DOI: 10.48305/jims.v40.i688.0743

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۸۸/هفته‌ی چهارم آبان ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۲ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۲۳ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۸/۲۸

تشخیص *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز با طیف گسترده و کارباپنماز در نمونه‌های بالینی: مروری

گلنار رحیم‌زاده[۱]، محمدصادق رضائی[۲]

مقاله مروری

چکیده

مقدمه: ظهور *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یک تهدید برای سلامت جهانی می‌باشد. تشخیص سریع و صحیح این سویه‌ها جهت کنترل عفونت‌های بیمارستانی و درمان صحیح نقش کلیدی دارد. در این مطالعه روش‌های تشخیص *انتروباکترهای* مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با تمرکز بر خلاصه تکنیک‌های مبتنی بر کشت و روش‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: مطالعه‌ی حاضر از نوع مروری است. که در آن مقالات منتشر شده طی سال‌های ۱۳۸۱ تا ۱۴۰۱ در پایگاه‌های معتبر بین‌المللی Scopus، PubMed، Google Scholar، Science Direct، Web of Science جستجو گردید.

یافته‌ها: برای شناسایی *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف روش‌های مرسوم کشت، روش‌های بیوشیمیایی، طیف‌سنجی جرمی، روش‌های مولکولی، توالی‌یابی نسل بعدی، ریز آرایه‌ها، توالی‌یابی کل ژنوم، سیستم مبتنی بر هیبریداسیون، سنجش ید نشاسته، ایمونوکروماتوگرافی، رنگ‌سنجی، طیف‌سنجی جرمی، سنجش الکتروشیمیایی و فلوسایتومتری مورد استفاده می‌باشند.

نتیجه‌گیری: MALDI–TOF (matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight)، توالی‌یابی نسل بعدی و توالی‌یابی کل ژنوم از جمله تکنیک‌های نوین و منتخب جهت تشخیص و شناسایی *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف می‌باشند.

واژگان کلیدی: کارباپنماز؛ بتالاکتامازها؛ *انتروباکتر*؛ تکنیک‌های فنوتیپی؛ تکنیک‌های مولکولی

ارجاع: رحیم‌زاده گلنار، رضائی محمدصادق. **تشخیص *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز با طیف گسترده و کارباپنماز در نمونه‌های بالینی: مروری.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۸۸): ۷۵۸-۷۴۳

مقدمه

ظهور و گسترش باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده‌ی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف کارباپنمازها، یکی از بزرگ‌ترین تهدیدات سلامت جهانی می‌باشند. بطور خاص، *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، علت اصلی عفونت‌های بیمارستانی، افزایش هزینه‌ی مراقبت‌های درمانی و بهداشتی به همراه عوارضی مانند مرگ و میر می‌باشند (۴-۱).

از جمله فاکتورهای اصلی خطر برای کلونیزاسیون این سویه‌ها، مصرف غیرضروری و نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها، زخم‌های مزمن، تجهیزات پزشکی، سفر به کشورهای با شیوع بالا می‌باشند (۳، ۴). ظهور و گسترش سویه‌های مقاوم به بتالاکتام‌ها عمدتاً توسط بتالاکتامازهای مختلف ایجاد می‌شود. بر اساس طبقه‌بندی آمبلر (کلاس A-D) و Bush-Jacoby-Medeiros (گروه ۳-۱)، بیش از ۷۰۰۰ نوع بتالاکتاماز مختلف شناخته شده است که نشان‌دهنده‌ی فراوانی جهش و سازگاری باکتری‌ها در موارد مختلف می‌باشد (۵). از دهه‌ی ۱۹۸۰، سویه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف گسترده به طور فزاینده‌ای در بیماران بستری در بیمارستان‌ها شناسایی شده‌اند که میزان کلونیزاسیون آن‌ها در آسیا، ۷۱/۶ درصد و در آمریکای شمالی، اروپا و اقیانوسیه، به ترتیب ۹، ۱۲/۹ و ۶ درصد گزارش شده است (۵، ۶).

سویه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف گسترده با موفقیت با کاربانپم‌ها درمان شدند اما استفاده‌ی گسترده از این آنتی‌بیوتیک‌ها باعث تسریع در انتشار مقاومت به کاربانپم‌ها گردید. در عصر حاضر به طور قابل توجهی شیوع *انتروباکترهای* مولد کاربانماز در کشورهای مختلف در یک قاره متفاوت است (۶). شیوع سویه‌های

۱- استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده‌ی بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده‌ی بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمدصادق رضائی: استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده‌ی بیماری‌های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

Email: rezai@mazums.ac.ir

مولد کارباپنماز در کشورهای اروپایی مانند رومانی و ایتالیا در بیماران بخش مراقبت‌های ویژه به ترتیب ۲، ۲۱ و ۲۸/۲ درصد گزارش شده است که در سال ۲۰۱۹ شیوع *اشریشیاکلی* و *کلبسیلا پنومونیه‌ی* مقاوم به کارباپنم‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم ۱/٦ و ۵۸/۳ درصد گزارش شده است (۷، ۸).

از جمله مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر کارباپنم‌ها، تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده‌ی کارباپنم‌ها مانند متالوبتالاکتامازها (Metallo-β-lactamases) MBL و کارباپنماز *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) *KPC* و حضور *AmpCs* بتالاکتاماز کروموزومی یا اکتسابی، همراه با مکانیسم‌های دیگر مانند جهش‌های پورین، افزایش بیان سیستم‌های افلاکس پمپ یا تغییرات پروتئین‌های متصل‌شونده به پنیسیلین می‌باشند (۷، ۸). به دلیل قرار داشتن ژن‌های رمزکننده‌ی کارباپنماز غالباً بر روی عناصر متحرک ژنتیکی نوعی مقاومت پایدار و قابل انتقال را ایجاد می‌نمایند که امکان انتشار از طریق گسترش کلونال و یا انتقال افقی ژن‌ها به باکتری‌های دیگر فراهم کرده است که باعث گسترش مقاومت در میان باکتری‌های گرم منفی می‌شود (۸).

چندین استراتژی مداخله‌ای جهت کاهش انتشار سویه‌های مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف مانند کنترل عفونت با برنامه‌های نظارت ضد میکروبی، کاهش مصرف کارباپنم‌ها، استفاده از ترکیبات مهارکننده‌ی بتالاکتامازها و در نهایت تشخیص سریع و صحیح باکتری‌های مقاوم به درمان مورد توجه می‌باشند (۹).

شناسایی سریع باکتری‌های مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف برای انتخاب صحیح الگوی درمان آنتی‌بیوتیکی، کاهش شیوع آن‌ها، کاهش گسترش عفونت‌های بیمارستانی و مقاومت میکروبی در محیط‌های درمانی یک مسأله‌ی ضروری می‌باشد. با این حال، نه تنها روش‌های تشخیصی اختصاصی بلکه پارامترهای قبل از تشخیص مانند نمونه‌ی مناسب، محل جمع‌آوری و وسیله‌ی جمع‌آوری نمونه نیز بر نتایج و موفقیت نهایی درمان تأثیرگذار می‌باشند (۹).

هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، مروری بر تکنیک‌های تشخیصی و پروتکل‌های کارآمد و ارتقا یافته جهت تشخیص *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف می‌باشد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع مروری می‌باشد. مقالات منتشر شده طی سال‌های ۱۳۸۱ تا ۱۴۰۱ در پایگاه‌های اطلاعاتی بین‌المللی از جمله PubMed، Scopus، Web of Science، Direct Science و Google Scholar، با واژگان کلیدی شامل کارباپنماز، بتالاکتامازها، *انتروباکترها*، تکنیک‌های فنوتیپی، تکنیک‌های مولکولی، روش‌های سنجش غیرفعال‌سازی بتالاکتام، روش رنگ‌سنجی، روش طیف‌سنجی جرمی، ایمونوکروماتوگرافی، سنجش الکتروشیمیایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ریز آرایه‌ها، توالی‌یابی نسل بعدی، توالی‌یابی کل ژنوم، ایمونوکروگاتوگرافی، سیستم مبتنی بر هیبریداسیون، روش‌های هیدرولیز کارباپنم و فلوسایتومتری جستجو و انتخاب شدند.

یافته‌ها

غربالگری با محیط‌های انتخابی کروموژنیک و غیر کروموژنیک (Screening with selective chromogenic and non-chromogenic media): محیط‌های انتخابی برای غربالگری نمونه‌های بیماران از نظر وجود *انتروباکترهای* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و کارباپنماز مناسب هستند. اغلب در این محیط‌ها آگار با کروموژن‌ها مکمل شده و امکان شناسایی احتمالی گونه‌ها را با استفاده از آنزیم‌های خاص گونه مانند β-گالاکتوزیداز، β-گلوکورونیداز و دآمیناز فراهم می‌نماید (۱۰).

محیط‌های متعددی مانند CHROMagar ESBL, chromID ESBL agar, ESBL chromogenicagar, chromogenic ESBL agar, ESBL ChromoSelect agar, CHROM agar, TM Chromatic ESBL agar, Brilliance ESBL ESBL agar, agar, BLSE agar برای تشخیص سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در دسترس می‌باشند (۱۰) (جدول ۱).

بیشتر محیط‌های انتخابی کروموژنیک حاوی سفالوسپورین با طیف گسترده (مثلاً سفپودوکسیم) و مخلوطی از آنتی‌بیوتیک‌ها برای مهار رشد باکتری‌های غیر مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف هستند. همچنین برخی از آگارها به عنوان مثال CHROMagar ESBL، chromID ESBL و Brilliance ESBL حاوی مهارکننده‌های AmpC هستند (۱۰). بسیاری از این محصولات در مطالعات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. در مطالعه‌ی Reglier-Poupet و همکاران، حساسیت جداسازی *انتروباکترهای* جدا شده از نمونه‌های بالینی سواب رکتوم، نمونه‌ی ادرار و آسپیراسیون ریوی پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در محیط‌های ChromID ESBL agar و BLSE agar medium به ترتیب ۸۸ و ۸۵ درصد گزارش شد (۱۱). حساسیت جداسازی برای محیط ChromID ESBL agar را با افزایش زمان انکوباسیون بیشتر از ۲٤ ساعت به ۹٤ درصد افزایش یافت اما بر حساسیت محیط BLSE agar تأثیری نداشت. دلیل این تفاوت‌ها احتمالاً حضور سفپودوکسیم در محیط ChromID ESBL agar و حضور سفوتاکسیم یا سفتازیدیم در محیط BLSE agar می‌باشد (۱۱).

در مطالعه‌ی Grohs و همکاران، مقایسه‌ی حساسیت و اختصاصیت برای تشخیص سویه‌ی مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در

محیط‌های Drigalski، BD ESBL، Brilliance chromID، CHROMagar مکمل شده با سفتازیدیم به ترتیب ۹۷/۲ تا ۹۸/۶ درصد و ۵۷/۹ تا ۷۲/۹ درصد گزارش شد (۱۲).

Göttig و همکاران از محیط کروموژنیک ESBL agar سویه‌های مولد کارباپنماز را تشخیص دادند و در دهه‌ی اخیر این محیط به صورت تجاری برای تشخیص سویه‌های مولد کارباپنماز در دسترس قرار گرفته است (۱۳).

در مطالعه‌ی Sturød و همکاران مشابه مطالعه‌ی Simner، محیط‌های Chromatic، McConkey agar، chromID OXA-48، chromID CARBA، CRE، Brilliance CRE با ارتاپنم و کلوگزاسیلین مکمل کردند و سپس ۶۹ ایزوله انتروباکتر تولیدکننده‌ی کارباپنماز و ۴۰ سویه‌ی شاهد بدون تولید کارباپنماز کشت داده شد. همچنین جدایه‌ها بر روی محیط‌های Brilliance ESBL، chromID ESBL، ESBL agar، نیز کشت داده شدند. نتایج نشان داد ESBL agar برای تشخیص سویه دارای ژن OXA-48-like مناسب نمی‌باشد. بیشترین حساسیت و اختصاصیت جهت شناسایی سویه‌های مولد کارباپنماز برای محیط Brilliance CRE گزارش شد. در محیط chromID CARBA، ۱۵ درصد از کل ایزوله‌های مولد کارباپنماز شناسایی نشدند و همچنین این محیط برای تشخیص سویه‌های دارای ژن OXA-48-like مناسب نمی‌باشد (۱۴، ۱۵).

بدیهی است که عملکرد محیط‌های غربالگری کروموژنیک مختلف بسته به نوع β-لاکتاماز و ارگانیسم مورد نظر متفاوت است. بنابراین، انتخاب مناسب محیط آگار کروموژنیک باید با اهداف خاص و اپیدمی در مراکز درمانی سازگار باشد.

در حالی که استفاده از محیط‌های کروموژنیک در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی به صورت تجربی و آسان است اما این تکنیک دارای اشکالاتی مانند رشد غیر اختصاصی، مشکل در تشخیص برخی بتالاکتامازها (OXA-48-like) و عدم تشخیص انواع بتالاکتامازهای موجود می‌باشد. روش‌های جانبی دیگر مانند تست هم‌افزایی دو دیسک (Double Disc Synergy Test; DDST) و آزمایش دیسک ترکیبی (Combined disc test; CDT) برای ارزیابی حساسیت و شناسایی نوع سویه مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا سویه مولد کارباپنماز مورد نیاز می‌باشد (۱۶).

بررسی تولید کارباپنماز با تست (Modified hodge test (MHT: Investigation of carbapenemase production by test

MHT برای تشخیص سویه مولد کارباپنماز و بر اساس غیرفعال شدن کارباپنم می‌باشد. در این تست، یک سویه‌ی حساس معمولاً *E. coli* ATCC 25922 بر روی آگار تلقیح می‌شود و یک دیسک کارباپنم در مرکز قرار می‌گیرد. سویه‌های آزمایشی و نیز سویه‌های کنترل در خطوطی از مرکز تا حاشیه کشت داده می‌شوند. اگر سویه‌ی آزمایشی کارباپنماز تولید نماید، کاربانم غیرفعال می‌شود و سویه‌ی حساس *E. coli* ATCC 25922 در کنار سویه‌ی مورد آزمایش رشد می‌نماید که می‌تواند با فرورفتگی‌های شبدر مانند مشاهده شود.

مزیت تست MHT مقرون به صرفه و آسان می‌باشد. حساسیت عالی برای تشخیص سویه‌ی مولد کارباپنماز در مناطق اندمیک با blaKPC و blaOXA-48-like دارد.

از محدودیت‌های این روش، تفسیر نتایج در برخی موارد مشکل است و مدت زمان انجام این تست ۱۶ تا ۱۸ ساعت می‌باشد. همچنین این تکنیک در تشخیص سویه‌های دارای blaNDM ضعیف عمل می‌نماید (17-19). عملکرد تست MHT برای کارباپنمازهای کلاس Ambler B مانند NDM-1 پایین است و حساسیت آن بدون افزودن سولفات روی ۵۰ درصد می‌باشد. علاوه بر این اختصاصیت پایین و تعداد بالای نتایج مثبت کاذب در جدایه‌هایی که بیش از حد AmpC یا بتالاکتاماز وسیع‌الطیف تولید می‌کنند مشاهده شده است (۲۰)، بنابراین مؤسسه‌ی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی این تست را از سال ۲۰۱۸ توصیه نمی‌کند (۲۱).

سنجش غیرفعال‌سازی بتالاکتام (Carbapenem inactivation method): CIM. در سنجش غیرفعال‌سازی کاربانم CIM، حساسیت سویه‌ی حساس *اشریشیاکلی* به مروپنم با روش انتشار در آگار (Kirby Bauer) تعیین می‌شود. سوسپانسیونی از سویه‌ی تولیدکننده‌ی کارباپنماز تهیه می‌شود و دیسک مروپنم به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در این سوسپانسیون انکوبه می‌گردد. دیسک مروپنم در پلیت حاوی سویه‌ی حساس *اشریشیاکلی* حساس به مروپنم قرار داده می‌شود. طبق نتایج منطقه‌ی هاله‌ی عدم رشد برای سویه‌ی حساس *اشریشیاکلی* در مقایسه با گروه شاهد کاهش می‌یابد (۲۲).

از مزایای CIM می‌توان به مقرون به صرفه بودن معرف‌هایی اشاره کرد که در اکثر آزمایشگاه‌های بالینی به راحتی در دسترس هستند و انجام آن آسان است. این روش مطابقت بالایی با نتایج به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی کارباپنم: KPC، NDM، OXA-48، VIM، IMP و OXA-23 نشان داد (۲۳). در مطالعه‌ای حساسیت و اختصاصیت CIM به ترتیب ۹۸/۸ و ۱۰۰ درصد برای تشخیص سویه‌ی مولد کارباپنماز با NDM، OXA-48-like و KPC گزارش شده است اما این نتایج با Carba NP منفی گزارش شده است (۲۴).

در حال حاضر روش CIM توسط کمیته‌ی اروپایی تست حساسیت ضد میکروبی و مؤسسه‌ی استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی برای تشخیص کارباپنمازها توصیه می‌شود و از ویژگی و حساسیت بالایی به ترتیب ۸۱–۱۰۰ درصد و ۱۰۰–۹۷ درصد برخوردار است.

از معایب این روش، زمان طولانی نتایج می‌باشد. نتایج این تست پس از ٦ ساعت اما بهترین نتیجه پس از ٢٤ ساعت قابل رؤیت می‌باشد. برای کاهش زمان، Jing و همکاران روش سریع و توسعه یافته‌ی تشخیص کارباپنماز (Rapid carbapenemase detection methor) CDM را گزارش کردند. در این پروتکل اصلاح شده، سویه‌های تولیدکننده‌ی کارباپنماز یک شبانه روز بر روی بلاد آگار رشد کرده‌اند، بر روی یک دیسک ایمی پنم آغشته می‌شوند. دیسک ایمی پنم بر روی آگار تلقیح شده با سویه‌ی حساس قرار می‌گیرد و پس از ٥-٦ ساعت انکوباسیون اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد بررسی می‌شود (٢٣، ٢٤).

روش رنگ‌سنجی (Colorimetric Assays): روش رنگ‌سنجی (NP-test) برای تشخیص سریع *انتروباکترهای* تولیدکننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف توسعه یافته است. تست ESBLs-NDP برای تشخیص بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف ستفاده می‌شود. در این روش باکتری در محیط مکمل شده با فنل رد به عنوان نشانگر pH، سفوتاکسیم و تازوباکتام انکوبه می‌شود. هیدرولیز سفوتاکسیم توسط سویه مولد بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف منجر به تشکیل کربوکسیلیک اسید می‌شود که باعث تغییر رنگ محیط از رنگ قرمز به رنگ زرد می‌گردد. این آزمایش با حساسیت و ویژگی بالایی برای نمونه‌های خون و ادرار انجام شده است (٢٥).

همچنین تست Carba NP برای تشخیص سویه‌های مولد کارباپنماز نیز توسعه یافته است. هیدرولیز ایمی پنم توسط یک کارباپنماز منجر به اسیدی شدن محلول و تغییر رنگ از قرمز به نارنجی یا زرد می‌شود.

مطالعه‌ی اولیه Nordmann و همکاران، حساسیت و اختصاصیت ١٠٠ درصد را برای سویه‌های مولد کارباپنماز با blaKPCs، blaNDMs، blaIMPs، blaVIMs، blaOXA-48-like گزارش کردند. اکثر نمونه‌های مثبت در عرض ٣٠ دقیقه واکنش نشان دادند اما مطالعات، انکوباسیون را تا ٢ ساعت توصیه کرده‌اند. از مزایای این تست، سریع بودن آن می‌باشد. اما تشخیص *کلبسیلا پنومونیه* و سویه‌های مولد کارباپنماز با OXA-48-like اغلب نتایج منفی کاذب می‌دهند و برای تست Carba NP مشکل‌ساز باقی مانده‌اند (٢٦).

در مطالعه‌ای با افزایش تلقیح باکتری حساسیت تست Carba NP را برای تشخیص OXA-48-like بهبود بخشیدند و به ٥٩ درصد افزایش دادند (٢٧).

از مزایای تست Carba NP تشخیص سویه‌های مولد کارباپنماز با واریانت‌های مختلف کارباپنماز با حساسیت و اختصاصیت بالای ٩٤ درصد پس از ١٥ دقیقه می‌باشد.

محدودیت عمده‌ی تست Carba NP این است که آزمایشگاه‌ها باید معرف‌هایی از جمله پودر ایمی پنم را با هزینه‌های بالا آماده نمایند. اما بجای ایمی پنم می‌توان از پودر ایمی پنم- سیلاستاتین که از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد استفاده کرد. همچنین تست Carba NP برای انجام و ارائه‌ی نتایج سریع برای سویه‌های CPE با blaKPC و blaNDM مؤثر است. با این حال این آزمون می‌تواند برای تشخیص OXA-48-like چالش‌برانگیز باشد (٢٨).

پیشرفت‌های اخیر اصلاحی برای تست Carba NP به نام Carba NP test II را گزارش کرده است. این تکنیک توانایی نوع کارباپنماز تولید شده در سویه‌ی CPE را دارد. در این روش با حضور مهارکننده‌های بتالاکتاماز توانایی تشخیص بین کلاس‌های A، B و D بتالاکتامازها فراهم شده است (٢٩).

انواع کیت‌های تشخیصی بر اساس تست Carba NP، مانند β-CARBA assay، NeoRapid CARB و CARBA PAcE و Rapid ESBL Screen kit 98022 به صورت تجاری در دسترس می‌باشند (٢٨-٣٨، ٣٩) (جدول ١).

سایر کیت‌های رنگ‌سنجی مانند β-Lacta test که برای تشخیص مقاومت به سفالوسپورین نسل سه استفاده می‌شوند، نمی‌تواند بین سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و کارباپنماز تمایز قائل بشوند (٤٠).

طیف‌سنجی جرمی (Mass spectrometry): اخیراً طیف‌سنجی جرمی تکنیک جذب و یونش لیزری با ماتریکس (MALDI–TOF) انقلابی در زمینه‌ی شناسایی گونه‌های باکتری‌ها و به طور فزاینده‌ای برای تشخیص مقاومت ضد میکروبی مورد استقبال قرار گرفته است. در این تکنیک پس از انکوباسیون ٢-٣ ساعت باکتری، محصولات حاصل از تخریب کارباپنم‌ها توسط کارباپنماز تولیده شده توسط سویه‌های مولد کارباپنماز توسط دستگاه اندازه‌گیری می‌شود (٤١).

با تکنیک MALDI–TOF حساسیت و اختصاصیت تشخیص مقاومت به کارباپنم و سفالوسپورین‌های نسل سوم به ترتیب ١٠٠-٩٨ درصد و ١٠٠-٩٧ درصد می‌باشد.

دو سیستم Microflex L ،VITEK MS برای شناسایی دقیق بیشتر گونه‌های باکتریایی، سریع و ارزان دارای استفاده‌ی بالینی می‌باشند. در این روش سیستم Bruker نرم‌افزاری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و برای تشخیص وجود کارباپنمازها استفاده شده است. Sauget و همکاران حساسیت ٩٨/٩ درصد و ویژگی ٩٧/٨ درصد برای تشخیص تولیدکنندگان OXA-48 گزارش کردند (٤١).

Studentova و همکاران روش اصلاح شده‌ی MALDI-TOF گزارش را کردند. در این روش بی‌کربنات آمونیوم را به محلول اضافه نمودند که فعالیت آنزیم‌های OXA را افزایش می‌دهد (٤٢).

جدول ۱. مروری بر تکنیک‌های تشخیصی *انتروباکترهای* تولیده‌کننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

رفرنس	نمونه	اختصاصیت (درصد)	حساسیت (درصد)	ژن‌های هدف	مدت زمان تشخیص	تست	روش‌های تشخیص
۱۳–۱۵	کلنی باکتری	۸۷/۱ –۶۰	۷۷/۶– ۹۸/۶	کلاس آمبلر A, B, D	۴۸–۱۸h*	Brilliance CRE	کشت برروی محیط
۱۳	کلنی باکتری	۶۰	۹۴/۲	کلاس آمبلر A, B, D	۴۸–۱۸h*	Chromatic CRE	کروموژنیک و
۱۳–۱۶	کلنی باکتری	۹۵– ۸۷/۵	۸۵/۵– ۸۹/۸	کلاس آمبلر A, B, D	۴۸–۱۸h*	chromID CARBA	غیرکروموژنیک
۱۳	کلنی باکتری	۱۰۰	۱۰۰	OXA-48	۴۸–۱۸h*	chromID OXA-48	
۱۳	کلنی باکتری	۷۷/۵	۹۷/۱	کلاس آمبلر A, B, D	۴۸–۲۴h*	McConkey supplemented with ertapenem, cloxacillin, zinc-sulfate and ticarcillin Mastdiscs ™	
۱۷	کلنی باکتری	۹۳	۷۸	کلاس آمبلر A, B	۲۴–۱۸h*	Set Carbapenemase Detection	
۱۸	کلنی باکتری	۹۸	۸۶	کلاس آمبلر A, B, D	۱۸h*	Combi Carba Plus Kit	
۱۸–۲۰	کلنی باکتری	۹۸– ۹۳/۱	۸۶– ۹۸/۸	کلاس آمبلر A, B, D	۲۴–۱۸h *	KPC/MBL & OXA-48 Confirm Kits	
۱۸	کلنی باکتری	۸۱	۹۹	کلاس آمبلر A, B, D	۱۸ h*	faropenem disc	روش دیسک دیفوژن
۱۸	کلنی باکتری	۳۸/۹	۷۷/۴	کلاس آمبلر A, B, D	۲۴–۱۸h*	Modified Hodge Test	
۲۶، ۲۷	کلنی باکتری	۹۹	۹۷	کلاس آمبلر A, B, D	۲۴–۱۸h*	mCIM	
۱۸	کلنی باکتری	۱۰۰– ۹۷/۷	۹۸– ۹۷/۴	کلاس آمبلر A, B, D	۲۴–۱۸h*	zCIM	
۲۸	کشت خون	۱۰۰	۱۰۰	کلاس آمبلر A, B, D	۲۴–۱۸h*	bcCIM	
۲۳	کلنی باکتری	۹۹/۶	۱۰۰	کلاس آمبلر A, B, D	۶–۵h*	Rapid carbapenemase detection method (rCDM)	روش رنگ‌سنجی
۲۵	کلنی باکتری	–	–	کلاس آمبلر A, B, D	۲۴–۱۸h*	Carbapenem inactivation method (CIM)	
۲۹	کشت خون	۹۵/۱	۹۹	کلاس آمبلر A, B, D	۱۲۰–۵ min**	bcCarba NP test	
۲۸	کشت خون–ادرار	۷۰/۹	۸۹.۵	کلاس آمبلر A, B, D	۱۲۰–۱۵min **	Neo-Rapid CARB Screen	
۳۰	کشت خون	۹۱/۴	۹۹	کلاس آمبلر A, B, D	۱۲۰–۹۰min**	Neo-Rapid CARB from PBC	
۳۱	کشت خون	۱۰۰	۹۹	کلاس آمبلر A, B, D	۱۲۰–۵min**	Rapidec carba NP test	
۳۲	کشت خون	۹۵/۶ –۹۰	۸۴/۹ –۶۴/۹	کلاس آمبلر A, B, D	۳۰min**	β-CARBA test	
۲۸	کلونی باکتری	۹۵/۱	۱۰۰	کلاس آمبلر A, B, D	۳۰min**	β-CARBA test from PBC	
۳۳	کلونی باکتری	۹۱	۷۲	کلاس آمبلر A, B, D	۱۰min**	CARBA PAcE	
۳۴	کلونی باکتری	۱۰۰	۱۰۰	کلاس آمبلر A, B, D	۱۲۰–۳۰min**	Blue Carba test	
۳۵	کشت خون–ادرار	۱۰۰	۹۳/۳	کلاس آمبلر A, B, D	۶۰–۱۵min**	Rapid Carb Blue kit	
۳۶	کلونی باکتری	۱۰۰	۹۸	کلاس آمبلر A, B, D	۲h*	CNPt-direct test	
۳۷	کلونی باکتری–کشت خون	–	–	کلاس آمبلر A, B, D	۲h*	Carba-H-assay	

http://jims.mui.ac.ir

ادامه جدول ۱. مروری بر تکنیک‌های تشخیصی *انتروباکترهای* تولیده‌کننده‌ی کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف

روش‌های تشخیص	تست	مدت زمان تشخیص	ژن‌های هدف	حساسیت (درصد)	اختصاصیت (درصد)	نمونه	رفرنس
	CRE ELITe MGB kit (Multiplex PCR)	۱۸۰min**	blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaOXA-48-like, blaIMP	۱۰۰	۱۰۰	نمونه‌ی تنفسی- سواب رکتال	۴۳
	Amplidiag CarbaR + VRE (Multiplex PCR)	۱۸۰min**	blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaOXA-48-like, blaIMP, ISAba1-OXA-51, blaOXA-23, blaOXA-24/40, blaOXA-58, blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaOXA-48-like, blaIMP, ISAba1-OXA-51, blaOXA-23 blaOXA-24/40	۱۰۰	۹۹	استخراج شده از ژنوم باکتری، مدفوع، سواب رکتال	۴۴
	Amplidiag CarbaR + MCR (Multiplex PCR)	۱۸۰min**	blaOXA-58, blaGES-2, blaGES4 through blaGES-6, blaGES-13 through blaGES-16, blaGES-18,blaGES-20/21, blaGES-24	۱۰۰-۹۲	۱۰۰-۸۶	استخراج شده از ژنوم باکتری، مدفوع، سواب رکتال	۴۵
	GenePOC/Revogene Carba C assay (Multiplex PCR)	۷۰min**	blaKPC, blaVIM, blaNDM,blaOXA-48-like, blaIMP, blaKPC, blaVIM,blaNDM,	۱۰۰	۱۰۰	کلنی باکتری	۴۶
	Verigene BC-GN (Multiplex PCR)	۲/۵-۲h*	blaOXA-48-like, blaIMP, blaOXA-23, blaOXA-24/40, blaOXA-58	۱۰۰	۱۰۰	کشت خون	۴۷
	Biofire Filmarray Blood Culture Identification Panel (Multiplex PCR)	۱h*	blaKPC, blaVIM,blaNDM,blaOXA-48-like, blaIMP	-	-	کشت خون	۴۸
	Biofire Filmarray Pneumonia plus Panel (Multiplex PCR)	۱h*	blaKPC, blaVIM,blaNDM,blaOXA-48-like, blaIMP, blaKPC, blaVIM, blaNDM	-	-	نمونه‌ی تنفسی	۴۹
	ePlex Blood Culture Identification Gram Negative Panel (Multiplex PCR)	۹۰min**	blaNDM, blaOXA-48-like,blaOXA-23, blaIMp, blaKPC, blaVIM	-	-	کشت خون	۵۰
	Unyvero (Multiplex PCR)	۵-۴h*	blaOXA-48-like,blaOXA-23,blaOXA-24/40,blaOXA-58, blaIMP	–	–	نمونه‌ی تنفسی، خون، بافت، قطعات استخوان، چرک	۵۱
	Hyplex SuperBug ID test system (Multiplex PCR)	–	blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaOXA-48-like, blaIMP,	۹۶/۷	۹۹	نمونه‌ی تنفسی، ادرار، خون، نمونه‌ی سواب	۵۲
	Luminex xTAG assay (Multiplex PCR)	۵h*	blaGES, blaOXA-23,blaOXA-51, blaSEM,blaVEM blaOXA-48-like, blaIMP blaKPC, blaVIM,blaOXA-23	۱۰۰	۹۹/۴	استخراج شده از ژنوم باکتری	۵۳
	VAPChip (Multiplex PCR)	۴h*	blaOXA-48-like, blaIMP, blaOXA-24/40, blaOXA-58	۱۰۰	۱۰۰	نمونه‌ی تنفسی	۵۴
	MinION (Oxford Nanopore) (Next generation Sequencing, NGS)	۸h*	کلاس آمبلر A, B, D	۱۰۰	۱۰۰	استخراج شده از ژنوم	۵۵
	Xpert-Carba-R assay (Multiplex PCR)	۵۰min**	blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaOXA-48-like, blaIMP	۹۷/۸	۹۵/۳	سواب رکتال	۵۶
روش‌های مولکولی	Check-MDR CT103 (Multiplex PCR)	۶h*	blaNDM1,2,3, blaOXA-48, blaOXA-181, blaVIM1,2,3,4,19, blaIMP1,4,8,13	۱۰۰-۹۵	۱۰۰	استخراج شده از ژنوم باکتری	۵۷، ۵۸-۶۴
	Carba NP test	۱۲۰-۵ min**	کلاس آمبلر A, B, D	۹۷/۹	۱۰۰	کشت خون	۲۹

* h: Hour; **: Min: minute

از معایب این روش این است که فقط مقاومت ایجاد شده توسط هیدرولیز آنتی‌بیوتیک مورد نظر را تشخیص می‌دهد. نتایج منفی کاذب را برای مقاومت ایجاد شده توسط مکانیسم‌های دیگر مثل پمپ‌های ترشحی یا حذف پورین‌ها را نشان می‌دهد (٦٥).

روش دیگر برای MALDI-TOF استفاده از آن به عنوان ابزاری حساس برای تشخیص رشد در حضور غلظت‌های مشخص آنتی‌بیوتیک است. برای این منظور Idelevich و همکاران سنجش رشد ریز قطره مستقیم روی هدف (DOT-MGA) را توسعه دادند. این تکنیک با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد قادر به شناسایی *کلبسیلا پنومونیه‌ی* مقاوم مروپنم پس از ٤ ساعت می‌باشد. همچنین به طور مستقیم از کشت خون مثبت، قادر به شناسایی بتالاکتامازهای ESBL و AmpC در انتروباکترها با حساسیت و اختصاصیت ۹۱/۷ و ۱۰۰ درصد می‌باشد (٦٦، ٦٧).

مزیت منحصر به فرد MALDI-TOF سرعت و ارزان بودن آن است. با این حال اگرچه MALDI-TOF تکنیک سریعی می‌باشد اما برای شناسایی تجزیه‌ی بتالاکتام یا محصولات اصلاح شده باید با آزمایشات فنوتیپی مانند هم‌افزایی با کلاولانات یا MHT تکمیل شود (٦٨). در واقع این رویکرد تنها برای طیف هیدرولیتیک بتالاکتاماز وسیع‌الطیف یا کارباپنماز توسط پاتوژن آزمایش شده، تعریف شده است. از دیگر محدودیت‌های این تکنیک هنوز مشخص نیست که تا چه اندازه حساسیت و اختصاصیت برای آنزیم‌هایی با میل ترکیبی ضعیف دارد (٦٩).

ایمونوکروماتوگرافی (Immunochromatography):

ایمونوکروماتوگرافی بر اساس واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی بر روی کاغذ کروماتوگرافی می‌باشد. یک محصول تجاری به نام Quick Chaser IMP برای شناسایی همه‌ی سویه‌های مولدکارباپنماز موجود می‌باشد. این آزمایش وجود کارباپنماز از نوع ایمنی پنم را در انتروباکتریاسه‌ها و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیرکننده‌ی گلوکز با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد تشخیص می‌دهد (۷۷-۷۰). در این روش نتایج در مدت زمان ۱۵ دقیقه پس از اعمال ۳ قطره از کلونی باکتریایی معلق در محلول عصاره در کارتریج آزمایشی به دست می‌آید.

از مزایای این روش این است که انجام آن آسان و نتایج سریعی را ارائه می‌دهد. اما در مناطق غیر بومی برای سویه‌های مولدکارباپنماز با blaIMP کاربردی ندارد. Bogaerts و همکاران دو کیت تجاری K-SeT KPC ،OXA-48 K-SeT را بر مبنای ایمونوکروماتوگرافی بررسی کردند. نتایج نشان داد حساسیت و اختصاصیت برای تشخیص KPC CPE، XA-48-like، ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۷۸).

سنجش الکتروشیمیایی (Electrochemical assay): تست BYG Carba یکی دیگر از روش‌های نوآورانه جهت تشخیص سویه‌های CPE بر اساس تشخیص الکتروشیمیایی می‌باشد. در این روش در مدت زمان ۳۰ دقیقه با هیدرولیز و احیای ایمنی پنم و با تغییر pH، وجود کارباپنماز تأیید می‌شود. این روش در مقایسه با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دارای حساسیت و اختصاصیت به ترتیب ۹۵ و ۱۰۰ درصد می‌باشد (۹۰-۷۹). این تکنیک جدید، سریع و کارآمد بر اساس یک الکتروفناوری حسگر زیستی فعال که بین سویه‌های مولد کارباپنماز و غیر مولد کارباپنماز تمایز قائل می‌شود.

فلوسایتومتری (Flow cytometry): Faria-Ramos و همکاران روش فنوتیپی Miscellaneous بر مبنای فلوسایتومتری جهت تمایز سویه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع از سویه‌های غیر مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع را گزارش کردند. در این روش، باکتری با سفتازیدیم و سفوتاکسیم به مدت ۲-۱ ساعت در حضور و عدم حضور کلاولانات انکوبه شد. سویه‌های غیر مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع در حضور رنگ فلورسانس، افزایش فلورسانس را آشکار کردند. سویه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع تنها در حضور کلاولانات فلورسانس را ساطع نمودند (۹۱).

مزیت این روش سرعت بالای آن می‌باشد. اما نمی‌توان باکتری‌ها در فاز سکون را بررسی کرد. علاوه بر این، این تکنیک فقط شناسایی سویه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع را انجام می‌دهد (۹۲).

روش سنجش ید نشاسته (Starch-iodine assay method):

این تست شامل نوارهای آغشته به ایمی پنم 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، نشان‌دهنده‌ی وجود کارباپنماز است. Lu و همکاران، حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد در شناسایی *انتروباکتریاسه‌های* مولد کارباپنماز را گزارش کردند. با این وجود، مطالعاتی جهت ارزیابی کاربرد این تست در تشخیص انواع کارباپنماز نیاز است (۹۳).

روش‌های هیدرولیز کاربا‌پنم (Carbapenem hydrolysis methods): روش carbapenembac یک روش تجاری مبتنی بر تشخیص هیدرولیز کاربا‌پنم از نوارهای آغشته به ۱۰۰ میکروگرم ایمی پنم و نشاسته می‌باشد. در ابتدا جدایه‌ها در یک میلی‌لیتر محیط مایع مولر-هینتون با pH ۷/۳ به حالت معلق درآمده که برای جدایه‌های تولیدکننده‌ی کارباپناماز، نوارها براق می‌شود. زمان تست تقریباً ۳۰ دقیقه می‌باشد. جدایه‌های مثبت برای تولید متالوبتالاکتاماز، اغلب توسط تست methalo-carbapenembac بررسی می‌شوند (۹٤).

روش BLUeCARBA در سال ۲۰۱۳ انجام شد که یک روش تغییر یافته CarbaNP می‌باشد. Blue-Carba روش سریع، ارزان و

جایگزین NP Carba است. این روش امکان شناسایی فعالیت کارباپنماز را مستقیماً از کشت‌های باکتریایی گونه‌های *انتروباکتریاسه*، *سودوموناس* و *اسینتوباکتر* می‌دهد.

نتایج این تست مشابه با carbanp است. محلول آزمایش شامل یک محلول بروموتیمول بلو ۰/۰۴ درصد تنظیم شده در pH ٦، ۰/۱ میلی مول در لیتر ZnSO4 و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایمی پنم با pHنهایی ۷ می‌باشد. در آزمون BlueCarba، از بروموتیمول بلو به دلیل محدوده‌ی pH مطلوب (٦-۷) به عنوان اندیکاتور برای شناسایی بیشتر بتالاکتامازها (pH ٦/۸) استفاده می‌شود.

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 ۹٦ چاهکی معلق شده و در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه می‌شود. سویه‌های مولد کارباپنماز در محلول‌های آزمون و کنترل منفی، به ترتیب زرد در مقابل آبی، زرد در مقابل سبز یا سبز در مقابل آبی می‌باشند، در حالی که جدایه‌های کارباپنماز منفی روی هر دو محلول، آبی یا سبز باقی می‌مانند.

از مزایای این روش حساسیت و اختصاصیت آن در شناسایی آنزیم‌های کارباپنماز در *انتروباکتریاسه* به ترتیب ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد می‌باشد. سادگی پروتکل به دلیل استفاده‌ی مستقیم از کلنی‌ها به جای عصاره‌ی باکتریایی، کاهش قابل توجه هزینه واکنش به دلیل استفاده از Tienam می‌باشد.

از معایب این روش متفاوت بودن مدت زمان تشخیص کارباپنماز‌های متفاوت است. به عنوان مثال، KPC یا MBL در ۳۰ دقیقه‌ی اول و بیشتر آنزیم‌های نوع OXA در ۳-۱ ساعت مثبت می‌شوند (۹۵).

روش NitroCarba مبتنی بر هیدرولیز نیتروسفین توسط کارباپنماز‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم است. بر اساس این روش، برای هر ایزوله باکتریایی، یک لوپ کامل (۱۰ میکرولیتر)، در ۵۰۰ میکرولیتربافر لیز حاوی ۰/۰۴ درصد CTAB، ۰/۱ میلی مولار ZnSO4 (pH ۵/۷)، ۱ درصد TritonTMX-100 به حالت تعلیق درآورده 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 میلی‌لیتر ایمی پنم و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیترمروپنم و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیترارتاپنم اضافه می‌شود. به دنبال انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه، ۵۰ میلی‌لیتر از ۱ گرم در لیتر نیتروسفین در مایع دهیدراته 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 مقطر به عنوان تولید کارباپنماز در نظر گرفته می‌شود.

از مزایای این روش، یک روش ساده، سریع، قابل اعتماد و مقرون به صرفه برای تشخیص سریع سویه‌های مولد کارباپنماز می‌باشد و امکان مشاهده سریع نتایج را در ۱۲-۱۰ دقیقه فراهم می‌نماید. حساسیت این روش برای هر سه کارباپنم ۱۰۰ درصد است، در حالی که اختصاصیت این تست برای شناسایی ایمی پنم، مروپنم و آرتاپنم به ترتیب ٦٤/۳، ۹۱/۱، ۱۰۰ درصد می‌باشد (۹٦).

روش‌های مولکولی (Molecular techniques): روش‌های مولکولی، بالاترین حساسیت و ویژگی را برای تشخیص ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند و می‌توانند روی جدایه‌های کشت شده یا مستقیماً روی نمونه‌های بالینی اعمال شوند. این روش‌ها می‌توانند اطلاعات دقیقی در مورد نوع آنزیم بتالاکتاماز یا کارباپنماز ارائه دهند و زمان رسیدن به نتیجه‌ی نسبتاً کوتاهی دارند. اگرچه روش‌های مولکولی دارای معایبی هستند. با توجه به نیاز به پرسنل واجد شرایط و متحمل شدن هزینه‌های بالا برای تجهیزات فنی و مواد مصرفی، اما تعداد آزمایشگاه‌هایی که از این تکنیک‌ها استفاده می‌کنند رو به افزایش است. به طور خاص از روش‌های مولکولی جهت غربالگری سویه‌های مولد بتالاکتاماز با طیف وسیع و کارباپنماز در نمونه‌های مراکز درمانی و بیمارستان‌ها با نتایج سریع و بدون مراحل قبلی مانند کشت می‌توان بهره برد (٤١-٤٢).

تکنیک‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (Polymerase chain reaction techniques) PCR: برای تشخیص ژن‌های مقاوم و همچنین تشخیص همزمان چندین ژن مقاوم روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان از روش‌های انتخابی می‌باشند. این سنجش‌ها تصویر جامع‌تری از مقاومت یک ایزوله را ارائه می‌دهند (جدول ۱)، زیرا بسیاری از ایزوله‌ها دارای ژن‌های مقاومت چندگانه هستند که با روش‌های کشت شناسایی نمی‌شوند. مزیت اصلی روش‌های مولکولی و تشخیص ژن مقاومت این است که سطوح بیان پایین ژن و فعالیت‌های کاتالیتیکی بر نتیجه‌ی تشخیص و شناسایی ژن تأثیر نمی‌گذارند و امکان تشخیص ژن‌های بتالاکتاماز را با بیان پایین هم فراهم می‌نماید. نقطه ضعف روش‌های مولکولی این است که فقط ژن‌هایی که در آزمایش هدف قرار می‌گیرند می‌توانند شناسایی بشوند. بنابراین واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان باید به طور مداوم با ظهور ژن‌های مقاومت جدید بهبود و گسترش یابند. همچنین در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی نیاز به چرخه‌های حرارتی زیاد، استفاده از دستگاه گران قیمت ترموسیکلر، روش‌های آشکارسازی و تشخیص محصول می‌باشد، به همین دلیل امکان استفاده در آزمایشگاه‌های سیار وجود ندارد (٤١-٤٢).

امروزه سنجش با کیت‌های تجاری واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی نسبت به تست‌های مرسوم ترجیح داده می‌شود. به منظور شناسایی بیمارانی که مبتلا به عفونت ناشی از باکتری‌های مقاوم به درمان هستند، انتخاب روش‌هایی که میتوانند مستقیماً از نمونه استفاده بشود، مفید است. در مطالعه‌ی Girlich و همکاران، از کیت تجاری ESBL ELITe MGB که بر اساس تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان می‌باشد با حساسیت و اختصاصیت به ترتیب ۱۰۰ و ۹۶/۶ درصد به طور مستقیم برای تشخیص ژن CTX-M از نمونه کشت خون یا سواب رکتوم استفاده شد (۴۳).

BD MAX یکی دیگر از روش‌ها برپایه واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان است با حساسیت و اختصاصیت ۹۵/۲ درصد و ۹۷/۶ درصد که ژن‌های CTX-M-1، CTX-M-2، CTX-M-9 و SHV-ESBLرا تشخیص می‌دهد (۵۸). در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک BD MAX، سویه‌هایCPE در ۱۲۹ نمونه سواپ رکتال برای شناسایی ژن‌های OXA-48، NDM، VIM/IMP، KPC مورد استفاده قرار گرفت. نتایج در هر ۲/۵ ساعت برای ۱۲ نمونه، با تشخیص ژن‌های کارباپنماز با حساسیت و اختصاصیت ۹۲/۸ و ۹۷/۸ درصد گزارش شد. اما این روش قادر به شناسایی ژن‌های IMP-11 -13-14، OXA-48 نبود (۴۷، ۵۰). در مطالعه‌ی دیگری، نتایج بر اساس این تکنیک برای نمونه‌های سواب‌های رکتال با حساسیت ۱۰۰-۹۶/۶ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ -۹۸/۳ درصد گزارش شد. دلیل این تفاوت بسته به نوع کارباپنماز می‌باشد (۵۹).

تکنیک دیگر Check-MDR CT103 XL بر اساس ترکیب محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی با تکنیک ریزآرایه‌ها می‌باشد. این تکنیک قادر به شناسایی ۱۱ کارباپنماز، ۱۹ گروه و زیرگروه ESBLs و AmpCs و MCR می‌باشد (۶۰). در مطالعه‌ی Cuzon و همکاران از این روش استفاده شد و حساسیت و اختصاصیت این روش را به ترتیب ۱۰۰-۹۵ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۵۷).

از معایب هر دو تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی نیاز به تعداد کپی بالایی از DNA الگو دارند. کشت باکتری و استخراج DNA از باکتری ضروری است. در این راستا نمونه بالینی ممکن است حاوی مهارکننده‌هایی باشند مانند هموگلوبین و هپارین در خون، اوره در نمونه‌ی ادرار و پلی ساکاریدها در نمونه‌ی مدفوع که همه‌ی این موارد می‌توانند حساسیت تکنیک را کاهش بدهند.

از مزایای این دو تکنیک، نتایج حاصل از هر دو روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی کمتر از ٤ ساعت مشخص می‌شود. اما در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی همزمان به صورت همزمان حضور چند ژن بررسی می‌شود که در کاهش هزینه‌ها، زمان و برای مطالعات اپیدمیولوژیک با تمرکز بر خصوصیات مولکولی ژن‌های مقاومت دارویی مفید می‌باشد (۸۵).

تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)

در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس با تجزیه و تحلیل منحنی‌های دمای ذوب، ویژگی خاص و تشخیص آسان محصولات به دست آمده در واکنش امکان‌پذیر می‌سازد. Bisiklis و همکاران با بهره‌گیری از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز رونویسی معکوس و پروب HYB، تمایز بین دو ژن bla IMP، blaVIM را گزارش کردند (۸۵). Geyer و همکاران، برای تشخیص pAmpCs، تکنیک TaqMan Real-time PCR را با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد گزارش کردند (۸۶). تشخیص بسیار دقیق کلاس‌های مختلف کارباپنمازها نیز توسط Monteiro و همکاران توسط تکنیک RT- PCR به دست آمد (۸۷).

Guillard و همکاران، برای اولین بار با بهره‌گیری از تکنیک RT-PCR و رنگ ResoLigh شناسایی ژن qnr و شناسایی ژن qepA با رنگ SYBR Green در مدت زمان کمتر از ۲ ساعت را گزارش کردند (۸۸).

کیت تجاری New NucliSENS EasyQ KPC بر اساس RT-PCR بالاترین حساسیت و اختصاصیت شناسایی ژن blaKPC در کلبسیلا پنومونیه را نشان داده است. کیت تجاری Check-Points Health BV طی مدت زمان ۳/۵ ساعت بر پایه‌ی multiplex real-time PCR، قادر به شناسایی ژن‌های non-ESBL، HV/TEM، CTX-M، ESBL می‌باشد (۹۰).

تکنیک RT-PCR در اجرای اقدامات بهداشتی لازم برای مبارزه با گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر می‌باشد. در تشخیص زودهنگام ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در نمونه‌های بالینی که به طور چشمگیری بر اثربخشی درمان تأثیر می‌گذارد، استفاده‌ی کمتر از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در درمان تجربی عفونت‌های جدی و غربالگری سریع حامل‌های تولیدکننده‌ی بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و یا کارباپنماز در بین سایر پاتوژن‌های گرم منفی مؤثر است (۹۱).

تکنیک تکثیر همدمایی نوکلییک اسید (Nucleic acid isothermal amplification technique): روش جدید تکثیر همدمای نوکلییک اسید وابسته به حلقه LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay) روشی ساده با کارآیی بالا است. این روش توسط نوتومی در سال ۲۰۰۰ معرفی گردید. در این روش از ٤ پرایمر و پروب اختصاصی (دو پرایمر داخلی و دو پرایمر خارجی) استفاده می‌گردد که در مجموع ٦ ناحیه ژنی از نوکلییک اسید هدف را مورد شناسایی قرار

می‌گیرد. ناحیه‌ی هدف با تشکیل نواحی سنجاق سری در دمای ۶۵-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و با استفاده از یک آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت تکثیر می‌یابد.

این روش دارای مزایای بسیاری است. LAMP بسیار اختصاصی عمل می‌نماید. بر خلاف روش PCR نیازی به چرخه‌های دمایی تکرای نمی‌باشد. نوکلییک اسید را با کارآیی بالا تحت شرایط تک دمایی و بدون نیاز به ترموسیکلر تکثیر می‌نماید. این روش قادر به شناسایی تعداد اندک نوکلییک اسید در حد ٦ کپی در نمونه می‌باشد. در این روش نیاز به استخراج نوکلییک اسید نمی‌باشد و همچنین تأثیر منفی ترکیبات موجود در نمونه‌های بالینی که می‌تواند فعالیت DNAپلیمراز را مهار نماید، گزارش نشده است. واضح است، روش LAMP همانند سایر روش‌ها دارای محدودیت‌هایی از جمله پیچیدگی در طراحی پرایمر باشد.

دستگاه eazyplex SuperBug CRE بر اساس LAMP قادر به شناسایی ژن‌های گروه CTX-M-1 و CTX-M-9 در سویه‌های ESBLs و کارباپنمازهای KPC، VIM، NDM، OXA-48 و OXA-181. می‌باشد (٦١). در مطالعه‌ای با بهره‌گیری از دستگاه eazyplex SuperBug CRE، ژن‌های کد کننده‌ی ESBLs برای *پسودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا، انتروباکتر و اشریشیاکلی* با حساسیت و اختصایت ۱۰۰ و ۹۷/۸ درصد شناسایی شد (٦٢).

ریزآرایه‌ها (Microarrays): این تکنیک بر اساس سنجش به طور همزمان تعداد زیادی ژن‌های کارباپنماز در سویه‌ی مورد نظر می‌باشد. کیت تجاری MDR CT103 Check- بر پایه‌ی این تکنیک به طور همزمان توانایی تشخیص ۱۱ ژن مختلف بتالاکتاماز شامل blaKPC، blaNDM، blaOXA-48-like، blaIMP و blaVIM را دارد، که حدود ٦ ساعت طول می‌کشد تا این شناسایی ژن‌ها کامل شود (٨١).

مزیت تکنیک Microarrays در مقایسه با اکثر روش‌های مولکولی، ظرفیت تحلیلی بالایی دارد. علاوه بر این، قادر به تشخیص موتانت‌ها در یک ژن که ممکن است حضور همزمان را نشان دهند، به عنوان مثال، bla SHV-11 و bla SHV-12 در کلبسیلا پنومونیه می‌باشد. همچنین از این تکنیک جهت بررسی شیوع سویه‌های مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و کارباپنماز می‌توان بهره برد (٨٢).

از محدودیت‌های این تکنیک به زمان طولانی مرتبط با استخراج DNA و کیت‌های تجاری بسیار گران، می‌توان اشاره کرد (٨٣).

سیستم Verigene یک سیستم خودکار تشخیص ژن مبتنی بر ریزآرایه است و آزمایش Verigene BC-GN را توسعه داده است. این تکنیک، توانایی شناسایی باکتری‌های گرم منفی و تشخیص همزمان مقاومت ژنتیکی از جمله blaKPC، blaNDM، blaOXA-48-like، blaIMP، blaVIM و blaCTX-M را دارا می‌باشد. مزیت این سیستم، تشخیص مستقیم نمونه‌های کشت خون مثبت در مدت زمان ۲ ساعت و محدودیت این سیستم، هزینه‌ی بالا است (٤٧).

توالی‌یابی نسل بعدی (Next generation sequencing) :NGS

توالی‌یابی نسل بعدی، یک تکنولوژی کارآمد و جدید است. فناوری که توالی DNA را به روشی سریع و دقیق‌تر مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌دهد. عمدتاً این تکنیک مبتنی بر RT-PCR می‌باشد که در طول فرایند توالی‌یابی اتفاق می‌افتد.

مزایای این تکنیک شامل تشخیص ژن‌های مقاومت و ژن‌های هدف که از پیش تعریف شده نیستند. ژن‌ها و توالی‌های جدید را می‌توان کشف کرد. تعیین ویژگی‌های ژنی از جمله ژن‌های مقاومت دوگانه، ارتباط کلونال و تعیین انواع پلاسمیدها، ژن‌های بیماری‌زایی، عناصر ژنتیکی متحرک امکان‌پذیر می‌باشد. این فناوری از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است و زمان کمتری نسبت به سایر تکنیک‌های تعیین توالی نیاز می‌باشد (٨٤).

محدودیت این تکنیک، تجزیه و تحلیل داده‌ها است. برای پردازش و تجزیه و تحلیل اطلاعات زیاد و خام به بیوانفورماتیک و محیط محاسباتی با کارآیی بالا مورد نیاز می‌باشد (٨٤).

سیستم‌های مبتنی بر هیبریداسیون (Hybridization based systems):

هیبریداسیون درجا فلورسانس (Fluorescence in situ hybridization) FISH یک روش بسیار خاص برای تأیید حضور ارگانیسم هدف به روش کمی می‌باشد. در فناوری PNA-FISH از پروب‌های اسید نوکلئیک پپتیدی استفاده می‌شود. QuickFish یک فناوری تجاری (OpGen, USA) می‌باشد. این تکنیک با هدف قرار دادن 16SrRNA عمل می‌نماید. سیستم Genefluidics Inc. (CA, USA) مبتنی بر حسگر زیستی رشد باکتری را به روش کمی با تشخیص 16srRNA توسط یک حسگر زیستی الکتروشیمیایی اندازه‌گیری می‌نماید. به دلیل در دسترس نبودن و کمبود دانش تخصصی، از محدودیت‌های این تکنیک، کاربرد بسیار محدود آن می‌باشد (٩٧).

توالی‌یابی کل ژنوم (Whole Genome Sequencing) :WGS

سیستم‌های نسل سوم مانند Illumina MiniSeq، Pacific Biosciences PacBio Sequel system یا Oxford Nanopore MiniON و PromethION می‌توانند خوانش نسبتاً طولانی را با سرعت بالا ارائه دهند. در اصل، WGS می‌تواند به طور همزمان شناسه‌ی پاتوژن، تیپ اپیدمیولوژیک و تشخیص ژن‌های حساسیت دارویی را ارائه دهد. از آن‌جایی که WGS حجم عظیمی از داده‌ها را به صورت تکه تکه فراهم می‌کند، نرم‌افزار پیچیده‌ای برای تفسیر نتایج نیاز دارد. کمیته‌ی اروپایی در سال ۲۰۱۷ برای تسهیل کاربرد WGS جهت شناسایی ژن‌ها و جهش‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی شناخته شده، یک پایگاه داده‌ی واحد را به عنوان نیاز

ضروری اعلام کردند (۹۸).

بحث

تشخیص سریع و قابل اعتماد سویه‌های مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در نمونه‌های بالینی، یک ظرفیت کلیدی برای هر آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی است. توصیه می‌شود روش‌های آزمایشگاهی مناسب، قابل اعتماد و نسبتاً سریع برای شناسایی این سویه‌های موجود در نمونه‌های بالینی فراهم گردد.

به طور کلی تست‌های فنوتیپی جهت تشخیص سویه‌های مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به راحتی قابل اجرا در آزمایشگاه بالینی می‌باشند. تفسیر نتایج حاصله از این روش‌ها آسان است و برای تفسیر نتایج نیاز به حضور کارشناس متخصص نمی‌باشد. اگرچه روش‌ها مبتنی برکشت و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی از جمله روش‌های بسیار ساده و قابل اجرا در هر آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی می‌باشند اما ممکن است نتایج منفی کاذب مشاهده شود و یا به دلایلی شرایط بیان ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها فراهم نگردد در نتیجه سویه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک به صورت کاذب گزارش خواهند شد.

روش‌های فنوتیپی مانند MHT دارای دامنه‌ی وسیع با توانایی حساسیت و اختصاصیت مناسب برای تشخیص کارباپنم‌های مختلف blaKPC و blaOXA-48 می‌باشد. در حالی که تست CIM برای تشخیص سویه CPEهای با blaKPC ، blaNDM، blaOXA-48-like، blaIMP و blaVIM مناسب است. این دو روش، قابلیت اجرا در آزمایشگاه میکروبیولوژیکی بالینی را دارند اما این روش‌ها وقت‌گیر هستند و پس از ۱۸-۲۴ ساعت نتایج نهایی مشخص می‌شود.

همان‌طور که در CLSI 2015 نشان داده شده است، تست Carba NP برای تشخیص سویه‌های CPE با blaKPC، blaNDM، blaIMP و blaVIM بهترین گزینه می‌باشد. اما در کشورهای در حال توسعه و ایران، تعداد محدودی از آزمایشگاه‌های بالینی از این تکنیک برخوردار هستند. خریداری کیت‌های مبتنی بر Carba NP برای کشورهای در حال توسعه از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. در ایران برای بهره‌گیری از تست Carba NP نیاز به طراحی و ساخت کیت‌های مبتنی بر اساس Carba NP توسط شرکت‌های دانش بنیان می‌باشد.

در مقایسه با اکثر آزمایشات فنوتیپی روش‌های تأییدی مولکولی مبتنی بر PCR دارای حساسیت‌ها و اختصایت عالی هستند، اما این روش زمان‌بر می‌باشد و متأسفانه روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های بیوشیمیایی گران‌تر هستند (از ۳۰ تا ۶۰ دلار در مقابل ۵ تا ۱۰ دلار). در تکنیک NGS در کشورهای در حال توسعه علاوه بر هزینه‌های بالا، حضور یک کارشناس متخصص برای تفسیر، تجزیه و تحلیل داده‌ها ضروری می‌باشد.

مقاومت آنتی‌بیوتیک در محیط‌های مراقبت‌های بهداشتی و درمانی ادامه خواهد یافت و در سطح جهانی سویه‌های مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف به گسترش خود ادامه خواهند داد. نیاز شدید به کنترل سویه‌های مولد کارباپنماز و بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و تحقیق در مورد توسعه و کاربرد فناوری تشخیصی بیشتر خواهد شد. برنامه‌های NGS و MALDI–TOF امیدوارکننده‌ترین تکنیک‌ها جهت تشخیص سویه‌های مقاوم به دارو می‌باشند.

نتیجه‌گیری

در آینده نه چندان دور تکنیک‌های WGS، NGS و حضور دستگاه MALDI–TOF در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی پررنگ‌تر خواهد شد. با این حال در ایران و کشورهای در حال توسعه، استانداردسازی پروتکل‌ها، مسائل کنترل کیفیت و ظرفیت‌های بیوانفورماتیک موانع جدی هستند که باید قبل از اجرای گسترده‌تر WGS، NGS و سایر روش‌های مولکولی در آزمایشگاه‌های میکروب‌شناسی بالینی مورد توجه قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از مرکز تحقیقات عفونی اطفال که امکانات لازم جهت انجام این مطالعه را فراهم نمود.

References

1. Rezai MS, Bagheri-nesami M, Hajalibeig A, Ahangarkani F. Multidrug and cross-resistance pattern of ESBL-producing Enterobacteriaceae agents of nosocomial infections in intensive care units [in Persian]. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26(144): 39-49.
2. Bagheri-Nesami M, Rafiei AR, Eslami G, Ahangarkani F, Rezai MS, et al. Assessment of extended-spectrum β-lactamases and integrons among Enterobacteriaceae in device-associated infections: multicenter study in north of Iran. Antimicrob Resist Infect Control 2016; 5: 52-60.
3. Rezai MS, Ahangarkani F, Rafiei A, Hajalibeig A, Bagheri-Nesami M. Extended-spectrum beta-lactamases producing Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with ventilator associated nosocomial infection. Arch Clin Infect Dis 2018; 13(4): e13974.
4. Rezai MS, Rafiei A, Ahangarkani F, Bagheri-Nesami M, Nikkhah A, Shafahi K, et al. Emergence of extensively drug resistant Acinetobacter baumannii-encoding integrons and extended-spectrum beta-

lactamase genes isolated from ventilator-associated pneumonia patients. Jundishapur J Microbiol 2017; 10(7): e14377.
5. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. J Intensive Care 2020; 8: 13-20.
6. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. J Infect Dis 2017; 215(suppl_1): S28-36.
7. ECDC. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)-annual epidemiological report 2019. [Online]. [cited 2020 Nov 18]. Avilable from: URL: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019
8. Voor In 't Holt AF, Mourik K, Beishuizen B, van der Schoor AS, Verbon A, Vos MC, et al. Acquisition of multidrug-resistant Enterobacterales during international travel: A systematic review of clinical and microbiological characteristics and meta-analyses of risk factors. Antimicrob Resist Infect Control 2020; 9(1): 71-80.
9. Eslami G, Rezaie MS, Salehifar E, Rafiei A, Langaie T, Rafati MR, et al. Epidemiology of extended spectrum beta lactamases producing E. coli genes in strains isolated from children with urinary tract infection in North of Iran [in Persian]. J Maz Univ Med Sci 2015; 25(132): 270-9.
10. Sturod K, Dahle UR, Berg ES, Steinbakk M, Wester AL. Evaluation of the ability of four ESBL-screening media to detect ESBL-producing Salmonella and Shigella. BMC Microbiol 2014; 14: 217-27.
11. Reglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N, et al. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. J Med Microbiol 2008; 57(Pt 3): 310-5.
12. Grohs P, Tillecovidin B, Caumont-Prim A, Carbonnelle E, Day N, Podglajen I, et al. Comparison of five media for detection of extended-spectrum Beta-lactamase by use of the wasp instrument for automated specimen processing. J Clin Microbiol 2013, 51(8): 2713-6.
13. Göttig S, Walker SV, Saleh A, Koroska F, Sommer J, Stelzer Y, et al. Comparison of nine different selective agars for the detection of carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2020; 39: 923-7.
14. Sturød K, Dahle UR, Berg ES, Steinbakk M, Wester AL, et al. Evaluation of the ability of four ESBL-screening media to detect ESBL-producing Salmonella and Shigella. BMC Microbiol 2014; 14: 217-23.
15. Simner PJ, Gilmour MW, DeGagne P, Nichol K, Karlowsky JA. Evaluation of five chromogenic agar media and the Rosco Rapid Carb screen kit for detection and confirmation of carbapenemase production in Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 2015; 53: 105-12.
16. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: Review and bench guide. Clin Microbiol Infect 2008; 14(Suppl 1): 90-103.
17. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. J Clin Microbiol 2012; 50: 3877-880.
18. Sattler J, Brunke A, Hamprecht A. Systematic comparison of three commercially available combination disc tests and zCIM for carbapenemase detection in Enterobacterales isolates. JClin Microbiol 2021; 59(9): e0314020.
19. Pantel A, Souzy D, Sotto A, Lavigne JP. Evaluation of two phenotypic screening tests for carbapenemase-producing enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2015; 53(10): 3359-62.
20. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteri-aceae. J Clin Microbiol 2012; 50(2): 477-9.
21. CLSI. The modified hodge test for suspected carbapenemase production in enterobacteriaceae. [Online]. [cited 2021]; Available from: URL: https://clsi.org/media/1899/_m100_archived_methods_table.pdf
22. CLSI. M100 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. [Online]. [cited 2021 Aug 12]; Available from: URL: https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/
23. Jing X, Min X, Zhang X, Gong L, Wu T, Sun R, et al. The rapid carbapenemase detection method (rCDM) for rapid and accurate detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae and pseudomonas aeruginosa. Front Cell Infect Microbiol 2019; 9: 371-7.
24. EUCAST. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or Epi demiological importance. [Online] [cited 2017 July]; Available from: URL: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
25. Van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram- negative rods. PLoS One 2015; 10(3): e0123690.
26. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2012; 50(9): 3016-22.
27. Baeza LL, Pfennigwerth N, Greissl C, Göttig S, Saleh A, Stelzer Y, et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. Clin Microbiol Infect 2019; 25(10): 1286.e9-1286.e15.
28. Meier M, Hamprecht A. Systematic comparison of four methods for detection of carbapenemase-producing enterobacterales directly from blood cultures. J Clin Microbiol 2019; 57(11): e00709-19.
29. Dortet L, Bréchard L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. Clin Microbiol Infect 2014; 20(4): 340-4.

30. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC(R) CARBA NP, the rapid CARB Screen(R) and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2015; 70(11): 3014-22.
31. Bernabeu S, Dortet L, Naas T. Evaluation of the beta-CARBA test, a colorimetric test for the rapid detection of carbapenemase activity in Gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother 2017; 72(6): 1646-58.
32. Mancini S, Kieffer N, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC(R) CARBA NP and beta-CARBA(R) tests for rapid detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis 2017; 88(4): 293-7.
33. Sattler J, Brunke A, Hamprecht A. Evaluation of CARBA PAcE, a novel rapid test for detection of carbapenemase-producing Enterobacterales. J Med Microbiol 2021; 70(2): 129-36.
34. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol 2013; 51: 4281-3.
35. Novais A, Brilhante M, Pires J, Peixe L. Evaluation of the recently launched rapid carb blue kit for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria. J Clin Microbiol 2015; 53(9): 3105-7.
36. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. Simplified protocol for carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol 2015; 53: 3908-11.
37. Ma CW, Ng KK, Yam BH, Ho PL, Ka RY, Yang D. Rapid broad spectrum detection of carbapenemases with a dual fluorogenic-colorimetric probe. J Am Chem Soc 2021; 143(18): 6886-94.
38. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2017; 55(8): 2321-33.
39. Poirel L, Fernandez J, Nordmann P. Comparison of three biochemical tests for rapid detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2016; 54(2): 423-7.
40. Gallah S, Decre D, Genel N, Arlet G. The beta-Lacta test for direct detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in urine. J Clin Microbiol 2014; 52(10): 3792-4.
41. Sauget M, Cabrolier N, Manzoni M, Bertrand X, Hocquet D. Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Methods 2014; 105: 88-91.
42. Studentova V, Papagiannitsis CC, Izdebski R, Pfeifer Y, Chudackova E, Bergerova T, et al. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbo-nates to cultivation media or reaction buffers. Folia Microbiol (Praha) 2015; 60(2): 119-29.
43. Girlich D, Bernabeu S, Fortineau N, Dortet L, Naas T. Evaluation of the CRE and ESBL ELITe MGB(R) kits for the accurate detection of carbapenemase- or CTX-M-producing bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 92(1): 1-7.
44. Oueslati S, Girlich D, Dortet L, Naas T. Evaluation of the amplidiag carbaR+VRE kit for accurate detection of carbapenemase-producing bacteria. J Clin Microbiol 2018; 56(3): e01092-17.
45. Girlich D, Bernabeu S, Grosperrin V, Langlois I, Begasse C, Arangia N, et al. Evaluation of the amplidiag CarbaR+MCR kit for accurate detection of carbapenemase-producing and colistin-resistant bacteria. J. Clin. Microbiol 2019; 57(3): e01800-18.
46. Dortet L, Fusaro M, Naas T. Improvement of the xpert carba-R kit for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60(6): 3832-7.
47. Tojo M, Fujita T, Ainoda Y, Nagamatsu M, Hayakawa K, Mezaki K, et al. Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of Gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. PLoS One 2014; 9(4): e94064.
48. Verroken A, Despas N, Rodriguez-Villalobos H, Laterre PF. The impact of a rapid molecular identification test on positive blood cultures from critically ill with bacteremia: A pre-post intervention study. PLoS One 2019; 14(9): e0223122.
49. Hopkins TM, Juang P, Weaver K, Kollef MH, Betthauser KD. Outcomes of macrolide deescalation in severe community acquired pneumonia. Clin Ther 2019; 41(12): 2540-8.
50. Huang TD, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex blood culture identification panels for detection of pathogens in bloodstream infections. J Clin Microbiol 2019; 57(2): e01597-18.
51. Burrack-Lange SC, Personne Y, Huber M, Winkler E, Weile J, Knabbe C, et al. Multicenter assessment of the rapid unyvero blood culture molecular assay. J Med Microbiol 2018; 67(9): 1294-301.
52. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae by a commercial multiplex PCR. J Clin Microbiol 2012; 50(9): 3115-8.
53. Ceyssens PJ, Garcia-Graells C, Fux F, Botteldoorn N, Mattheus W, Wuyts V, et al. Development of a Luminex xTAG(R) assay for cost-effective multiplex detection of beta-lactamases in Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 2016; 71(9): 2479-83.
54. Bogaerts P, Hamels S, de Mendonca R, Huang TD, Roisin S, Remacle J, et al. Analytical validation of a novel high multiplexing real-time PCR array for the identification of key pathogens causative of bacterial ventilator-associated pneumonia and their associated resistance genes. J Antimicrob Chemother 2013; 68(2): 340-7.
55. Ashton PM, Nair S, Dallman T, Rubino S, Rabsch W, Mwaigwisya S, et al. MinION nanopore sequencing identifies the position and structure of a bacterial antibiotic resistance island. Nat Biotechnol 2015; 33(3): 296-300.

56. Baeza LL, Hamprecht A. A profile of the GenePOC Carba C assay for the detection and differentiation of gene sequences associated with carbapenem-non-susceptibility. Expert Rev Mol Diagn 2020; 20(8): 757-69.
57. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother 2012; 67(8): 1865-9.
58. Ogutu JO, Zhang Q, Huang Y, Yan H, Su L, Gao B, et al. Development of a multiplex PCR system and its application in detection of blaSHV, blaTEM, blaCTX-M-1, blaCTX-M-9 and blaOXA-1 group genes in clinical Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli strains. J Antibiot 2015; 68(12): 725-733.
59. Chung HS, Lee M. Verification of the performance of the BD MAX check-points CPO assay on clinical isolates. J Lab Med 2020; 44(3):165-8.
60. Cunningham SA, Vasoo S, Patel R. Evaluation of the check-points check MDR CT103 and CT103 XL microarray kits by use of preparatory rapid cell lysis. J Clin Microbiol 2016; 54(5): 1368-71.
61. Zalas-Wiecek P, Gospodarek-Komkowska E, Smalczewska A. Rapid detection of genes encoding extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase in clinical escherichia coli isolates with eazyplex SuperBug CRE system. Microb Drug Resist 2020; 26(10): 1245-9.
62. Hinic V, Ziegler J, Straub C, Goldenberger D, Frei R. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) detection directly from urine samples with the rapid isothermal amplification-based eazyplex(R) SuperBug CRE assay: Proof of concept. J Microbiol Methods 2015; 119: 203-5.
63. Gazin M, Paasch F, Goossens H, Malhotra-Kumar S, MOSAR WP2, SATURN WP1 Study Teams. Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum-beta-lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1140-6.
64. Akyar I, Ayas MK, Karatuna O. Performance evaluation of MALDI-TOF MS MBT STAR-BL versus in-house carba NP testing for the rapid detection of carbapenemase activity in escherichia coli and klebsiella pneumoniae strains. Microb Drug Resist 2019; 25(7): 985-90.
65. Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. Clin Microbiol Infect 2018; 24(7): 738-43.
66. Idelevich EA, Storck LM, Sparbier K, Drews O, Kostrzewa M, Becker K. Rapid direct susceptibility testing from positive blood cultures by the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based direct-on-target microdroplet growth assay. J Clin Microbiol 2018; 56(10): e00913-18.
67. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of light mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. J Clin Microbiol 2011; 49(9): 3321-4.
68. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 432-8.
69. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2012; 50(2): 477-9.
70. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One 2015; 10(3): e0123690.
71. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. J Antimicrob Chemother 2016; 71(1): 274-6.
72. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(9): 4578-80.
73. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
74. AbdelGhani S, Thomson GK, Snyder JW, Thomson KS. Comparison of the carba NP, modified carba NP, and updated rosco neo-rapid CARB kit tests for carbapenemase detection. J Clin Microbiol 2015; 53(11): 3539-42.
75. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapene-mase types in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. by using a biochemical test. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(12): 6437-40.
76. Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. Detection of IMP metallo-β-lactamase in carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting Gram-negative rods by immunochromato-graphy assay. J Clin Microbiol 2013; 51(6):1762-8.
77. Evrard S. Rethinking clinical research in surgical oncology. From comic opera to quality control [in French]. Bull Cancer 2016; 103(1): 87-95.
78. Bogaerts P, Yunus S, Massart M, Huang TD, Glupczynski Y. Evaluation of the BYG Carba test, a new electrochemical assay for rapid laboratory detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2016; 54(2): 349-58.
79. Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012; 50(7): 2441-3.
80. Braun SD, Monecke S, Thürmer A, Ruppelt A, Makarewicz O, Pletz M, et al. Rapid identification of

carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay. PLoS One 2014; 9(7): e102232.

81. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother 2012; 67(8): 1865-9.

82. Bogaerts P, Hujer AM, Naas T, de Castro RR, Endimiani A, Nordmann P, et al. Multicenter evaluation of a new DNA microarray for rapid detection of clinically relevant bla genes from β-lactam-resistant gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(9): 4457-60.

83. Reuter S, Ellington MJ, Cartwright EJ, Köser CU, Török ME, Gouliouris T, et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. JAMA Intern Med 2013; 173(15): 1397-404.

84. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol 2012; 113(5): 1014-26.

85. Bisiklis A, Papageorgiou F, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S. Specic detection of blaVIM and bla IMP metallo-β-lactamase genes in a single real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 1201-3.

86. Geyer CN, Reisbig MD, Hanson ND. Development of a TaqMan multiplex PCR assay for detection of plasmid-mediated ampC β-lactamase genes. J Clin Microbiol 2012; 50: 3722-5.

87. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 906-9.

88. Guillard T, Moret H, Brasme L, Carlier A, Vernet-Garnier V, Cambau E, et al. Rapid detection of qnr and qepA plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(2): 253-9.

89. Spanu T, Fiori B, D'Inzeo T, Canu G, Campoli S, Giani T, et al. Evaluation of the new nucliSENS easyQ KPC test for rapid detection of Klebsiella pneumoniae carbapene-mase genes (bla KPC). J Clin Microbiol 2012; 50(8): 2783-5.

90. Singh K, Mangold KA, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, et al. Rectal screening for Klebsiella pneumoniae carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. J Clin Microbiol 2012; 50(8): 2596-600.

91. Faria-Ramos I, Espinar MJ, Rocha R, Santos-Antunes J, Rodrigues AG, Canton R, et al. A novel ow cytometric assay for rapid detection of extended-spectrum β-lactamases. Clin Microbiol Infect 2013; 19(1): E8-15.

92. Maragakis LL. Recognition and prevention of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in the intensive care unit. Crit Care Med 2010; 38(8 Suppl): S345-51.

93. 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.

94. 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.

95. 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; 17(1): 229.

96. Mezger A, Gullberg E, Göransson J, Zorzet A, Herthnek D, Tano E, et al. A general method for rapid determination of antibiotic susceptibility and species in bacterial infections. J Clin Microbiol 2015; 53(2): 425-32.

97. van Belkum A, Rochas A. Laboratory-based and point-of-care testing for MSSA/MRSA detection in the age of whole genome sequencing. Front Microbiol 2018; 9: 1437-47.

DOI: *10.48305/jims.v40.i688.0743*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 688, 4th Week, November 2022**

Received: 04.10.2022 Accepted: 14.11.2022 Published: 19.11.2022

Detection Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates from Clinical Samples; Narrative Review

Golnar Rahimzadeh[1], Mohammad Sadegh Rezai[2]

Review Article

Abstract

Background: The emergence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Carbapenemase- Producing Enterobacteriaceae is a threat to global health. Fast and accurate detection of these strains plays a key role in controlling nosocomial infections and effective treatment. In the present study, the detection methods of carbapenemase and broad-spectrum β-lactam-producing Enterobacteriaceae have been investigated, focusing on the summary of culture-based techniques and molecular methods.

Methods: The present study is a narrative review. The articles published between 2000 and 2022 were searched in international authoritative databases namely Scopus, PubMed, Scholar, Google, Web of Science, Science direct.

Findings: To identify Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, conventional culture methods, biochemical methods, mass spectrometry, molecular methods, next generation sequencing, microarrays, whole genome sequencing, hybridization-based system, starch iodine assay, immunochromatography, colorimetry, mass spectrometry, electrochemical measurement, and flow cytometry were used.

Conclusion: For the detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae, MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight), next-generation sequencing and whole genome sequencing are among the new and selected techniques.

Keywords: Carbapenemase; Beta-Lactamases; *Enterobacteriaceae;* Phenotypic techniques; Molecular diagnostic technique

Citation: Rahimzadeh G, Rezai MS. **Detection Extended-Spectrum Beta-Lactamase- and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates from Clinical Samples; Narrative Review.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(688): 743-58.

1- Assistant Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2- Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Corresponding Author: Mohammad Sadegh Rezai, Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran; Email: rezai@mazums.ac.ir