzim tersebut dapat dihambat oleh asam klavulanat (Nordmann *et*

al., 2011; Benedic *et al.*, 2014). Diantara gen-gen tersebut diatas, gen KPC merupakan yang paling umum dan banyak ditemukan (Nordmann *et al.*, 2009). Gen KPC telah berevolusi yang menjadikan bakteri pembawa bersifat resisten terhadap berbagai jenis antibiotik dengan gugus β -laktam (*multidrug resistant*), sehingga membatasi pilihan terapi untuk mengobati infeksi pasien.

Penelitian Perez dan van Duin (2013) menemukan bahwa saat ini ada 12 varian tambahan blaKPC di dunia. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Woodford *et al.* (2008) menunjukkan bahwa isolat pembawa KPC menyebar secara internasional di beberapa daerah. Gen KPC berlokasi pada beberapa lokus (multi-lokus) dengan tambahan konten β -laktamase berbeda berdasarkan ukuran, jumlah, dan struktur plasmid pembawa gen tersebut. Satu elemen genetik (transposon Tn4401) juga telah ditemukan membawa gen blaKPC (Nordmann *et al.*, 2013; Cuzon *et al.*, 2010). Pada tahun 2009 dan 2010, Program Pengawasan Infeksi Nosokomial Kanada menyelidiki 7 kasus KPC-3-positif yang melibatkan 4 spesies bakteri, yaitu *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, dan *Klebsiella pneumoniae*. Keberadaan spesies-spesies tersebut di rumah sakit dideteksi dengan menggunakan *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Mataseje *et al.*, 2012). Penelitian ini mengungkap bahwa ST512 sebagai varian lokus tunggal isolat ST258 *Klebsiella pneumoniae* asli tersebar luas di Yunani. Dalam penelitian ini juga ditemukan indikasi terjadinya transfer yang dimediasi plasmid inter dan intra spesies repFIIA *replicon type* (Munoz-Price *et al.*, 2013). Dalam insiden lain, seorang pasien lansia yang mengunjungi Yunani pada tahun 2012 terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* KPC-2, dan isolat tersebut diisolasi dari urin pasien. Hal ini menegaskan bahwa gen tersebut telah tersebar luas di Yunani (Munoz-Price *et al.*, 2013).

β -Laktamase Kelas B (metallo β -laktamase)

Kelompok metallo β -laktamase yang paling umum antara lain *metalo β -lactamase New Delhi-1* (NDM-1), *Imipenem-resistant*

Pseudomonas (IMP)-*type* Carbapenemase, VIM (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase), GIM (Germany Imipenemase), dan SIM (Seoul Imipenemase) (Queenan and Bush, 2007). Gen-gen yang mengkode enzim-enzim tersebut sering berada dalam berbagai struktur integron dan dimasukkan ke dalam kaset gen (Giakkoupi *et al.*, 2003).

Pada pertengahan 2010 ditemukan bahwa ada kemungkinan gen NDM-1 terbawa ke negara lain (termasuk Negara-negara yang ada di Eropa dan Amerika Serikat) oleh migrasi manusia melalui aktivitas pariwisata (Pesesky *et al.*, 2015). Strain yang sama juga telah ditemukan dalam sampel lingkungan di India (Khan and Nordmann 2012). Gen NDM banyak ditemukan pada isolat-isolat *Klebsiella pneumoniae* dan *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, dan *Pseudomonas aeruginosa* (Benedic *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2008; Poirel *et al.*, 2010).

Saat ini, ada 18 jenis Carbapenemase tipe IMP yang telah teridentifikasi, dan tipe ini pertama kali terdeteksi pada tahun 1990an di Jepang. Mayoritas enzim tipe ini diselidiki pada spesies *Acinetobacter* dan *Pseudomonas*, serta yang ada dalam kelompok *Enterobacteriaceae*. Selain di Jepang, gen IMP juga ditemukan di Brasil dan Kanada setelah laporan pertama dari Eropa pada tahun 1997 (Queenan and Bush, 2007). Menurut Bush and Fisher (2011) jenis gen ini telah menyebar secara perlahan ke negara-negara lain di belahan timur dunia dan berlanjut ke Amerika Serikat dan Australia.

Marsik and Nambiar (2011) secara detail mereview bahwa gen VIM jarang ditemukan pada *Enterobacteriaceae*, tetapi paling sering ditemukan pada *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas putida*. Carbapenemase lain yang dikode oleh gen VIM pertama kali diisolasi di Verona, Italia pada tahun 1997 dan ditemukan terdapat 14 kelompok dalam VIM (*Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase*). VIM dan IMP memiliki beberapa kesamaan, antara lain keduanya dikode oleh gen-gen yang terintegrasi pada plasmid. Kedua kelompok enzim ini menghidrolisis semua antibiotik dengan gugus β -laktam, kecuali monobaktam.

Kedua kelompok enzim ini disebutkan bersifat rentan terhadap semua penghambat β -laktam.

β -Laktamase Kelas D

Kelompok enzim ini merupakan serine β -laktamase yang dapat dihambat oleh EDTA atau asam klavulanat. Carbapenemase ini adalah jenis enzim OXA, dan memiliki aktivitas yang lemah terhadap carbapenem. Enzim ini ditemukan terutama dalam organisme non-fermenter seperti *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan jarang ditemukan pada kelompok *Enterobacteriaceae* yang terisolasi di sebagian besar negara, termasuk Inggris dan Amerika Serikat (Moquet *et al.*, 2011). Aktivitas Carbapenemase OXA dapat meningkat oleh adanya elemen yang mengontrol ekspresi gen (Carrer *et al.*, 2010). Gen pengkode Carbapenemase OXA memiliki kemampuan yang cepat bermutasi, sehingga spektrum aktivitasnya meluas (Aziz, 2015). Menurut Mathers *et al.* (2013) bahwa terdeteksinya kelompok enzim β -Laktamase kelas D di antara keluarga *Enterobacteriaceae* membuat dunia kesehatan masyarakat di seluruh dunia menjadi terancam, karena tidak akan ada antibiotik yang mampu menghambat patogen pembawa gen ini.

Saat ini, gen OXA-48 pengkode Carbapenemase OXA pada *Klebsiella pneumoniae* telah tersebar di Turki, Timur Tengah, Afrika Utara, dan Eropa (Ma *et al.*, 2015). Menurut Evan and Amyes (2014) jenis OXA-24 non-nosokomial juga telah ditemukan diantara spesies *Acinetobacter*. Sementara itu, penyebaran OXA-23 terjadi secara global, dan lebih banyak ditemukan di Amerika Serikat dan Eropa. Kelompok lain, seperti OXA-58 telah menyebabkan munculnya beberapa wabah di seluruh dunia. Isolat pembawa gen OXA-48 merupakan salah satu produsen carbapenemase yang paling sulit untuk diidentifikasi, karena titik mutan mereka analog dengan *Extended-spectrum β -Lactamases* (ESBL). Oleh karena itu, tingkat prevalensi sebenarnya dari isolat tersebut menjadi sulit untuk diperkirakan (Nordmann *et al.*, 2011). Setelah melalui berbagai penelitian yang bertahun-tahun, ditemukan sebanyak 102 urutan OXA unik yang

teridentifikasi, dan 9 diantaranya merupakan perluasan spektrum β -laktamase, serta 37 diantaranya dianggap sebagai Carbapenemase (Queenan and Bush, 2007).

DETEKSI FENOTIP KEBERADAAN ENZIM CARBAPENEMASE

Modified Hodge Test (MHT) merupakan salah satu metoda uji fenotipik untuk mendeteksi aktivitas enzim carbapenemase dan sering digunakan pada Laboratorium Patologi Klinik. Walaupun direkomendasi oleh CLSI pada tahun 2009, namun uji ini tidak dapat digunakan untuk mendeteksi semua jenis Carbapenemase (CLSI, 2009). Bonnin *et al.* (2012) melakukan uji fenotip dengan menggunakan MHT pada 19 isolat *Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii* dan menemukan bahwa semua isolat tidak terdeteksi menghasilkan enzim yang dikode oleh gen NDM, tetapi positif untuk VIM, IMP, dan OXA-type. Hasil negatif untuk keberadaan carbapenemase pada medium *Mueller Hinton* tanpa kandungan seng (Zn), kemungkinan disebabkan oleh adanya pertukaran materi genetik diantara strain bakteri NDM-1 (Castanheira *et al.*, 2011 ; Girlich *et al.*, 2012).

Hasil dengan sensitivitas yang lebih tinggi dapat dilakukan dengan metode disk imipenem-EDTA, dan dengan metoda ini 95,7% spesies *Acinetobacter* dan 100% spesies *Pseudomonas* penghasil carbapenemase dapat dideteksi (Overturf, 2010 ; Queenan and Bush, 2007). Nordmann *et al.* (2011) menyatakan bahwa tidak ada tes atau uji penghambatan yang tersedia untuk mendeteksi aktivitas dari produk OXA-48 / OXA-181, karena EDTA yang dipakai dalam uji dapat menghambat beberapa bakteri, sehingga memberikan hasil positif palsu. Laporan *Public Health of England* (2014) menyebutkan bahwa resistensi terhadap salah satu obat Carbapenem dapat dikonfirmasi dengan menggunakan tes berbasis inhibitor. Untuk mendeteksi Carbapenemase dalam suatu komunitas bakteri sangat ditentukan oleh ketersediaan inhibitor β -laktamase.

Metode untuk uji fenotipik lain yang banyak dikenal adalah *Carba Nordmann-Poirel*

Test atau carba NP (Nordmann *et al.*, 2011). Metode ini digunakan untuk mendeteksi keberadaan atau aktivitas Carbapenemase pada *Enterobacteriaceae*. Uji ini mudah dilakukan, harganya terjangkau, dan dapat digunakan untuk tes klinis (CLSI, 2009). Tes ini dapat membantu untuk menghambat dan sebagai tindakan untuk membatasi penyebaran patogen penghasil carbapenemase di rumah sakit.

Test carba NP menunjukkan hasil 100% sensitif dan spesifik untuk *Enterobacteriaceae* (Nordmann *et al.*, 2012) dan 100% spesifik dan 94,4% sensitif untuk spesies *Pseudomonas* penghasil carbapenemase (Dortet *et al.*, 2012). Hasil sebaliknya ditunjukkan oleh penelitian Tijet *et al.* (2013) yang melaporkan bahwa sensitivitas tes Carba NP sangat rendah dan cenderung memberikan hasil negatif palsu pada isolat pembawa gen yang menyerupai gen OXA-48 pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacteriaceae*, dengan spesifisitas sebesar 80%. Studi lain melaporkan bahwa tes Carba NP, tidak dapat membedakan antar kelas carbapenemase, terutama aktivitas carbapenemase lemah dalam strain yang mengandung Carbapenemase jenis GES di daerah prevalensi tinggi (Dortet *et al.*, 2014). Metode deteksi fenotip dengan versi yang lebih baru untuk uji aktivitas semua jenis carbapenemase dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi pada spesies *Acinetobacter* adalah *CarbAcineto NP Test* (Dortet *et al.*, 2014; Hammoud *et al.*, 2014).

Tes biokimia untuk deteksi Carbapenemase yang baru-baru ini dikembangkan adalah Rapidec Carba NP. Metode ini telah terbukti memiliki kepekaan identik (96%) dengan uji Carba NP tetapi spesifisitasnya lebih rendah (93%) (Sakarikou *et al.*, 2017). Dibandingkan dengan uji Carba NP (CNP) dan uji Hodge yang dimodifikasi, Rapidec Carba NP memerlukan waktu yang lebih singkat dan lebih mudah dilakukan (Lifshitz *et al.*, 2016).

Metode lain untuk uji fenotipik terbaru adalah *Modified Carbapenem Inactivation Method* (MCIM) (CLSI, 2017). Prinsip dari metode ini adalah ketika 10 µg meropenem (MEM) disk diinkubasi selama 4 jam dalam

suspensi mikroorganisme (dalam medium *Tryptic Soy Broth* atau TSB) penghasil carbapenem, maka antibiotik MEM akan didegradasi oleh Carbapenemase yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut, sehingga aktivitasnya akan menurun pada mikroba uji. Hasil uji ini sangat mudah diinterpretasikan dan bahan-bahan yang digunakan tidak mahal serta tersedia di laboratorium-laboratorium klinis (Zwaluw *et al.*, 2014).

Metoda MCIM merupakan metode yang lebih akurat daripada metoda carba NP untuk mendeteksi CP-CRE, dengan sensitivitas yang sama atau lebih baik untuk mendeteksi keberadaan OXA-48 carbapenemase pada kelompok *Enterobacteriaceae* (Tijet *et al.*, 2016; Aktas *et al.*, 2016; CLSI, 2017). Namun, hasil yang berlawanan dilaporkan oleh Tamma *et al.* (2017) yang menemukan bahwa metoda MCIM memiliki tingkat deteksi yang lebih rendah daripada carba NP untuk mendeteksi Carbapenemase OXA-48.

Menurut Pierce *et al.* (2017) walaupun terdapat perbedaan hasil kepekaan dari metoda MCIM, namun metoda ini masih dapat dianggap sebagai metode yang sederhana, murah, dan akurat, sehingga dapat digunakan untuk identifikasi produksi carbapenemase pada *Enterobacteriaceae*. Dimasukkannya prosedur MCIM sebagai standar yang dikembangkan dari berbagai penelitian (dokumen CLSI M100) memberikan harapan potensial untuk memfasilitasi identifikasi CP-CRE di laboratorium klinis, yang pada akhirnya dapat membantu untuk memahami epidemiologi lokal yang disebabkan oleh patogen resisten terhadap Carbapenem.

DETEKSI SECARA GENOTIP

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik biologi molekuler untuk mengamplifikasi satu atau beberapa salinan DNA menjadi ribuan atau milyaran segmen DNA. PCR dikembangkan tahun 1984 oleh Kary Mullis dan sekarang berfungsi sebagai teknik yang digunakan pada bidang kedokteran dan penelitian laboratorium biologi. PCR merupakan teknik yang sederhana untuk

menghasilkan salinan fragmen DNA yang berjumlah tidak terbatas. Prinsip dasar dari PCR sangat sederhana, yaitu mereplikasi potongan atau fragmen DNA secara berantai, dari satu fragmen menjadi 2 salinan, kemudian menjadi 4, lalu 8 dan seterusnya. Tahap-tahap penting dalam PCR adalah denaturasi, annealing, dan ekstensi (Atawodi *et al.*, 2016). Metoda ini dapat dipakai untuk mendeteksi keberadaan gen penyandi enzim penghidrolisis carbapenem, dengan menggunakan primer-primer spesifik agar diperoleh fragmen DNA yang diinginkan dalam jumlah yang memadai, sehingga membentuk bands (pita) pada elektroforesis (Mohini and Deshpande, 2010).

KESIMPULAN

Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae (CRE) merupakan ancaman global karena tingginya angka kematian yang diakibatkan oleh bakteri tersebut. Oleh karena itu, diperlukan metoda-metoda yang dapat mendeteksi secara dini keberadaan CRE, yang meliputi uji fenotip dan genotip. Uji fenotip dapat dilakukan dengan *Modified Hodge Test* (MHT), *Carba Nordmann-Poirel* (Carba NP), dan *Modified Carbapenem Inactivation Method* (MCIM). Sementara itu, keberadaan gen penyandi enzim carbapenemase dapat dilakukan uji genotip dengan menggunakan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

DAFTAR PUSTAKA

- Aktas, E., G. Malkocoglu., B. Otlu., C.A. Copur., C. Kulah., F. Comert., C. Sandalli., N.C. Gursoy., D. Erdemir., M.E. Bulut. 2016. Evaluation of the carbapenem inactivation method for detection of carbapenemase producing Gram-negative bacteria in comparison with the RAPIDEC CARBA NP. *Microb Drug Resist.*
- Aziz, Z.S. 2015. Identification of *blaOXA-1* genes in *Klebsiella* isolated from urinary tract infections. *International Journal of Advanced Research.* 3(3): 947-950.
- Bedenic, B., V. Plecko., S. Sardelić., S. Uzunović., K.G. Torkar. 2014. Carbapenemases in Gram-negative bacteria: Laboratory detection and clinical significance. *BioMed Research International.* 841951.
- Bonnin, R.A., T. Naas., L. Poirel., P. Nordmann. 2012. Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*. *Journal Clinical Microbiology.* 50. 1419–1421.
- Bush, K. and J.F. Fisher. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 65. 455–478.
- Carrèr, A., L. Poirel., Y.M. Mesut., O.A. Akan., C. Feriha., G. Cuzon., G. Matar., P. Honderlick. P. Nordmann. 2010. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54. 1369–1373.
- Castanheira, M., L.M. Deshpande., D. Mathai., J.M. Bell., R.N. Jones. R.E. Mendes. 2011. Early dissemination of NDM-1 and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006–2007. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55. 1274–1278.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). 2017. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing, 27th ed. *CLSI supplement M100*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *Nineteenth Information Supplement (M100-S19)*. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
- Cuzon, G., T. Naas., H. Truong., M.V. Villegas., K.T. Wisell. Y. Carmeli. 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase *blaKPC-2* gene. *Emerging Infection Disease.* 16. 1349–1356.
- Dortet, L., L. Poirel., C. Errera., P. Nordmann. 2014. CarbAcineto NP Test for rapid detection of carbapenemase-producing

- Acinetobacter* spp. *Journal Clinical Microbiology*. 52: 2359–2364.
- Evans, B.A., and S.G. Amyes. 2014. OXA β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*. 27: 241–263.
- Gazin, M., F. Paasch., H. Goossens., and S. Malhotra-Kumar. 2012. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal Clinical Microbiology*. 50: 1140–1146.
- Giakkoupi, P., A. Xanthaki., M. Kanelopoulou., A. Vlahaki., V. Miriagou., S. Kontou., E. Papafragas., H. Malamou-Lada., L.S. Tzouveleki., N.J. Legakis. 2003. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *Journal Clinical Microbiology*. 41: 3893–3896.
- Girlich, D., L. Poirel., P. Nordmann. 2012. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal Clinical Microbiology*. 50: 477–479.
- Hammoud, D., C.A. Moubareck., D.K. Sarkis. 2014. How to detect carbapenemase producers: A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal Microbiology Methods*. 107: 106–118.
- Khan, A.U. and Nordmann, P. 2012. Spread of carbapenemase NDM-1 producers; The situation in India and what may be proposed. *Scand. J. Infect. Dis.*, 44: 531 – 535. doi:10.3109/00365548.2012.669046.
- Kenneley, Irena. 2013. A Microbial Overview of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *APIC*. 10(2) : 30-33.
- Lifshitz, Z., A. Adler., Y. Carmeli. 2016. Comparative Study of a Novel Biochemical Assay, the Rapidec Carba NP Test, for Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Journal Clinical Microbiology*. 54: 453–456.
- Ma, L., J.T. Wang., T.L. Wu., L.K. Siu., Y.C. Chuang., J.C. Lin., M.C. Lu., P.O. Lu. 2015. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS ONE*. 10: e0139152.
- Magiorakos, A.P., A. Srinivasan., R. B. Carey., Y. Carmeli., M. E. Falagas., C. G. Giske., S. Harbarth., J. F. Hindler., G. Kahlmeter., B. Olsson-Liljequist., D. L. Paterson., L. B. Rice., J. Stelling., M. J. Struelens, A. Vatopoulos., J. T. Weber and D. L. Monnet. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18: 268–281.
- Marsik, F.J., and S. Nambiar. 2011. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *Pediatr. Infection Disease Journal*. 30: 1094–1095.
- Mataseje, L.F., E. Bryce., D. Roscoe., D.A. Boyd., J. Embree., D. Gravel., K. Katz., P. Kibsey., M. Kuhn., A. Mouchili. 2012. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009–2010: Results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *Journal Antimicrob. Chemother*. 67: 1359–1367.
- Mathers, A.J., K.C. Hazen., J. Carroll., A.J. Yeh. H.L. Cox. R.A. Bonomo. C.D. Sifri. 2013. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: The “menace” arrives in the new world. *Journal Clinical Microbiology*. 51: 680–683.
- Meletis, G. 2016. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 3(1) 1521.
- Mohini, J., and M.S. Deshpande. 2010. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*. 1(5): 81-97
- Moquet, O., C. Bouchiat., A. Kinana., A. Seck., O. Arouna., R. Bercion., S. Breurec., B. Garin. 2011. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant

- enterobacteria, Senegal. *Emerging Infection Disease*. 17. 143–144.
- Munoz-Price, L.S., L. Poirel., R.A. Bonomo., M.J. Schwaber., G.L. Daikos. M. Cormican., G. Cornaglia., J. Garau., M. Gniadkowski., M.K. Hayden. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infection Disease*. 13. 785–796.
- Nordmann, P., G. Cuzon., T. Naas. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infection Disease*. 9. 228–233.
- Nordmann, P., L. Poirel., L. Dortet. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infection Disease*. 18. 1503–1507.
- Nordmann, P., T. Naas., L., Poirel. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Disease*. 17. 1791–1798.
- Odonkor, S.T. and K. E. Addo. 2011. Bacteria Resistance to Antibiotics: Recent Trends and Challenges. *Int J Biol Med Res*. 2(4): 1204 -1210.
- Overturf, G.D. 2010. Carbapenemases: A brief review for pediatric infectious disease specialists: Carbapenemases. *Pediatr. Infection Disease Journal*. 29. 68–70.
- Paton, R., R.S. Miles., J. Hood, J., S.G.B. Amyes. 1993. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal Antimicrob. Agents*. 2. 81–87.
- Peseky, M.W., Hussain, T., Wallace, M., Wang, B., Andleeb, S., Burnham, C.D., and Dantas, G. 2015. KPC and NDM-1 Genes in Related *Enterobacteriaceae* Strains and Plasmids from Pakistan and the United States. *Emerging Infectious Diseases*. 21(6): 1034 – 1037. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2106.141504>
- Perez, F., D. van Duin. 2013. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinical Journal Medical*. 80. 225–233.
- Pierce, V.M., P.J. Simner., D.R. Lonsway., D.E. Roe-Carpenter., J.K. Johnson., W.B. Brasso., A.M. Bobenchick., Z.C. Lockett., A. Chartnot-Katsikas., M.J. Ferraro., R.B. Thomson Jr., S.G. Jenkins., B.M. Limbago., and S. Das. 2017. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 55(8): 2321-2333.
- Pitout, J.D., G. Revathi., B.L. Chow. B. Kabera., S. Kariuki., P. Nordmann., L. Poirel. 2008. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clinical Microbiology Infection*. 14. 755–759.
- Poirel, L., C. Hombrouck-Alet., C. Freneaux., S. Bernabeu., P. Nordmann. 2010. Global spread of New Delhi metallo- β -lactamase 1. *Lancet Infection Disease*. 10. 832.
- Public Health England. 2014. UK Standards for Microbiology Investigations: Laboratory Detection and Reporting of Bacteria with Carbapenem-Hydrolysing β -Lactamases (Carbapenemases). *Public Health England*: London, UK.
- Queenan, A.M., K. Bush. 2007. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev*. 20. 440–458.
- Sakarikou, C., M. Ciotti., C. Dolfa., S. Angeletti. C. Favalli. 2017. Rapid detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains derived from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *BMC Microbiology*. 17. 54.
- Tamma, P.D., B.N.A. Opene., A. Gluck., K.K. Chambers., K.C. Carroll., P.J. Simner. 2017. A comparison of eleven phenotypic assays for the accurate detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal Clinical Microbiology*.
- Tijet, N., D. Boyd., S.N. Patel., M.R. Mulvey. R.G. Melano. 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 4578–4580.

- Tijet, N., S.N. Patel., R.G. Melano. 2016. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *Journal Antimicrob Chemother.* 71: 274–276.
- Woodford, N., J. Zhang., M. Warner., M.E. Kaufmann., J. Matos. A. MacDonald., D. Brudney., D. Sompolinsky., S. Navon-Venezia., D.M. Livermore. 2008. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *Journal Antimicrob. Chemother.* 62: 1261–1264.
- World Health Organization (WHO). 2014. Anti Microbial Resistant Global Report on Surveillance. *WHO Press* . 15-19.
- Zwaluw, V.D.K., A. de Haan., G.N. Pluister. H.J. Bootsma. A.J. de Neeling., L.M. Schouls. 2015. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenoty