

## مروری بر روش‌های رایج آزمایشگاهی شناسایی کارباپنمازها در باسیل‌های گرم منفی

**ابراهیم کوهساری:** دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. ebrahim.msph@gmail.com  
**عابد زاهدی بیالوانی:** دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. abedzahedi@gmail.com  
**سارا عباسیان:** دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. sabassian460@gmail.com  
**هاشم فخر یاسری:** متخصص گوارش، استادیار، گروه طب داخلی، بیمارستان فیروزگر، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.  
**حسین صمدی کفیل:** دکتری تخصصی، استادیار، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. ebrahim1340@yahoo.com  
**رخساره محمد زاده:** دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. rmohamadi@gmail.com  
**\*محمد رهبر:** دکتری تخصصی، استاد، گروه میکروب شناسی، آزمایشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران (\*نویسنده مسئول). rahbar.reflab@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۴

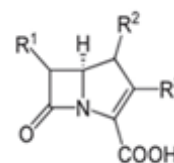
### چکیده

شیوع انتروباکتریاسه تولیدکننده کارباپنماز در طی یک دهه‌ی گذشته با افزایش چشمگیری روبه رو بوده است. شناسایی این دسته از باکتری‌ها بدلیل اینکه همیشه یک میزان حداقل غلظت مهاری برای کارباپنمازها در طیف مقاومتشان نشان نمی‌دهند، اهمیت دارد. به همین دلیل شناسایی این باکتری‌ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی یک موضوع با اهمیت برای انتخاب طرح درمانی مناسب و اجرای اقدامات کنترل عفونت است. غربالگری باکتری‌های تولیدکننده کارباپنماز با استفاده از روش‌های مختلف فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی انجام می‌گیرد، با این حال هر یک از این روش‌ها دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند. هدف از این مطالعه مروری بررسی و معرفی روش‌های رایج موجود جهت شناسایی کارباپنمازها می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** کارباپنماز، انتروباکتریاسه، مقاومت آنتی بیوتیکی، شناسایی، کنترل عفونت

### مقدمه

کارباپنم‌ها به‌عنوان مثال، مروپنم (MEM) و ایمپنم (IPM) با طیف فعالیت ضد باکتریایی گسترده، یک کلاس از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام متفاوت از پنی‌سیلین هستند. ساختار کارباپنم در شکل ۱ آورده شده است. کارباپنم‌ها اولین بار در سال ۱۹۸۰ میلادی معرفی شدند. آن‌ها معمولاً به‌عنوان آخرین انتخاب در درمان عفونت‌های جدی ناشی از سویه‌های مقاوم چند دارویی باسیل‌های



شکل ۱- ساختار یک کارباپنم

گرم منفی استفاده می‌شوند. مقاومت به کارباپنم‌ها در میان باکتری‌های گرم منفی (MDR-GNB) عمدتاً مرتبط با تولید کارباپنمازها می‌باشد. بخاطر ارتباط کارباپنمازها در مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سایر کلاس‌های آنتی‌بیوتیک‌ها، مانند فلوروکینولون‌ها، کوتریموکسازول و آمینوگلیکوزیدها، این مسئله در حال حاضر به یک نگرانی فزاینده در مراکز بهداشتی درمانی در سراسر جهان تبدیل شده است (۱-۳). بر اساس طبقه‌بندی آمبلر (Ambler)، آنزیم‌های هیدرولیز کننده‌ی کارباپنم به سه گروه مجزا A، B و D تقسیم می‌شوند. از انواع مهم کلاس A این گروه شامل نوع KPC (بیشتر در سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه) و نوع GES (بیشتر در اسینتو بومانی) می‌باشد. این کلاس عمدتاً به‌صورت کروموزومی کدگذاری می‌شود و شامل کارباپنمازهای حساس به مهارکننده کلاولانیک اسید هستند. کلاس B آمبلر، متالو-

D هستند. خصوصیات بیشتر این کلاس ها در جدول ۱ آورده شده است. این گروه از آنزیم ها معمولاً سبب مقاومت به کاربایم در انتروباکتریاسه و یا گونه های اسینتوباکتر می شوند. مقاومت به کاربایم ها به دلایل مختلفی از قبیل کاهش بیان پروتئین های غشای خارجی، افزایش فعالیت سیستم Efflux و تولید بتا لاکتامازهای کاربایمنمازی که می توانند کاربایم ها را با عمل هیدرولیز غیر فعال کنند، مرتبط می دانند. ظهور مقاومت به آنتی بیوتیک کاربایم نظیر ژن های *blaKPC* بر روی عناصر متحرک ژنتیکی نظیر پلاسمیدها واقع شده است که سبب تسهیل انتقال آنها در میان ایزوله های بالینی انتروباکتریاسه بخصوص کلبسیلا پنومونیه می شوند. ظهور مقاومت به این آنتی بیوتیک ها به عنوان انتخاب آخر درمان آنتی بیوتیکی، درمان عفونت های ناشی از پاتوژن های مقاوم به دارو (باکتری های گرم منفی) را پیچیده تر کرده است (۹،۸،۱).

باکتری های گرم منفی تولید کننده کاربایمنماز می توانند عامل طیف وسیعی از عفونت ها، از جمله باکتری می، اندوکاردیت، عفونت های زخم، عفونت های دستگاه ادراری و پنومونی بیمارستانی باشند. این عفونت ها اغلب با میزان مرگ و میر بالا، شکست درمان و بستری شدن طولانی مدت در بیمارستان مرتبط هستند؛ بنابراین، برای انتخاب طرح درمان آنتی بیوتیکی، به ویژه در بخش های

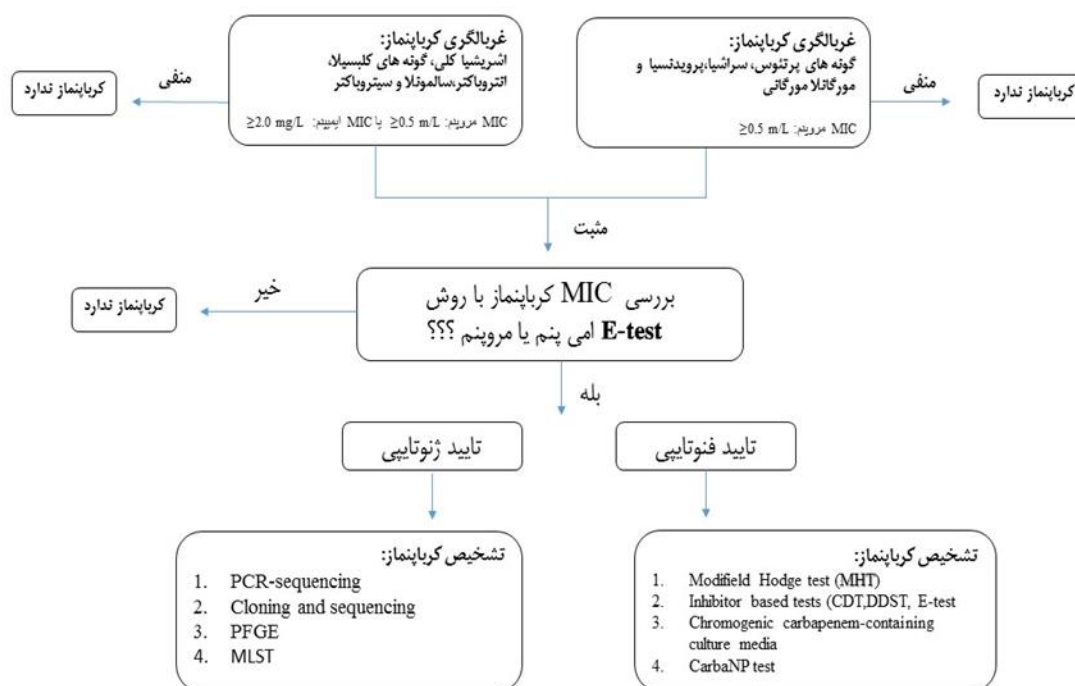
بتا لاکتامازهایی (beta lactamase Metallo: MBL) را شامل می شوند که عمدتاً متشکل از انواع GIM، IMP، VIM و NDM می باشد. در آخر، کلاس D آمبلر شامل کاربایمنمازهای انواع OXA-23، OXA-24/40، OXA-58 و OXA-143 در گونه های اسینتوباکتر و نوع OXA-48 در باکتری های انتروباکتریاسه می باشند. وجود تغییرات پورینی در کاربایمنمازهای کلاس D اغلب مقاومت بیشتر را ایجاد می کنند. بر اساس مطالعات مولکولی، آنزیم های هیدرولیز کننده کاربایم می تواند به دو گروه طبقه بندی شوند: آنزیم های سرین کاربایمنماز و متالوبتا لاکتاماز. آنزیم سرین کاربایمنماز دارای یک سرین در سایت فعال خود می باشد. متالوبتا لاکتامازها برای فعالیت نیازمند کاتیون های دو ظرفیتی مثل روی، به عنوان کوفاکتور فلزی است. ژن های کاربایمنمازها عمدتاً بر روی عناصر ژنتیکی بسیار متحرک نظیر پلاسمیدهای قابل انتقال قرار دارند، بنابراین می توانند به سرعت در بین باکتری های مختلف منتشر و سبب تشدید مقاومت شوند. این پتانسیل انتشار مقاومت در چندین شیوع با مرگ و میر بالا گزارش شده است. مراکز کنترل و پیشگیری بیماری (CDC) غربالگری پری رکتال و جداسازی از بیماران کلونیزه شده و یا آلوده به انتروباکتریاسه تولید کننده کاربایمنماز را توصیه می کند (۴-۷). سرین کاربایمنمازها متعلق به کلاس A یا کلاس

جدول ۱- سوبسترا و پروفایل های مهارتی کاربایمنمازها

آنزیم	گروه های عملکردی	پروفایل های مولکولی			پروفایل های هیدرولیز		پروفایل های مهارتی	
		پنی سیلین ها	سفالوسپورین ها	آزترونام	کاربایم ها	EDTA	کلولانیک اسید	
NMC		+	+	+	+	-	+	
IMI	2f	+	+	+	+	-	+	
SME		+	+	+	+	-	+	
KPC		+	+	+	+	-	+	
GES		+	+	-	±	-	+	
IMP		+	+	-	+	+	-	
VIM	3	+	+	-	+	+	-	
GIM		+	+	-	+	+	-	
SPM		+	+	-	+	+	-	
OXA	2d	+	+	-	±	-	±	

+ : هیدرولیز قوی، ± : هیدرولیز ضعیف، - : بدون هیدرولیز

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, NMC: Not metallo enzyme carbapenemase, SME: *Serratia marcescens* enzyme, KPC: K. pneumonia carbapenemases, GES: Guiana extended spectrum, VIM: Verona integron-encoded metallo-beta-lactamases, GIM: German imipenemase, SPM: Sao Paulo metallo-beta-lactamases.



شکل ۲- طرح تشخیص کارباینماز های در انتروباکتریاسه. قطر هاله نقطه انفصال غربالگری برای مروپنم در  $\geq 23$  میلی متر با دیسک ۱۰ میکروگرم و برای اشریشیاکلی، گونه‌های کلبسیلا و انتروباکتر قطر هاله نقطه انفصال غربالگری برای ایمی پنم با دیسک ۱۰ میکروگرم  $\geq 21$  میلی متر تنظیم شده است (۷).

مؤثر باکتری‌های تولید کننده کارباینماز است. شناسایی باکتری‌های تولید کننده KPC به دلیل بیان ناهمگن مقاومت  $\beta$ -لاکتامی می‌تواند چالش برانگیز باشد. برای تشخیص، چندین روش غیر مولکولی مطالعه شده است که عمدتاً بر اساس استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی است. تکنیک‌های مولکولی روش‌های استاندارد تشخیص کارباینماز نیز موجود می‌باشند. طرح تشخیص کلی شامل یک مرحله غربالی است که توسط یک مرحله فنوتیپی و ژنتیکی در شکل ۲ آورده شده است تأیید می‌شود (۱ و ۷ و ۱۰ و ۱۱).

هدف از ارائه این مقاله مروری، فراهم نمودن خلاصه‌ای از روش‌های موجود در شناسایی کارباینمازها به همراه شرح نقاط ضعف و قوت هر یک از این روش‌ها می‌باشد.

### چالش‌های شناسایی تشخیص آزمایشگاهی کارباینمازها

شناسایی ایزوله‌های تولید کننده KPC به خصوص در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی مسئله چالش برانگیز است. حضور KPC همیشه

مراقبت‌های ویژه (ICU) و اجرای اقدامات کنترل عفونت، تشخیص دقیق و سریع بیماران در آزمایشگاه میکروبیولوژی بالینی یک موضوع با اهمیت هستند. تشخیص این میکروارگانیسم‌ها با مشکلاتی همراه است، بطوری که روش‌های شناسایی کارباینمازها هنوز به خوبی استاندارد نشده‌اند. سنجش ایده آل شناسایی کارباینماز باکتری‌های گرم منفی مقاوم به دارو برای اطمینان از اجرای به موقع اقدامات کنترل باید در زمان کوتاه انجام شود و قابلیت تشخیص هیدرولیز کارباینم که توسط کلاس‌های مختلف از آنزیم انجام می‌شود را داشته باشد. این مسئله می‌تواند توسط مشکلاتی که شناسایی ایزوله‌های تولید کننده کارباینماز به همراه دارد، چالش برانگیز باشد. از آنجایی که حداقل غلظت‌های بازدارنده (MICs) کارباینم‌ها می‌تواند بالا باشد، اما رنج حساسیت در اسینتو بومانی و انتروباکتریاسه پایین است؛ بنابراین، تصور می‌شود که تشخیص فعالیت این آنزیم‌ها عملکرد بسیار مهمی در بسیاری از مراکز پزشکی است و به منظور کنترل انتشار آنها نیازمند روش‌های قوی غربالگری استاندارد برای تشخیص

که MALDI-TOF MS برای تشخیص گونه‌ها، تایپینگ و شناسایی ژن مقاومت پیشنهاد می‌شود. تکنولوژی next generation sequencing (NGS) پلتفرم بهتری را جهت تشخیص و تعیین ویژگی باکتری‌های مقاوم به کاربایتم را فراهم می‌کند. حساسیت، اختصاصیت و زمان انجام آزمایش در مطالعات متفاوتی به نفع استفاده از تست‌های بیوشیمیایی (Carba NP) جهت تشخیص ایزوله‌های تولیدکننده کاربایتماز گزارش شده است. MALDI-TOF MS و روش‌های مولکولی مانند میکروآرای، LAMP و real-time PCR multiplex در آزمایشگاه مرجع انجام می‌شود. NGS نیز ممکن است برای مطالعات اپیدمیولوژی و مولکولی پیشرفته استفاده شود. خلاصه‌ای از ویژگی‌های عملکردی روش‌های شناسایی کاربایتماز در جدول ۲ آورده شده است (۱۶، ۱۷).

### شناسایی کاربایتماز توسط روش‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی

اگر چه روش‌های جدید مولکولی و فنوتیپی برای تشخیص کاربایتماز در پاتوژن‌های گرم منفی معرفی شده‌اند، اما هنوز نیاز به تست‌های ساده و مطمئن تر است. اولین گام در تشخیص کاربایتماز،

مربوط به مقاومت سطح بالا به کاربایتم‌ها نبوده، ولی ممکن است سبب نوسانات MIC در محدوده حساس و یا متوسط شود. این افزایش MIC ممکن است توسط پرسنل آزمایشگاه مورد توجه قرار نگیرد مگر اینکه آزمایش‌های تأییدی فنوتیپی به کار گرفته شوند. عوامل شناخته شده مداخله کننده با تشخیص کاربایتماز شامل ماده تلقیح شده ناکافی مورد استفاده در تست حساسیت و تغییرات روزانه در مقادیر MIC می‌باشند. با مقایسه روش‌های شناسایی، به نظر می‌رسد که روش مرجع میکروداپلوشن بالاترین حساسیت (۹۰٪) را دارد، در حالی که سیستم‌های خودکار متغیرترین نتایج را ارائه می‌کنند. تشخیص نادرست KPC ممکن است در بیماران منجر به درمان ناموفق شود (۱۲-۱۵). با وجود پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌های کشت و محیط‌های کشت غربالی، این روش‌ها هنوز هم نیاز به انکوباسیون طولانی مدت دارند. روش‌های بیوشیمیایی زمان انجام کوتاهتر و حساسیت و اختصاصیت بالاتر دارند، اما نمی‌تواند بین انواع و واریانت‌های مختلف کاربایتمازها افتراق قائل شوند. روش اسپکتروفتومتری ارزان و کارآمد هستند، اما در بسیاری از مراکز بالینی غیر معمول‌اند، در حالی

جدول ۲- ویژگی‌های عملکردی تمامی روش‌های شناسایی کاربایتمازی (۹).

تست / روش	زمان انجام	گونه‌های مورد نظر	کاربایتمازهای مورد هدف	حساسیت (%)	اختصاصیت (%)	PPV	NPV
دیسک EDTA-IMI	۱۸-۲۴ ساعت	گونه‌های سودوموناس اسپیتوباکتر	MBL	۱۰۰	۹۵,۷	ND	ND
تست دیسک ترکیبی	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B	۹۴,۸	۱۰۰	۹۴,۸	۱۰۰
تست دیسک ازتایتم	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	KPC	۸۳	۷۳,۸	۵۹,۱	۹۰,۵
دیسک دیفیوژن	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B OXA-48	۹۵-۱۰۰	۹۶-۱۰۰	ND	ND
تست دیسک OXA-48	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	OXA-48	۹۶,۳	۹۷,۷	ND	ND
AVI-DDST	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	OXA-48 و کلاس A	۱۰۰	۱۰۰	ND	ND
MAST-CDS	۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B	۹۱	۱۰۰	ND	ND
ChromID ESBL	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A, B و D	۸۷,۷	۲۴,۲	ND	ND
CHROMagar KPC	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A, B و D	۴۰,۳-۷۶,۶	۷۵,۷-۸۵,۵	۵۹	۸۷,۶
Brilliance™	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A و B	۵۹-۹۸,۸	۳۴-۱۰۰	۱۶	ND
ChromID CARBA	۱۸-۲۴ ساعت	انتروباکتریاسه	کلاس‌های A, B و D	۱۰۰	۹۸	۹۱	ND
			OXA-48	۳۰>	۶۷,۵	ND	ND

ادامه جدول ۲

ND	ND	۹۶٫۵	۹۱٫۲-۹۶٫۵			۱۸-۲۴ ساعت	ChromID OXA-48
ND	ND	۵۲٫۵	۹۳-۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	انتروباکتریاسه	۱۸-۲۴ ساعت	SUPERCARBA
۹۸٫۹	۷۶٫۷	۸۶٫۴	۹۷٫۸	KPC	انتروباکتریاسه	۱۸ ساعت	REMEL SPECTRA
۸۸٫۷	۸۴٫۶	۸۷٫۷-۱۰۰	۷۳٫۳-۹۸٫۷	کلاس‌های B,A و D	انتروباکتریاسه و سودموناس آئروژینوزا	۵-۱۸۰ دقیقه	Rapid Carb Screen Kit
۶۹٫۲-۹۲٫۲	۱۰۰	۱۰۰	۷۲٫۵-۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	انتروباکتریاسه و سودموناس آئروژینوزا	۵-۱۲۰ دقیقه	Carba NP test
ND	ND	۱۰۰	۹۴٫۷	کلاس‌های B,A و D	اسیتوباکتر بومانی	۵-۱۲۰ دقیقه	CarbAcineto NP test
ND	ND	۹۸٫۵	۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	انتروباکتریاسه	۱-۳ ساعت	Spectrophotometry
ND	ND	۸۹٫۹-۱۰۰	۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	باسیل گرم منفی	۷۵ دقیقه - ۱۲ ساعت	MALDI-TOF MS
۱۰۰	-۱۶٫۶ ۴۶٫۶	۸۹٫۹-۱۰۰	۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	باسیل گرم منفی	۶۰-۱۲۰ دقیقه	Real-time multiplex PCR
۱۰۰	۱۰۰	۸۷٫۷-۱۰۰	۹۰٫۵-۱۰۰	NDM, VIM, IMP, OXA-48, KPC	انتروباکتریاسه و باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	۴٫۵-۵ ساعت	Check-MDR Carba assay
۰-۷۰	۱۰۰	۹۴-۱۰۰	۹۷٫۱-۱۰۰	KPC, VIM, NDM, OXA-48	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	>۱۸۰ دقیقه	Check-Direct CPE
ND	ND	۱۰۰	۱۰۰	KPC, VIM, NDM, OXA-48	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	۲۵-۶۰ دقیقه	LAMP/Eazyplex superbug complete A
ND	ND	۱۰۰	۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	انتروباکتریاسه	>۱۲۰ دقیقه	TaqMan PCR
ND	ND	۱۰۰	۱۰۰	KPC	انتروباکتریاسه	>۱۲۰ دقیقه	NucliSENSEasyQKPC
ND	ND	۱۰۰	۱۰۰	KPC, VIM, NDM, OXA-48	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	۵۲ دقیقه	Carba-R kit Xpert
ND	ND	۹۷٫۴	۹۸٫۲	کلاس‌های B,A و D	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	۲-۸ ساعت	Microarray
۱۰۰	۸۱٫۸-۹۳	۹۹-۹۹٫۴	۱۰۰	KPC, NDM, VIM	باسیل‌های گرم منفی غیر تخمیری	>۱ ساعت	Xpert MDRO assay
ND	ND	۱۰۰	۱۰۰	کلاس‌های B,A و D	همه‌ی باکتری‌ها	<۸ ساعت	Next generation sequencing platforms

AVI-DDST, avibactam-double disc synergy test; CPE, carbapenemase-producing Enterobacteriaceae; CRE, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; LAMP, Loop-mediated isothermal amplification; MALDI-TOF MS, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; MBL, metallo-β-lactamases; PPV: Positive predictive value; NPV: Negative predictive value; MBL: Metallo beta lactamase

استفاده از روش‌های شناسایی بر اساس آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی است. این روش‌ها شامل دیسک دیفیوژن، میکرودایلوشن برات، روش‌های گرادیان ضد میکروبی (به‌عنوان مثال نوارهای E-test) و چندین سیستم خودکار تجاری موجود به‌عنوان مثال، سیستم‌های VITEK شرکت بیومریکس (Marcy L'Etoile, France)، سیستم میکروباشناسی خودکار Phoenix MicroScan و BD Diagnostics سیستم‌های WalkAway شرکت زیمنس (Dade Behring)،

West Sacramento, CA) می‌باشند (۱۸).  
دستیابی به نتایج دقیق تست حساسیت برای داروهای کارباپنم اغلب در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی چالش برانگیز است. ارزیابی صحیح ژن مقاومت در مورد طغیان‌های بیمارستانی در تعیین مسیر انتشار و استفاده از مناسب‌ترین تدابیر مهار، مهم و اساسی تلقی می‌شود. با توجه به دستورالعمل‌ها، نقاط انفضال (breakpoints) برای مروپنم (MEM) و ایمپنم (IPM) در  $\geq 1$  میلی‌گرم/لیتر حساس و در  $\leq 4$  میلی‌گرم/لیتر مقاوم

استفاده از روش‌های شناسایی بر اساس آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بالینی است. این روش‌ها شامل دیسک دیفیوژن، میکرودایلوشن برات، روش‌های گرادیان ضد میکروبی (به‌عنوان مثال نوارهای E-test) و چندین سیستم خودکار تجاری موجود به‌عنوان مثال، سیستم‌های VITEK شرکت بیومریکس (Marcy L'Etoile, France)، سیستم میکروباشناسی خودکار Phoenix MicroScan و BD Diagnostics سیستم‌های WalkAway شرکت زیمنس (Dade Behring)،

حساسیت ضد میکروبی، مانند Vitek و یا Phoenix استفاده می‌شود (۲۶، ۲۵، ۲۴). سیستم Vitek در دهه ۱۹۸۰ میلادی معرفی شد و در مطالعات متعددی ارزیابی شده است، این سیستم به طور خودکار تشخیص سریع و حساسیت ضد میکروبی برای کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی را در عرض ۳ ساعت ممکن می‌سازد. البته سیستم Vitek II نیز در سال ۱۹۹۹ میلادی معرفی شد که اساساً متفاوت از سیستم قبلی VITEK است. سیستم Vitek II می‌تواند با اطمینان برای شناسایی مقاومت در برابر چندین عامل ضد میکروبی مهم بالینی استفاده شود. در مقابل آگار دیلوشن و E-test برای شناسایی تولیدکنندگان کارباپنماز با سطح مقاومت پایین‌تر به کارباپنم، سیستم Vitek II موثرتر است (۲۹، ۲۸، ۲۷).

سیستم میکروبیولوژی خودکار PHOENIX™ (BD Diagnostics, Sparks, MD, USA) یکی دیگر از سیستم‌های خودکار است که در سال ۲۰۰۳ معرفی شد و برای شناسایی سریع باکتری در سطح گونه و تعیین دقیق تست حساسیت ضد میکروبی پاتوژن‌های باکتریایی مهم بالینی طراحی شده است. غربال‌گری بر اساس MIC کارباپنم  $\leq 2$  میکروگرم/ میلی لیتر (MEM برای VITEK II؛ ETP در ترکیب با IPM یا MEM برای Phoenix) نسبت به سیستم غربالگری توسط کارشناس آزمایشگاهی، حساس‌تر و در معرض تفسیر اشتباه کمتر قرار دارد. آزمایشگاه‌های میکروبی شناسی بالینی بطور معمول جهت تأیید حساسیت IPM از سیستم خودکار MicroScan استفاده می‌کنند که بایست از یک روش مستقل از تست حساسیت ضد میکروبی نیز استفاده نمایند (به جهت نتایج غیر قابل قبول که در شناسایی حساسیت IPM دارند (میزان خطای بیشتر در حساسیت IPM) (۳۲-۳۰).

### روش‌های فنوتیپی شناسایی کارباپنمازها

در حالی که برخی از آزمایشات ممکن است برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده کارباپنماز استفاده شوند، در سال‌های اخیر شش روش

است و برای ارتاپنم در  $\geq 0.5$  میلی گرم/لیتر حساس و در  $\leq 2$  میلی گرم/لیتر مقاوم می‌باشد. تشخیص ایزوله‌های تولیدکننده کارباپنماز تنها بر اساس مقادیر MIC اختصاصیتی ندارد. با این حال، برای تشخیص بسیاری از آنها، به نظر می‌رسد ارتاپنم ETP، بدلیل اینکه به طور کلی مقادیر MIC بالاتر از سایر کارباپنماها دارد، کاندید خوبی است (۱۹-۲۱). روش‌های دیسک دیفیوژن و میکرودايلوشن برات برای شناسایی تمامی انواع مقاومت مرتبط با کارباپنماز مطمئن‌تر می‌باشند. هدف روش‌های آگار میکرودايلوشن و برات میکرودايلوشن تعیین MIC عامل ضد میکروبی مورد سنجش است که تحت شرایط مشخصی مانع از رشد باکتری مورد بررسی می‌شود. در روش برات میکرودايلوشن که توسط CLSI نیز توصیه شده، زمان انکوباسیون برای تعیین حساسیت ضد میکروبی باکتری‌های پاتوژن بین ۱۶ و ۲۰ ساعت تنظیم شده است. با توجه به دستورالعمل CLSI برای غربالگری فنوتیپی کارباپنماز انتروباکتریاسه، MICs برای ETP، IPM و MEM به ترتیب ۲، ۴-۲ و ۲-۴ میکروگرم/ میلی لیتر است (و یا یک قطر هاله عدم رشد ETP و یا  $\geq 21$  میلی متر در در روش دیسک دیفیوژن) ممکن است تولید کارباپنماز توسط ایزوله‌ها را نشان دهد و این فنوتیپ باید توسط روش‌های اختصاصی تأیید شود (۲۲، ۲۳).

روش‌های تست حساسیت خودکار، به دلیل سهولت در انجام و کارایی بالا، به طور گسترده‌ای در مراکز پزشکی استفاده می‌شود. با توجه به توصیه‌های CLSI، شناسایی فنوتیپی ارگانسیم‌های تولیدکننده KPC بر اساس کاهش حساسیت به MEM یا ETP است. روش‌های تست حساسیت خودکار نیز برای شناسایی مقاومت مرتبط با KPC قابل اعتماد نیستند؛ با این حال، بسیاری از سیستم‌های خودکار بطور صحیح ایزوله‌های KPC حساس به MEM را گزارش می‌کنند. بسیاری از این سیستم‌های خودکار از روش‌های کالیمتری، کدورت سنجی و یا فلورسنت استفاده می‌کنند. در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی برای کاهش زمان انجام کار معمولاً از سیستم‌های خودکار تست

کاربایپنمازهای کلاس A، B و D بالا می‌برد. هر چند انجام این روش در آزمایشگاه بالینی نسبتاً آسان و عملی است، ولی تفسیر نتایج آن نیاز به فرد با تجربه دارد (۳۷-۳۵).

این تست و روش‌های مشابه مانند روش Masuda (MAS) مستقیماً فعالیت کاربایپنماز را به ترتیب در سلول‌های سالم و آنزیم عصاره‌های خام آنزیمی مورد ارزیابی قرار می‌دهد. برای شناسایی باکتری تولید کننده کاربایپنماز، انجام این روش‌ها نسبت به روش‌های معمول فنوتیپی به ویژه هنگامی که مکانیسم‌های ترکیبی حضور دارند، بهتر است. مطالعات نشان می‌دهد که MHT مورد تایید مراکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) و CLSI بوده و اختصاصیت پایین‌تری نسبت به آزمون کاربایپنماز غیر مستقیم (ICT) در شناسایی کاربایپنماز تولیدی توسط ایزوله‌های غیر کلبسیلابی انتروباکتریاسه تولیدکننده KPC دارد. آزمون کاربایپنماز غیر مستقیم می‌تواند به آزمایشگاه‌های بالینی در شناسایی دقیق اشیریشیا کلی، سیتروباکترفروندی، انتروباکتر و ایزوله‌هایی که ژن bla<sub>KPC</sub> را ندارند کمک کند (۳۸).

MHT در شناسایی فعالیت کاربایپنماز ایزوله‌ها می‌تواند در گام نخست استفاده شود. علاوه بر این، انجام این روش برای ارزیابی فعالیت کاربایپنماز به‌عنوان بخشی از فرایند کنترل عفونت در طغیان‌های ناشی از تولیدکنندگان کاربایپنماز مفید است. شناسایی اشتباه تولید کاربایپنماز در روش MHT ممکن است در گونه‌هایی از انتروباکتریاسه، از جمله کلبسیلا پنومونیه و اشیریشیا کلی و همچنین AmpC بتالاکتاماز کروموزومی سرایشیا و انتروباکتر کلوآکه رخ دهد. این نتایج مثبت کاذب احتمالاً از سطح پایین فعالیت کاربایپنماز توسط ESBL و آنزیم‌های AmpC، یا از دست دادن پورین‌ها نشات می‌گیرد (۳۹،۷).

MHT ممکن است بیان کاربایپنماز عملکردی را شناسایی کند و توسط برخی آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، زمان لازم برای شناسایی ۲۴-۴۸ ساعت است و تنها برای شناسای تیپ KPC توسط CDC توصیه می‌شود (۴۰). برای هر ایزوله نامشخص و یا مثبت در MHT،

فنوتیپی بطور فزاینده‌ای در بسیاری از آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی بالینی بکار گرفته می‌شود. از جمله این روش‌ها MHT، آزمون هم افزایی دیسک - مهارکننده، محیط کشت غربالی کروموژنیک و غیر کروموژنیک، روش‌های بیوشیمیایی، اسپکتروفتومتری، MALDI-TOF. شناسایی فنوتیپی به تست‌های غربالگری و تشخیصی تقسیم می‌شوند. محیط کشت‌های غربالی برای شناسایی ویژگی ایزوله‌های تولید کننده کاربایپنماز استفاده می‌شوند. برای تشخیص فعالیت کاربایپنماز، چندین روش آزمایشگاهی فنوتیپی تجاری موجود توصیف شده است. برخی از تست‌ها دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی هستند؛ اما هیچ یک از آنها نزدیک به ۱۰۰٪ نمی‌باشد.

روش MHT تنها روش تشخیصی و فنوتیپی کاربایپنماز است که توسط CLSI توصیه می‌شود. اصل مهم این روش غیر فعال سازی کاربایپنماز توسط سلول‌ها یا عصاره سلولی ارگانسیم‌های تولید کننده کاربایپنماز است. این تست برای شناسایی مکانیسم، حساس و مناسب است. با این حال، در این روش جزئیات نوع کاربایپنماز ارائه نمی‌شود. علاوه بر این، نتایج مثبت کاذب که با کاهش نفوذپذیری غشای خارجی توسط سویه‌های تولید کننده CTX-M ایجاد می‌شود یک نقطه ضعف این روش است (۳۳،۷،۳۴).

### Modified Hodge test

آزمون MHT یک نسخه اصلاح شده آزمون Hodge است که توسط CLSI در سال ۲۰۰۹ معرفی شد. آزمون MHT، یک تست غربالگری فنوتیپی برای باکتری‌های حساس به کاربایپنماز است و دارای حساسیت و اختصاصیت بالا (> ۹۰٪) در شناسایی کاربایپنمازهای آمبلر کلاس A نوع KPC و کلاس D (OXA-48) تولید شده در بین اعضای انتروباکتریاسه است. با این حال، این روش در شناسایی متالوبتالاکتامازها دارای حساسیت پایین، و برای شناسایی سرین کاربایپنمازها اختصاصیتی ندارد و زمان بر است. اما، راه حل این مشکلات، اضافه کردن عنصر روی به محیط کشت است، که حساسیت روش MHT را در تشخیص

مهارکننده‌ها بر سلول باکتری اختصاصیت داشته باشد. EDTA، مانند بسیاری شلاته کننده های فلزی دیگر، سبب افزایش نفوذپذیری غشای خارجی می‌شود که به طور بالقوه سبب نتایج مثبت کاذب آزمون MBL می‌شوند (۴۳-۴۵).

اطلاعات قبلی پیشنهاد می‌کنند که دیسک DPA-IPM (دیپیکولنیک اسید - امی پنم) و تست‌های سینرژیسیم دیسک DPA (D-DST) برای شناسایی ایزوله‌های تولید کننده MBL می‌تواند بدلیل کارایی بالا و نسبتاً آسان یک روش غربال گری مفید باشد. در میان روش‌های شناسایی فنوتیپی که تا کنون معرفی شده، آزمون دیسک DPA-IPM بهترین روش غربالگری برای شناسایی فنوتیپی در گونه‌های کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر و پسودوموناس تولید کننده MBL (انواع 2-VIM و 1-IMP) می‌باشد (۴۷).

از طرفی دیگر، موگزالاکتام، یک سفامايسين وسیع الطیف، در DST موگزالاکتام - EDTA (MOX-EDTA) می‌تواند به‌عنوان یک روش تاییدی جهت افتراق تولید MBL و نفوذ ناپذیری غشای خارجی استفاده شود. این روش با توجه اینکه به معرف‌های ارزان نیاز دارد برای غربالگری اختصاصی MBL در کشورهای با منابع محدود مناسب است. در ارزیابی مقایسه‌ای دیسک‌های مهارکننده MEM- و محیط کشت آگار کرموزنیک برای شناسایی کارباینماز در انتروباکتریاسه روش دیسک‌های مهارکننده، با وجود محدودیت در اینکه قادر به تشخیص کارباینماز های کلاس D نمی‌باشد، نسبت به روش‌های دیگر حساستر و اختصاصی‌تر می‌باشند (۴۸، ۴۹).

### روش مبتنی بر بورونیک اسید

روش‌های فنوتیپی بر اساس فعالیت مهارتی ترکیبات بورونیک اسید بسیار راحت انجام و تفسیر می‌شوند و ممکن است از روز نخست از ایزولاسیون انتروباکتریاسه مقاوم مشکوک اعمال شوند. این تست هنگامی که به همراه ایمی‌پنم، مروپنم و سفپیم انجام می‌شود، تست حساس و اختصاصی در تشخیص KPC در کلبسیلا پنومونیه است (۳۴).

معمولاً آزمایشگاه انجام آزمون دیسک ترکیبی را درخواست می‌کند که اساساً تست حساسیت دیسک دیفیوژن معمول با یک کارباینم، به همراه همان دیسک کارباینم محتوی مهارکننده‌ی کارباینماز های کلاس A و کلاس B به ترتیب با بورونیک اسید و EDTA می‌باشد. آزمون MHT برای شناسایی فنوتیپی آنزیم‌های KPC در بیمارستان‌هایی که در آن این بتالاکتامازها اندمیک هستند مفید است (۴۱).

Pasteran و همکارانش جهت بهینه سازی MHT و نتایج قابل اعتماد تر و دقیق‌تر این روش در شناسایی کارباینماز تولیدی در سودوموناس از یک سویه شاخص جدید *K. pneumoniae* ATCC 700603 بجای *E. coli* ATCC 25922 استفاده کردند؛ بنابراین، آن را آزمایش سودوموناس MHT (PAE-MHT) نامیدند. این آزمون آزمایشگاه‌های معمول را قادر می‌سازد کارباینماز تولیدی سودوموناس مانند کارباینم حساس به MBLs و KPCs؛ که از مهم‌ترین چالش‌های اپیدمیولوژیک است را شناسایی کنند (۴۲).

### روش‌های مبتنی بر مهارکننده‌ها

اگر چه، برای کارباینماز های OXA-48، هیچ روش تشخیصی فنوتیپی خاصی موجود نمی‌باشد، شناسایی حساس و اختصاصی کارباینماز های کلاس A و B ممکن است با استفاده از آزمون دیسک دیفیوژن مهارتی کارباینماز (آزمون هم افزایی) انجام بگیرد. با این حال، برای شناسایی MBL، هیچ دستورالعمل استاندارد در دسترس نیست. در نتیجه، استاندارد سازی یک روش فنوتیپی برای غربالگری ایزوله‌های تولید کننده MBL از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. چندین روش غربالگری برای شناسایی باکتری‌های تولید کننده MBL بر پایه ممانعت از فعالیت MBL توسط عوامل شلاته کننده همچون EDTA، دیپیکولنیک اسید و ۲- مرکاپتوپروپیونیک اسید معرفی شده است. آزمون های دیسک مبتنی بر مهارکننده با مهارکننده‌های MBL در ترکیب با کارباینم‌ها می‌تواند برای اسینتوباکتر بومانی و سودوموناس به دلیل تأثیر غیر اختصاصی

سنجش دیسک ترکیبی (CD) و آزمون سینرژیسمی دو دیسک (DDST) استفاده می‌کنند. بیشترین مزیت تست‌های KPC E-test و MBL E-test و Carba NP تمایز سریع بین تولید کنندگان کارباپنمازهای کلاس A و B می‌باشد (۵۴،۵۳،۵۲).

### تست دیسک ترکیبی

قبلاً از آزمایشات دیسک ترکیبی (CDT) با استفاده از مقادیر مختلف EDTA برای شناسایی کارباپنمازهای MBL استفاده می‌گردید. آزمایشات دیسک سینرژیسم ترکیبی، به دلیل هزینه کم و سهولت انجام، به طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. با این حال، عملکرد این تست‌ها ممکن است با توجه به تغییرات در جمعیت باکتریایی تولیدکننده کارباپنماز دچار نقص شود. تست‌های دیسک ترکیبی بر اساس مهار آنزیم‌های MBL توسط DPA یا EDTA، منجر به تفاوت در قطر هاله دیسک‌های کارباپنم یا بدون مهارکننده می‌شوند. به تازگی آزمایشات دیسک ترکیبی مختلفی به ویژه آزمایشاتی که از مروپنم استفاده می‌کنند، برای تمایز کلاس A و MBL معرفی شده است. این روش، تشخیص سریع و قابل اعتماد کارباپنماز را در سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه ارائه می‌کند می‌تواند در کار روزانه بسیار عملی باشد (۵۶،۵۵،۷).

### تست دیسک دوتایی سینرژیسمی (DDST)

تست دیسک دوتایی سینرژیسمی روشی برای غربالگری بتالاکتامازهایی است که توسط مهارکننده‌هایی مانند کلاولانیک اسید (بتالاکتامازهای آمبلر کلاس A، به خصوص بتالاکتامازهای وسیع الطیف ESBL) غیر فعال می‌شوند. آزمون دیسک دوتایی سینرژیسمی به آسانی انجام می‌شود و می‌تواند به صورت معمول در کار روزانه آزمایشگاه‌های میکروب شناسی بالینی که از دیسک دیفیوژن به‌عنوان روش آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی استفاده می‌کنند، گنجانده شود. همچنین، برای غربال کردن حضور سویه‌های تولیدکننده MBL جهت اهداف بالینی

ترکیبات بورونیک اسید مهارکننده‌های نوع سرینی بتالاکتاماز اند که در اوایل ۱۹۸۰ میلادی معرفی شدند و به‌عنوان مهارکننده‌های سریع و برگشت پذیر آنزیم‌های AmpC متعلق به بتالاکتامازهای کلاس C شناخته شده‌اند (مهار آنها بر اساس ساختار بتالاکتام نمی‌باشد). کارباپنمازهای کلاس A، مانند KPC، می‌تواند به‌صورت سینرژیسم با بورونیک اسید غربالگری شوند؛ اما نتایج مثبت کاذب آزمون سینرژیسم در صورت تولید بتالاکتامازهای AmpC می‌تواند رخ می‌دهد. اخیراً پیشنهاد شده است که ترکیبات بورونیک اسید می‌تواند در تست‌های سینرژیسم دیسک استفاده شوند و بطور مؤثر قادر به افتراق تولیدکنندگان KPC از تولیدکنندگان MBL یا دیگر بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌باشند. به تازگی، یک روش مبتنی بر بورونیک اسید، با استفاده از دیسک ترکیبی ۳-آمینوفنیل بورونیک اسید (APBA) و IPM در شناسایی حضور کارباپنمازهای کلاس A با حساسیت و اختصاصیت بالاتر از MHT مشاهده شده است (۷، ۵۰، ۵۱).

### نوار E-test MBL

E-Test یک روش کمی برای تعیین MIC عوامل ضد میکروبی در برابر میکروارگانیزم‌ها و برای شناسایی مکانیزم‌های مقاومت است. نوار E-test (IP-IPM + EDTA) MBL یکی از روش‌های پیشنهادی برای شناسایی انواع متالوبتالاکتامازهای IMP و VIM بر اساس مهار فعالیت MBL توسط EDTA است.

MBL E-test در شناسایی ارگانیزم‌های تولیدکننده MBL با مقاومت بالا مؤثر است، اما ممکن است قادر به شناسایی ارگانیزم‌های تولیدکننده MBL با سطح مقاومت پایین به IPM نباشد. اگرچه انجام این آزمایش ساده است، ولی هزینه بوده و از نظر شناسایی ارگانیزم‌های دارای MBL حساس به کارباپنم (میکروگرم / میلی لیتر  $MIC \leq 4$ ) بسیار غیر حساس است. با توجه به این نقایص، بسیاری از آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی از روش‌های غربالگری جایگزین از قبیل

سویه‌های با سطح بالای مقاومت به کارباینم‌ها (< ۱۶ میکروگرم / میلی لیتر) می‌باشد؛ اما برای غربالگری سویه با سطوح پایین مقاومت در برابر کارباینم‌ها کمتر حساس است. ویژگی فنوتیپی در CHROMagar KPC اجازه تمایز آسان کلنی‌های باکتریایی را می‌دهد. علاوه بر این، این محیط بدون نیاز به ساب کالچر اجازه تشخیص ایزوله‌های مقاوم به ارتاپنم و حساس به کارباینم‌ها دیگر را می‌دهد (۶۱، ۶۲).

ChromID CARBA یکی دیگر از محیط‌های کشت آگار کروموژنیک برای تشخیص کارباینماز طراحی شده است که با عوامل اختصاصی که رشد گرم مثبت و غیر کارباینمازی را مهار می‌کند غنی شده است. این محیط بهترین حساسیت و اختصاصیت را نشان می‌دهد و به خوبی Brilliance CRE و CHROMagar KPC برای تشخیص سویه‌های انتروباکتریاسه تولید کننده کارباینماز است (۶۳، ۷).

ارزیابی مقایسه‌ای این محیط کشت کروموژنیک با SUPERCARBA و chromID CARBA نشان می‌دهد که chromID محیط OXA-48 و SUPERCARBA بالاترین حساسیت را برای انتروباکتریاسه تولید کننده OXA-48 (۹۱٪) و ۹۳٪ نسبت به chromID CARBA (۲۱٪) دارند (۶۴).

Brilliance™ CRE agar محیط کروموژنیک تجاری جدید است که جهت مهار رشد باکتری‌های حساس به کارباینم با یک کارباینم غنی شده است. این روش، یک برای تشخیص اعضای انتروباکتریاسه تولید کننده MBL و KPC روشی مناسب، ساده و حساس است؛ بنابراین، می‌تواند یک روش جایگزین با مصرف وقت کمتر تلقی شود که توسط CDC توصیه شده است (۶۵).

با توجه به اطلاعات موجود، Brilliance™ CRE agar می‌تواند محیط انتخابی مناسب باشد زیرا اجازه رشد اغلب قریب به اتفاق (۹۲،۶٪) از ایزوله‌های انتروباکتریایی غیر حساس به کارباینم را می‌دهد در حالی که مانع از رشد اغلب ایزوله‌های حساس به کارباینم (۸۵،۱٪) می‌شود (۶۶).

و مراقبتی، این روش ممکن است مفید باشد. تشخیص متالوبتالاکتامازها به طور کلی مبتنی بر تست‌های سینرژیک‌سیمی کارباینم-EDTA در فرمت‌های مختلف استوار است. با توجه به قطر هاله مهارى سوبسترا و دیسک‌های مهارکننده، در DDST نیاز به اصلاح فاصله بین دیسک‌هاست. در مقایسه روش‌های دیسک دوتایی با روش E-test و دیسک ترکیبی، روش دیسک دوتایی ۲- مرکاپتوپروپیونیک اسید، با استفاده از سفپیم و CAZ با یا بدون کلولانات بیشترین حساسیت (۱۰۰٪) را در شناسایی MBL در باکتریهای گرم منفی دارد. اگر چه DDST و تست دیسک ترکیبی بی دردسر و ارزان‌تر از روش E-test MBL، بسته به روش کار بکار گرفته شده است، مهارکننده‌های MBL (IMBL) و سوبستراهای بتالاکتام نتایج ناسازگار را نشان داده‌اند (۵۷، ۵۸).

### شناسایی کارباینماز با استفاده از روش‌های

#### مبتنی بر کشت

در حال حاضر، محیط غربالی که بتواند تمامی انواع کارباینمازهایی را با حساسیت و اختصاصیت بالا شناسایی کند، وجود ندارد (۳۴). چندین روش کشت برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی مقاوم به کارباینم، از جمله روش‌هایی که از محیط کشت‌های انتخابی مانند تریپتیک سوی آگار (TSA) یا مک کانکی آگار حاوی یک دیسک ۱۰ میکروگرم کارباینم و یا محیط کشت‌های آگار کروموژنیک تجاری، مانند CHROMagar KPC، ChromID CARBA، ChromID ESBL SUPERCARBA و Brilliance™ CRE Agar موجود است. در حال حاضر، کشت سواب اطراف مقعد و یا نمونه رکتال بر روی پلیت آگار انتخابی و افتراقی مانند مک کانکی آگار، روش استاندارد برای غربالگری بیماران کلونیزه شده با ارگانیسیم‌های تولید کننده کارباینماز است. محیط‌های کروموژنیک به طور گسترده‌ای برای غربالگری و تشخیص سریع باکتری‌های گرم منفی مقاوم در برابر کارباینم استفاده می‌شود (۵۹، ۶۰). اخیراً محیط کروموژنیک جدید CHROMagar KPC معرفی شده است. این یک محیط مناسب برای غربالگری

تست کارباپنماز (Carba NP) Nordmann-Poirel را به‌عنوان یک نوع تست سریع و آسان در انجام و تفسیر، با حساسیت و اختصاصیت بالا نه تنها در تشخیص فعالیت کارباپنماز بلکه انواع کارباپنمازهای سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه معرفی کردند. این روش مبتنی بر شناسایی بیوشیمیایی هیدرولیز حلقه بتالاکتام مولکول کارباپنم و به دنبال آن تغییر رنگ معرف فنل رد (قرمز به زرد یا نارنجی) بدون نیاز به تجهیزات خاصی می‌باشد. آزمون Carba NP یک تکنیک مقرون به صرفه و دقیق است که با تکنیک‌های مولکولی مانند PCR تأیید می‌شود. به استثنای برخی از تولیدکننده‌های نوع GES، آزمون Carba NP قادر به تمایز ایزوله‌های مقاوم به کارباپنم (بدلیل مکانیسم‌های غیر وابسته به کارباپنماز) از گونه‌های حساس به کارباپنم می‌باشد، همچنین برای غربالگری سویه‌های کارباپنمازهایی که در طغیان شرکت دارند مفید است و به سرعت تولیدکنندگان کارباپنمازی (مقاومت قابل انتقال) و غیر کارباپنمازی (مقاومت غیر قابل انتقال) را افتراق می‌دهد (۷۴،۷۳).

### شناسایی بر اساس روش‌های طیف سنجی جرمی

روش طیف سنجی جرمی برای تشخیص بتالاکتاماز کاتالیز شده (به‌عنوان مثال، پنی‌سیلین هیدرولیز شده و کارباپنم) بکار می‌رود. بسیاری از این ارزیابی‌ها بطور کیفی وجود محصولات هیدرولیز شده را شناسایی می‌کند، اما غلظت آنها را اندازه‌گیری نمی‌کنند و در نتیجه ارزیابی کمی فعالیت بتالاکتاماز در میان سلول‌های مختلف باکتریایی امکان پذیر نمی‌باشد. در سال‌های اخیر، روش‌های مبتنی بر تکنولوژی طیف سنجی جرمی (MS) مشخص شده است که قادر به تشخیص باکتری تولیدکننده کارباپنماز هستند. برخی از این روش‌ها UPLC-MS/MS و MALDI-TOF MS می‌باشند. اخیراً، برای شناسایی هیدرولیز حلقه بتالاکتام، MALDI-TOF در میکروپ شناسایی بالینی برای تشخیص گونه‌ها معرفی شده است. این روش ارزان، بسیار دقیق و سریع بوده که قادر به

### شناسایی کارباپنمازها مبتنی بر روش‌های بیوشیمیایی

روش‌های اسپکتروفتومتری: بر اساس آنالیز هیدرولیز ایمی‌پنم، یک روش اسپکتروفتومتری معرفی شده است که کارباپنمازها را از غیر کارباپنمازها متمایز می‌کند. هیدرولیز در حضور یا عدم حضور مهارکننده‌ها (به‌عنوان مثال، EDTA برای MBL، اسید تازوباکتام یا کلوالانیک برای KPC) انجام می‌شود. این روش ارزان و مناسب، شناسایی‌کننده سویه‌های تولیدکننده کارباپنماز است و ممکن است در سطح جهانی در هر آزمایشگاه مرجع اجرا شود. این روش می‌تواند گونه‌های کارباپنماز را از آنهایی که بدلیل مکانیسم غیرمستقل کارباپنماز، مانند مکانیسم مقاومت ترکیبی (به‌عنوان مثال مهار ESBL توسط کلوالانیک اسید، نقص نفوذ پذیری غشاء خارجی، بیان بالای سفالوسپورینازها) ایجاد شدند و همچنین گونه‌های ESBL بدون فعالیت کارباپنمازی را متمایز سازد. سنجش اسپکتروفتومتری زمانبر بوده، نیاز به نیروی کار و متخصص فنی و معمولاً مقاصد پژوهشی دارد، از این رو در آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌شود (۷). در سال‌های اخیر، آنالیز طیفی Raman برای تایپ کردن گونه‌های مختلف باکتریایی تأیید شده است. اسپکتروفتومتری Raman یک تکنولوژی نوری بر اساس پراکندگی بدون ارتجاعی نور توسط مولکول‌ها است (۶۷،۶۸).

سنجش اسپکتروفتومتری UV: این روش در چند مرحله انجام می‌گیرد: (الف) کشت ۱۸ ساعت (که در برخی از موارد به ۸ ساعت کاهش می‌یابد) (ب) یک مرحله برای استخراج پروتئین و (ج) اندازه‌گیری هیدرولیز IMP با استفاده از اسپکتروفتومتر UV. این تکنیک بطور مؤثر می‌تواند برای ارگانیزم‌های تولیدکننده IMP، SIM، VIM و بتالاکتاماز کلاس D و تولیدکنندگان NDM که شناسایی آن‌ها دشوار می‌باشد، استفاده شود (۶۷،۶۹).

تست Carba NP: اخیراً، نوردمن و همکاران

مولکولی به دلیل معطلات در تنوع آلی در ژن‌های هدف، ناکامی در تشخیص ژن‌های جدید تشخیص داده نشده، واکنش‌های متقاطع پرایمر، نیاز به پرسنل با تجربه و هزینه بالا ممکن است عملکرد کمی داشته باشند. سیمپلکس و مولتی پلکس PCR، real-time PCR، تکنیک هیبرید DNA و سکانسینگ معمولاً برای تشخیص ژن‌های کارباپنماز (*bla* KPC) در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و مرجع استفاده می‌شود. امروزه، برخی از آزمایشگاه‌های بالینی به طور معمول از این روش‌های مولکولی برای اجتناب از مشکلات شناسایی فنوتیپی ارگانسیم‌های تولیدکننده کارباپنماز استفاده می‌شود. سنجش اسپکتروفتومتری برای تشخیص هیدرولیز یک کارباپنم و به دنبال آن PCR برای شناسایی ژن *bla* KPC روشی استاندارد طلایی جهت تأیید KPC است (۷، ۱۲ و ۱۶).

### سنجش‌های Real-time PCR، Sequencing و LAMP

Multiple real-time PCR قادر به تشخیص KPC و یا NDM-1 می‌باشد، علاوه بر این، برای غربالگری حضور شایع‌ترین ژن‌های *bla* IMP، *bla* OXA، *bla* VIM چندین پروتکل real-time PCR معرفی شده است. روش Real-time PCR کمی (qPCR) تکنیک PCR استاندارد است که میزان DNA بعد از هر سیکل را با استفاده از رنگ‌های فلورسنت یا پروب الیگونوکلوئیدی فلورسنتی شناسایی می‌کند. این روش به احتمال زیاد زمان تشخیص کارباپنماز، به خصوص در مورد *bla* OXA-48 را از ۴۸ ساعت به ۴ ساعت کاهش می‌دهد. PCR-P روش دیگری است که متشکل از یک PCR کمی طولانی قطعه (LF-qPCR) جدید برای شناسایی تمام طول *bla* NDM-1 در ایزوله‌های بالینی است. اخیراً، برای غربال کردن ایزوله‌های دارای ژن KPC، یک سنجش real-time PCR کنترل شده مبتنی بر رنگ سایبر گرین که برای گونه‌های بالینی معرفی شده است. حساسیت و اختصاصیت تکنیک‌های مولکولی و شناسایی *bla* KPC با استفاده از تست‌های real-time nucleic

شناسایی انواع زیادی از ایزوله‌های باکتریایی است. در MALDI-TOF MS مواد در یک اتاقک پر از خلاء یونیزه شده و در میدان الکتریکی شتاب دار می‌شوند. این روش اجازه می‌دهد تا تشخیص و تأیید بسیار سریعی از فعالیت کارباپنمازهای کلاس A و B صورت گیرد و می‌تواند توسط ماتریس استاندارد انجام شود. این روش معمولاً برای تشخیص مستقیم فنوتیپ‌های مقاومت و تشخیص پروتئین خاص مسئول این مقاومت مناسب نیست. با توجه به مطالعات قبلی، عملکرد (LC-MS)، MALDI-TOF MS و سنجش هیدرولیز در شناسایی فعالیت کارباپنمازهای کلاس A (IMP-1، IMP-2، GIM-1، KPC-2) و B (IMP-1، IMP-2، VIM-1، SPM-1، NDM-1) عالی است (حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪). سنجش MALDI-TOF حساسیت و اختصاصیت بالاتر نسبت به دیگر روش‌های تشخیص کارباپنماز مرسوم مانند MHT و 3-D bioassay در VIM-2، OXA-23/-، SIM-1، NDM-1، KPC-1، IMP-6 و 51. کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروژینوزا و گونه‌های اسینتوباکتر دارد (۷۲-۷۰).

### روش‌های مولکولی برای شناسایی ژن‌های کارباپنماز

تکنیک‌های مولکولی بدلیل سرعت انجام، دقت و حساسیت جهت تشخیص ژن‌های کارباپنماز بکار می‌روند. با توجه به محدودیت‌های آزمون‌های فنوتیپی کارباپنماز، استاندارد طلایی تشخیص کارباپنمازها بر اساس تکنیک‌های مولکولی می‌باشد. این تکنیک‌ها نسبتاً پیچیده و نیازمند تجهیزات گران قیمت هستند. روش‌های Multiplex PCR و میکروآرای DNA اختصاصی‌ترین تکنیک‌های مولکولی هستند. روش‌های مبتنی بر PCR و سکانسینگ برای تشخیص ژن‌های مقاومتی مناسب هستند و روش‌های مبتنی بر سکانسینگ مناسب برای تشخیص ژن‌های مقاومت است، اگرچه گران‌ترند، اما بسیار تکرار پذیرند. سکانسینگ ژن‌ها عمدتاً برای اهداف اپیدمیولوژیک و پژوهش استفاده می‌شود. با وجود مزایای این روش‌ها، تکنیک‌های

مفید در آزمایشگاه بالینی در مورد KPC و MBL (*bla*<sub>VIM</sub> و *bla*<sub>NDM</sub>) به جهت تشخیص به موقع و حساسیت (۹۸٪) و اختصاصیت (۹۸،۶٪) باشد (۷۵-۸۱).

تکنیک LAMP (isothermal Loop-mediated amplification) روشی نسبتاً ساده است. این روش برای تشخیص بالینی و تشخیص انگل‌ها و باکتری‌های دخیل در بیماری‌های اپیدمی به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. مزایای اصلی استفاده از این روش، سادگی و سهولت عملکرد، خودکار بودن و زمان آنالیز کوتاه‌تر است. حمام آب تنها تجهیزات مورد نیاز برای استفاده از روش LAMP است. در نهایت، سیستم Eazyplex در ترکیب با LAMP و تشخیص فتومتریکی *real-time*، ژن‌های کد کننده کاربایناماز را سریع و ساده تشخیص می‌دهد. این روش اجازه می‌دهد تا تکثیر و تشخیص ژن‌های هدف در یک مرحله در دمای ثابت در عرض >۱۵ دقیقه بدست آید (۸۲،۷).

### روش‌های مبتنی بر میکروآرای

تکنولوژی‌های اسیدنوکلئیک میکروآرای در میان روش‌های مرسوم در تعیین ویژگی‌های ژن‌های مقاومتی و اپیدمیولوژی مولکولی بسیار مهم می‌باشند. فن آوری هیبریداسیون میکروآرای روش پیشنهادی جهت تشخیص تعداد کثیری از ژن‌های مختلف به طور همزمان در یک کوتاه دوره زمانی است. این روش دارای مزایای قابل توجهی نسبت به روش‌های سنتی است و اجازه می‌دهد تا تشخیص سریع پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) و آنالیز چند پارامتری صورت گیرد که زمان و هزینه مورد نیاز برای کسب نتایج را کاهش می‌دهد. برای تشخیص مقاومت در جنس‌های مختلف باکتری‌ها، چندین روش میکروآرای ارائه شده است. با بهینه سازی تکثیر، ژن‌های کاربایناماز از کلاس‌های مولکولی A، B و D در یک واکنش multiplex PCR که حدود ۴۰ دقیقه طول می‌کشد، می‌تواند تکثیر یابد. با این حال، تمام مراحل تجزیه و تحلیل هیبریداسیون کمتر از ۴ ساعت طول می‌کشد و می‌تواند در آزمایشگاه میکروب شناسی بالینی برای بیان تشخیص مقاومت به

acid amplification و میکروآرای DNA بر این مشکلات غلبه می‌کند و ممکن است قادر به ارائه نتایج در همان روز شود که موجب اقدامات سریع نظارتی بر عفونت می‌شود. در مقابل، تشخیص KPC با آزمون‌های فنوتیپی می‌تواند پر زحمت باشد؛ همچنین، برای به دست آوردن کامل نتیجه، زمان طولانی بیش از ۷۲ ساعت نیز مورد نیاز است. روش دیگر برای تشخیص *bla*<sub>KPC</sub> روش EasyQ KPC است که روش *real-time* مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک (NASBA) است. روش EasyQ KPC برای غربالگری نظارت نمونه‌های انتروباکتریاسه KPC مثبت حساس و اختصاصی است. در کل، در مقایسه با آنالیز استاندارد توالی DNA، آزمون EasyQ KPC با دقت و سرعت، به صورت مقرون به صرفه‌ای ایزوله‌های انتروباکتریاسه تولیدکننده KPC را شناسایی می‌کند که سبب صرف جویی در وقت و زمان انجام خواهد شد.

روش مولتی پلکس PCR چندین مزیت دارد. اولاً، قادر به تشخیص پنج کاربایناماز شایع است. دوماً، عملکرد خوب این روش جهت شناسایی کارباینامازها در سواب‌های بالینی مناسب است. اخیراً، یک مولتی پلکس *real-time* PCR معرفی شده است که تنها در یک واکنش، قادر به تشخیص شایع‌ترین نوع سرین کارباینامازها و متالوبتالاکتامازها (KPC, GES, OXA-48, IMP, ) و VIM-1 و NDM) در باکتری‌های انتروباکتریاسه است. CPE Check-Direct یک روش جدید مولتی پلکس *real-time* PCR است که هدف آن NDM، KPC، VIM و OXA-48 می‌باشد. این روش، ابرازی حساس بوده که قادر به تمایز ژن‌های کارباینامازی در عرض ۳ ساعت است. Hyplex Multiplex PCR-ELISA روش تشخیصی جدید برای تشخیص مستقیم ژن‌های MBL از انواع IMP و VIM در نمونه‌های بالینی است. در میان روش‌های تجاری در دسترس، PCR-Hyplex ELISA مناسب تشخیص پاتوژن‌های باکتریایی مختلف از کشت خون و مکانیسم‌های مقاومت در انتروباکتریاسه می‌باشد. اطلاعات نشان دهنده آنست که این روش ممکن است یک تست تکمیلی

گونه‌ها و اطلاعاتی در مورد کل ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ویروالانس ایزوله را فراهم می‌کند، در نتیجه یک دید مولکولی جامع از ایزوله تحت بررسی را ارائه می‌کند. در نتیجه، مطالعات اپیدمیولوژی و مطالعات مکانیسم‌های مقاومت کارباپنم در حال حاضر در یک واکنش انجام می‌شود و تک کارباپنمازهایی که نمی‌توانند با روش PCR مشخص شوند، به راحتی توسط WGS شناسایی و مشخص می‌شوند. WGS، بر خلاف تمام روش‌هایی دیگر که در بالا توضیح داده شد، قادر به شناسایی انواع کارباپنمازها، شناخته شده و یا ناشناخته، در عرض ۸ ساعت، با اختصاصیت و حساسیت ۱۰۰٪ است. اشکال عمده WGS عدم وجود یک پلتفرم آنالیز داده‌های جهانی جهت سهولت در مقایسه، آنالیز و به اشتراک گذاری اطلاعات در جامعه علمی جهانی است. این مشکل ناشی از تفاوت جزئی در سیستم عامل‌های NGS است. برای حل این مشکل می‌توان مجموعه‌ای از اطلاعات را به یک پایگاه اطلاعاتی مرکزی اضافه نمود، بهینه‌سازی داده‌های NGS با داده‌های قدیمی‌تر انجام گیرد و از یک نرم افزار بیوانفورماتیک استاندارد جهت آنالیز تمام WGS فعلی و اطلاعات توالی قدیمی‌تر استفاده نمود (۱۶).

### نتیجه‌گیری

سویه‌های تولید کننده کارباپنماز به دلیل مقاومت‌های MDR و PDR (Pan-drug resistance) و همچنین بدلیل عدم وجود روش‌های شناسایی مؤثر و استاندارد بالینی بجز MHT در تشخیص اولیه، مرتبط با مرگ و میر بالایی در بیماران می‌باشند. درمان مناسب و کنترل عفونت مرتبط به تشخیص به موقع و مؤثر باکتری‌های مقاوم به کارباپنم و نیز مکانیسم‌های مقاومت کارباپنمی است. ناکامی در شناسایی کارباپنمازها، وابسته به انتشار غیر قابل کنترل و شکست‌های درمانی آنهاست. کارباپنمازها باید بطور معمول در آزمایشگاه‌های بالینی با استفاده از روش‌های مناسب شناسایی شوند و جهت اجرای صحیح استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به پزشکان

آنتی‌بیوتیک‌های ناشی از تولید کارباپنماز استفاده شود. میکرواروی عوامل مکانیسم‌های مختلف مقاومت مانند اصلاحات آنزیمی، افزایش بیان ژن توسط تغییرات پروموتور، غیر فعال سازی آنزیمی آنتی‌بیوتیک‌ها، جهش سایت‌های هدف و جهش در ژن تنظیمی را پوشش دهد. Check-MDR DNA CT102 میکرواروی یک آزمون تشخیصی مولکولی جدید است که قادر به تشخیص ژن‌های خانواده ESBL (SHV، TEM و CTX-M) و شایع‌ترین کارباپنمازها (IMP، KPC، VIM، NDM و OXA-48) می‌باشد. اگر چه میکرواروی برای اپیدمیولوژی ژن‌های ESBL به نظر می‌رسد کمتر مناسب باشد ولی این روش یک تکنیک قوی است و دارای اختصاصیت و حساسیت (۱۰۰٪) برای اغلب ایزوله‌های باکتریایی است (۸۳، ۸۴، ۸۵).

### (NGS) Next generation sequencing

فن آوری NGS به موجب سکانسینگ مقرون به صرفه و سریع کل ژنوم، انقلابی در تحقیقات زیست پزشکی بوجود آورده است. با اجتناب از استفاده از کلون‌های باکتریایی، فن آوری NGS قادر به توالی یابی DNA با کتابخانه‌های خاص پلتفرم که به صورت مداوم قبل از سکانسینگ به صورت ایزوترمال تکثیر می‌یابند و یا به طور مستقیم و بدون یک مرحله تکثیر در عرض چند ساعت با هزینه نسبتاً کمی انجام می‌گیرد. NGS ابزاری برای میکروبی شناسی بالینی جهت توالی یابی DNA تک سلولی و DNA باکتری غیر قابل کشت از تمام نمونه‌های بالینی بدون یک مرحله کشت را فراهم می‌آورد، در نتیجه به طور مؤثر در زمان مورد نیاز برای کشت و پس از آن PCR و تعیین توالی صرفه جویی می‌کند. به عنوان یک نتیجه توالی یابی کل ژنوم (WGS) از طریق NGS، خصوصیات مبتنی بر PCR کارباپنمازها، محیط ژنتیکی‌شان و عناصر متحرک ژنتیکی (اینترگون، ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدها) را می‌توان در یک واکنش واحد با چند PCR پر زحمت، هضم آنزیم‌های محدودالثر و مراحل ژل الکتروفورز مقایسه کرد. علاوه بر این، فن آوری NGS اطلاعاتی را برای تایپینگ سویه‌ها، شناسایی

40.

6. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1-12.

7. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemotherapy*. 2016 Jan 2;28(1):1-9.[Persian]

8. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-25.

9. Azimi L, Rastegar Lari AA, Talebi M, Ebrahimzadeh Namvar AM, Soleymanzadeh Moghadam S. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Producing *K. pneumoniae* in Tehran, Iran. *J Med Bacteriol*. 2013; 2 (3, 4):pp. 26-31. [Persian]

10. Lari AR, Azimi L, Rahbar M, Fallah F, Alaghebandan R. Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase among burns patients: first report from Iran. *Burns*. 2013 Feb 28;39(1):174-6.

11. Bialvaei AZ, Kouhsari E, Salehi-Abargouei A, Amirmozafari N, Ramazanadeh R, Ghadimi-Daresajini A, Sedighi M. Epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Chemotherapy*. 2017 Jun 17:1-1.

12. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Apr 8;dkq108.

13. Bratu S, Landman D, Haag Ret al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005;165: 1430 - 5

14. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006;12: 1209 - 13.

15. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2009;47: 785 - 6.

16. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of applied microbiology*. 2015 Nov 1;119(5):1219-33.

17. Bertelli, C. and Greub, G. (2013) Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 19, 803-813.

18. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on

گزارش شود. با این حال، روش‌های فنوتیپی بسیار حساس نمی‌باشند. شناسایی ارگانسیم‌های تولیدکننده KPC و MBL ممکن است مبتنی بر خواص مهاری مولکول‌های متعدد (به ترتیب بورونیک اسید و EDTA) باشد. شناسایی مولکولی ژن‌های کارباپنماز یک روش جایگزین دیگر است، اما نیاز به تخصص و هزینه بالا دارد که آن را برای آزمایشگاه‌های غیر تخصصی غیرممکن می‌کند. اختصاصی‌ترین روش‌های مولکولی که برای تشخیص کارباپنماز معرفی شده است، روش‌های Multiplex PCR و سنجش میکروآرای DNA هستند. با این حال، به منظور جلوگیری از گسترش طغیان‌های بیمارستانی، شناسایی ارگانسیم‌های تولیدکننده کارباپنماز بطور جدی باید دنبال درمان آنتی‌بیوتیکی مؤثر و جداسازی باکتریهای عامل عفونت از بیماران صورت گیرد. در نهایت، برای سویه آلودکننده، آزمون Carba NP با حساسیت و اختصاصیت کمتر نسبت به دیگر روش‌ها به کارباپنمازها، می‌تواند توصیه شود. در موارد مثبت، روش مولکولی را می‌توان به‌عنوان یک روش تاییدی که به طور عمده مربوط به عوامل اپیدمیولوژیک است استفاده شود؛ اما در مورد غربالگری حاملین، محیط کرموزنیسک SUPERCARBA و به دنبال آن تست Carba NP دارای اهمیت زیادی هستند.

## منابع

1. Dahiya S, Singla P, Chaudhary U, Singh B. Carbapenemases: A Review. *Int J Adv Health Sci* 2015;2(4):11-17.

2. Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:916-29.

3. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-58.

4. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014.

5. Rahbar M, Monnavar KM, Vatan KK, Fadaei-haq A, Shakerian F. Carbapenem resistance in gram-negative bacilli isolates in an Iranian 1000-bed Tertiary Hospital. *Pak J Med Sci* 2008;24(4):537-

and instruments for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. in Manual of commercial methods in medical microbiology edited by Allan L. Truant. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2002; p. 413–29.

31. Thomson KS, Robledo IE, Vázquez GJ, Moland ES. KPC screening by updated BD Phoenix and Vitek 2 automated systems. *J Clin Microbiol*. 2011;49(9):3386–7.

32. Kulah C, Aktas E, Comert F, Ozlu N, Akyar I, Ankarali H. Detecting imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* by automated systems (BD Phoenix, Microscan WalkAway, Vitek 2); high error rates with Microscan WalkAway. *BMC Infect Dis*. 2009;9(1):30.

33. Morsi / Phenotypic and genotypic detection of carbapenem resistant *K. pneumoniae*, Volume 25 / No. 1 / January 2016 109-116.

34. Haji Hashemi B, Farzanehkhah M, Dolatyar A, Imani M, Farzami MR, Rahbar M, Hajia MA. A study on prevalence of KPC producing from *Klebsiella pneumoniae* using Modified Hodge Test and CHROMagar in Iran. *Ann Biol Res*. 2012;3(12):5659-64.

35. Riazipour M, Tavakoli HR, Fooladi AAI. Assessment of carboxyl esterase activity in clinical isolates of *Candida albicans*. *Jundishapur J Microbiol*. 2011;4(1):43–8. [Persian]

36. Hung KH, Yan JJ, Lu JJ, Chen HM, Wu JJ. Characterization of the modified Hodge test-positive isolates of *Enterobacteriaceae* in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(1):35–40.

37. 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.

38. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1323–32.

39. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):432–8.

40. Peaper DR, Kulkarni MV, Tichy AN, Jarvis M, Murray TS, Hodsdon ME. Rapid detection of carbapenemase activity through monitoring ertapenem hydrolysis in *Enterobacteriaceae* with LC-MS/MS. *Bioanalysis*. 2013;5(2):147–57

41. Janice Y. Laboratory diagnosis of NDM-1 and other carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Med Bull*. 2011;16:4

42. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator

the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(12):2710–7

19. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):432–8.

20. Institute CaLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S21. Wayne, PA: CLSI; 2012.

21. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis S, Daikos G, Bou Casals J, Tzouvelekis L. Combined disc methods for the detection of KPC-and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):E412–5

22. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163–75.

23. Bialvaei AZ, Kaafi HS. Colistin Mechanisms and prevalence of resistance. *Cur Med Res Opin*. 2015;31:707–721. [Persian]

24. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th informational supplement. CLSI Document M100-S20. Wayne, PA: CLSI; 2010.

25. Raghunathan A, Samuel L, Tibbetts RJ. Evaluation of a real-time PCR assay for the detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes in microbiological samples in comparison with the modified Hodge test. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(4):566–71

26. Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? *J Clin Microbiol*. 2011;49(2):697–701

27. De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol*. 2004;42(8):3734–8.

28. Sanders CC, Peyret M, Moland ES, Shubert C, Thomson KS, Boeufgras J-M, et al. Ability of the VITEK 2 advanced expert system to identify  $\beta$ -lactam phenotypes in isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):570–4.

29. Pailhories H, Cassisa V, Lamoureux C, Chesnay A, Lebreton C, Lemarie C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of ertapenem for *Enterobacter cloacae*: Vitek 2 system versus Etest and agar dilution methods. *Int J Infect Dis*. 2014;18:94–6.

30. Evangelista AT, Truant AL. Rapid systems

- Chen Y-G, et al. Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1136–42
55. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis S, Daikos G, Bou Casals J, Tzouvelekis L. Combined disc methods for the detection of KPC-and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(9):E412–5.
56. Peter S, Lacher A, Marschal M, Hölzl F, Buhl M, Autenrieth I, et al. Evaluation of phenotypic detection methods for metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(7):1133–41
57. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(9):2990–5.
58. Picao RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol*. 2008;46(6):2028–37
59. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1841–6.
60. Tenover FC, Canton R, Kop J, Chan R, Ryan J, Weir F, et al. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol*. 2013;51(11):3780–7
61. Carrer A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1913–4.
62. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):3110–1
63. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1841–6
64. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;77(4):296–300
65. Bracco S, Migliavacca R, Pini B, Corbo N, strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol*. 2011;49(12):4301–3
43. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in Enterobacteriaceae using phenylboronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):345–9.
44. Yan J-J, Wu J-J, Tsai S-H, Chuang C-L. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49(1):5–11.
45. Hansen F, Hammerum AM, Skov R, Haldorsen B, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of the total MBL confirm kit (ROSCO) for detection of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(4):486–8.
47. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(1):102–5
48. Pluquet E, Arlet G, Bingen E, Drieux L, Mammeri HA. Sensitive and specific phenotypic assay for metallo- $\beta$ -lactamases detection in enterobacteria using moxalactam disk supplemented with EDTA (MOX-EDTA disk method). *J Clin Microbiol*. 2011;49(7):2667–70.
49. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1965–9
50. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(7):1319–21.
51. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley S, Jaurin B, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. *Biochem J*. 1983;209:229–33
52. Shivaprasad A, Antony B, Shenoy P. Comparative evaluation of four phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase and carbapenemase production in *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(5):DC05–DC08.
53. Lee K, Yong D, Yum JH, Lim YS, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, et al. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2005;43(2):942–4
54. Qu T-T, Zhang J-L, Wang J, Tao J, Yu Y-S,

blaKPC genes in bacteria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2013;12:30.

77. Bisiklis A, Papageorgiou F, Frantzidou F, Alexiou-Daniel S. Specific detection of blaVIM and blaIMP metallo- $\beta$ -lactamase genes in a single real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(12):1201-3

78. Huang L, Hu X, Zhou M, Yang Y, Qiao J, Wang D, et al. Rapid detection of New Delhi metallo-beta-lactamase gene and variants coding for carbapenemases with different activities by use of a PCR-based in vitro protein expression method. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):1947-53

79. 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 carbapenemase genes (blaKPC). *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2783-5

80. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, et al. Rapid and direct real-time detection of blaKPC and blaNDM from surveillance samples. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3609-15.

81. Ambretti S, Gaibani P, Berlinger A, Cordovana M, Tamburini MV, Bua G, et al. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* 2013;19(3):212-5

82. Cheng C, Zheng F, Rui Y. Rapid detection of bla NDM, bla KPC, blaIMP, and bla VIM carbapenemase genes in bacteria by loop-mediated isothermal amplification. *Microb Drug Resist.* 2014;20(6):533-8

83. Ulyashova CE, Khalilova YI, Rubtsova CE, Edelstein CE, Alexandrova Icapital AC, Egorov CA. Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes a, B, and d. *Acta Nat.* 2010;2(3):101-9.

84. Peter H, Berggrav K, Thomas P, Pfeifer Y, Witte W, Templeton K, et al. Direct detection and genotyping of Klebsiella pneumoniae carbapenemases from urine by use of a new DNA microarray test. *J Clin Microbiol.* 2012;50(12):3990-8.

85. Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-Van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with a commercial DNA microarray. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 6):809-12

86. Mardis, E.R. (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, 387-402.

Nucleo E, Brigante G, et al. Evaluation of Brilliance CRE Agar for the detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *New Microbiol.* 2013;36(2):181-6

66. Kotsakis SD, Petinaki E, Scopes E, Siatravani E, Miriagou V, Tzelepi E. Laboratory evaluation of Brilliance™ CRE Agar for screening carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: performance on a collection of characterised clinical isolates from Greece. *J Glob Antimicrob Resist.* 2013;1(2):85-90

67. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):88-90.

68. Willemse-Erix D, Bakker-Schut T, Slagboom-Bax F, Jachtenberg JW, Lemmens-den Toom N, Papagiannitsis CC, et al. Rapid typing of extended spectrum  $\beta$ -lactamase and carbapenemase producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates using SpectraCellRA®. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1370-5

69. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):487-9

70. Wang M, Shen Y, Turko Nelson DC IV, Li S. Determining carbapenemase activity with 18O labeling and targeted mass spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85(22):11014-9.

71. Carricajo A, Verhoeven PO, Guezou S, Fonsale N, Aubert G. Detection of carbapenemase-producing bacteria by using an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):1231-4.

72. Vogne C, Prod'Hom G, Jatton K, Decosterd L, Greub G. A simple, robust and rapid approach to detect carbapenemases in Gram negative isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: validation with triple quadrupole tandem mass spectrometry, microarray and PCR. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(12):O1106-12.

73. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Comparative evaluation of two chromogenic tests for rapid detection of carbapenemase in Enterobacteriaceae and in Pseudomonas aeruginosa isolates. *J Clin Microbiol.* 2014;52(8):3060-3.

74. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-7.

75. 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(4):906-9.

76. Zheng F, Sun J, Cheng C, Rui Y. The establishment of a duplex real-time PCR assay for rapid and simultaneous detection of blaNDM and

## A review on common laboratory methods for detection of carbapenemase gram-negative bacilli

**Ebrahim Kouhsari**, PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ebrahim.msph@gmail.com

**Abed Zahedi bialvaei**, PhD student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. abedzahedi@gmail.com

**Sara Abbasian**, MSc student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. sabassian460@gmail.com

**Hashem Fakhre Yaseri**, MD, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Firouzgar Hospital, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Hossein Samadi Kafil**, PhD, Assistant Professor, Drug Applied Research Center, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. ebrahim1340@yahoo.com

**Rokhsare Mohamadzade**, MSc student, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. rmohamadi@gmail.com

**\*Mohammad Rahbar**, PhD, Professor, Department of Microbiology, Iranian Reference Health Laboratory Research Center, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran (\*Corresponding author). rahbar.reflab@gmail.com

### Abstract

The prevalence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* has increased dramatically over the past decade. Identification of these bacteria because of its variation in minimum inhibitory concentration for carbapenem resistance is important. Therefore, identification of the bacteria in the clinical microbiology laboratory is a major matter for the selection and implementation of infection control measures and appropriate treatment plan. The screening of carbapenemase-producing bacteria could be done with different phenotypic, biochemical and molecular methods; however, each of these methods has its own advantages and disadvantages. The aim of this study is to investigate and introduction of common available methods to detect carbapenemase.

**Keywords:** Carbapenemase, Enterobacteriaceae, Antibiotic resistance, Identification, Infection control