www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences
Vol. 65, No.1, P: 148-171
Apr-May 2022

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۵، شماره ۱
فروردین- اردیبهشت ۱۴۰۱، صفحه ۱۷۱-۱۴۸

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

مهرداد محمدی [۱*]
معصومه بیگ [۲]
کیمیا باریک رو [۳]
سیما سلطانی [۴]
لیلا علی نسب مالکی [۴]
پارسا ویسی [۴]
سمانه تیموری [۵]

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

Email:
mehrdad.mohammadi1984@gmail.com

خلاصه

در سال های 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 آزمایش های تأییدی بستگی دارد. مطابق با انچه در این تحقیق بررسی شده است، تست های کاربرپسند، مقرون به صرفه، دقیق و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های میکروب 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 آنتی بیوتیکی

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

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 باکتری‌های‌گرم منفی در برابر کارباپنم‌ها، تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده کارباپنم‌ها همچون MBL[1] و KPC[2]، حضور AmpCs بتالاکتاماز (کروموزومی یا اکتسابی) و بتالاکتامازهایی با طیف گسترده (ESBL)[3] همراه با مکانیسم‌های دیگر مانند جهش‌های پورین، افزایش بیان سیستم‌های افلاکس‌پمپ یا تغییرات پروتئین‌های‌متصل‌شونده به پنی‌سیلین (PBPs)[4] می‌باشند.(۲) تولید آنزیم‌های‌کارباپنماز 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 غالبا روی عناصر متحرک ژنتیکی مختلف می‌باشند، نوعی مقاومت پایدار و قابل انتقالی را ارائه می دهند که امکان انتشار از طریق گسترش کلونال و یا انتقال افقی ژن‌ها به باکتری‌های‌دیگر فراهم کرده که باعث گسترش مقاومت در میان باکتری‌های گرم منفی می‌شود (جدول ۱) (۳).

جدول۱ . کارباپنمازهای اصلی در *انتروباکتریاسه*

کلاس آمبلر	کارباپنماز	پروفایل هیدرولیز انترباکتریاسه					مهارکننده
		پنی‌سیلین	سفالوسپورین نسل ۱ و ۲	سفالوسپورین نسل ۳ و ۴	مونوباکتام	کارباپنم ها	
A	KPC,GES.	+	+[a]	+	+[b]	+	بورونیک اسید
B	IMP,VIM,SPM,NDM	+	+	+	-	+	EDTA,DPA
C	CYM10	+	+	+	-	W	بورونیک اسید، کلوگزاسیلین
D	OXA48 و واریانت ها	+	+	–[c]	+-	+	مهارکننده خاصی ندارد

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، سفالوسپورین های طیف گسترده را هیدرولیز می‌کنند.

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[5] و انواع کارباپنمازهای درگیر، در میان کشورها متفاوت است. این در حالی است که KPC، کارباپنماز غالب جدا شده در 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،

[1] metallo-β-actamase
[2] Klebsiella pneumoniae carbapenemase
[3] extended spectrum beta-lactamase
[4] Penicillin-binding proteins
[5] Carbapenemase-producing Enterobacterales
[6] Verona Integron-Enconded Metallo-beta-lactamase

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 حضورکارباپنمازها 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 میکروب‌شناسی بالینی مناسب نمی‌باشد.(۶) علاوه بر این، با استفاده از روش‌های مولکولی شناسایی CPE، فقط ژن های 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 ازآنزیم‌های 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 هیدرولیزکارباپنم 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 هوچ اصلاح شده [1](MHT)، E test، و روش غیرفعال سازی کارباپنم [2](CIM)، سنجش‌های ایمونوکروماتوژن، روش‌های هیدرولیز کارباپنم یونیزاسیون لیزر با استفاده از لیزر ماتریس زمان طیف سنجی پرواز (MALDI-TOF MS^3) 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 روش های با حساسیت بالا برای تشخیص جدایه تولید بتالاکتاماز هستند. روش غیر فعال سازی کارباپنم (CIM) یا نسخه اصلاح شده آن [4](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 [5](DDST) با استفاده از مهار کننده‌های خاص بتالاکتاماز، محیط کشت کروموژنیک، سنجش‌های فعالیت هیدرولیزکارباپنم (تغییر PH، طیف‌سنجی یا آزمایش‌های الکتروشیمیایی) یا سنجش های 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 می شوند. (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

[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

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 آنتی بادی‌های 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 تصمیم گیری درمانی و هم برای کنترل عفونت مهم می‌باشد(۱۳).

ملاحظات دیگر شامل باکتری‌هایی که باید آزمایش شوند، (به عنوان مثال، *انتروباکتریاسه* 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. آزمایش های 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 شناسایی کند، اما امکان تمایز سرین و متالوکارباپنماز را به موازات افزودن شلاته کننده کاتیونی دو ظرفیتی مانند EDTA، EDTA-mCIM (eCIM) را فراهم می‌کند. بعنوان یک رویکرد برای شناسایی گروه خاص کارباپنماز، سنجش‌های ایمنی جریان جانبی چندگانه (LFIA[1]) 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 EDTA[2] 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 ویژگی ها، 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 آنتی بیوتیک (دیسک دیفیوژن)، تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC[3]) به روش‌های میکروبراث دایلوشن، رقت سازی در آگار (آگاردایلوشن) و E-test، و چندین سیستم خودکار تجاری همچون سیستم‌های VITEK،

[1] lateral flow immunoassay
[2] Ethylenediamine tetraacetic acid
[3] minimum inhibitory concentration

سیستم میکروب‌شناسی خودکار Phoenix MicroScan و سیستم‌های BD Diagnostics، Microscan WalkAway می‌باشند (۱۶). دستیابی دقیق به نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی به داروهای کارباپنم به کمک روش‌های تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، اغلب در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی چالش برانگیز است. مطابق با دستورالعمل CLSI[1] نقطه انفصال (breakpoints) برای آنتی‌بیوتیک ایمی‌پنم (IMP) در ۴≤ میلی‌گرم/میلی لیتر مقاوم، و برای مروپنم و ارتاپنم (ETP[2]) به ترتیب در ۱ ≤ و ۰,۵≤ میلی‌گرم/ لیتر حساس می‌باشد (۱۷). روش MIC به تنهایی برای تشخیص جدایه‌های مولد آنزیم کارباپنماز اختصاصیتی ندارد. مطابق با CLSI روش‌های دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوشن جهت شناسایی جدایه‌های مولد آنزیم کارباپنماز روش‌های مطمئن می‌باشند و زمان انکوباسیون برای روش‌های مذکور۲۴-۱۸ ساعت می‌باشد. مطابق با دستورالعمل CLSI، میزان MIC[3] برای MEM[5], IMP[4] و ETP در *انتروباکتریاسه* به ترتیب ۴-۲، ۴-۲ و ۲ میکروگرم/ میلی‌لیتر است. قطر هاله‌ی عدم رشد به روش دیسک دیفیوژن برای ETP و MEM ۲۱≤ 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 Pheonix به صورت گسترده‌ای در مراکز درمانی و آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی استفاده می‌شود. سیستم‌های خودکار به طور معمول ازکدورت سنجی و یا فلورسنت استفاده می‌کنند، هرچند که برای تشخیص آنزیم KPC اختصاصی نیستند، با این حال بسیاری از سیستم‌های خودکار توانایی شناسایی جدایه‌های مولد KPC حساس به MEM را دارند. سیستم VITEK در سال ۱۹۸۰ معرفی گردیدکه 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 دایلوشن و E-TEST[6]، جدایه‌هایی با مقاومت کمتر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم را تشخیص دهد. سیستم خودکار Pheonix 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 Pheonix، ۲ میکروگرم/میلی‌لیترمی‌باشد. 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 کارباپنماز توسط روش‌های مبتنی بر کشت

۲-۱- روش‌های پلیت کروموژنیک

در حال حاضر محیط‌های غربالی که توانایی شناسایی انواع کارباپنماز با حساسیت و اختصاصیت بالا داشته باشد، وجود ندارد. شناسایی سریع باکتری‌های مولد کارباپنماز 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 کارباپنماز مانند محیط‌های کشت شامل TSA[7] یا مک کانکی حاوی ۱۰ میکروگرم کارباپنم و محیط‌های کشت کروموژنیک وجود دارند(۲۱). در حال حاضر روش

[1] Clinical and Laboratory Standards Institute
[2] ertapenem
[3] Minimal inhibitory concentration
[4] imipenem
[5] Meropenem
[6] Epsilometer test
[7] Trypticase soy agar

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 ۲۴-۱۸ 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 CARBA ™ ،ChromID ESBL، CARBA SMART (bioMerieux) OXA48، Brillance ™ CRE ، Colorex KPC، CHROMagar KPC ، Remel Spectra ™ CRE (Remel)، RambaCHROM KPRO CRE (Gibson Biobson) تجاری شده اند. محیط CHROMagar KPC معرفی شده اند 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 محیط ها 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، 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. اخیرا محیط‌های جدید برای شناسایی جدایه‌های مولد کارباپنماز با حساسیت بالا گسترش یافته اند(۲۵). از جمله مزایای این محیط‌های کشت، به کارگیری راحت برای استفاده روزمره در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی 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 وGES-6 درمیان *Enterobacteriaceae* که رشد آنها در محیط‌های خاص کارباپنماز پشتیبانی نشده، دارای ارزش می‌باشد(۲۶).

۳) روش‌های مبتنی بر مهار کننده‌ها

آزمایشات مبتنی بر بازدارنده به توانایی برخی از ترکیبات برای مهار فعالیت آنزیم‌های کارباپنماز مانند اسید اتیلن دی آمین ترا استیک (EDTA)، اسید دی پیکولینیک (DPA) یا اسید فنیل بوریک (PBA) متکی هستند. EDTA و DPA (عوامل شلاته‌کننده) سبب مهار فعالیت آنزیمی MBL وهمچنین PBA باعث مهار آنزیم KPC می‌شوند. با توجه به اینکه PBA باعث مهار سایر بتالاکتامازها مانند AmpC بتالاکتامازمی‌شود، از کلوکساسیلین (یک مهار کننده AmpC بدون فعالیت علیه KPC و سایر کارباپنمازهای 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 شده‌است(۲۵). مقاومت به تموسیلین را می‌توان در میان باکتری‌های مولد MBL و توسط باکتری‌هایی که KPC بیان می‌کنند یا حتی فاقد هرگونه کارباپنماز هستند، مشاهده کرد. همانطور که تولید آنزیم OXA-48 مقاومت بالایی را به ترکیبات تموسیلین می‌دهد، بیانگرعدم 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 آویبکتام (یک مهار کننده غیر بتالاکتاماز کلاس A، C و برخی از کارباپنمازهای D) برای تشخیص بهتر آنزیم‌های OXA-48 همراه شود. همانطور که اشاره شد، همچنین می‌توان از پیپراسیلین-تازوباکتام در ترکیب با تموسیلین برای شناسایی تولیدکنندگان OXA-48 استفاده کرد. سنجش‌های مبتنی بر مهارکننده نه تنها شواهدی از تولید کاربا پنماز ارائه می‌دهند، بلکه امکان ایجاد تمایز بین کلاس‌های مختلف کارباپنماز را نیز فراهم می‌کنند. همچنین، گزارش شده که به دلیل پدیده سوارمینگ، تفسیر نتایج در پروتئوس و باکتری‌های مرتبط مشکل ساز است(۲۹).

۳-۱- نوار :Etest

۳-۱-۱- نوارهای انتشار شیب دار

چندین قالب نوار انتشار شیب دار برای تشخیص کارباپنمازها، به ویژهMBL ها طراحی شده است. روشETEST-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 برایMBL یا بورونیک اسید برایKPC) است و به طورجداگانه MBL و KPC را تشخیص می‌دهد. نوارهای Etest® MBL IP / IPI (bioMerieux)حاوی دو طرف، با هفت رقت ایمی‌پنم (۲۵۶-۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ایمی‌پنم (۶۴-۱ میکروگرم در میلی لیتر) همراه با غلظت ثابت EDTA است. نوارهای MBL MP / MPI،(bioMerieux) France شامل غلظت افزایشی مروپنم (۸-۰,۱۲۵ میکرو گرم در میلی لیتر) در یک طرف و مروپنم (۲-۰,۰۳۲ میکروگرم گرم / میلی لیتر) با EDTA (غلظت ثابت) در طرف‌دیگر است. MIC هر دو طرف نوار پس از انکوباسیون به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۵درجه‌سانتی‌گراد خوانده می‌شود. به دنبال دستورالعمل‌های سازنده، کاهش ۳ رقت دو برابری MIC کارباپنم 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

تفسیر می شود. نوارهای حاوی مروپنم در تشخیص تولیدکنندگان MBL کارآیی بیشتری نسبت به نوارهای حاوی ایمی‌پنم 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 کارباپنم (MIC ۴ ≤) حساسیت ندارد. به دلیل وجود نقایص این تست برخی از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی از روش‌های جایگزین مانند آزمایشهای دیسک ترکیبی (CDT) و هم افزایی دیسک ترکیبی(DDSTs) استفاده می کنند. **(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 کارباپنم 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 کارباپنم (در بیشتر شرایط مروپنم یا ایمی پنم) در مقایسه با منطقه مهار تولید شده توسط یک دیسک حاوی ترکیبی از کارباپنم و یک مهار کننده می‌باشد. پس از انکوباسیون شبانه سویه آزمایش شده بر حسب میلی متر اندازه‌گیری می شود. در حال حاضر برخی از آزمایشهای دیسک ترکیبی مانند کیت تأییدی KPC + þMBL(Rosco Diagnostica) یا مجموعه دیسک تشخیص کارباپنماز MASTDISCS (MAST Diagnostics) تجاری شده‌اند. معیارهای مختلف تفسیر قطر منطقه توسط تولید کنندگان مختلف استاندارد شده‌اند که به نوع کارباپنماز و روش در نظر گرفته‌شده مربوط می‌شوند. مطالعات انجام شده برای شناسایی *Enterobacteriaceae* مولد کارباپنماز خصوصاً برای تشخیص کارباپنماز 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 + þMBL ، یافت شده است(۳۰).

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

آزمایش هم افزایی دیسک ترکیبی، روش فنوتیپی است که می‌تواند بین برخی از انواع کارباپنمازها تفاوت ایجاد کند. اساس این روش‌ها، هم‌افزایی بین‌مهارکننده‌های بتالاکتاماز و کارباپنم‌ها می‌باشد. این مهارکننده‌ها شامل اسیدهای بورونیک مهارکننده KPC، اسید دیپیکولینیک (DPA) یا اسید اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک(EDTA) مهارکننده MBL،کلاولانات مهارکنندهESBL، کلوکساسیلین مهار کنندهAmpC و آویباکتام(NXL104) مهارکننده OXA-48 هستند. تعدادی آزمایش چند دیسک فنوتیپی برای شناسایی و تمایز انواع مختلف کارباپنمازها مانند دیسک‌های تشخیص ترکیبی بازدارنده Mastdiscs ID (MDI)، تجاری‌سازی شده‌است. این روش توسط Mast Diagnostics برای شناسایی کارباپنمازها 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 فنوتیپی جدید، تست دیسک OXA-48، برای تمایز کارباپنماز OXA-48 از دیگر کلاس‌های کارباپنماز، ارائه شده‌است. این تست عملکرد بسیار خوبی برای تشخیص OXA-48 با حساسیت ۹۶/۳٪ دارد. آزمایشهای هم‌افزایی دیسک ترکیبی به دلیل سادگی و

[1] Combination disc test

[2] double-disk synergy tests

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

٤) روش‌های مبتنی بر هیدرولیز کارباپنم

٤-۱- آزمایش هوچ تغییر یافته (MHT)

یک آزمایش فنوتیپی ساده برای تشخیص آنزیم‌های کارباپنماز در میان جدایه‌های *انتروباکتریاسه* و *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. این آزمایش به توانایی سویه‌ی تولید کننده کارباپنماز در کاهش غلظت کارباپنم و امکان رشد یک سویه‌ی اشریشیاکلی حساس به کارباپنم بستگی دارد. MHT توسط CLSI از سال ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۷ به عنوان یک آزمایش تأییدکننده برای کارباپنمازها توصیه شده‌است و قابلیت تشخیص تولیدکنندگان KPC را دارد. به همین‌دلیل از آن در بسیاری از آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی استفاده می‌شود. همچنین از نظر تشخیص انواع دیگر کارباپنمازها از جمله VIM، IMP و OXA-48 از حساسیت خوبی برخوردار هستند(۳۲). با این حال، MHT دارای حساسیت کم به سایر کارباپنمازها مانند NDM، MBL، برخی از انواع OXA و SME می‌باشد. علاوه بر این، MHT در شناسایی برخی از جدایه‌های مولد AmpC همراه با جهش‌های پورین، نتایج مثبت کاذب دارد. می‌توان این تست را بدون نیاز به ماده خاصی، مطابق با دستورالعمل CLSI به راحتی انجام داد. با این حال، روشMHT معایب عمده‌ای دارد از جمله عدم ایجاد تفاوت بین انواع کارباپنماز، دشوار و زمان‌بر بودن تفسیر نتایج و نیاز زمانی حداقل به ۴۸-۲۴ ساعت، فاقد اختصاصیت (نتایج مثبت کاذب برای تولیدکنندگان سطح بالا AmpC یا تولیدکنندگان ESBL از نوع CTX-M و هم در گونه‌های *Enterobacter* گزارش شده) و هم حساسیت (تشخیص ضعیف آنزیم های NDM) می‌باشد. بنابراین توصیه می شود، نتایج مثبت یا مبهم، به ویژه در مناطقی که جدایه‌های مولد ESBL شیوع دارد، توسط آزمایش‌های جایگزین تأیید شوند(۸).

٥) سنجش ید نشاسته

اخیرا آزمون ید نشاسته بر اساس هیدرولیز کارباپنم تجاری شده است. به طور خلاصه این تست شامل نوارهای آغشته به ایمی‌پنم و نشاسته است که با سویه‌ی مورد مطالعه تلقیح شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه و در مرحله‌ی بعد یک محلول ید اضافه شده و می‌توان نتایج را پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق گزارش کرد. تغییر رنگ از تاریکی به روشنی و وضوح، نشان دهنده‌ی وجود کارباپنماز است. Della valle و همکاران حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ در شناسایی *انتروباکتریاسه*های مولد کارباپنماز را گزارش کرده‌اند. با این وجود، مطالعاتی جهت ارزیابی کاربرد این تست در تشخیص انواع کارباپنماز نیاز است(۳۳).

٦) روش‌های رنگ سنجی

روش‌های رنگ سنجی بر اساس هیدرولیز آنزیمی حلقه‌ی بتالاکتام در حضور فعالیت کارباپنماز می‌باشد که منجر به کاهش PH و متعاقبا تغییر رنگ نشانگر PH (فنول رد برایCARBANP، یا برموتیمول بلو برای BLU-CARBA) می‌شود. از مهمترین مزایای این روش دستیابی سریع به نتایج (کمتر از۲ ساعت)، سادگی و کاربرد راحت است. علاوه بر این در مطالعه‌ای Dortet و همکاران امکان کاربرد روشCarbaNP به صورت مستقیم از کشت‌های 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. اخیرا این تست ها به صورت تجاری تحت عنوان RAPIDIC CARBANP, Rapid CARB Screen, NEO-RAPIDCARB RAPIDCARBBLU KIT, نامگذاری شده‌اند (۳۴).

٦-۱- آزمون Crba NP و انواع آن

در دهه‌های 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. CNPt با استفاده از فنل رد به عنوان نشانگر pH فعالیت‌های آنزیمی را مستقیماً تشخیص می‌دهد. هنگامی که ایمی‌پنم توسط کارباپنماز هیدرولیز

[1] Hodge Modified Test

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 درعصاره‌های باکتریایی، کارباپنمازها را بر اساس تغییرات رنگ ایجاد شده، طی ۲ ساعت تشخیص می‌دهد. هیدرولیز ایمی‌پنم منجربه 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 CarbaNP برای کارباپنمازهای OXA-48، به طور قابل توجهی پایین‌تر 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 از۰٫۰۲٪ بافر ستیل تری‌متیل آمونیم بروماید 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 *انتروباکتریاسه* برای تشخیص آنزیم‌های کارباپنمازی انجام شد، روش CLSI Carba NP دارای حساسیت ۸۴٪ واختصاصیت۱۰۰٪ 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٪ به ۷۱٪ افزایش یافته و دریافتند که جدایه‌های موکوئیدی 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 B و Dدر ۳۰ جدایه‌ی *سودوموناس آئروژینوزا* و ۳۰ جدایه‌ی *اسینتوباکتر بومانی* مورد استفاده قرارگرفت. 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 *اسینتوباکتر 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 *اسینتوباکتر 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 *اسینتوباکتر بومانی* نگران کننده است. کارباپنمازهای نوع OXA که در میان سویه‌های اسینتوباکتر بومانی مقاوم به کارباپنم، مشترک می‌باشند، در هیدرولیز حلقه‌ی بتالاکتام آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم ناکارآمد هستند. MIC های افزایش یافته‌ی کارباپنم که در سویه‌های *اسینتوباکتر 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

پایین غشای خارجی این باکتری‌ها، از فعالیت آزمایش Carba NP که متکی بر لیز سلول و انتشاربعدی کارباپنمازها برای تشخیص تغییرات‌رنگ است، جلوگیری می‌کند. آزمون CarbAcineto NP برای غلبه بر تعدادی از موانع مرتبط با تشخیص کارباپنمازهای تولید شده توسط اسینتوباکتر 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 کارباپنماز اکتسابی مشترک در مجموعه ای از ۱۵۱ جدایه‌ی *اسینتوباکتر بومانی* مولد کارباپنماز، به ویژه کارباپنمازهای OXA-23، OXA-40، OXA-58 و OXA-143، ۱۲٪ بود. در حالی که آزمایش CarbAcineto قادر به تشخیص تمام این کارباپنمازهای اکتسابی بود هرچند ناسازگاری با توانایی CarbAcineto در تشخیص کارباپنمازها مانند OXA-51 مشاهده شده است. ژن‌های blaOXA-51 به صورت کروموزمی اینتگره شده، و آنزیم‌های OXA-51 در غیاب توالی ISAba1 در انتهای ۵/ ژن BlaOXA-51، فعالیت ضعیفی برای هیدرولیز آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم دارند. به طور کلی، آزمون CarbAcineto دارای حساسیت ۹۵٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ برای تشخیص کارباپنمازهای مشترک در جدایه‌های *اسینتوباکتر بومانی* می‌باشد (۳۹). به دلیل اینکه محلول‌های حاوی ایمی‌پنم حداکثر ۷۲ ساعت ماندگاری دارند، انواع نسخه‌های دستی آزمایش Carba NP به آماده سازی مکرر معرف نیاز دارند. سایر سنجش‌های موجود در بازار با استفاده از اصول مشابه آزمایش Carba NP مانند آزمایش(bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) the Rapidec Carba NP, the Neo-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 کارباپنماز 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 کارباپنم از نوارهای آغشته به ۱۰۰ میکروگرم ایمی‌پنم و نشاسته است. در ابتدا، جدایه‌ها در یک میلی‌لیتر محیط مایع مولر-هینتون با pH= ۷/۳ به حالت معلق درآمده که برای جدایه‌های تولید کننده کارباپناماز، نوارها براق شده و رنگ از بین می‌رود. در صورت تداوم رنگ تیره، پیشنهاد می‌شود که ماده بدون کارباپنماز باشد. زمان مطالعه تقریباً ۳۰ دقیقه بود. علاوه بر این، جدایه های مثبت برای تولیدMβL ، اغلب توسط تست carbapenembac-methalo آزمایش شدند، بدین ترتیب که تلقیح در مقیاس ۱۰ مک فارلند در

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

٦-٣-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 کارباپنماز در *انتروباکتریاسه* به ترتیب ۱۰۰٪ و ۱۰۰ -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 بروموتیمول‌بلو به دلیل محدوده‌ی pH مطلوب (۶-۷) به عنوان اندیکاتور برای بیشتر بتالاکتامازها (pH۶/۸) استفاده می‌شود. در این تست از یک ایمی‌پنم تجاری و در دسترس (Tienam ؛ Merck Sharp & Dohme؛France 500) بعنوان سوبسترای کارباپنمازها استفاده می‌شود. محلول آزمایش شامل یک محلول بروموتیمول‌بلو ۰/۰۴٪ تنظیم شده در pH=۶، ۰/۱ میلی مول در لیتر ZnSO4 و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایمی‌پنم 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-هینتون به طور مستقیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول‌های تست و کنترل منفی در یک صفحه میکروتیتر ۹۶ چاهکی معلق شده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انکوبه می‌شود. جدایه‌های مولد کارباپنماز درمحلول‌های آزمون و کنترل منفی، به ترتیب زرد در مقابل آبی، زرد در مقابل سبز یا سبز در مقابل آبی می‌باشند، درحالیکه جدایه‌های کارباپنماز منفی روی هر دو محلول، آبی یا سبز باقی می‌مانند. تمام تولیدکنندگان غیرکارباپنماز (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 کارباپنمازها زمان های مختلف مورد نیاز است. به عنوان مثال، KPC یا MBL در ۳۰ دقیقه اول در مقابل بیشتر آنزیم‌های نوع OXA در ۱ ونیم ۲ ساعت. علاوه بر این، میزان تلقیح زیاد باکتری منجر به تغییر رنگ واضح‌تری برای انواع گونه‌های *اسینتوباکتر* مولد OXA می‌شود. از مزایای آزمون Blue-Carba ، حساسیت و اختصاصیت بالای این تست (۱۰۰٪) مشابه Carba NP جهت شناسایی جدایه‌های مولد کارباپنماز، 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 ارزان تر از فرمول مونوهیدرات ایمی‌پنم) و قابلیت پخش بافر استخراج (بافر ۲)، جهت بدست آوردن عصاره ی باکتریایی و اعتبارسنجی آزمایش برای تشخیص کارباپنمازهای نوع OXA که معمولاً در گونه‌های *اسینتوباکتر* حضور دارند، می‌باشد. Blue-Carba یک روش سریع، راحت و ارزان جایگزین Carba NP است که امکان شناسایی فعالیت کارباپنماز را مستقیماً از کشت‌های باکتریایی گونه‌های *انتروباکتریاسه*، *سودوموناس* و *اسینتوباکتر* می‌دهد (۴۱).

٦-٤- روش NitroCarba

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

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 میکرولیتربافر 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 میلی‌لیترآب مقطر (شاهد)، ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیترایمی پنم (IPM) (200 میکروگرم در میلی‌لیترمروپنم (MEM) یا ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیترارتاپنم (ETP) اضافه می‌شود. به دنبال انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، ۵۰ میلی‌لیتراز ۱گرم 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 کارباپنم و هم در چاهک‌های حاوی آب به عنوان تولید کارباپنماز در نظر گرفته می‌شود. عدم وجود هرگونه تغییر رنگ (عدم هیدرولیز نیتروسفین) در چاهک‌های حاوی کارباپنم یا چاهک‌های حاوی آب، نشان دهنده‌ی عدم تولید کارباپنماز یا عدم تولید بتالاکتاماز می‌باشد. حساسیت برای هر سه کارباپنم 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 کارباپنم می‌باشد، که امکان مشاهده‌ی سریع نتایج را در ۱۲-۱۰ دقیقه فراهم می‌کند (۴۵).

٦-٥-روش Ngtest carba

شناسایی جدایه‌های مولدکارباپنماز 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 کارباپنماز (CPE) از کشت خون ارزیابی شده است. بنابراین، شناسایی کارباپنمازها به کمک این روش ممکن است به بهینه‌سازی سریع درمان عفونت‌های جریان خون ناشی از CPE کمک کند. این تست، پنج خانواده کارباپنماز(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 تشخیص۱۰۰٪ جدایه‌های مولد KPC، IMP ، OXA-48، ۹۰٪ VIM و ۹۵/۵٪ NDM را می‌دهد (۴۶).

٦-٦-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 کارباپنماز انجام گرفت (۴۷). به طور خلاصه در این روش پس از جداسازی باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف و شناسایی جدایه‌های مولدکارباپنماز توسط روش‌های مولکولی، سوسپانسیون‌های باکتریایی مقطر تهیه وغلظت 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 لایه‌های‌کنترل 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

دوربین موبایل عادی گرفته شده و تصاویر با استفاده از نرم افزار ImageJ به شدت‌کانال 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 وکلنی‌های باکتریایی که در محیط کشت آگار تازه رشد کرده‌اند در ddH2O استریل‌شده 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 داده ها با استفاده از یک الگوریتم پیگیری متلبMatlab برای استخراج ردیابی‌های منفرد حرکت باکتری‌ها قبل و بعد از افزودن مقادیر مختلف ایمی پنم مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. در حالی که آزمایشCarbaNPtest (CNPt) یک روش رنگ سنجی محبوب و ساده برای تشخیص فعالیت کارباپنماز می‌باشد، کاربرد بالینی آن به دلیل کمبود اطلاعات در مورد تغییرات رنگ وابسته به زمان و دوز، حساسیت ضعیف در شناسایی برخی گروه‌های کارباپنماز و تفسیر رنگی، محدود می‌شود(۴۸). برای پرداختن به این موارد، مطابق با روش On-chip Carba NP test یک دستگاه میکروسیال چند منظوره (۱۲۸۰ اتاق) ایجاد شده که قادراست به طور خودکار ۱۶ شیب غلظت باکتری تولیدکند 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. ویژگی توان عملیاتی بالای On-chip Carba NP test باعث می‌شود چندین جدایه‌ی باکتریایی به طور همزمان بر روی یک تراشه مورد بررسی قرارگیرد. این تست قادر به تشخیص دقیق‌کارباپنمازهایNDM-1، KPC و OXA-48 با حساسیت، اختصاصیت، انتخاب‌پذیری و تکرارپذیری بالا می‌باشد. با توجه به گسترش سریع پاتوژن‌های مولد OXA-48 در کلینیک‌ها، توانایی On-chip 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 میکروب‌شناسی بالینی تسهیل کند. علاوه بر این، ثابت شده است که پروفایل‌های تغییر رنگ، خاص هر باکتری می‌باشد. همچنین On-chip 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 آنتی بیوتیکی می‌باشد (۴۹).

۷) روش غیر فعال سازی کارباپنم (CIM)

روش غیرفعال سازی کارباپنم (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 دیسک‌های‌کارباپنم (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 کارباپنم تلقیح می‌شود. عدم وجود یک منطقه‌ی مهاری بزرگ، نشان دهنده‌ی غیر فعال شدن دیسک مروپنم توسط باکتری مولد کارباپنماز می‌باشد. اگر دیسک مروپنم هنوز فعال باشد، می‌توان یک منطقه روشن را در اطراف دیسک مشاهده کرده که نشان‌دهنده‌ی عدم تولید کارباپنماز توسط باکتری

[1] carbapenem inactivation method

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 کارباپنماز در بین جدایه‌های بالینی *انتروباکتریاسه* می‌باشد. این مطالعات همچنین گزارش کرده اند 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 کارباپنم اصلاح شده(mCIM)

از روش اصلاح شده غیر فعال کردن کارباپنم (mCIM) برای تشخیص تولید کارباپنماز 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 کارباپنمازهای کلاس MBL از دیگر کلاس‌های کارباپنمازی استفاده کرد. (۵۲)

۹) روش کارباپنماز سریع (rCDM[2])

Rapid Carbapenemase Detection Method (rCDM) روش جدید برای شناسایی سریع و دقیق آنزیم‌های کارباپنماز بر اساس غیرفعال کردن کارباپنم می‌باشد. rCDM دارای طیف شناسایی وسیع بوده و قادر به تشخیص سویه‌های *انتروباکتریاسه* و *سودوموناس آئروژینوزا* مولد کارباپنماز در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی می‌باشد. در مقایسه با سایر روش‌های شناسایی فنوتیپی کارباپنماز، 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 کارباپنماز استفاده می‌شوند.

۱۰-۱-UV اسپکتروفتومتری: برخی محققان این روش را روش مرجع جهت شناسایی باکتری‌های مشکوک به تولید آنزیم‌های کارباپنماز دانسته‌اند. این تکنیک امکان شناسایی جدایه‌های مولد IMP, VIM, SIM، کارباپنمازهای‌کلاس D و همچنین NDM را فراهم می‌سازد. نوع آنزیم کارباپنماز را می‌توان از داده‌های هیدرولیز در حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها استنباط کرد. Bernabeu و همکاران روش اسپکتروفتومتریuv را بر اساس تجزیه و تحلیل هیدرولیز ایمی‌پنم با حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۸,۵٪ توصیف کردند. دورتت 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 آنزیم‌های‌کارباپنماز توسعه یافته‌اند. بسیاری از این روش‌ها حضورمحصولات هیدرولیز شده را شناسایی کرده اما نمی‌توانند غلظت آنها را اندازه

[1] Modified carbapenem inactivation method
[2] Rapid Carbapenemase Detection Method

بگیرند و ارزیابی کمی فعالیت کارباپنمازی 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 کارباپنماز نسبت به کارباپنم‌ها مقاومت دارند از جدایه‌هایی که از طریق مکانیسمی به غیر از کارباپنماز به کارباپنم مقاوم هستند را تشخیص دهد.(۵۴) اخیرا روش MALDI-TOF MS معرفی شده که به طور فزاینده‌ای در آزمایشگاه‌های معمول برای شناسایی باکتری‌ها و قارچ ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در شناسایی فعالیت کارباپنماز از سال ۲۰۱۱ با نتایج امیدوار کننده گزارش شده‌است. 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 کارباپنمازهای کلاس A وB را امکان‌پذیر می‌سازد. مطالعات مختلف حساسیت و اختصاصیت این روش را به ترتیب، ۱۰۰-۷۷٪ و ۱۰۰-۹۴٪ گزارش کرده‌اند. با توجه به مطالعات انجام گرفته روش MALDI-TOF MS برای شناسایی کارباپنمازهای کلاس A (KPC2 و GES-5) و B (NDM-1, VIM-1, SPM-1, IMP-1, IMP-10, GIM-1) دارای حساسیت و اختصاصیت۱۰۰٪ می‌باشد. سنجش MALDI-TOF نسبت به دیگر روش‌های شناسایی کارباپنماز مانند MHT حساسیت و اختصاصیت بالایی جهت شناسایی VIMM2, IMP6, KPC1, NDM1, SIM1 و OXA23 وOXA51 *کلبسیلا پنومونیه*، *سودوموناس آئروژینوزا* و گونه‌های *اسینتوباکتر* دارد. نتایج منفی کاذب عمدتا در تولید کنندگان OXA-48 گزارش شده است. Papagiannitsis و همکاران نشان دادند که افزودن NH4HCO3 به بافرواکنش منجر به بهبود در تشخیص 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 کارباپنماز می‌باشد(۵۶).

از جمله معایبی که می توان ذکر کرد:

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

۱۱) روش الکتروشیمیایی:

اخیرا Bogaerts و همکاران برای شناسایی *انتروباکتریاسه* مولد کارباپنماز یک روش الکتروشیمیایی (Bogaerts-Yunus Glupczynski)BYE carba test توصیف کردند. این روش مبتنی بر تشخیص نوسانات هدایت الکترود است که به pH و تغییرات فعالیت ردوکس پس از هیدرولیز ایمی‌پنم توسط یک کارباپنماز بسیار حساس است. تغییرات امپرانس الکتروشیمیایی اندازه‌گیری شده و

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

۱۲) ایمنوکروماتوگرافی:

روش ایمنوکروماتوگرافی (IC) بر اساس واکنش Ag-Ab بوده و اخیرا به دلیل شناسایی آسان و سریع (کمتر از ۲۰ دقیقه) کارباپنمازهای خاص تجاری شده‌اند. اطلاعات منتشر شده ارزیابی این تست نتایج امیدوار کننده‌ای 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 ایمنوکروماتوگرافی IMP MBL یافتند (۹).

۱۲-۱- روش ایمنی سنجی لترال (LFIA):

روش‌های مبتنی بر آنتی بادی برای شناسایی وجود کارباپنمازها هستند که به طور کلی امکان شناسایی یک یا چند مورد از مهم ترین کارباپنمازها را از نظر اپیدمیولوژیک فراهم می‌کنند. LFIA کارباپنمازهای IMP, NDM, KPC, OXA-48, را در طی ۱۵ دقیقه شناسایی می‌کند. روش LFIA با هدف قراردادن پنج خانواده اصلی کارباپنماز (به عنوان مثال، KPC، NDM، VIM، IMP و کارباپنمازهای OXA-48) ارزیابی شده است. به طور خلاصه، در این روش بعد از کشت باکتری بر روی محیط مولرهینتون، 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 کارباپنم‌ها به عنوان آخرین آنتی‌بیوتیک برای درمان عفونت های ناشی از CRE و بدلیل محدود بودن گزینه های درمانی، یک نگرانی اساسی برای سلامتی است. تشخیص سریع حضور کارباپنمازها در *Enterobacteriaceae* می‌تواند برای انتخاب آنتی‌بیوتیک و کنترل عفونت مفید باشد (۱۷). اگرچه روش‌های مختلفی ایجاد شده اند، 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 گونه های مختلف می‌باشد(۵۰). روش‌های فنوتیپی، MHT به عنوان روش استاندارد طلایی برای تشخیص باکتری‌های تولید کننده کارباپنماز 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 تولید کنندگان KPC و OXA-48 مفید باشد .مقاومت در برابر عوامل کارباپنم به دلیل وجود کارباپنماز و وجود مکانیسم‌های مقاومت دیگر مانند ESBL ها، جهش‌های پورین و یا وجود پمپ های خروجی است (۵۹). در حال حاضر، آزمون استاندارد eCIM یک روش ساده و ارزان برای افتراق فعالیت سرین و متالوبلاکتاماز در انتروباکترالها است (۶۰). توانایی iCIM برای تشخیص کارباپنماز در انتروباکترالها با حساسیت بالا (۱۰۰٪) و ویژگی (۹۸٪) است (۶۱).

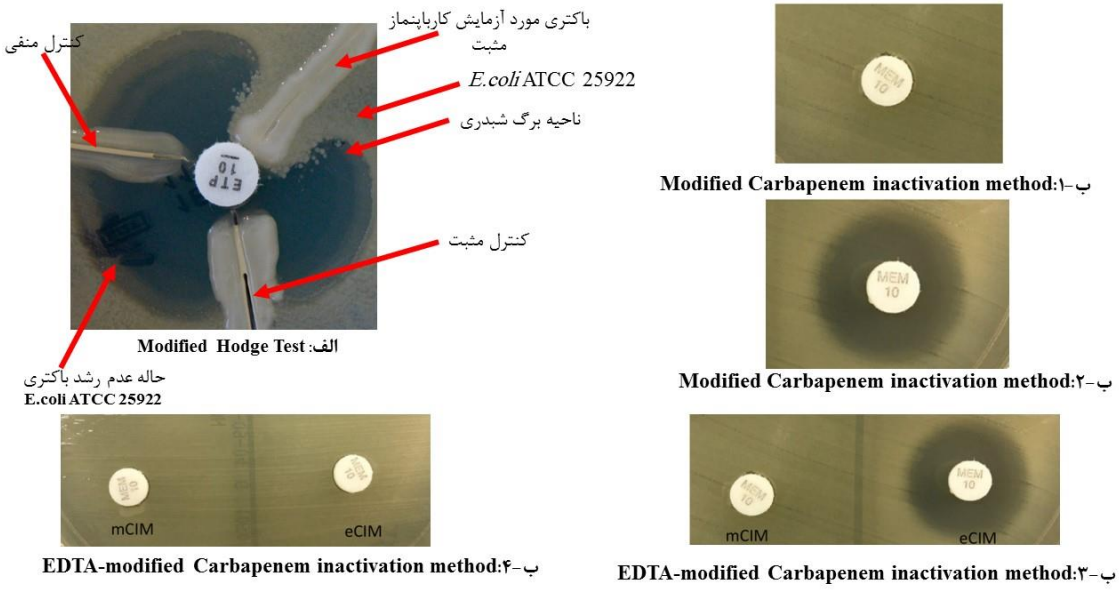
روش‌های متعددی برای تایید تولید کارباپنماز آزمایش شده‌اند(MHT، دیسک انتشار و MICگرادیان نوار تست هم افزایی، کار با NP، اندازه مولکولی، ایمونوکروماتوگرافی)؛ اما همه این روش‌ها محدودیت هایی را نشان دادند (جدول ۲) (۶۲).

[1] Lateral flow immunoassays

جدول۲. آزمایش‌های فنوتیپی برای تشخیص کارباپنماز

پارامتر تست	Modified Hodge Test	Carba NP	mCIM	Lateral flow immunoassays	سنجش‌های کارباپنماز
ارگانیسم های مقاوم در برابر کارباپنم	*انتروباکتریاسه*	*انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا*	*انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا*	*انتروباکتریاسه*	عموما *انتروباکتریاسه*
دقت	برای *انتروباکتریاسه* حساسیت ۹۵٪ و اختصاصیت ۹۱٪، نتایج مثبت کاذب *ESBL* با جدایه های *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 ٪ ۹۸و اختصاصیت ٪۹۵؛ mCIM تشخیص OXA-48 را بهبود می بخشد. 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 آنزیم های OXA غیرکارباپنماز	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، ویژگی و۹۵٪ ، تشخیص CPO BD Phoenix حساسیت ٪ ۹۷ و ویژگی ۶۹٪
سهولت استفاده	اجرای آسان، هیچ معرف یا محیط خاصی لازم نیست.	برای نسخه های دستی، معرف‌های تازه به دلیل نیمه عمرمحدود محلول ایمی‌پنم 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 می کند.	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 کارباپنم 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 براساس 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 و۲ دقیقه برای خواندن	متفاوت براساس آزمون، برای MBL Etest راه اندازی اولیه ۱۰ دقیقه و ۵> برای خواندن
زمان چرخش	۱۸-۲۴ ساعت	نتیجه همان روز،۳۰ دقیقه تا ۲ساعت	۱۸-۲۴ ساعت؛ TAT و انکوباسیون کوتاهتر	نتیجه همان روز،۱۵ دقیقه	۱۸-۲۴ ساعت
هزینه تخمینی	۱,۰۰$>	برای نسخه های دستی، ۲,۰۰$<	۱,۰۰$>	قیمت‌ها هنوز تخمین نشده است.	متفاوت براساس آزمون، نوارهای شیب MBL حدود ۶,۰۰$
وضعیت نظارتی	دیگر مورد تأیید CLSI نیست، LDT	LDT; بجز Carba NP برای انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا؛ Carba NP دستی توسط CLSI تایید شده است.	LDT; مورد تاییدCLSI	RUO	RUO

LDT= تست توسعه‌یافته آزمایشگاه، RUO= فقط استفاده تحقیقاتی



الف: Modified Hodge Test

ب-۱: Modified Carbapenem inactivation method

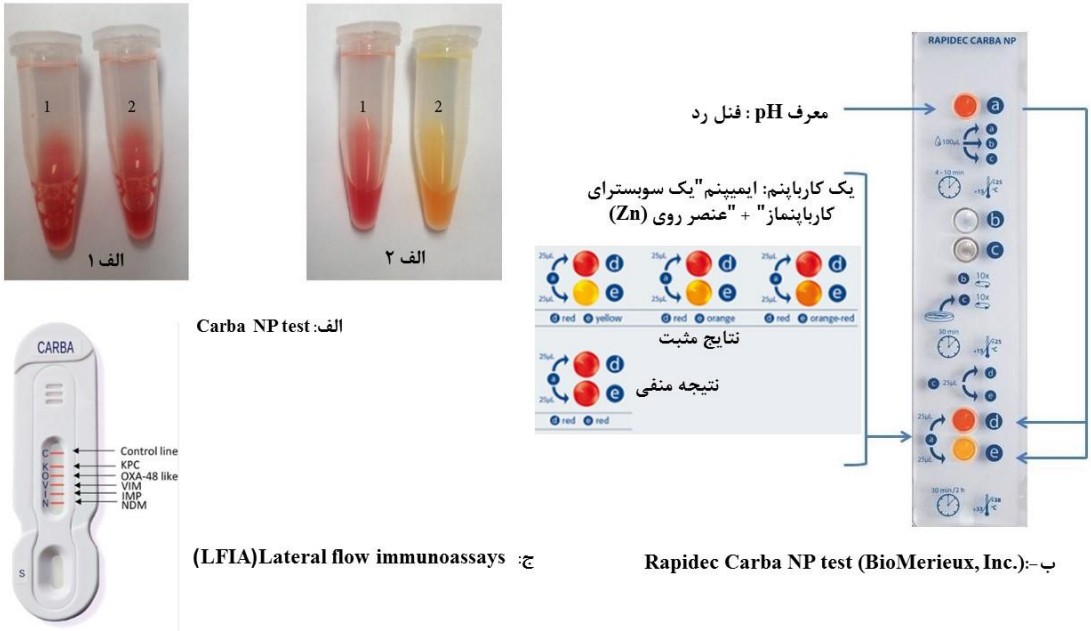
ب-۲: Modified Carbapenem inactivation method

ب-۳: EDTA-modified Carbapenem inactivation method

ب-۴: EDTA-modified Carbapenem inactivation method

شکل۱.روش‌های فنوتیپی برای تشخیص کارباپنمازها بر پایه روش های انتشار در آگار و دیسک دیفیوژن

شکل ۱: آزمایش هوچ تست، ایزوله تولید کننده کارباپنماز دارای ناحیه برگ شبدری، ب۱: روش غیر فعال سازی کارباپنم تغییر یافته از یک ایزوله مثبت که دارای ناحیه عدم رشد در حضور دیسک مروپنم می باشد، ب۲: نتیجه منفی از آزمایش غیر فعال سازی کارباپنم تغییر یافته که نشانگر ناحیه عدم رشد است، ب۳: نتیجه مثبت از باکتری متالوبتالاکتاماز تولید کننده کارباپنماز به علت ناحیه عدم رشد در ترکیب با EDTA، ب۴: نتیجه مثبت از ایزوله سرین کارباپنماز در آزمایش کارباپنم تغییر یافته غیر فعال شده به علت عدم رشد در ترکیب با EDTA.



الف: Carba NP test

ب-: Rapidec Carba NP test (BioMerieux, Inc.)

ج: (LFIA)Lateral flow immunoassays

شکل۲.روش‌های فنوتیپی برای تشخیص کارباپنماز ها بر پایه روش های رنگ سنجی و ایمونولوژی

نتایج متبت و منفی تعیین کارباپنماز با روش های نوین، الف: آزمایش Carba NP ، الف ۱، نتیجه منفی و الق ۲ نتیجه مثبت از ایزوله با توانایی کارباپنماز، ب: آزمایش Rapidec Carba NP، معرف کیت فنول رد می باشد، در ترکیب کارباپنم ایمیپنم 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.

نتیجه‌گیری

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 آنتی‌بیوتیک‌ها، nitro carba test (NCT) است. روش NCT ارائه شده یک روش بسیار ساده، قابل اعتماد و مقرون به صرفه می‌باشد که امکان مشاهده سریع نتایج را در عرض ۲۰ دقیقه فراهم می‌کند. 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 نسبتا نامناسب آن این است که نیاز به استفاده از روش‌های تائیدی 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 ازمایشگاه و بر تصمیمات درمانی کنترل عفونت داشته باشد(۶۲). به طور کلی آزمایش‌های STAR -CARBA برای همه سویه‌های تولیدکننده کارباپنماز از کشت صفحه‌ای نتیجه مثبت داشتند، به جز *Serratia marcescens* و *Klebsiella aerogenes* که تولید کنندهKPC می‌باشند و *E.coli* که تولید کننده VIM اس (۶۳). در مجموع روش‌های کروموژنیک عملکرد خوبی برای تشخیص کارباپنمازهای کلاس A و B و برای تشخیص انواع -OXA 48 حساسیت از ۴۰ تا ۱۰۰٪ داشتند. برای روش‌های مبتنی بر رشد، عملکرد در کلاس‌های 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 تولیدکنندگان KPC، و ۹۲٪ از تولید کنندگان NDM بود(۱۳). با این حال، با تغییرات درگیر باCIM اصلاح شده (mCIM)، حساسیت و ویژگی کلی به ۹۸ و ۹۹٪ افزایش یافت و تمام انواع OXA-48و NDM شناسایی شد. جداسازی KPC منفرد *Serratia marcescens* و *Klebsiella pneumonia* 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, Tzouvelekis 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):.۱۰۱-۳۰۹۷
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 ۸)۳۸;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, ChromidID 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):4023.٦-
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, Gudiol 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, Akeda 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.(۱)۱۷;
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.۲۰۲۱ .

47. Abdul-Mutakabbir JC, Kebriaei 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 Enterobacterales and non-fermenters. Journal of global antimicrobial resistance. 2020;21:78-82.
62. Croxatto A, Coste AT, Pillonel T, Bertelli C, Greub G, Prod'hom 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;۲۶(۱۱):۱۲۹۸-۳۰۶.

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 Beig [2]
Kimia Barikrou [3]
Sima Soltani [4]
Leila Ali Nasab Maleki [4]
Parsa Veisi [4]
Samane Teymouri [5]

[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