

مقاله مروری

مروری بر روش‌های فنوتیپی تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از آنزیم کارباپنماز در باکتری‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۶

خلاصه

در سال‌های اخیر، عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مولد آنزیم‌های کارباپنماز به یکی از چالش‌ها و نگرانی‌های بهداشت جهانی تبدیل شده است. شناسایی سریع و دقیق باکتری‌های گرم منفی مولد آنزیم کارباپنماز می‌تواند در کنترل بیماری‌های عفونی و درمان به موقع آنها موثر واقع شود. طی سال‌های گذشته، تعداد فزاینده‌ای از روش‌های فنوتیپی برای تشخیص سریع فعالیت کارباپنماز باکتری‌های گرم منفی توسعه یافته است. با این حال، هیچ روش فنوتیپی واحدی برای شناسایی آنزیم‌های کارباپنماز که دارای حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ و حاوی همه ویژگی‌های آزمایش ایده آل باشد، وجود ندارد. انتخاب رویکرد انجام آزمایش مناسب به عوامل مختلفی نظیر وضعیت اپیدمیولوژیک، منابع آزمایشگاهی و در دسترس بودن سایر آزمایش‌های تأییدی بستگی دارد. مطابق با آنچه در این تحقیق بررسی شده است، تست‌های کاربرپسند، مقرون به صرفه، دقیق و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی بالینی وجود دارد. در این مقاله مروری، روش‌های فنوتیپی مختلف موجود برای تشخیص فعالیت کارباپنماز در باکتری‌های گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: کارباپنماز، انتروباکتریاسه، بتالاکتام، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پی‌نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مهرداد محمدی^{۱*}
معصومه بیگ^۲
کیمیا باریک‌رو^۳
سیما سلطانی^۴
لیلا علی‌نسب مالکی^۴
پارسا ویسی^۴
سمانه تیموری^۵

^۱گروه آموزشی میکروب شناسی و ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
^۲گروه میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
^۳دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران
^۴دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
^۵گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email:

mehrdad.mohammadi1984@gmail.com

مقدمه

کارباپنم‌ها آخرین ترکیبات موجود برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی در نظر گرفته می‌شوند. با این وجود در سال‌های اخیر افزایش عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد آنزیم کارباپنماز به یکی از معضلات مهم بهداشت جهانی تبدیل شده است.^(۱) از جمله مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر کارباپنم‌ها، تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کارباپنم‌ها همچون MBL^۱ و KPC^۲، حضور AmpCs بتالاکتاماز (کروموزومی یا اکتسابی) و بتالاکتامازهایی با طیف گسترده (ESBL)^۳ همراه با مکانیسم‌های دیگر مانند جهش‌های پورین، افزایش بیان سیستم‌های افلاکس پمپ یا تغییرات پروتئین‌های متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBPs)^۴ می‌باشند.^(۲) تولید آنزیم‌های کارباپنماز از جمله مهم‌ترین

مکانیسم‌های مقاومت به کارباپنم‌ها می‌باشند. بر اساس همولوژی اسیدهای آمینه، کارباپنمازها در کلاس‌های A ، B ، C و D طبقه بندی Ambler قرار می‌گیرند. بتالاکتامازهای کلاس A، C و D یک سرین بتالاکتاماز می‌باشند که در محل فعال آنزیمی آنها یک سرین حضور دارد، در حالی که بتالاکتامازهای کلاس B (به عنوان متالوبتالاکتاماز، MBL نیز نامیده می‌شوند) برای فعالیت آنزیمی خود به وجود روی نیازمندند. به دلیل قرار داشتن ژن‌های رمزکننده کارباپنماز که غالباً روی عناصر متحرک ژنتیکی مختلف می‌باشند، نوعی مقاومت پایدار و قابل انتقالی را ارائه می‌دهند که امکان انتشار از طریق گسترش کلونال و یا انتقال افقی ژن‌ها به باکتری‌های دیگر فراهم کرده که باعث گسترش مقاومت در میان باکتری‌های گرم منفی می‌شود (جدول ۱) (۳).

جدول ۱. کارباپنمازهای اصلی در انتروباکتریاسه

مهارکننده	پروفایل هیدرولیز انتروباکتریاسه				کارباپنماز	کلاس آمبر
	کارباپنم‌ها	مونوباکتام	سفالوسپورین نسل ۳ و ۴	سفالوسپورین نسل ۱ و ۲		
بوروونیک اسید	+	+ ^b	+	+ ^a	KPC, GES.	A
EDTA, DPA	+	-	+	+	IMP, VIM, SPM, NDM	B
بوروونیک اسید، کلوگراسیلین	W	-	+	+	CYM10	C
مهارکننده خاصی ندارد	+	+/-	- ^c	+	OXA48ها و واریانت‌ها	D

EDTA: اتیلن دی آمین تترا استیک اسید، DPA: اسید دی پیکولینیک، (w): فعالیت هیدرولیتیک ضعیف

(+): نشان دهنده هیدرولیز قابل تشخیص است. (-) هیدرولیز قابل تشخیص نیست.

a سفامایسین‌ها بسترهای ضعیفی برای بیشتر آنزیم‌های کلاس A هستند.

b بعضی از آنزیم‌های GES، آزترونام را هیدرولیز نمی‌کنند.

c برخی از آنزیم‌های OXA، سفالوسپورین‌های طیف گسترده را هیدرولیز می‌کنند.

ایالات متحده آمریکا و VIM اغلب در یونان یافت شده است. کارباپنمازهای نوع IMP در کشورهای آسیایی، به ویژه ژاپن و OXA-48 در برخی از کشورهای اروپای غربی، آفریقای شمالی و خاورمیانه شیوع بالایی داشته و همچنین ظهور NDM تأثیر چشمگیری در شبه قاره هند، بالکان و خاورمیانه داشته است.^(۴) در حال حاضر،

از طرف دیگر، باید اشاره کرد که برخی از گونه‌ها مانند *Stenotrophomonas maltophilia* حامل کارباپنمازهای رمزگذاری شده کروموزومی هستند که به باکتری‌های دیگر منتقل نمی‌شوند. اپیدمیولوژی CPE^۵ و انواع کارباپنمازهای درگیر، در میان کشورها متفاوت است. این در حالی است که KPC، کارباپنماز غالب جدا شده در

⁶ Verona Integron-Encoded Metallo-beta-lactamase

¹ metallo-β-actamase

² Klebsiella pneumoniae carbapenemase

³ extended spectrum beta-lactamase

⁴ Penicillin-binding proteins

⁵ Carbapenemase-producing Enterobacterales

هوج اصلاح شده (MHT)، E test، و روش غیرفعال سازی کارباپنم (CIM)، سنجش‌های ایمونوکروماتوژن، روش‌های هیدرولیز کارباپنم یونیزاسیون لیزر با استفاده از لیزر ماتریس زمان طیف سنجی پرواز (MALDI-TOF MS³) در دسترس بوده است. عملکرد این آزمایش‌ها، بسته به آنزیم کارباپنماز و گونه‌ی باکتری مقاوم، بطور قابل توجهی متفاوت می‌باشد. آزمایش‌های رنگ سنجی، مانند RAPIDEC CARBA NP یا β -CARBA، جزو روش‌های با حساسیت بالا برای تشخیص جدایه تولید بتالاکتاماز هستند. روش غیر فعال سازی کارباپنم (CIM) یا نسخه اصلاح شده آن (mCIM) برای یک نتیجه قطعی نیاز به کشت مجدد جدایه باکتری مد نظر دارند. (۹) بنابراین تشخیص مطمئن و سریع جدایه‌های مولد کارباپنماز توسط آزمایش‌های روتین میکروبیولوژی برای انتخاب گزینه درمانی ضد میکروبی مناسب و معرفی اقدامات کنترل عفونت بیمارستانی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برخی آزمایش‌های فنوتیپی با استفاده از آزمون‌های هم‌افزایی دو دیسک (DDST^۴) با استفاده از مهار کننده‌های خاص بتالاکتاماز، محیط کشت کروموژنیک، سنجش‌های فعالیت هیدرولیز کارباپنم (تغییر PH، طیف‌سنجی یا آزمایش‌های الکتروشیمیایی) یا سنجش‌های ایمونوکروماتوگرافی انجام می‌شود. به طور کلی، در مراکز بدون سابقه قبلی CPE، روش‌های بسیار حساس ولی در شرایط شیوع یا بومی، روش‌های تشخیصی سریع انتخاب می‌شوند. (۱۰) هدف از این مطالعه، بررسی مروری روش‌های فنوتیپی مختلف موجود برای تشخیصی باکتری‌های گرم منفی مولد کارباپنماز می‌باشد.

بررسی اجمالی روش‌های فنوتیپی

روش‌های فنوتیپی مختلفی برای تشخیص باکتری‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز در دسترس هستند. روش‌های فنوتیپی

کشورهای اروپای شمالی مانند هلند یا کشورهای اسکاندیناوی میزان شیوع کمتری برای انواع کارباپنمازها گزارش داده‌اند. میزان حساسیت به کارباپنم‌ها ممکن است به طور قابل توجهی در جدایه‌های مولد کارباپنماز متفاوت باشد. برخی از باکتری‌های مولد آنزیم‌های کارباپنمازی، کارباپنم‌ها را بسیار موثر هیدرولیز می‌کنند، در حالی که برخی دیگر فعالیت ضعیفی علیه آنها نشان می‌دهند، بنابراین طیف متغیر هیدرولیز کارباپنم توسط آنزیم‌های کارباپنماز، مانع شناسایی دقیق آن‌ها می‌شود (۵).

شناسایی سریع باکتری‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز، برای انتخاب الگوی درمان آنتی‌بیوتیکی و به حداقل رساندن شیوع آن‌ها یک مسئله ضروری می‌باشد. برای تشخیص و یا حضور کارباپنمازها میتوان از روش‌های فنوتیپی یا مولکولی استفاده کرد. با وجود اینکه از نظر برخی محققین شناسایی مولکولی جدایه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز، روش استاندارد است، اما به دلایل هزینه‌ی بالا، نیازمندی به تجهیزات پیشرفته آزمایشگاهی و نیروی متخصص، روش مولکولی برای آزمایش روزانه در بسیاری از آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی بالینی مناسب نمی‌باشد. (۶) علاوه بر این، با استفاده از روش‌های مولکولی شناسایی CPE، فقط ژن‌های خاصی مورد بررسی قرار گرفته شده و کارباپنمازهای جدید شناسایی نمی‌شوند. بنابراین، منطقی است که روش‌های فنوتیپی را به عنوان روش‌های مرجع و قابل اعتماد جهت شناسایی انواع مختلفی از آنزیم‌های کارباپنماز در نظر بگیریم. (۷) طی سال‌های گذشته، چندین روش فنوتیپی با هدف تشخیص جدایه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز شناسایی شده است. اساس این روش‌ها مهار کارباپنمازها توسط مهارکننده‌های خاص یا هیدرولیز کارباپنم است. روش تشخیصی مورد استفاده به شیوع و اپیدمیولوژی جدایه‌های تولید کننده کارباپنماز و منابع آزمایشگاهی موجود بستگی دارد. (۸)

طی دهه گذشته، تعدادی از روش‌های فنوتیپی از جمله روش‌های سریع مبتنی بر رنگ سنجی (نسخه‌های دستی و تجاری Carba NP)، روش‌های مبتنی بر رشد آزمون

¹ Modified Hodge test

² Carbapenem Inactivation Method

³ Matrix-Assisted Laser Desorption - Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry

⁴ Modified Carbapenem Inactivation Method

⁵ Double Disc Synergy Test

شناسایی کند، اما امکان تمایز سرین و متالوکارباپنماز را به موازات افزودن شلاته کننده کاتیونی دو ظرفیتی مانند EDTA-mCIM (eCIM) را فراهم می‌کند. بعنوان یک رویکرد برای شناسایی گروه خاص کارباپنماز، سنجش‌های ایمنی جریان جانبی چندگانه (LFIA) حتی در صورت وجود همزمان چندین کارباپنماز در حال تولید، به طور ویژه ای مد نظر هستند. روش‌های مبتنی بر بازدارنده، روش‌های فنوتیپی جایگزینی هستند که می‌توانند با استفاده از مهارکننده‌های خاص، برای تمایز بین کارباپنمازها مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال، MBL Etest و آزمایش دیسک^۲ EDTA ترکیبی به کاهش فعالیت MBL در نتیجه اتصال EDTA به روی بستگی دارند. اگرچه MALDI-TOF MS برای شناسایی جنس و گونه‌های باکتریایی و قارچی، معمولاً توسط آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی استفاده می‌شود ولی نقش آن در تشخیص آنزیم‌های کارباپنماز در حال بررسی است (۱۵). تمامی ویژگی‌ها، مزایا و معایب هر یک از این روش‌های فنوتیپی برای تشخیص کارباپنماز در زیر شرح داده شده است.

روش‌های آزمایشی فنوتیپی:

۱) شناسایی کارباپنماز توسط روش‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی

هرچند روش‌های فنوتیپی مختلفی جهت شناسایی پاتوژن‌های گرم منفی مولد آنزیم‌های کارباپنماز وجود دارند، با این حال اولین گام تشخیص سریع باکتری‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز، به کارگیری روش‌های تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشد. این روش‌ها شامل انتشار دیسک آنتی‌بیوتیک (دیسک دیفیوژن)، تعیین حداقل غلظت مهار (MIC)^۳ به روش‌های میکروبراث دایلوژن، رقت سازی در آگار (آگار دایلوژن) و E-test، و چندین سیستم خودکار تجاری همچون سیستم‌های VITEK،

که در حال حاضر در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی استفاده می‌شوند، شامل موارد زیر می‌باشد: (الف) روش‌های مبتنی بر رشد که مقاومت را بر اساس رشد در حضور یک آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری می‌کنند. (به عنوان مثال، تست هوچ اصلاح شده (MHT) و روش غیرفعال سازی کارباپنم اصلاح شده (mCIM)؛ (ب) روش‌های هیدرولیزی، محصول هیدرولیز شده را که توسط آنزیم‌های کارباپنماز کاتالیز می‌شود، تشخیص می‌دهند. به عنوان مثال، Carba NP و زمان یونیزاسیون لیزر به کمک ماتریس روش طیف سنجی جرمی پرواز روش‌های (MALDI-TOF MS)؛ و (ج) سنجش‌های ایمنی جریان جانبی که با استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص، آنزیم‌های کارباپنماز را تشخیص می‌دهند (۱۱). انتخاب یک آزمایش تشخیص کارباپنماز به عوامل مختلفی، از جمله شیوع منطقه‌ای کارباپنماز، اپیدمیولوژی مولکولی منطقه‌ای، ویژگی‌های عملکرد تشخیصی، شدت کار، هزینه و مدت زمان تست بستگی دارد (۱۲). مدت زمان تست هم برای تصمیم‌گیری درمانی و هم برای کنترل عفونت مهم می‌باشد (۱۳).

ملاحظات دیگر شامل باکتری‌هایی که باید آزمایش شوند، (به عنوان مثال، اتروباکتریاسه و یا باکتری گرم منفی غیر تخمیرکننده گلوکز)، سهولت استفاده، گردش کار، وضعیت نظارتی، تجهیزات لازم و نیازهای آماده سازی معرف می‌باشد. متأسفانه، هیچ سنجشی در حال حاضر که مشخصات کلی معیارهای ذکر شده را داشته باشد در دسترس نیست. آزمایش‌های فنوتیپی متداول و مورد استفاده در آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی شامل MHT، آزمایش Carba NP و انواع مختلف آن و اخیراً mCIM می‌باشد. این آزمایش‌ها تولید کارباپنماز را در اشکال سنتی شناسایی می‌کنند و فاقد راهنمایی در مورد کارباپنماز خاص تولید شده هستند. برخی از اصلاحات در این روش‌ها می‌تواند در مورد گروه‌های خاص کارباپنماز تولید شده اطلاعات بیشتری ارائه دهد (۱۴). به عنوان مثال، اگرچه mCIM نمی‌تواند نوع کلاس کارباپنماز را

^۱ lateral flow immunoassay

^۲ Ethylenediamine tetraacetic acid

^۳ minimum inhibitory concentration

شناسایی جدایه‌های مولد KPC حساس به MEM را دارند. سیستم VITEK در سال ۱۹۸۰ معرفی گردید که به صورت خودکار تشخیص سریع حساسیت ضد میکروبی کوکسی گرم مثبت و باسیل گرم منفی را در مدت ۳ ساعت امکان پذیر می‌سازد (۱۹). در سال ۱۹۹۹ سیستم VITEKII معرفی گردید. این سیستم قادر به تشخیص مقاومت به چندین عامل ضد میکروبی بوده و می‌تواند با کارایی بالایی در مقایسه با روش‌های آگار دایلوژن و E-TEST^۶، جدایه‌هایی با مقاومت کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباینامز را تشخیص دهد. سیستم خودکار Phoenix جهت شناسایی سریع باکتری‌ها در سطح گونه و تعیین حساسیت ضد میکروبی جدایه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. میزان MIC برای MEM توسط سیستم VITEKII و ETP در ترکیب با IMP و یا MEM توسط سیستم Phoenix، ۲ میکروگرم/میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین جهت تعیین حساسیت جدایه‌های بالینی نسبت به IMP از سیستم خودکار MicroScan استفاده می‌شود. تمامی آزمایش‌های تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باید با روش‌های اختصاصی تایید شوند (۲۰).

۲) شناسایی کارباینامز توسط روش‌های مبتنی بر کشت

۲-۱- روش‌های پلیت کروموژنیک

در حال حاضر محیط‌های غربالی که توانایی شناسایی انواع کارباینامز با حساسیت و اختصاصیت بالا داشته باشد، وجود ندارد. شناسایی سریع باکتری‌های مولد کارباینامز برای مدیریت موثر، کنترل عفونت و بنابراین جلوگیری از شیوع عفونت‌های بیمارستانی توسط این باکتری‌ها ضروری می‌باشد. چندین محیط کشت جهت شناسایی جدایه‌های مولد آنزیم کارباینامز مانند محیط‌های کشت شامل TSA^۷ یا مک کانکی حاوی ۱۰ میکروگرم کارباینامز و محیط‌های کشت کروموژنیک وجود دارند (۲۱). در حال حاضر روش

سیستم میکروب‌شناسی خودکار Phoenix MicroScan و سیستم‌های BD Diagnostics، Microscan WalkAway می‌باشند (۱۶). دستیابی دقیق به نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی به داروهای کارباینامز به کمک روش‌های تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، اغلب در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی چالش برانگیز است. مطابق با دستورالعمل CLSI^۱ نقطه انفصال (breakpoints) برای آنتی‌بیوتیک ایمپنم (IMP) در ≥ 4 میلی‌گرم/میلی لیتر مقاوم، و برای مروپنم و ارتاپنم (ETP) به ترتیب در ≤ 1 و ≤ 0.5 میلی‌گرم/لیتر حساس می‌باشد (۱۷). روش MIC به تنهایی برای تشخیص جدایه‌های مولد آنزیم کارباینامز اختصاصیتی ندارد. مطابق با CLSI روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوژن جهت شناسایی جدایه‌های مولد آنزیم کارباینامز روش‌های مطمئن می‌باشند و زمان انکوباسیون برای روش‌های مذکور ۲۴-۱۸ ساعت می‌باشد. مطابق با دستورالعمل CLSI، میزان MIC^۳ برای MEM^۵، IMP^۴ و ETP در *انتروباکتریاسه* به ترتیب ۲-۴، ۲-۴ و ۲ میکروگرم/میلی لیتر است. قطر هاله‌ی عدم رشد به روش دیسک دیفیوژن برای ETP و MEM ≤ 21 میلی‌متر می‌باشد. این روش‌های فنوتیپی تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باید توسط روش‌های اختصاصی تایید شوند (۱۸).

به دلیل سهولت در انجام کار و کارایی بالا از سیستم‌های خودکار همچون VITEK و Phoenix به صورت گسترده‌ای در مراکز درمانی و آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی استفاده می‌شود. سیستم‌های خودکار به طور معمول از کدورت سنجی و یا فلورسنت استفاده می‌کنند، هرچند که برای تشخیص آنزیم KPC اختصاصی نیستند، با این حال بسیاری از سیستم‌های خودکار توانایی

¹ Clinical and Laboratory Standards Institute

² ertapenem

³ Minimal inhibitory concentration

⁴ imipenem

⁵ Meropenem

⁶ Epsilonometer test

⁷ Trypticase soy agar

اجازه رشد جدایه‌های مقاوم به کارباپنم (۹۲٪) می‌دهد و رشد جدایه‌های حساس به کارباپنم (۸۵٪) را مهار می‌کند. این محیط کشت برای شناسایی جدایه‌های مولد MBL و KPC روشی مناسب، راحت و حساس بوده و می‌تواند در مدت زمان کوتاهی جدایه‌های مولد کارباپنماز را شناسایی کند (۲۴). چندین مطالعه جهت ارزیابی محیط‌های مختلف کروموژنیک انجام شده است که این محیط‌ها اختصاصیت قابل قبولی جهت شناسایی باکتری‌های مولد کارباپنماز دارند، اما دارای حساسیت‌های مختلف (۵۳-۱۰۰٪) می‌باشند. اخیراً محیط‌های جدید برای شناسایی جدایه‌های مولد کارباپنماز با حساسیت بالا گسترش یافته‌اند (۲۵). از جمله مزایای این محیط‌های کشت، به کارگیری راحت برای استفاده روزمره در آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی بالینی می‌باشد. از جمله معایب به کارگیری محیط‌های کشت کروموژنیک، دشواری تفسیر برخی از این محیط‌ها به دلیل تولید چندین رنگ پس از انکوباسیون، ماندگاری کوتاه اکثر این محیط‌ها، افزایش هزینه به دلیل استفاده از ترکیب دو محیط کروموژن برای افزایش حساسیت می‌باشد. همچنین اگر یک مرحله غنی‌سازی برای تقویت رشد باکتری‌ها، قبل از کشت مجدد بر روی محیط کروموژنیک انجام شود زمان گزارش نهایی تا ۴۸ ساعت افزایش می‌یابد، از طرفی در جدایه‌هایی که حاوی ESBL یا دارای بیان بیش از حد AmpC به همراه نقص پورین‌های غشا خارجی بوده، نتایج مثبت کاذب گزارش شده است. بنابراین، بهبود اغلب محیط‌های کروموژنیک برای تشخیص قابل اعتماد انواع جدایه‌های مولد کارباپنماز مورد نیاز می‌باشد. بعلاوه پیشنهاد شده است که برای تشخیص احتمالی جدایه‌های مولد کارباپنماز یک صفحه دیسک کارباپنم به صفحه انتخابی ESBL اضافه شود. این روش به ویژه برای تشخیص آنزیم‌های OXA-48 و GES-6 در میان *Enterobacteriaceae* که رشد آنها در محیط‌های خاص کارباپنماز پشتیبانی نشده، دارای ارزش می‌باشد (۲۶).

استاندارد برای شناسایی جدایه‌های مولد کارباپنماز، کشت سواب نمونه‌های اطراف مقعد و یا نمونه رکتال بر روی محیط‌های افتراقی و انتخابی همچون مک کانگی آگار می‌باشد. روش شناسایی پلیت کروموژنیک به ویژه برای غربالگری مستقیم ناقلین بدون علامت مفید است. پلیت‌های کروموژنیک شناسایی باکتری‌های مولد کارباپنماز را در مدت ۱۸-۲۴ ساعت فراهم می‌کنند. محیط کشت کروموژنیک غربالگری که قادر به شناسایی انواع کارباپنماز با حساسیت و اختصاصیت بالا باشد، وجود ندارد (۲۲). در سال‌های اخیر، محیط‌های کروموژنیک متنوع همچون ChromID ESBL, ChromID™ CARBA, OXA48 (bioMerieux), CARBA SMART, Colorex KPC, Brilliance™ CRE Remel Spectra™, CHROMagar KPC RambaCHROM KPRO, CRE (Remel) (Gibson Biobson) CRE تجاری شده‌اند. محیط CHROMagar KPC معرفی شده‌اند که برای غربالگری جدایه‌هایی با سطح مقاومت بالا به کارباپنم (< ۱۶ میکروگرم/میلی لیتر) استفاده می‌شوند و برای شناسایی جدایه‌هایی با سطح مقاومت پایین به کارباپنم حساسیت کمتری دارند. این محیط‌ها بدون نیاز به کشت مجدد، تشخیص جدایه‌های مقاوم به ارتاپنم و حساس به دیگر کارباپنم‌ها را امکان می‌سازند (۲۳).

محیط کشت ChromID CARBA محیط کشت غنی شده با عوامل اختصاصی جهت مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های کارباپنماز منفی می‌باشد که با حساسیت و اختصاصیت بالا برای شناسایی جدایه‌های مولد کارباپنماز مورد استفاده قرار می‌گیرد. ارزیابی مقایسه‌ای محیط ChromID CARBA با محیط SUPERCARBA حساسیت بالای محیط SUPERCARBA برای شناسایی OXA 48 (۹۱-۹۳٪) در مقایسه با محیط ChromID CARBA (۲۱٪) را نشان می‌دهد. محیط Brilliance™ CRE Agar یک محیط انتخابی غنی شده با کارباپنم،

۳) روش‌های مبتنی بر مهار کننده‌ها

آزمایشات مبتنی بر بازدارنده به توانایی برخی از ترکیبات برای مهار فعالیت آنزیم‌های کاربایناماز مانند اسید اتیلن دی آمین تترا استیک (EDTA)، اسید دی پیکولینیک (DPA) یا اسید فنیل بوریک (PBA) متکی هستند. EDTA و DPA (عوامل شلاته کننده) سبب مهار فعالیت آنزیمی MBL و همچنین PBA باعث مهار آنزیم KPC می‌شوند. با توجه به اینکه PBA باعث مهار سایر بتالاکتامازها مانند AmpC بتالاکتاماز می‌شود، از کلوکساسیلین (یک مهار کننده AmpC بدون فعالیت علیه KPC و سایر کارباینامازهای کلاس A) نیز برای تمایز AmpC از تولید KPC استفاده می‌شود (۲۷). پورناراس و همکاران دریافتند که با استفاده همزمان از EDTA و PBA در یک دیسک، می‌توان سویه‌هایی را که همزمان مولد MBL و KPC هستند، شناسایی کرد (۲۸). در این زمینه، میریاگو و همکاران با دیسک‌های حاوی PBA و DPA (به جای EDTA) سویه‌های مولد KPC و VIM را شناسایی کردند. علاوه بر این، یک دیسک تموسیلین به عنوان نشانگر جایگزین OXA-48 و انواع عملکردی مرتبط با آن ارائه شده است (۲۵). مقاومت به تموسیلین را می‌توان در میان باکتری‌های مولد MBL و توسط باکتری‌هایی که KPC بیان می‌کنند یا حتی فاقد هرگونه کاربایناماز هستند، مشاهده کرد. همانطور که تولید آنزیم OXA-48 مقاومت بالایی را به ترکیبات تموسیلین می‌دهد، بیانگر عدم هم افزایی PBA یا DPA می‌باشد. همچنین یک منطقه مهار کننده تموسیلین ۱۰ میلی متر (عدم وجود منطقه مهار) یا MIC 128 میلی گرم در لیتر مشکوک به تولید کننده‌های OXA-48 هستند. لازم به ذکر است که مقاومت به تموسیلین به عنوان تنها نشانگر تشخیصی تولید کنندگان OXA-48 نبوده به طوری که همیشه باید برای تشخیص آنزیم OXA-48 همراه با نشانگرهای دیگر استفاده شود. برخی از نویسندگان پیشنهاد

کرده‌اند که دیسک تموسیلین با آویکتام (یک مهار کننده غیر بتالاکتاماز کلاس A، C و برخی از کارباینامازهای D) برای تشخیص بهتر آنزیم‌های OXA-48 همراه شود. همانطور که اشاره شد، همچنین می‌توان از پیراسیلین-تازوباکتام در ترکیب با تموسیلین برای شناسایی تولید کنندگان OXA-48 استفاده کرد. سنجش‌های مبتنی بر مهار کننده نه تنها شواهدی از تولید کاربایناماز ارائه می‌دهند، بلکه امکان ایجاد تمایز بین کلاس‌های مختلف کاربایناماز را نیز فراهم می‌کنند. همچنین، گزارش شده که به دلیل پدیده سوآرمنینگ، تفسیر نتایج در پروتئوس و باکتری‌های مرتبط مشکل ساز است (۲۹).

۳-۱-۱-۳- نوار: Etest

۳-۱-۱-۳-۱- نوارهای انتشار شیب دار

چندین قالب نوار انتشار شیب دار برای تشخیص کارباینامازها، به ویژه MBL ها طراحی شده است. روش ETEST-MBL جهت شناسایی جدایه‌ها با مقاومت بالا به ایمی پنم می‌باشد. این روش بر اساس ترکیبی از یک بستر بتالاکتام و یک مهار کننده بتالاکتام/بتالاکتاماز (EDTA برای MBL یا بورونیک اسید برای KPC) است و به طور جداگانه MBL و KPC را تشخیص می‌دهد. نوارهای IPI / MBL IP / Etest® () bioMerieux) حاوی دو طرف، با هفت رقت ایمی پنم (۲۵۶-۴ میکروگرم در میلی لیتر) و ایمی پنم (۶۴-۱ میکروگرم در میلی لیتر) همراه با غلظت ثابت EDTA است. نوارهای MBL MP / MPI، (bioMerieux) France شامل غلظت افزایشی مروپنم (۸-۱۲۵، میکرو گرم در میلی لیتر) در یک طرف و مروپنم (۲-۰،۳۲، میکروگرم / میلی لیتر) با EDTA (غلظت ثابت) در طرف دیگر است. MIC هر دو طرف نوار پس از انکوباسیون به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد خوانده می‌شود. به دنبال دستورالعمل‌های سازنده، کاهش ۳ رقت دو برابری MIC کارباینام در حضور بازدارنده یا وجود یک بیضوی تغییر شکل یافته در سمت نوار IPI یا MPI برای MBL مثبت

¹ Dipicolinic acid

² Phenylboronic acid

Enterobacteriaceae مولد کاربامپناز خصوصاً برای تشخیص کاربامپناز کلاس A توسط این روش، حساسیت (۹۰-۱۰۰٪) و اختصاصیت (۹۶-۱۰۰٪) نشان داده‌اند. نتایج مشابهی توسط مطالعات دیگر با حساسیت ۹۲٫۱٪ و اختصاصیت ۸۲٫۵٪ با استفاده از کیت KPC + pMBL، یافت شده است (۳۰).

۳-۱-۳- آزمایش مکانیسم چند دیسک و آزمایش‌های هم افزایی دیسک ترکیبی (DDSTs)

آزمایش هم افزایی دیسک ترکیبی، روش فوتویی است که می‌تواند بین برخی از انواع کاربامپنازها تفاوت ایجاد کند. اساس این روش‌ها، هم‌افزایی بین مهارکننده‌های بتالاکتاماز و کاربامپنازها می‌باشد. این مهارکننده‌ها شامل اسیدهای بورونیک مهارکننده KPC، اسید دیپیکولینیک (DPA) یا اسید ایتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک (EDTA) مهارکننده MBL، کلانولانات مهارکننده ESBL، کلوکساسیلین مهارکننده AmpC و آویاکتام (NXL104) مهارکننده OXA-48 هستند. تعدادی آزمایش چند دیسک فوتویی برای شناسایی و تمایز انواع مختلف کاربامپنازها مانند دیسک‌های تشخیص ترکیبی بازدارنده Mastdiscs ID Mast (MDI)، تجاری‌سازی شده‌است. این روش توسط Mast Diagnostics برای شناسایی کاربامپنازها بر اساس محاسبه ساده منطقه مهار دیسک‌های ترکیبی، با ترکیب مهارکننده‌های آنزیم خاص، توسعه یافته است. در مطالعه‌ای، این روش قدرت تشخیص خوبی در تشخیص KPC و MBL در میان *K. pneumoniae* نشان داد، اما قادر به تشخیص ژن‌های OXA-48 و ژن‌های مختلف MBL مانند NDM، VIM و IMP نبود. اخیراً، یک آزمایش فوتویی جدید، تست دیسک OXA-48، برای تمایز کاربامپناز OXA-48 از دیگر کلاس‌های کاربامپناز، ارائه شده‌است. این تست عملکرد بسیار خوبی برای تشخیص OXA-48 با حساسیت ۹۶/۳٪ دارد. آزمایش‌های هم‌افزایی دیسک ترکیبی به دلیل سادگی و

تفسیر می‌شود. نوارهای حاوی مروپنم در تشخیص تولیدکنندگان MBL کارآیی بیشتری نسبت به نوارهای حاوی ایمپنم دارند. داده‌های منتشر شده ارزیابی نوارهای انتشار شیب با میزان حساسیت و اختصاصیت بالا در تشخیص MBL، به ترتیب (۸۲-۹۴٪) و (۹۷-۱۰۰٪) نشان داده‌اند. با این حال، مطالعات بیشتری لازم است تا کارآیی آن تأیید شود. این روش هزینه بالایی داشته و برای شناسایی جدایه‌های مولد آنزیم MBL حساس به کاربامپنم (MIC ۴) حساسیت ندارد. به دلیل وجود نقایص این تست برخی از آزمایشگاه‌های میکروبی‌شناسی بالینی از روش‌های جایگزین مانند آزمایش‌های دیسک ترکیبی (CDT) و هم افزایی دیسک ترکیبی (DDSTs) استفاده می‌کنند. (۲۸)

۳-۱-۲- تست دیسک ترکیبی (CDT)

اساس این تست مهار آنزیم‌های MBL توسط DPA و یا EDTA می‌باشد که منجر به تفاوت در قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌های کاربامپنم با یا بدون مهارکننده می‌شود. به دلیل هزینه پایین و سهولت انجام برای شناسایی سریع جدایه‌های *انتروباکتریاسه* و *سودوموناس آئروژینوزا* مولد آنزیم‌های MBL به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. آزمون دیسک ترکیبی (CDT) تفاوت بین قطر منطقه مهار دیسک کاربامپنم (در بیشتر شرایط مروپنم یا ایمپنم) در مقایسه با منطقه مهار تولید شده توسط یک دیسک حاوی ترکیبی از کاربامپنم و یک مهارکننده می‌باشد. پس از انکوباسیون شبانه سویه آزمایش شده بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری می‌شود. در حال حاضر برخی از آزمایش‌های دیسک ترکیبی مانند کیت تأییدی KPC + pMBL (Rosco Diagnostica) یا مجموعه دیسک تشخیص کاربامپناز MASTDISCS (MAST Diagnostics) تجاری شده‌اند. معیارهای مختلف تفسیر قطر منطقه توسط تولیدکنندگان مختلف استاندارد شده‌اند که به نوع کاربامپناز و روش در نظر گرفته شده مربوط می‌شوند. مطالعات انجام شده برای شناسایی

² double-disk synergy tests

¹ Combination disc test

اخیراً آزمون ید نشاسته بر اساس هیدرولیز کارباینام تجاری شده است. به طور خلاصه این تست شامل نوارهای آغشته به ایمی پنم و نشاسته است که با سویی مورد مطالعه تلقیح شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و در مرحله ی بعد یک محلول ید اضافه شده و می توان نتایج را پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق گزارش کرد. تغییر رنگ از تاریکی به روشنی و وضوح، نشان دهنده ی وجود کاربایناماز است. Della valle و همکاران حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ در شناسایی انتروباکتریاسه های مولد کاربایناماز را گزارش کرده اند. با این وجود، مطالعاتی جهت ارزیابی کاربرد این تست در تشخیص انواع کاربایناماز نیاز است (۳۳).

۶) روش های رنگ سنجی

روش های رنگ سنجی بر اساس هیدرولیز آنزیمی حلقه ی بتالاکتام در حضور فعالیت کاربایناماز می باشد که منجر به کاهش PH و متعاقباً تغییر رنگ نشانگر PH (فنول رد برای CARBANP، یا برموتیمول بلو برای BLU-CARBA) می شود. از مهمترین مزایای این روش دستیابی سریع به نتایج (کمتر از ۲ ساعت)، سادگی و کاربرد راحت است. علاوه بر این در مطالعه ای Dortet و همکاران امکان کاربرد روش CarbanP به صورت مستقیم از کشت های خون را توصیف کردند. در مقابل، گاهی به دلیل مشهود نبودن تغییر رنگ برای تمایز به برخی از تجربیات در خواندن و تفسیر نتایج نیاز است. اخیراً این تست ها به صورت تجاری تحت عنوان RAPIDIC CARBANP, NEO-RAPIDCARB Rapid CARB Screen, RAPIDCARBBLU KIT نامگذاری شده اند (۳۴).

۶-۱- آزمون Crba NP و انواع آن

در دهه های گذشته تعدادی روش مبتنی بر فنوتیپ توسعه یافته که در این میان آزمایش Carba NP (CNPt) یک روش رنگ سنجی محبوب و ساده با زمان آزمایش کوتاه (۲ ساعت) است. با استفاده از فنل رد به عنوان نشانگر pH فعالیت های آنزیمی را مستقیماً تشخیص می دهد. هنگامی که ایمی پنم توسط کاربایناماز هیدرولیز

هزینه پایین بسیار مورد استفاده قرار گرفته و دارای حساسیت متغیر ۹۰-۱۰۰٪ هستند (۳۰, ۳۱).

۴) روش های مبتنی بر هیدرولیز کارباینام ۴-۱- آزمایش هوچ تغییر یافته (MHT)

یک آزمایش فنوتیپی ساده برای تشخیص آنزیم های کاربایناماز در میان جدایه های انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا می باشد. این آزمایش به توانایی سویی تولید کننده کاربایناماز در کاهش غلظت کارباینام و امکان رشد یک سویی اشیریشیاکلی حساس به کارباینام بستگی دارد. MHT توسط CLSI از سال ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۷ به عنوان یک آزمایش تأیید کننده برای کارباینامازها توصیه شده است و قابلیت تشخیص تولید کنندگان KPC را دارد. به همین دلیل از آن در بسیاری از آزمایشگاه های میکروبی شناسی بالینی استفاده می شود. همچنین از نظر تشخیص انواع دیگر کارباینامازها از جمله VIM، IMP و OXA-48 حساسیت خوبی برخوردار هستند (۳۲). با این حال، MHT دارای حساسیت کم به سایر کارباینامازها مانند NDM، MBL، برخی از انواع OXA و SME می باشد. علاوه بر این، MHT در شناسایی برخی از جدایه های مولد AmpC همراه با جهش های پورین، نتایج مثبت کاذب دارد. می توان این تست را بدون نیاز به ماده خاصی، مطابق با دستورالعمل CLSI به راحتی انجام داد. با این حال، روش MHT معایب عمده ای دارد از جمله عدم ایجاد تفاوت بین انواع کاربایناماز، دشوار و زمان بر بودن تفسیر نتایج و نیاز زمانی حداقل به ۴۸-۲۴ ساعت، فاقد اختصاصیت (نتایج مثبت کاذب برای تولید کنندگان سطح بالا AmpC یا تولید کنندگان ESBL از نوع CTX-M و هم در گونه های *Enterobacter* گزارش شده) و هم حساسیت (تشخیص ضعیف آنزیم های NDM) می باشد. بنابراین توصیه می شود، نتایج مثبت یا مبهم، به ویژه در مناطقی که جدایه های مولد ESBL شیوع دارد، توسط آزمایش های جایگزین تأیید شوند (۸).

۵) سنجش ید نشاسته

¹ Hodge Modified Test

به ۷۱٪ افزایش یافته و دریافتند که جدایه‌های موکونیدی مستعد نتایج منفی کاذب هستند. آزمایش Carba NP II برای شناسایی تولید کارباپنماز و همچنین برای تمایز کلاس‌های کارباپنماز ایجاد شد. این روش وابسته به تغییرات pH ناشی از هیدرولیز ایمی‌پنم همراه با مهار آنزیم خاص از طریق استفاده از تازوباکتام برای تشخیص KPC و EDTA برای تشخیص MBL است. همچنین آزمایش Carba NP برای شناسایی تولید کارباپنماز در موجودات غیر تخمیرکننده‌ی گلوکز بررسی شده است. روش CLSI Carba NP برای ارزیابی کارباپنمازهای کلاس A و B و در ۳۰ جدایه‌ی سودوموناس آئروژینوزا و ۳۰ جدایه‌ی اسیتوباکتر بومانی مورد استفاده قرار گرفت. میانگین حساسیت و اختصاصیت تشخیص کارباپنماز در سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۸٪ (دامنه، ۹۳٪ - ۱۰۰٪) و ۹۸٪ (دامنه‌ی، ۹۳٪ - ۱۰۰٪) بود، در حالی که میانگین حساسیت و اختصاصیت تشخیص کارباپنماز در اسیتوباکتر بومانی به ترتیب ۱۹٪ (دامنه‌ی، ۹٪ - ۲۶٪) و ۱۰۰٪ (دامنه‌ی، ۱۰۰٪ تا ۱۰۰٪) بود. آزمایش اصلاح شده Carba NP توانایی تشخیص تولید کارباپنماز را در اسیتوباکتر بومانی افزایش می‌دهد اما همچنان میزان آن پایین می‌باشد. در یک مطالعه، حساسیت CLSI Carba NP و آزمایش Carba NP اصلاح شده به ترتیب ۲۱٪ (فاصله اطمینان ۹۵٪، تا ۵۱٪) و ۷۹٪ (فاصله اطمینان ۹۵٪، تا ۹۴٪) بود. حساسیت ضعیف Carba NP برای تشخیص کارباپنماز در اسیتوباکتر بومانی نگران کننده است. کارباپنمازهای نوع OXA که در میان سویه‌های اسیتوباکتر بومانی مقاوم به کارباپنم، مشترک می‌باشند، در هیدرولیز حلقه‌ی بتالاکتام آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم ناکارآمد هستند. MIC های افزایش یافته‌ی کارباپنم که در سویه‌های اسیتوباکتر بومانی مقاوم در برابر کارباپنم مشاهده شدند، تا حد زیادی به دیگر مکانیسم‌های مقاومت، مانند کاهش بیان پورین یا افزایش بیان سیستم‌های افلاکس پمپ نسبت داده شده‌اند (۳۸). علاوه بر این، نفوذپذیری سطح

می‌شود، اسیدی شدن محلول واکنش باعث تغییر رنگ مشاهده شده از قرمز به زرد می‌شود (۳۵). در ابتدا توسط Nordman و همکارانش توصیف و سپس تحت عنوان Carba NP نامگذاری شد. این تست بر اساس هیدرولیز آنزیمی ایمی‌پنم در عصاره‌های باکتریایی، کارباپنمازها را بر اساس تغییرات رنگ ایجاد شده، طی ۲ ساعت تشخیص می‌دهد. هیدرولیز ایمی‌پنم منجر به تولید کربوکسیلیک شده، که به نوبه‌ی خود منجر به کاهش pH و در نتیجه تغییر رنگ نشانگر فنل رد از قرمز به زرد می‌شود. این تست حساسیت بالایی برای تشخیص اغلب کلاس‌های کارباپنمازی دارد، که دامنه‌ی آن از ۱۰۰-۷۳٪ گزارش شده است، این در حالی است که حساسیت تست Carba NP برای کارباپنمازهای OXA-48، به طور قابل توجهی پایین تر بوده و در یک مطالعه فقط ۶٪ گزارش شده است (۳۶). علاوه بر این، آزمایش Carba NP نیاز به آماده سازی معرف‌هایی با ماندگاری کوتاه دارد و ممکن است تفسیرهای مختلفی از نتایج وجود داشته باشد. بسیاری از انواع آزمون Carba NP با تغییر در میزان تلقیح، معرف‌های استخراج، pH اولیه، شاخص‌های pH و زمان خوانش، شرح داده شده است: مانند آزمون Blue Carba، که از شاخص pH بروموتیمول‌بلو استفاده می‌کند (۳۷).

آزمایش اصلاح شده Carba NP نوع دیگری است که با استفاده از ۰,۰۲٪ بافر ستیل تری‌متیل آمونیم برومید لیز و pH شروع ۷/۵ به جای ۷/۸، شناسایی بهتر تولید کارباپنماز را امکان پذیر می‌کند. در مطالعه‌ای که بر روی ۱۹۱ جدایه‌ی اتروباکتریاسه برای تشخیص آنزیم‌های کارباپنمازی انجام شد، روش CLSI Carba NP دارای حساسیت ۸۴٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ بود. این در حالی است که آزمون اصلاح شده Carba NP حساسیت ۹۹٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ داشت. Tijet و همکارانش نشان دادند که حساسیت آزمایش Carba NP در مقایسه با آزمایش تغییر یافته Carba NP برای تشخیص OXA-48 از ۵۶٪

آزمایش (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, the Neo-, the Rapidec Carba NP (France Rapid Carbscreen (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark), the -Carba NP test (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), the Rapid Carb Blue ایجاد شده است. به طور کلی، این آزمایش‌ها (به غیر از β -Carba NP) دارای حساسیت ۹۸-۸۹٪ و اختصاصیت نزدیک به ۱۰۰ می‌باشند. (۴۰) مقایسه‌ی اخیر آزمایش‌های Rapidec Carba NP و β -Carba NP نشان داد که آزمون Rapidec Carba NP ویژگی‌های عملکردی بهتری (حساسیت، ۹۴؛ اختصاصیت، ۱۰۰٪) نسبت به آزمون Carba NP (حساسیت، ۶۵؛ اختصاصیت، ۹۰٪) به نمایش گذاشته است. مشابه آزمایش Carba NP، همان محدودیت‌ها برای این روش‌های تجاری نیز وجود دارد، زیرا نتایج منفی کاذب با آنزیم‌های OXA-48 رخ می‌دهد (۴۱).

CNPt اکنون در رهنمودهای استاندارد بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) برای تأیید فنوتیپی CPE گنجانده شده است. با اینکه در طی چند سال گذشته تلاش زیادی برای ساده‌تر، ارزان‌تر و تجاری‌تر کردن CNPt انجام شده است، اما بزرگترین معایب این تست توان کم، حساسیت پایین نسبت به برخی گروه‌های کاربپنماز و تفسیر رنگی مبهم CNPt می‌باشد که مانع کاربرد بالینی CNPt در غربالگری CPE می‌شود (۴۲).

۶-۲- روش Carbapenembac

این روش تجاری مبتنی بر تشخیص هیدرولیز کاربپنم از نوارهای آغشته به ۱۰۰ میکروگرم ایمپنم و نشاسته است. در ابتدا، جدایه‌ها در یک میلی‌لیتر محیط مایع مولر-هینتون با $\text{pH} = 7/3$ به حالت معلق درآمده که برای جدایه‌های تولید کننده کاربپنماز، نوارها براق شده و رنگ از بین می‌رود. در صورت تداوم رنگ تیره، پیشنهاد می‌شود که ماده بدون کاربپنماز باشد. زمان مطالعه تقریباً ۳۰ دقیقه بود. علاوه بر این، جدایه‌های مثبت برای تولید $\text{M}\beta\text{L}$ ، اغلب توسط تست carbapenembac-methalo آزمایش شدند، بدین ترتیب که تلقیح در مقیاس ۱۰ مک فارلند در

پایین غشای خارجی این باکتری‌ها، از فعالیت آزمایش Carba NP که متکی بر لیز سلول و انتشار بعدی کاربپنمازها برای تشخیص تغییرات رنگ است، جلوگیری می‌کند. آزمون CarbAcineto NP برای غلبه بر تعدادی از موانع مرتبط با تشخیص کاربپنمازهای تولید شده توسط اسیتوباکتر بومانی طراحی شده است. آزمون CarAcineto NP به شرایط لیز اصلاح شده و افزایش تلقیح باکتریایی در مقایسه با آزمایش اصلی Carba NP نیاز دارد. به طور خاص، در این روش، بافرلیز (معرف استخراج پروتئین باکتریایی [B-PER II]؛ Thermo Scientific Pierce Villebon-sur-Yvette) در پاسخ به نفوذپذیری کم غشای خارجی با محلول هایپراسموتیک محلول ۵ مولار NaCl جایگزین شد و تلقیح از تقریباً نیم حلقه‌ی ۱۰ میکرولیتری به یک حلقه‌ی کامل ۱۰ میکرولیتری افزایش یافت. در مطالعه‌ای حساسیت آزمایش Carba NP در تشخیص زیرگروه‌های کاربپنماز اکتسابی مشترک در مجموعه‌ای از ۱۵۱ جدایه‌ی اسیتوباکتر بومانی مولد کاربپنماز، به ویژه کاربپنمازهای OXA-23، OXA-40، OXA-58، OXA-143، OXA-12٪ بود. در حالی که آزمایش CarbAcineto قادر به تشخیص تمام این کاربپنمازهای اکتسابی بود هرچند ناسازگاری با توانایی CarbAcineto در تشخیص کاربپنمازها مانند OXA-51 مشاهده شده است. ژن‌های blaOXA-51 به صورت کروموزومی اینتگره شده، و آنزیم‌های OXA-51 در غیاب توالی ISAbal در انتهای ۵' ژن BlaOXA-51، فعالیت ضعیفی برای هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های کاربپنم دارند. به طور کلی، آزمون CarbAcineto دارای حساسیت ۹۵٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ برای تشخیص کاربپنمازهای مشترک در جدایه‌های اسیتوباکتر بومانی می‌باشد (۳۹). به دلیل اینکه محلول‌های حاوی ایمپنم حداکثر ۷۲ ساعت ماندگاری دارند، انواع نسخه‌های دستی آزمایش Carba NP به آماده‌سازی مکرر معرف نیاز دارند. سایر سنجش‌های موجود در بازار با استفاده از اصول مشابه آزمایش Carba NP مانند

سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انکوبه می‌شود. جدایه‌های مولد کاربایناماز در محلول‌های آزمون و کنترل منفی، به ترتیب زرد در مقابل آبی، زرد در مقابل سبز یا سبز در مقابل آبی می‌باشند، درحالی‌که جدایه‌های کاربایناماز منفی روی هر دو محلول، آبی یا سبز باقی می‌مانند. تمام تولیدکنندگان غیر کاربایناماز (از جمله جدایه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف گسترده و یا جدایه‌های مولد AmpC)، با یا بدون تغییر در نفوذ پذیری غشا خارجی، نتایج منفی توسط این آزمون دارند (۴۴).

برای مشاهده‌ی نتیجه‌ی مثبت انواع مختلف کارباینامازها زمان‌های مختلف مورد نیاز است. به عنوان مثال، KPC یا MBL در ۳۰ دقیقه اول در مقابل بیشتر آنزیم‌های نوع OXA در ۱ و نیم ۲ ساعت. علاوه بر این، میزان تلقیح زیاد باکتری منجر به تغییر رنگ واضح‌تری برای انواع گونه‌های /اسیتوباکتر مولد OXA می‌شود. از مزایای آزمون Blue-Carba، حساسیت و اختصاصیت بالای این تست (۱۰۰٪) مشابه Carba NP جهت شناسایی جدایه‌های مولد کاربایناماز، افزایش سادگی پروتکل، به دلیل استفاده‌ی مستقیم از کلنی‌ها به جای عصاره‌های باکتریایی، کاهش قابل توجه هزینه‌ی واکنش به دلیل استفاده از Tienam (حدود ۱۰ برابر ارزان‌تر از فرمول مونویدرات ایمپنم) و قابلیت پخش بافر استخراج (بافر ۲)، جهت بدست آوردن عصاره‌ی باکتریایی و اعتبارسنجی آزمایش برای تشخیص کارباینامازهای نوع OXA که معمولاً در گونه‌های /اسیتوباکتر حضور دارند، می‌باشد. Blue-Carba یک روش سریع، راحت و ارزان جایگزین Carba NP است که امکان شناسایی فعالیت کاربایناماز را مستقیماً از کشت‌های باکتریایی گونه‌های *انتروباکتریاسه*، *سودوموناس* و /اسیتوباکتر می‌دهد (۴۱).

۶-۴- روش NitroCarba

NitroCarba test (NCT) مبتنی بر هیدرولیز نیتروسفین توسط کارباینامازها در حضور آنتی‌بیوتیک‌های کارباینام است. بر اساس این روش، برای هر جدایه‌ی باکتریایی، یک

یک میلی‌لیتر آب‌گوشت مولر هیتتون با pH 7.3 همراه مراحل بعدی EDTA تنظیم شد. مراحل بعدی با موارد توصیف شده برای تست Carbapenembac یکسان بود. هنگامی که جدایه‌های آزمایش شده، MBL (مهار توسط EDTA) تولید کردند، نوارها تاریک باقی ماندند، در حالی که وقتی جدایه‌ها گروه‌های دیگری از carbapenemasis را تولید می‌کردند، شفاف و مشخص می‌شدند. (۴۳)

۶-۳- روش BLUeCARBA

روش BLUeCARBA در سال ۲۰۱۳ توسط Pier و همکاران گسترش یافت. BLUeCARBA، یک روش تغییر یافته‌ی CarbaNP است که نتایج مشابهی با carbanp دارد. حساسیت و اختصاصیت این روش در شناسایی آنزیم‌های کاربایناماز در *انتروباکتریاسه* به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۱-٪ می‌باشد. از جمله مزایای این روش نسبت به روش carbanp، انجام تست به صورت مستقیم بر روی کلنی‌های باکتری بوده و نیازی به عصاره‌ی باکتری نمی‌باشد. در آزمون BlueCarba، از بروموتیمول بلو به دلیل محدوده‌ی pH مطلوب (۶-۷) به عنوان اندیکاتور برای بیشتر بتالاکتامازها (pH/۶) استفاده می‌شود. در این تست از یک ایمپنم تجاری و در دسترس (Tienam؛ Merck Sharp & Dohme؛ France 500) بعنوان سوبسترای کارباینامازها استفاده می‌شود. محلول آزمایش شامل یک محلول بروموتیمول بلو ۰/۰۴٪ تنظیم شده در pH=۶، ۰/۱ میلی‌مول در لیتر ZnSO4 و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایمپنم با PH نهایی ۷ می‌باشد. در این تست یک محلول کنترل منفی (۰/۰۴ محلول آبی بروموتیمول، pH 7.0) برای کنترل تأثیر اجزای باکتریایی یا محصولات در pH محلول آماده می‌شود. به طور خلاصه در این روش، یک لوپ (تقریباً ۵ میکرولیتر) از کشت خالص باکتریایی از محیط مولر-هیتتون به طور مستقیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تست و کنترل منفی در یک صفحه میکروتیتر ۹۶ چاهکی معلق شده و در ۳۷ درجه

خون ارزیابی شده است. بنابراین، شناسایی کارباینامازها به کمک این روش ممکن است به بهینه‌سازی سریع درمان عفونت‌های جریان خون ناشی از CPE کمک کند. این تست، پنج خانواده کاربایناماز (به عنوان مثال، KPC، NDM، VIM، IMP، و آنزیم‌های OXA-48) را در کمتر از ۳۰ دقیقه شناسایی می‌کند. حساسیت و اختصاصیت این روش برای جدایه‌های مولد KPC، IMP، VIM، NDM و OXA-48 به ترتیب با ۹۷٫۷٪ و ۹۶٫۱٪ می‌باشد. NG-Test Carba اجازه تشخیص ۱۰۰٪ VIM، OXA-48، IMP، KPC، و ۹۵/۵٪ NDM را می‌دهد (۴۶).

۶-۱-۶ روش On-chip Carba NP test

این تست برای اولین بار توسط Abdul Wasey و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای شناسایی دقیق جدایه‌های بالینی *انتروباکتریاسه* مولد کاربایناماز انجام گرفت (۴۷). به طور خلاصه در این روش پس از جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف و شناسایی جدایه‌های مولد کاربایناماز توسط روش‌های مولکولی، سوسپانسیون‌های باکتریایی مقطر تهیه و غلظت سوسپانسیون باکتریایی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر با اندازه‌گیری تراکم نوری OD600 بدست می‌آید. در مرحله‌ی بعد ساخت تراشه با استفاده از استاندارد چند لایه لیتوگرافی نرم انجام شده و سرانجام، تراشه با استفاده از تیمار O₂ پلاسما مهر و موم و در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حداقل ۴۰ ساعت انکوبه شد. سپس تراشه‌ها با قرار گرفتن در معرض اشعه‌ی ماورابنفش به مدت حداقل ۲۰ دقیقه استریل و لایه‌های کنترل تراشه‌ها با عبور آب مقطر گاززدایی و توسط نرم افزار Matlab کنترل شدند. سوسپانسیون‌های باکتریایی در OD600 = 8 در آب مقطر قبل از اینکه محلول‌های مخلوط در محفظه‌ها بارگیری شوند، به سرعت با محلول بستر مخلوط و شیب غلظت باکتری به طور خودکار در هنگام بارگذاری نمونه تولید ایجاد می‌شود. تصاویر محلول در اتاق‌های واکنش در ۰ دقیقه قبل از بارگیری باکتری و سپس در فواصل زمانی مختلف تا ۲ ساعت با استفاده از

لوپ کامل (۱۰ میکرولیتر) از کلنی‌هایی که یک شبانه روز بر روی محیط‌های کشت در ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد رشد یافته‌اند، استفاده می‌شود. برای استخراج آنزیم، نمونه‌ها مجدداً در ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی ۰٫۰۴٪ CTAB، 0.1 میلی مولار ZnSO₄ (PH 5/7) و ۱٪ TritonTMX-100 به حالت تعلیق درآمده و به مدت ۲ دقیقه با شدت چرخانده می‌شود. سپس، ۱۰۰ میلی‌لیتر آنزیم استخراج شده به چاهک‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (شاهد)، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیترایمی پنم (IPM) (200 میکروگرم در میلی‌لیتر مروپنم (MEM) یا ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اتاپنم (ETP) اضافه می‌شود. به دنبال انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، ۵۰ میلی‌لیتر از ۱ گرم درلیتر نیتروسفین در مایع دهیدراته (OxoidTM؛ Thermo Scientific) به هر چاهک اضافه می‌شود. با افزودن نیتروسفین، تغییر رنگ از زرد به قرمز هم در چاهک‌های حاوی کارباینام و هم در چاهک‌های حاوی آب به عنوان تولید کاربایناماز در نظر گرفته می‌شود. عدم وجود هرگونه تغییر رنگ (عدم هیدرولیز نیتروسفین) در چاهک‌های حاوی کارباینام یا چاهک‌های حاوی آب، نشان دهنده‌ی عدم تولید کاربایناماز یا عدم تولید بتالاکتاماز می‌باشد. حساسیت برای هر سه کارباینام ۱۰۰٪ می‌باشد، در حالی که اختصاصیت این تست برای IPM، MEM و ETP به ترتیب ۶۴٫۳٪، ۹۱٫۱٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد. IPM، MEM و ETP می‌باشد. این روش یک روش ساده، سریع، امیدوار کننده، قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای تشخیص سریع CPE حتی در سویه‌های حساس به کارباینام می‌باشد، که امکان مشاهده‌ی سریع نتایج را در ۱۰-۱۲ دقیقه فراهم می‌کند (۴۵).

۶-۵-۶ روش Ngtest carba

شناسایی جدایه‌های مولد کاربایناماز برای جلوگیری از شیوع بیشتر در بیمارستان‌ها و اجرای مناسب‌ترین روش درمانی در صورت عفونت حائز اهمیت می‌باشد. روش ایمونوکروماتوگرافی، NG-test Carba، برای تشخیص سویه‌های *انتروباکتریاسه* مولد کاربایناماز (CPE) از کشت

NP test باعث می‌شود چندین جدایه‌ی باکتریایی به طور همزمان بر روی یک تراشه مورد بررسی قرارگیرد. این تست قادر به تشخیص دقیق کارباینامزهای OXA-48 و KPC با حساسیت، اختصاصیت، انتخاب‌پذیری و تکرارپذیری بالا می‌باشد. با توجه به گسترش سریع پاتوژن‌های مولد OXA-48 در کلینیک‌ها، توانایی NP test Carba NP test برای تشخیص جدایه‌های مولد OXA-48 می‌تواند آن را به یک آزمایش تشخیصی بالینی قابل اطمینان‌تر تبدیل کند. این ویژگی‌های مطلوب، پیشرفت‌های قابل توجهی در آزمون CNPt را نشان می‌دهد و انتظار می‌رود اجرای بالقوه On-chip Carba NP test را در آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی بالینی تسهیل کند. علاوه بر این، ثابت شده است که پروفایل‌های تغییر رنگ، خاص هر باکتری می‌باشد. همچنین NP test Carba NP test ممکن است یک روش جدید برای تمایز سویه‌های باکتریایی بر اساس ویژگی‌های مشخصه در پروفایل تغییر رنگ را ارائه دهد و نویدبخشی برای مطالعه پاسخ دینامیکی باکتری‌ها به استرس آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۴۹).

۷) روش غیر فعال سازی کارباینم (CIM)

روش غیرفعال سازی کارباینم (CIM) روش فنوتیپی جدید است که برای اولین بار توسط ون‌در زوالو و همکارانش در سال ۲۰۱۵ معرفی شد. این روش شامل افزودن کلنی‌های باکتری در آب حاوی دیسک‌های کارباینم (معمولاً ۱۰ میکروگرم مروپنم) و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت می‌باشد. دیسک مروپنم سپس بر روی مولر-هینتون آگار (MHA) قرار گرفته و با سویه‌ی *E. coli* حساس به کارباینم تلقیح می‌شود. عدم وجود یک منطقه‌ی مهاری بزرگ، نشان دهنده‌ی غیر فعال شدن دیسک مروپنم توسط باکتری مولد کارباینم می‌باشد. اگر دیسک مروپنم هنوز فعال باشد، می‌توان یک منطقه روشن را در اطراف دیسک مشاهده کرده که نشان‌دهنده‌ی عدم تولید کارباینم توسط باکتری

دوربین موبایل عادی گرفته شده و تصاویر با استفاده از نرم افزار ImageJ به شدت کانال تک رنگ قرمز، آبی و سبز تقسیم می‌شوند. سپس این داده‌ها با استفاده از برنامه‌ی Matlab جمع آوری و تحلیل می‌شوند. از طرفی CNPt با پانسیون‌های زنده باکتریایی در قالب صفحه میکروتیتر انجام گرفته و کلنی‌های باکتریایی که در محیط کشت آگار تازه رشد کرده‌اند در ddH₂O استریل شده مجدداً معلق شدند تا به عنوان سوسپانسیون باکتریایی ذخیره شوند. یکی از چاهک‌هایی که در آن باکتری با ddH₂O جایگزین شده به عنوان شاهد استفاده و تصاویر در ۰ دقیقه بدون باکتری و سپس در ۵، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه گرفته می‌شود. تغییر رنگ محلول از قرمز به زرد به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته می‌شود و در نهایت تصاویر و داده‌ها با استفاده از یک الگوریتم پیگیری متلب Matlab برای استخراج ردیابی‌های منفرد حرکت باکتری‌ها قبل و بعد از افزودن مقادیر مختلف ایمنی پنم مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. در حالی که آزمایش CarbaNPtest (CNPt) یک روش رنگ سنجی محبوب و ساده برای تشخیص فعالیت کارباینم می‌باشد، کاربرد بالینی آن به دلیل کمبود اطلاعات در مورد تغییرات رنگ وابسته به زمان و دوز، حساسیت ضعیف در شناسایی برخی گروه‌های کارباینم‌ناز و تفسیر رنگی، محدود می‌شود (۴۸). برای پرداختن به این موارد، مطابق با روش NP test Carba NP test یک دستگاه میکروسیال چند منظوره (۱۲۸۰ اتاق) ایجاد شده که قادر است به طور خودکار ۱۶ شیب غلظت باکتری تولید کند و از شدت کانال سبز برای تعیین تغییرات کمی رنگ به عنوان تابعی از زمان استفاده کند. به عنوان اولین پلت فرم میکروسیالی دیجیتال برای تشخیص CPE، On-chip Carba NP test به طور قابل توجهی در مقایسه با روش معمولی CNPt، یک روش با حساسیت بالا، توان زیاد، میزان مصرف پائین و دارای سیستم خودکار، با کاربردهای بالینی بالقوه برای غربالگری سریع CPE با هزینه‌ی کم می‌باشد. ویژگی‌های توان عملیاتی بالای On-chip Carba

¹ carbapenem inactivation method

می‌باشد. rCDM دارای طیف شناسایی وسیع بوده و قادر به تشخیص سویه‌های انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا مولد کاربپنماز در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی می‌باشد. در مقایسه با سایر روش‌های شناسایی فنوتیپی کاربپنماز، rCDM دارای مزایایی از جمله اینکه به تجهیزات یا معرف خاصی احتیاج نداشته و به راحتی قابل اجرا بوده و ارزیابی نتایج آسان می‌باشد. زمان تشخیص rCDM فقط ۵-۶ ساعت است که نسبت به زمان تشخیص آزمایشهای sCIM یا mCIM یک روز کوتاه‌تر می‌باشد. (۴۶)

۱۰ اسپکترومتری

تکنیک‌های اسپکترومتری شامل اشعه‌ی ماورا بنفش (UV) و به ویژه طیف سنجی جرمی (MS) اسپکترومتری به صورت روز افزون برای شناسایی باکتری‌های مولد کاربپنماز استفاده می‌شوند.

۱۰-۱ UV اسپکتروفتومتری: برخی محققان این روش را روش مرجع جهت شناسایی باکتری‌های مشکوک به تولید آنزیم‌های کاربپنماز دانسته‌اند. این تکنیک امکان شناسایی جدایه‌های مولد IMP, VIM, SIM, کاربپنمازهای کلاس D و همچنین NDM را فراهم می‌سازد. نوع آنزیم کاربپنماز را می‌توان از داده‌های هیدرولیز در حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها استنباط کرد. Bernabeu و همکاران روش اسپکتروفتومتری UV را بر اساس تجزیه و تحلیل هیدرولیز ایمی‌پنم با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۸٫۵٪ توصیف کردند. دورت و همکاران در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که حساسیت و اختصاصیت این تست ۱۰۰٪ است. زمانبر بودن، نیازمندی به تجهیزات خاص و نیروی متخصص در اجرای آن اشکال عمده سنجش اسپکتروفتومتری می‌باشد (۵۳).

۱۰-۲ روش‌های طیف سنجی جرمی (MS): در سال‌های اخیر روش‌های مبتنی بر طیف سنجی جرمی برای شناسایی جدایه‌های مولد آنزیم‌های کاربپنماز توسعه یافته‌اند. بسیاری از این روش‌ها حضور محصولات هیدرولیز شده را شناسایی کرده اما نمی‌توانند غلظت آنها را اندازه

مورد نظر است. CIM به عنوان یک روش ساده، مقرون به صرفه و بسیار حساس با ویژگی عالی توصیف شده‌است که در دسترس بسیاری از آزمایشگاه‌های بالینی است. از نظر هزینه با MHT قابل مقایسه بوده، اما دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی است و در حال حاضر توسط CLSI 2018 به صورت CIM اصلاح شده (mCIM) توصیه می‌شود. سایر مطالعات مقایسه‌ای نشان داده‌اند که CIM دقیق‌تر از Carba NP و MHT در تشخیص تولیدکنندگان کاربپنماز در بین جدایه‌های بالینی انتروباکتریاسه می‌باشد. این مطالعات همچنین گزارش کرده‌اند که CIM در تشخیص OXA-48 حساسیت برابر و یا بهتر نشان داده است. اگرچه CIM مدت زمان ۲۴-۱۸ ساعت برای کشت باکتری مورد نظر نیاز است با این حال این تست ساده و ارزان بوده و به تجهیزات و تخصص خاصی احتیاج ندارد. این ویژگی‌ها موجب کاربرد مناسب و روزافزون CIM در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی نسبت به سایر روش‌های فنوتیپی می‌شود (۵۰، ۵۱).

۸ روش غیرفعال سازی کاربپنم اصلاح شده (mCIM)

از روش اصلاح شده غیر فعال کردن کاربپنم (mCIM) برای تشخیص تولید کاربپنماز در سویه‌های انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا استفاده می‌شود. در آزمون mCIM معرف‌ها و محیط‌هایی که به راحتی در دسترس هستند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. mCIM یک تست کاربردی که نتایج آن را می‌توان به راحتی تفسیر کرد. علاوه بر این، می‌توان از EDTA-mCIM همراه با mCIM برای تمایز کاربپنمازهای کلاس MBL از دیگر کلاس‌های کاربپنمازی استفاده کرد. (۵۲)

۹ روش کاربپنماز سریع (rCDM)

Rapid Carbapenemase Detection Method (rCDM) روش جدید برای شناسایی سریع و دقیق آنزیم‌های کاربپنماز بر اساس غیرفعال کردن کاربپنم

¹ Modified carbapenem inactivation method

² Rapid Carbapenemase Detection Method

OXA-48 (افزایش حساسیت آن از ۷۷٪ به ۹۸٪) می‌شود (۱۵، ۵۵). روش اسپکترومتری Raman که برای تایپینگ گونه‌های مختلف باکتری مورد استفاده قرار می‌گیرد، تکنولوژی نوری بر اساس پراکنش بدون ارتجاعی نور توسط مولکول‌ها می‌باشد. این روش از جمله روش‌های سریع (۴ ساعت) و مقرون به صرفه برای تشخیص کاربایناماز می‌باشد (۵۶).

از جمله معایبی که می‌توان ذکر کرد:

در بیشتر مطالعات، هیچ راهنمایی در مورد نوع خاص کاربایناماز موجود ارائه نشده است. با این حال، در مقاله‌ای که اخیراً منتشر شده، Oviano و همکاران نشان دادند که افزودن مهارکننده (PBA و DPA) و تموسیلین (سطوح با مقاومت بالا به عنوان نشانگر آنزیم OXA-48) امکان تشخیص کلاس کاربایناماز را به طور موثری می‌دهد. سایر سیستم‌های طیف‌سنجی جرمی برای تشخیص مانند کروماتوگرافی مایع (LC-MS)، طیف‌سنجی جرمی متوالی کروماتوگرافی مایع با عملکرد فوق العاده (UPLC-MS/MS)، طیف‌سنجی جرمی متوالی یونیزاسیون الکترواسپری الکتروفورز مویزگی (CEESI-MS/MS) یا PCR electrospray ionization-MS طیف‌سنجی جرمی یونیزاسیون الکترواسپری (PCR/ESI-MS) در حال ارزیابی هستند. علی‌رغم عملکرد مطلوب این تست در تشخیص کاربایناماز، مفید بودن آن به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته، محدود به محیط تحقیق است (۲۶).

۱۱) روش الکتروشیمیایی:

اخیراً Bogaerts و همکاران برای شناسایی اتروباکتریاسه مولد کاربایناماز یک روش الکتروشیمیایی (Bogaerts-Yunus Glupczynski)BYE carba test توصیف کردند. این روش مبتنی بر تشخیص نوسانات هدایت الکتروود است که به pH و تغییرات فعالیت ردوکس پس از هیدرولیز ایمی‌پنم توسط یک کاربایناماز بسیار حساس است. تغییرات امپرناس الکتروشیمیایی اندازه‌گیری شده و

بگیرند و ارزیابی کمی فعالیت کارباینامازی جدایه‌های باکتری را امکان پذیر نمی‌سازند. این تکنیک بر اساس آنالیز هیدرولیز ایمی‌پنم در حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها انجام می‌گیرد و می‌تواند جدایه‌هایی را که از طریق تولید آنزیم کاربایناماز نسبت به کارباینام‌ها مقاومت دارند از جدایه‌هایی که از طریق مکانیسمی به غیر از کاربایناماز به کارباینام مقاوم هستند را تشخیص دهد (۵۴). اخیراً روش MALDI-TOF MS معرفی شده که به طور فزاینده‌ای در آزمایشگاه‌های معمول برای شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در شناسایی فعالیت کاربایناماز از سال ۲۰۱۱ با نتایج امیدوار کننده گزارش شده است. MALDI-TOF MS روشی ارزان، دقیق و سریع برای شناسایی گونه‌های باکتری بر اساس هیدرولیز حلقه‌ی بتالاکتام می‌باشد. چندین پروتکل توصیف شده است اگرچه یک پروتکل کاملاً استاندارد هنوز در دسترس نیست. در این روش مواد در اتاقک پر از خلا یونیزه و توسط میدان الکتریکی شتاب دار شده و امکان شناسایی کارباینامازهای کلاس A و B را امکان‌پذیر می‌سازد. مطالعات مختلف حساسیت و اختصاصیت این روش را به ترتیب، ۷۷-۱۰۰٪ و ۹۴-۱۰۰٪ گزارش کرده‌اند. با توجه به مطالعات انجام گرفته روش MALDI-TOF MS برای شناسایی کارباینامازهای کلاس A (KPC2) و B (GES-5, NDM-1, VIM-1, SPM-1,) و دارای حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ می‌باشد. سنجش MALDI-TOF نسبت به دیگر روش‌های شناسایی کاربایناماز مانند MHT حساسیت و اختصاصیت بالایی جهت شناسایی VIM2, OXA23 و IMP6, KPC1, NDM1, SIM1 و OXA51 کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آتروژینوزا و گونه‌های اسیتوباکتر دارد. نتایج منفی کاذب عمدتاً در تولید کنندگان OXA-48 گزارش شده است. Papagiannitsis و همکاران نشان دادند که افزودن NH4HCO3 با فرواکنش منجر به بهبود در تشخیص

است. تشخیص سریع حضور کارباینامازها در *Enterobacteriaceae* می‌تواند برای انتخاب آنتی‌بیوتیک و کنترل عفونت مفید باشد (۱۷). اگرچه روش‌های مختلفی ایجاد شده‌اند، اما هنوز ایجاد روش‌های نوین، سریع و ساده، نوآورانه با عملکرد بالا، قابل اعتماد و مقرون به صرفه یک چالش برای محققان می‌باشد (۵۸).

اعضای انتروباکتریاسه مانند *E. coli* و *K. pneumoniae* از مهمترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی و ناشی از جامعه است. روش‌های تشخیص قابل اعتماد با سرعت، حساسیت و ویژگی بالا مورد نیاز است. با این حال، روش‌های سنتی فنوتیپی دارای معایبی مانند: وقت گیر بودن، دشواری تفسیر و حساسیت، ویژگی بین گونه‌های مختلف می‌باشد (۵۰). روش‌های فنوتیپی، MHT به عنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده کاربایناماز در سال‌های گذشته پیشنهاد شده است. MHT برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده NMM، VIM و IMP کمتر قابل اعتماد است. با این حال، ممکن است برای شناسایی تولیدکنندگان KPC و OXA-48 مفید باشد. مقاومت در برابر عوامل کارباینام به دلیل وجود کاربایناماز و وجود مکانیسم‌های مقاومت دیگر مانند ESBL ها، جهش‌های پورین و یا وجود پمپ‌های خروجی است (۵۹). در حال حاضر، آزمون استاندارد eCIM یک روش ساده و ارزان برای افتراق فعالیت سرین و متالوبلاکتاماز در انتروباکترها است (۶۰). توانایی iCIM برای تشخیص کاربایناماز در انتروباکترها با حساسیت بالا (۱۰۰٪) و ویژگی (۹۸٪) است (۶۱).

روش‌های متعددی برای تایید تولید کاربایناماز آزمایش شده‌اند (MHT، دیسک انتشار و MIC گرادیان نوار تست هم افزایی، کار با NP، اندازه مولکولی، ایمونوکروماتوگرافی)؛ اما همه این روش‌ها محدودیت‌هایی را نشان دادند (جدول ۲) (۶۲).

نتایج به صوت منحنی‌هایی نمایش داده می‌شوند. آزمایش BYE carba test با حساسیت ۹۵٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ حضور کاربایناماز را در کمتر از ۳۵ دقیقه تشخیص می‌دهد (۷).

۱۲) ایمونوکروماتوگرافی:

روش ایمونوکروماتوگرافی (IC) بر اساس واکنش Ag-Ab بوده و اخیراً به دلیل شناسایی آسان و سریع (کمتر از ۲۰ دقیقه) کارباینامازهای خاص تجاری شده‌اند. اطلاعات منتشر شده ارزیابی این تست نتایج امیدوارکننده‌ای نشان می‌دهد. Notake و همکاران حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ در شناسایی MBL های نوع IMP (IMP1,2,6,7,10,11,19,20,22,40,41,42) با استفاده از IC کیت آزمایشی ایمونوکروماتوگرافی IMP MBL یافتند (۹).

۱۲-۱- روش ایمنی سنجی لترال (LFIA):

روش‌های مبتنی بر آنتی بادی برای شناسایی وجود کارباینامازها هستند که به طور کلی امکان شناسایی یک یا چند مورد از مهم‌ترین کارباینامازها را از نظر اپیدمیولوژیک فراهم می‌کنند. LFIA کارباینامازهای IMP, NDM, KPC, OXA-48, را در طی ۱۵ دقیقه شناسایی می‌کند. روش LFIA با هدف قراردادن پنج خانواده اصلی کاربایناماز (به عنوان مثال، KPC, NDM, VIM, IMP, و کارباینامازهای OXA-48) ارزیابی شده است. به طور خلاصه، در این روش بعد از کشت باکتری بر روی محیط مولر هیتون، کلنی‌های رشد یافته را در ۱۵۰ لیتر بافر استخراج معلق کرده و پس از آن، ۱۰۰ میکرولیتر از این عصاره بر روی یک کاست قرار داده شده، و نتایج تست در ۱۵ دقیقه پس از حرکت، بر اساس وجود خطوط مرئی که نشان دهنده یک نتیجه مثبت است، خوانده می‌شود (۵۷).

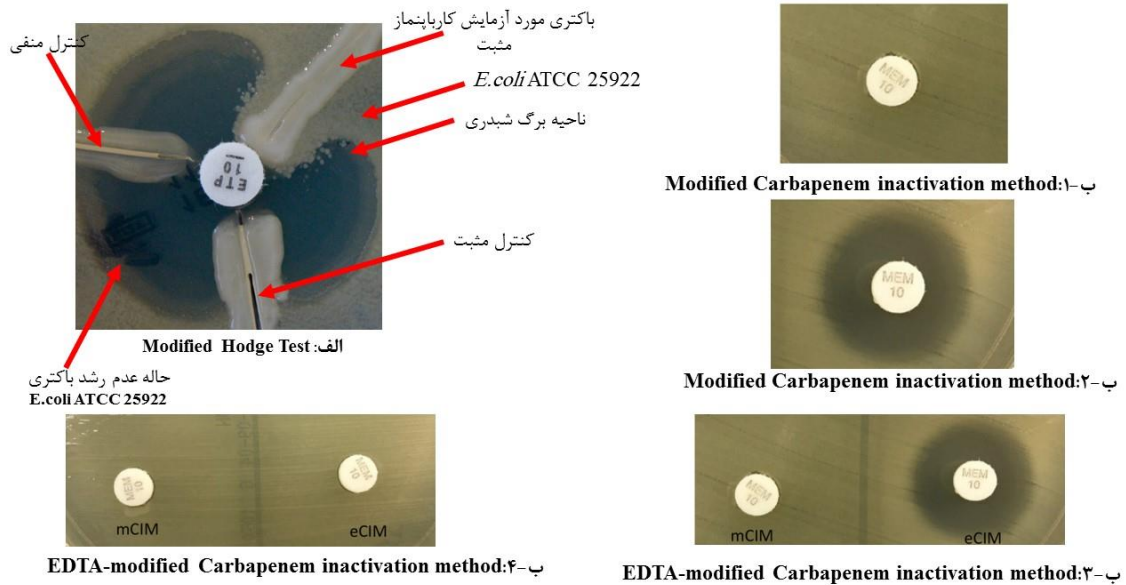
مقاومت در برابر کارباینام‌ها به عنوان آخرین آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت‌های ناشی از CRE و بدلیل محدود بودن گزینه‌های درمانی، یک نگرانی اساسی برای سلامتی

¹ Lateral flow immunoassays

جدول ۲. آزمایش‌های فنوتیپی برای تشخیص کاربایناماز

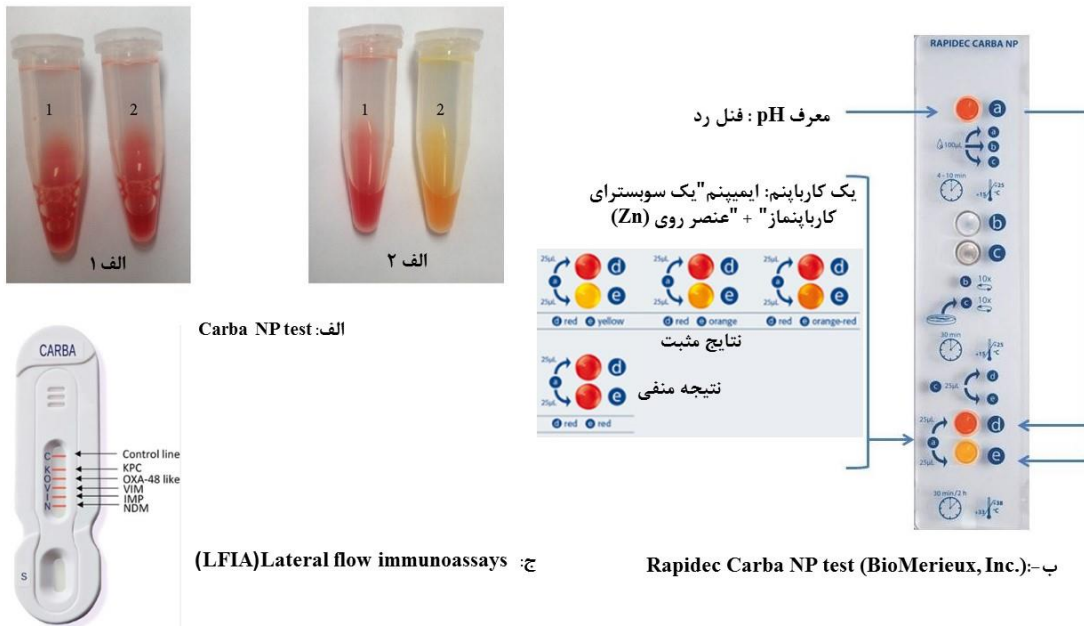
پارامتر تست	Modified Hodge Test	Carba NP	mCIM	Lateral flow immunoassays	سنجش‌های کاربایناماز
ارگانسیم‌های مقاوم در برابر کارباینام	انتروباکتریاسه	انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا	انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا	انتروباکتریاسه	عموماً انتروباکتریاسه
دقت	برای انتروباکتریاسه حساسیت ۹۵٪ و اختصاصیت ۹۱٪، نتایج مثبت کاذب ESBL با جدایه‌های AmpC مثبت بانقص پورین، نتایج منفی کاذب با MBL	برای انتروباکتریاسه حساسیت ۸۴٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ و برای سودوموناس آئروژینوزا حساسیت ۹۸٪ و اختصاصیت ۹۸٪؛ با تغییر در بافر لیز و pH شروع، حساسیت به ۹۹٪ افزایش می‌یابد. نتایج منفی کاذب با تولید کنندگان شبه OXA-48 یا جدایه‌های موکوئیدی	برای انتروباکتریاسه حساسیت ۹۷٪ و اختصاصیت ۹۹٪؛ برای سودوموناس آئروژینوزا حساسیت ۹۸٪ و اختصاصیت ۹۵٪؛ mCIM تشخیص OXA-48 را بهبود می‌بخشد. نتایج مثبت کاذب ممکن است با E. cloacae رخ دهد. بعلاوه شناسایی MBL در انتروباکتریاسه	برای انتروباکتریاسه حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت < ۹۵٪؛ نتایج مثبت کاذب با برخی آنزیم‌های OXA غیر کاربایناماز	دقت در آزمون متفاوت است، بعنوان مثال، حساسیت تست دیسک OXA-48 ۹۶٪ و ویژگی ۹۸٪؛ نوارهای شیب KPC حساسیت ۹۲٪ و ویژگی ۱۰۰٪، نوارهای شیب MBL حساسیت ۹۴٪ و ویژگی ۹۵٪، تشخیص CPO BD Phoenix حساسیت ۹۷٪ و ویژگی ۶۹٪
سهولت استفاده	اجرای آسان، هیچ معرف یا محیط خاصی لازم نیست.	برای نسخه‌های دستی، معرف‌های تازه به دلیل نیمه عمر محدود محلول‌ایمی پنم لازم است بطور مکرر آماده شوند، pH متر مورد نیاز است، آزمایشات تجاری موجود الزامات برای آماده سازی معرف و نیاز به PH متر را حذف می‌کند.	اجرای آسان، هیچ معرف یا محیط خاصی لازم نیست.	اجرای آسان، هیچ معرف یا محیط خاصی در کنار کیت آزمایش لازم نیست.	همه روش‌ها بجز نوارهای شیب یا دیسک معمولاً به راحتی در دسترس هستند.
تفسیر نتایج	تفسیر قطر منطقه ای E. coli به سمت دیسک کارباینام در امتداد جدایه کشت داده شده	تغییر رنگ از قرمز به زرد یا آبی تا زرد بستگی به نشانگر pH دارد.	مثبت قطر منطقه ۶-۱۵ میلی متر؛ حدواسط ۱۶-۱۸ میلی متر؛ منفی < ۱۹ میلی متر و سپس کشت چمنی دیسک E. coli پس از ۴ ساعت انکوباسیون	نتایج مثبت بر اساس حضور خطوط مرئی خاص	متفاوت بر اساس آزمون، فقط برای MBL Etest برای تشخیص MBL استفاده می‌شود. نسبت IP / IPI MIC > ۸
زمان کل برای انجام آزمایش	۱۵ دقیقه برای راه اندازی و ۲ دقیقه برای خواندن	۴۰ تا ۱۷۰ دقیقه (بر اساس تست متفاوت است)	۵ دقیقه برای راه اندازی اولیه، ۱۰ دقیقه برای تلقیح کشت و ۲ دقیقه برای خواندن	۵ دقیقه برای راه اندازی اولیه و ۲ دقیقه برای خواندن	متفاوت بر اساس آزمون، برای MBL Etest راه اندازی اولیه ۱۰ دقیقه و ۵ < برای خواندن
زمان چرخش	۱۸-۲۴ ساعت	نتیجه همان روز، ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت	۱۸-۲۴ ساعت؛ TAT و انکوباسیون کوتاهتر	نتیجه همان روز، ۱۵ دقیقه	۱۸-۲۴ ساعت
هزینه تخمینی	> \$۱,۰۰	برای نسخه‌های دستی، > \$۲,۰۰	> \$۱,۰۰	قیمت‌ها هنوز تخمین نشده است.	متفاوت بر اساس آزمون، نوارهای شیب MBL حدود \$۶,۰۰
وضعیت نظارتی	دیگر مورد تأیید CLSI نیست، LDT	برای انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا؛ Carba NP دستی توسط CLSI تایید شده است.	LDT؛ مورد تأیید CLSI	RUO	RUO

LDT=تست توسعه یافته آزمایشگاه، RUO=فقط استفاده تحقیقاتی



شکل ۱. روش های فنوتیپی برای تشخیص کاربپنمازها بر پایه روش های انتشار در آگار و دیسک دیفیوژن

شکل ۱: آزمایش هوچ تست، ایزوله تولید کننده کاربپنماز دارای ناحیه برگ شبدری، ب ۱: روش غیر فعال سازی کاربپنم تغییر یافته از یک ایزوله مثبت که دارای ناحیه عدم رشد در حضور دیسک مروینم می باشد، ب ۲: نتیجه منفی از آزمایش غیر فعال سازی کاربپنم تغییر یافته که نشانگر ناحیه عدم رشد است، ب ۳: نتیجه مثبت از باکتری متالوبتالاکتاماز تولید کننده کاربپنماز به علت ناحیه عدم رشد در ترکیب با EDTA، ب ۴: نتیجه مثبت از ایزوله سرین کاربپنماز در آزمایش کاربپنم تغییر یافته غیر فعال شده به علت عدم رشد در ترکیب با EDTA.



شکل ۲. روش های فنوتیپی برای تشخیص کاربپنمازها بر پایه روش های رنگ سنجی و ایمونولوژی

نتایج مثبت و منفی تعیین کاربپنماز با روش های نوین، الف: آزمایش Carba NP، الف ۱، نتیجه منفی و الف ۲ نتیجه مثبت از ایزوله با توانایی کاربپنماز، ب: آزمایش Rapidec Carba NP، معرف کیت فنل رد می باشد، در ترکیب کاربپنم ایمینیم با سوبسترای خود یا همان باکتری در صورت درای این

قابلیت از باکتری در حضور عنصر روی نمایشگر رنگی انتهای کیت به زرد تا نارنجی تغییر رنگ میدهد و در نتیجه منفی قسمت معرف بعد از تلقیح به رنگ همان قرمز می ماند. ج: روش ایمنی سنجی لترال.

نتیجه گیری

یک روش سریع و قابل اعتماد برای تشخیص تولید کارباپنماز در *Enterobacteriaceae* و برای کنترل شیوع عوامل بیماریزای مقاوم در برابر میکروب، غربالگری بیماران و استفاده منطقی از آنتی بیوتیک ها، nitro carba test (NCT) است. روش NCT ارائه شده یک روش بسیار ساده، قابل اعتماد و مقرون به صرفه می باشد که امکان مشاهده سریع نتایج را در عرض ۲۰ دقیقه فراهم می کند. ETP بهترین حساسیت و ویژگی را نشان داد و بنابراین باید برای تحقیقات آینده در یک محیط بالینی انتخاب شود. این روش یک روش جایگزین امیدوار کننده است که می تواند در هر آزمایشگاهی برای غربالگری CPE قابل استفاده باشد (۵۸). آزمون CPO برای تشخیص با حساسیت بالا قابل اعتماد است، اما ویژگی نسبتاً نامناسب آن این است که نیاز به استفاده از روش های تأییدی اضافه دارد. دقت طبقه بندی کارباپنماز در ارائه نتایج اولیه قبل از خصوصیات مولکولی بسیار قدرتمند است. به طور کلی اجرای تست تشخیص CPO PHONIX ممکن است تاثیر مثبتی بر گردش کار آزمایشگاه و بر تصمیمات درمانی کنترل عفونت داشته باشد (۶۲). به طور کلی آزمایش های STAR-CARBA برای همه سویه های تولیدکننده کارباپنماز از کشت صفحه ای نتیجه مثبت داشتند، به جز *Serratia marcescens*

و *Klebsiella aerogenes* که تولید کننده KPC می باشد و *E.coli* که تولید کننده VIM اس (۶۳). در مجموع روش های کروموزنیک عملکرد خوبی برای تشخیص کارباپنمازهای کلاس A و B و برای تشخیص انواع OXA-48 حساسیت از ۴۰ تا ۱۰۰٪ داشتند. برای روش های مبتنی بر رشد، عملکرد در کلاس های مختلف کارباپنماز متفاوت است. MHT برای تشخیص تولیدکنندگان NDM از حساسیت کمتری (۸۶٪) و ویژگی محدود (۹۱٪) برخوردار بود. CIM به ترتیب دارای حساسیت و ویژگی کلی ۹۱ و ۹۹٪ بود، اما برای تشخیص کارباپنماز فقط قادر به شناسایی ۸۰٪ از انواع OXA-48، ۸۳٪ از تولید کنندگان IMP، ۹۱٪ از تولید کنندگان KPC، و ۹۲٪ از تولید کنندگان NDM بود (۱۳). با این حال، با تغییرات در گیر با CIM اصلاح شده (mCIM)، حساسیت و ویژگی کلی به ۹۸ و ۹۹٪ افزایش یافت و تمام انواع OXA-48 و NDM شناسایی شد. جداسازی KPC منفرد *Serratia marcescens* و *Klebsiella pneumoniae* تولید کننده IMP نتایج نادرست به همراه داشت. همه سنجش ها به استثنای MHT (۹۱٪) و روش دستی Blue Carba (۹۶٪)، دارای بیش از ۹۹٪ ویژگی بودند (۴۱).

References

1. Akova M, Daikos GL, Tzouveleki L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):439-48.
2. Ludden C, Cormican M, Vellinga A, Johnson JR, Austin B, Morris D. Colonisation with ESBL-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, vancomycin-resistant enterococci, and meticillin-resistant Staphylococcus aureus in a long-term care facility over one year. BMC Infect Dis. 2015;15(1).
3. Latour K, Huang TD, Jans B, Berhin C, Bogaerts P, Noel A, et al. Prevalence of multidrug-resistant organisms in nursing homes in Belgium in 2015. PLoS ONE. 2019;14(3).
4. Bialvaei AZ, Kafil HS, Leylabadlo HE, Asgharzadeh M, Aghazadeh M. Dissemination of carbapenemases producing gram negative bacteria in the middle east. Iran J Microbiol. 2015;7(5):226-46.

5. O'Connor C, Cormican M, Boo TW, McGrath E, Slevin B, O'Gorman A, et al. An Irish outbreak of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-1 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: increasing but unrecognized prevalence. *J Hosp Infect.* 2016;94(4):351-7.
6. Okanda T, Haque A, Koshikawa T, Islam A, Huda Q, Takemura H, et al. Characteristics of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in the Intensive Care Unit of the Largest Tertiary Hospital in Bangladesh. *Front Microbiol.* 2021;11.
7. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2018;66(8):1290-7.
8. Yarbrough ML, Wallace MA, Potter RF, D'Souza AW, Dantas G, Burnham CAD. Breakpoint beware: reliance on historical breakpoints for Enterobacteriaceae leads to discrepancies in interpretation of susceptibility testing for carbapenems and cephalosporins and gaps in detection of carbapenem-resistant organisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(1):187-95.
9. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(4):909-15.
10. Yee R, Fisher S, Bergman Y, Chambers KK, Tamma PD, Carroll KC, et al. Combined selective culture and molecular methods for the detection of carbapenem-resistant organisms from fecal specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021.
11. Toner G, Russell CD, Hamilton F, Templeton K, Laurenson IF. Phenotypic and molecular detection methods for carbapenemase-producing organisms and their clinical significance at two scottish tertiary care hospitals. *J Med Microbiol.* 2019;68(4):560-5.
12. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, Dodgson A, McEwan A, Humphries R, et al. Multisite evaluation of cepheid xpert carba-r assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2016;54(7):1814-9.
13. Morrison BJ, Rubin JE. Carbapenemase producing bacteria in the food supply escaping detection. *PLoS ONE.* 2015;10(5).
14. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology.* 2013;51(9):3097-101.
15. Anantharajah A, Tossens B, Olive N, Kabamba-Mukadi B, Rodriguez-Villalobos H, Verroken A. Performance evaluation of the MBT STAR@-CARBA IVD assay for the detection of carbapenemases with MALDI-TOF MS. *Front Microbiol.* 2019;10(JUN).
16. Banerjee R, Humphries R. Clinical and laboratory considerations for the rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017;8(4):427-39.
17. Alizadeh N, Rezaee MA, Kafil HS, Hasani A, Barhaghi MHS, Milani M, et al. Evaluation of resistance mechanisms in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance.* 2020;13:1377.
18. Benenson S, Temper V, Cohen MJ, Schwartz C, Hidalgo-Grass C, Block C. Imipenem disc for detection of KPC carbapenemase-producing enterobacteriaceae in clinical practice. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1617-20.
19. Berneking L, Both A, Berinson B, Hoffmann A, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, et al. Performance of the BD Phoenix CPO detect assay for detection and classification of carbapenemase-producing organisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(5):979-85.
20. Saad Albichr I, Anantharajah A, Dodémont M, Hallin M, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Evaluation of the automated BD Phoenix CPO Detect test for detection and classification of carbapenemases in Gram negatives. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;96(2).
21. Creighton J, Wang H. Evaluation of CHROMagar™mSuperCARBA™ for the detection of carbapenemase-producing gram-negative organisms. *New Zealand J Med Lab Sci.* 2016;70(3):101-5.
22. Mao W, Xia L, Xie H. Detection of Carbapenemase-Producing Organisms with a Carbapenem-Based Fluorogenic Probe. *Angew Chem Int Ed.* 2017;56(16):4468-72.
23. Bordin A, Trembizki E, Windsor M, Wee R, Tan LY, Buckley C, et al. Evaluation of the SpeeDx Carba (beta) multiplex real-time PCR assay for detection of NDM, KPC, OXA-48-like, IMP-4-like and VIM carbapenemase genes. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1).
24. McMullen AR, Wallace MA, LaBombardi V, Hindler J, Campeau S, Humphries R, et al. Multicenter evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP assay for the detection of carbapenemase production in clinical isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39(11):2037-44.
25. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: Detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):112-22.

26. Anderson REV, Boerlin P. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in animals and methodologies for their detection. *Can J Vet Res.* 2020;84(1):3-17.
27. Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, et al. EDTA-modified carbapenem inactivation method: A phenotypic method for detecting metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5).
28. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2986-90.
29. Brehony C, McGrath E, Brennan W, Tuohy A, Whyte T, Brisse S, et al. An MLST approach to support tracking of plasmids carrying OXA-48-like carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7):1856-62.
30. Kumar N, Singh VA, Beniwal V. Modified combined disc test (mCDT): a novel, labor-saving and 4 times cheaper method to differentiate Class A, B and D carbapenemase-producing Klebsiella species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019;93(2):96-100.
31. Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. *South Med J.* 2011;104(1):40-5.
32. Pragasam AK, Sahni RD, Anandan S, Sharma A, Gopi R, Hadibasha N, et al. A pilot study on Carbapenemase detection: Do we see the same level of agreement as with the CLSI observations. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(7):DC09-DC13.
33. Maragakis LL. Recognition and prevention of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2010 19(12);SUPPL.):S345-S51.
34. Zhou M, Kudinha T, Du B, Peng J, Ma X, Yang Y, et al. Active surveillance of carbapenemase-producing organisms (CPO) colonization with Xpert carba-R assay plus positive patient isolation proves to be effective in CPO containment. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(MAY).
35. El Awady BA, Anan MG, Gohar HA, Saleh MH. Detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae using chromogenic medium, ChromID OXA-48, in critical care patients of kasr Al-Ainy hospital in Egypt. *J Pure Appl Microbiol.* 2017;11(4):1655-64.
36. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis.* 2019;69:S521-S8.
37. Fernando SA, Phan T, Parker C, Cai T, Gottlieb T. Increased detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae on post-clean sampling of a burns unit's wet surfaces. *J Hosp Infect.* 2019;101(2):179-82.
38. Tschudin-Sutter S, Lavigne T, Grundmann H, Rauch J, Eichel VM, Deboscker S, et al. Differences in infection control and diagnostic measures for multidrug-resistant organisms in the tristate area of France, Germany and Switzerland in 2019 - survey results from the RH(E)IN-CARE network. *Swiss Med Wkly.* 2021;151:w20454.
39. Abed AS, Al hussein TMA. Molecular genotyping survey for blaIMP virulence gene of Acinetobacter baumannii isolates, Iraq. *Plant Arch.* 2019;19(2):3862-4.
40. Lee LY, Korman TM, Graham M. Rapid time to results and high sensitivity of the CarbaNP test on early cultures. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):4023. 7-
41. Tamma PD, Opene BNA, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2017;55(4):1046-55.
42. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-San Francisco C, Gudíol C, et al. Executive summary of the diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(5):338-41.
43. Lu Q, Okanda T, Yang Y, Khalifa HO, Haque A, Takemura H, et al. High-Speed Quenching Probe-Polymerase Chain Reaction Assay for the Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Gene Using GENECUBE: A Fully Automatic Gene Analyzer. *Mol Diagn Ther.* 2021;25(2):231-8.
44. Perovic O, Britz E, Chetty V, Singh-Moodley A. Molecular detection of carbapenemase-producing genes in referral enterobacteriaceae in South Africa: A short report. *S Afr Med J.* 2016;106(10):975-7.
45. Yamamoto N, Kawahara R, Aakeda Y, Shanmugakani RK, Yoshida H, Hagiya H, et al. Development of selective medium for IMP-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in stool specimens. *BMC Infect Dis.* 2017.(1)11;
46. Ayfan AKS, Macdonald J, Harris PNA, Heney C, Paterson DL, Trembizki E, et al. Rapid detection of NDM and VIM carbapenemase encoding genes by recombinase polymerase amplification and lateral flow-based detection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021.

47. Abdul-Mutakabbir JC, Kebriyai R, Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Teaching an Old Class New Tricks: A Novel Semi-Synthetic Aminoglycoside, Plazomicin. *Infect Dis Ther.* 2019;8(2):155-70.
48. Yoo IY, Huh K, Shim HJ, Yun SA, Chung YN, Kang OK, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for rapid detection of respiratory bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in sputum and endotracheal aspirate specimens. *Int J Infect Dis.* 2020;95:326-31.
49. Vanstone GL, Woodhead S, Roulston K, Sharma H, Wey E, Smith ER, et al. Improving the detection of carbapenemase-producing organisms (CPO) in a low-prevalence setting: Evaluation of four commercial methods and implementation of an algorithm of testing. *J Med Microbiol.* 2018;67(2):208-14.
50. Abbas HA, Kadry AA, Shaker GH, Goda RM. Impact of specific inhibitors on metallo- β -carbapenemases detected in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microb Pathog.* 2019;132:266-74.
51. Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PHM, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis.* 2014;14(1).
52. Byun JH, Seo Y, Kim D, Kim M, Lee H, Yong D, et al. An agar plate-based modified carbapenem inactivation method (p-mCIM) for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods.* 2020;168.
53. Vasilakopoulou A, Karakosta P, Vourli S, Kalogeropoulou E, Pournaras S. Detection of kpc, ndm and vim-producing organisms directly from rectal swabs by a multiplex lateral flow immunoassay. *Microorg.* 2021;9(5).
54. Mohan S, Farooq U. Prevalence and characterization of multi drug resistant gram negative bacilli isolates from a tertiary care centre of western U.P., India. *J Pure Appl Microbiol.* 2019;13(2):1069-78.
55. Yan Y, Yang H, Pan L, Sun K, Fan H, Lu Y, et al. Improving the efficiency of the modified Hodge test in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by incorporating an EDTA disk. *Curr Microbiol.* 2014;69(1):47-5. ^۲
56. Stokes W, Pitout J, Campbell L, Church D, Gregson D. Rapid detection of carbapenemase-producing organisms directly from blood cultures positive for Gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40(2):381-4.
57. Moore NM, Traczewski MM, Cantón R, Carretto E, Peterson LR, Sautter RL. Rapid identification of five classes of carbapenem resistance genes directly from rectal swabs by use of the xpert carba-R assay. *J Clin Microbiol.* 2017;55(7):2268-75.
58. Teethaisong Y, Nakouti I, Evans K, Eumkeb G, Hobbs G. Nitro-Carba test, a novel and simple chromogenic phenotypic method for rapid screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of global antimicrobial resistance.* 2019;18:22-5.
59. AlTamimi M, AlSalamah A, AlKhulaifi M, AlAjlan H. Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemases production by Enterobacteriaceae. *Saudi journal of biological sciences.* 2017;24(1):155-61.
60. Lasko MJ, Gill CM, Asempa TE, Nicolau DP. EDTA-modified carbapenem inactivation method (eCIM) for detecting IMP Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: an assessment of increasing EDTA concentrations. *BMC microbiology.* 2020;20(1):1-5.
61. Howard JC, Creighton J, Ikram R, Werno AM. Comparison of the performance of three variations of the Carbapenem Inactivation Method (CIM, modified CIM [mCIM] and in-house method (iCIM)) for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriales and non-fermenters. *Journal of global antimicrobial resistance.* 2020;21:78-82.
62. Croxatto A, Coste AT, Pillonel T, Bertelli C, Greub G, Prod'homme G. Evaluation of the BD Phoenix™ CPO Detect Test for the detection of carbapenemase producers. *Clinical Microbiology and Infection.* 2020;26(5):644-e9.
63. Cordovana M, Abdalla M, Ambretti S. Evaluation of the MBT STAR-Carba Assay for the Detection of Carbapenemase Production in Enterobacteriaceae and Hafniaceae with a Large Collection of Routine Isolates from Plate Cultures and Patient-Derived Positive Blood Cultures. *Microbial Drug Resistance.* ۲۰۲۰-۱۲۹۸:(۱۱)۲۶:۲۰۲۰.

Review Article

A review of phenotypic methods for detecting antibiotic resistance induced by carbapenemase enzyme in bacteria isolated from clinical specimens

Received: 24/10/2021 - Accepted: 26/04/2022

Mehrdad Mohammadi^{1*}

Masoumeh Beig²

Kimia Barikrou³

Sima Soltani⁴

Leila Ali Nasab Maleki⁴

Parsa Veisi⁴

Samane Teymouri⁵

¹ Department of Microbiology and immunology, school of Medicine,, Kashan university of medical sciences, Kashan ,Iran

² Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

³ Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran,Iran

⁴ Department of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

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

Email:

mehrdad.mohammadi1984@gmail.com

Abstract

In recent years, infections caused by gram-negative organisms that produce carbapenemase enzymes (CPO) have become one of the global health challenges and concerns. Rapid and accurate identification of gram-negative organisms that produce the carbapenemase enzyme can be effective in controlling infectious diseases and their timely treatment. Over the years, an increasing number of phenotypic methods have been developed to rapidly detect the activity of gram-negative carbapenemases. However, there is no single phenotypic method that has 100% sensitivity and specificity and contains all the characteristics of an ideal test for the detection of carbapenemase enzymes. The choice of an appropriate methodological approach depends on various factors such as epidemiological status, laboratory resources, and the availability of other confirmatory tests. According to what has been studied in this research, there are user-friendly, cost-effective, accurate, and applicable tests in clinical microbiology laboratories. In this review study, various phenotypic methods have been evaluated for detecting carbapenemase activity in gram-negative bacteria.

Key words: Carbapenemase, Enterobacteriaceae, Beta-lactam, antibiotic resistance

Acknowledgement: There is no conflict of interest