



Semnan University



Review Article

A Review of Laboratory Methods for Diagnosing Antibiotic Resistance with Emphasis on Identifying Beta-Lactamase-Producing Strains

Khatereh Kafshdouzan¹ , Faeze Emarloo², Heidar Rahimi¹

Abstract

The widespread and often indiscriminate use of antibiotics in medicine, veterinary practice, and agriculture has led to the emergence and global spread of diverse forms of antibiotic resistance. The rise of antibiotic resistance has not only increased patient mortality but has also imposed significant economic losses, particularly in developing countries. Among the most pressing concerns is the proliferation of β -lactamase-producing bacteria, which undermine the efficacy of β -lactam antibiotics. Rapid and accurate identification of resistant bacteria is critical for controlling infectious diseases, ensuring timely treatment, and preventing further transmission. A variety of diagnostic methods are currently employed to identify resistance mechanisms, including culture-based assays (e.g., disk diffusion, broth/agar dilution, E-test), molecular techniques, and emerging technologies. However, no single method offers complete sensitivity and specificity while meeting all the criteria for an ideal diagnostic tool. This review critically examines current methodologies for detecting antibiotic resistance, with a particular focus on β -lactamase-mediated resistance. The strengths and limitations of each approach are discussed, alongside current challenges in antimicrobial susceptibility testing and future directions for advancing diagnostic accuracy and efficiency.

Keywords: Antibiotics, Antibiotic Resistance, Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs), Phenotypic Methods, Molecular Methods.

1. Department of Pathobiology, faculty of veterinary medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Clinical Science, faculty of veterinary medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

*Corresponding author: kafshdouzan@semnan.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2025.36795.1150](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.36795.1150)

Received: 04.02.2025

Revised: 29.06.2025

Accepted: 29.06.2025

How to Cite this Article:

Kafshdouzan, K., Emarloo, F. and Rahimi, H. (2025). A Review of Laboratory Methods for Diagnosing Antibiotic Resistance with Emphasis on Identifying Beta-Lactamase-Producing Strains. *Journal of Veterinary Laboratory Research*, 17(2), 137-154. doi: [10.22075/jvlr.2025.36795.1150](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.36795.1150)





مروری بر روش‌های آزمایشگاهی تشخیص مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی با تاکید بر شناسایی سویه‌های مولد آنزیم بتالاکتاماز

خاطره کفشدوزان ^{۱*}، فائزه عمارلو ^۲، حیدر رحیمی ^۱ ID.

خلاصه

در سال‌های اخیر، افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در حوزه‌های مختلفی نظیر پزشکی، دامپزشکی و کشاورزی، به شکل‌گیری و گسترش انواع مختلفی از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در سطح جهانی منجر شده است. ظهور این مقاومت‌ها نه تنها میزان مرگ‌ومیر بیماران را افزایش داده، بلکه خسارات اقتصادی قابل‌توجهی، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، وارد کرده است. یکی از نگرانی‌های عمده در حوزه سلامت عمومی، گسترش باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز است. شناسایی سریع و دقیق این باکتری‌های مقاوم در کنترل مؤثر بیماری‌های عفونی، درمان به‌موقع و جلوگیری از شیوع بیشتر آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. در حال حاضر، روش‌های متعددی برای شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، از جمله مقاومت ناشی از تولید انواع آنزیم‌های بتالاکتاماز، به کار گرفته می‌شود. با این حال، تاکنون هیچ روش آزمایشگاهی واحدی که از حساسیت و ویژگی تشخیصی صددرصدی برخوردار بوده و تمامی ویژگی‌های ایده‌آل یک آزمون تشخیصی مطلوب را دارا باشد، معرفی نشده است. بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر، بررسی و مرور جامع انواع روش‌های تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی، شامل روش‌های مبتنی بر کشت (نظیر انتشار دیسک، رقت‌سازی و آزمون اپسیلومتر یا E-test)، روش‌های مولکولی و رویکردهای نوظهور است. همچنین، در این مطالعه به ارزیابی مزایا و محدودیت‌های هر یک از این روش‌ها پرداخته شده و چالش‌های موجود در تست‌های تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به همراه چشم‌اندازهای آینده آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: مقاومت آنتی‌بیوتیکی، بتالاکتامازهای وسیع الطیف، روش‌های فنوتیپی، روش‌های مولکولی.

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.

*نویسنده مسئول: kafshdouzan@semnan.ac.ir

DOI: [10.22075/jvlr.2025.36795.1150](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.36795.1150)

دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶

بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۰۸

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۸

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به عنوان یک روش موفق به منظور درمان عفونت‌های باکتریایی، پیشگیری و حتی مکمل رشد محسوب می‌شود. اگرچه پس از کشف و مصرف آنتی بیوتیک‌های مختلف، امید به مبارزه و کنترل بیماری‌های عفونی افزایش پیدا کرد، بلافاصله بعد از شناسایی نخستین آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت‌های آنتی بیوتیکی نیز تکوین یافته و با گذشت زمان گسترده‌تر شدند. (Abushaheen et al., 2020). به طوری که بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۶، مقاومت های آنتی بیوتیکی تا سال ۲۰۵۰ به عنوان شایع ترین علت مرگ و میر در جهان بوده و سالانه موجب مرگ و میر بیش از ۱۰ میلیون نفر خواهد شد. (de Kraker et al., 2016). بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی علاوه بر اینکه موجب شکست درمان و افزایش مرگ و میر بیماران می شود، موجب تحمیل خسارت‌های اقتصادی زیادی به جوامع بشری نیز می‌گردد (Dadgostar, 2019). به علت گستردگی عواقب ناشی از این موضوع، امروزه مقاومت‌های آنتی بیوتیکی یکی از چالش‌های جدی بهداشت جهانی محسوب می‌شود. به طوریکه سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۱ را به عنوان سال مبارزه با مقاومت‌های آنتی بیوتیکی نامگذاری کرد و در سال ۲۰۱۴ کلیه کشورهای جهان را به همکاری جهت مبارزه با توسعه مقاومت های آنتی بیوتیکی دعوت نمود (Lye et al., 2011). مکانیسم ایجاد مقاومت‌های آنتی بیوتیکی بسیار متنوع است و با گذشت زمان باکتری‌ها خود را به منظور بقاء بیشتر در شرایط جدید تطبیق داده و از روش های خلاقانه و پیچیده‌تری نظیر تغییر ساختار و غیر فعال سازی داروها، تغییر محل اتصال دارو، تغییرات نفوذ پذیری سلول از طریق پمپ های فعال و غیر فعال و تشکیل بیوفیلم و... برای غلبه بر عوامل ضد میکروبی استفاده می‌کنند (Ali et al., 2018). باکتری های مولد آنزیم بتالاکتاماز وسیع الطیف^۱ به عنوان یکی از مهم ترین مشکلات بهداشتی و درمانی از گذشته تا کنون مطرح بوده‌اند و امروزه با افزایش مصرف داروهای بتالاکتام وسیع الطیف این مشکل گسترده تر شده است. بتالاکتامازهای وسیع الطیف گروهی از آنزیم‌های بتالاکتاماز هستند که سبب مقاومت سویه مولد نسبت به

سفالوسپورین ها، پنی سیلین ها و آزتروئونام ها می شوند. این دسته از آنزیم ها در اثر جهش های آمینو اسیدی در بتالاکتاماز های اولیه (TEM-1، TEM-2 و SHV-1) به وجود آمده‌اند و به دلیل قابلیت انتقال ژنتیکی، قادرند انواع مختلف باکتری‌ها را به سویه‌های مقاوم تبدیل نمایند (Malekpour et al., 2019). از مهم ترین باکتری‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف، می‌توان به باکتری‌های گرم منفی از جمله انتروباکتریاسه ها مانند *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، گونه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اسیتوباکتر بومانی* اشاره کرد که از مهم ترین عوامل بیماریزای عفونی در پزشکی و دامپزشکی محسوب می شوند. به گونه‌ای که *سودوموناس آئروژینوزا* به عنوان شایع ترین عفونت بیمارستانی و اسیتو باکترها به عنوان دومین عوامل شایع بیمارستانی به شمار می روند (Nia et al., 2020). از طرف دیگر انتشار مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در محیط و انتقال آن بین سویه‌های مختلف باکتری، مانند انتقال سویه‌های مقاوم از دام‌های مولد غذا از طریق زنجیره غذایی به انسان، نگرانی مهمی است که در سال‌های اخیر توجه محققین بسیاری را در سراسر جهان به خود جلب کرده است (Wooldridge, 2012). اگرچه تلاش برای دستیابی به آنتی بیوتیک‌های جدید و استفاده از منابع جایگزین آنتی بیوتیکی مانند اسانس و عصاره‌های گیاهی و یا ترکیبات ضد میکروبی آنها به منظور مقابله با عواقب زیانبار مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در سال‌های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته‌است (Malekpour et al., 2019)، اما به کارگیری روش‌های آزمایشگاهی با دقت و حساسیت مطلوب برای شناسایی سویه‌های مقاوم در مناطق مختلف جغرافیایی در شناسایی سویه های مقاوم علاوه بر اینکه موجب پیشگیری از شکست درمان می‌گردد، در جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم نیز اهمیت ویژه‌ای دارد.

در سال های اخیر روش‌های آزمایشگاهی متنوعی برای بررسی انواع مختلف مقاومت های آنتی بیوتیکی تکوین یافته‌است. برخی از این روش ها نظیر انتشار دیسک، تست اپسیلومتر، رقت سازی در محیط آگار و مایع به بررسی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی به صورت فتوتیپی پرداخته و در برخی دیگر از روش‌های ملکولی مانند واکنش زنجیره ای

¹ Extended spectrum β -lactamase

پلیمرز (PCR)^۲، ریزآرایه یا بیوچیپ DNA (microarray)، توالی یابی کل ژنوم (WGS^۳) و یونیزاسیون لیزر با کمک ماتریس برای شناسایی مقاومت-های آنتی‌بیوتیکی در سطح ژنتیکی پرداخته می‌شود (Davison et al., 2010). امروزه با پیشرفت تکنیک-های میکروبیولوژی، روش‌های جدیدتری از جمله میکروکالری متری هم‌دمایی، روش‌های مبتنی بر باکتریوفاژ، روش‌های نوری و روش‌های اتوماتیک نیز برای تشخیص، این پدیده به کار گرفته می‌شوند که در مقایسه با روش‌های قبلی دارای سرعت و حساسیت بالاتری هستند. از آنجاییکه بهترین گزینه برای درمان بسیاری از عفونت‌های باکتریایی استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های خانواده بتالاکتام می‌باشد و با توجه به اهمیت پدیده مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی نسبت به این خانواده در باکتری‌ها، گسترش باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های بتالاکتاماز و جلوگیری از افزایش خسارات وارده ناشی از این پدیده در زمینه بهداشت، درمان و اقتصاد، هدف از این مطالعه، بررسی مقایسه‌ای روش‌های مورد استفاده برای تشخیص آزمایشگاهی سویه‌های مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف می‌باشد که برای شناسایی هرچه بهتر و سریع‌تر مقاومت‌های ناشی از باکتری‌ها و در نتیجه جلوگیری از شکست درمان و گسترش سویه‌های مقاوم ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش کار

روش‌های مبتنی بر کشت (فوتیپی)

ظهور مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی منجر به شکل‌گیری روش‌های مختلفی به منظور تشخیص حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی شد. روش‌های فوتیپی مبتنی بر رشد، جزء رایج‌ترین روش‌ها برای ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند به گونه‌ای که در بسیاری از مطالعات انجام شده ملی و بین‌المللی در حوزه مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، برای تعیین ویژگی‌های فوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های منفرد از این روش استفاده می‌کنند (J. E. McLain et al., 2016). این روش‌ها زمان بر بوده و معمولاً بیش از ۴۸ ساعت طول می‌کشد تا نتایج کمی یا کیفی را ارائه کنند اما با توجه به اینکه روش‌های ارزان و قابل اعتمادی هستند، هنوز هم مورد استفاده قرار می‌گیرند. اساس این روش‌ها، جداسازی

باکتری هدف در محیط‌های عمومی یا انتخابی رشد و میزان پاسخ دهی آن جدایه به غلظت‌های خاص آنتی‌بیوتیک می‌باشد. روش‌های مبتنی بر کشت برای درک ویژگی‌های فوتیپی جدایه و الگوی مقاومت آنها ضروری‌اند. از این روش‌ها بیشتر برای شناسایی پاتوژن‌های بالینی مانند سالمونلا، باکتری‌های متمایل به دریافت ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی به صورت افقی مانند انتروکوکوس و استافیلوکوکوس و باکتری‌های آسان رشد مانند کلی فرم‌های مدفوعی استفاده می‌شود (Davies & Davies, 2002; Poole, 2010). این روش‌ها در کشور‌های اروپایی بر اساس دستور العمل‌های تعیین شده توسط EUCAST^۴ تفسیر می‌شوند که از جمله این فاکتورها می‌توان به تعیین MIC^۵ اشاره کرد. CLSI^۶ نیز استاندارد‌هایی را برای MIC ارائه می‌کند. میزان باکتری مورد نیاز برای کشت، دما و زمان انکوباسیون نیز توسط EUCAST و CLSI تعیین می‌شوند. تعیین این استاندارد‌های اشاره شده اثرات زیادی بر تفسیر مناسب این تست‌ها دارد برای مثال افزایش میزان باکتری کشت داده شده، منجر به ایجاد فوتیپ‌های کاذب زیادی می‌شود (Sahoo et al., 2024). از جمله پرکاربردترین روش‌های فوتیپی می‌توان به روش انتشار دیسک، دیسک‌های ترکیبی، تست هم‌افزایی دو دیسک، رقت‌سازی در محیط آگار و مایع و تست اسپلومتر اشاره کرد. در ادامه به توضیح بیشتر هریک از این روش‌ها پرداخته می‌شود.

انتشار دیسک

روش انتشار دیسک یک روش ساده و کاربردی است که از سال ۱۹۴۰ به منظور شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نام دیگر این روش سنجش انتشار دیسک Kirby-Bauer (کربی-بائر) می‌باشد که نتایج مربوط به مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی را به صورت کیفی (حساس، متوسط و مقاوم) به جای یک شاخص کمی گزارش می‌کند. در این روش، در ابتدا تعداد Cfu/ml^۸ $10 \times 1-2$ باکتری (بر اساس دستور العمل EUCAST) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (حدوداً ۱۵۰ میلی لیتر) به صورت سطحی کشت داده شده و سپس دیسک‌های

^۴ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

^۵ Minimum inhibitory concentration

^۶ Clinical and Laboratory Standards Institute

^۲ Polymerase chain reaction

^۳ Whole genome sequencing

دیسک‌های حاوی انواع سفالوسپورین‌ها می‌باشد. برای انجام این تست، نیاز به ۲ دیسک مجزا می‌باشد. به گونه‌ای که یکی از این دیسک‌ها فقط حاوی یکی از انواع آنتی بیوتیک‌های خانواده سفالوسپورین‌ها (سفوتاکسیم، سفتازیدیم و سفپیم) بوده و دیسک دیگر به صورت ترکیبی علاوه بر سفالوسپورین‌ها حاوی کلاولانیک اسید نیز می‌باشد. در این روش هاله عدم رشد باکتری پیرامون دیسک‌های حاوی سفالوسپورین‌ها (بدون کلاولانیک اسید) با هاله عدم رشد اطراف دیسک دیگر مقایسه می‌شود. چنانچه اختلاف قطر هاله عدم رشد این دو نوع دیسک، بیش از ۵ میلی متر باشد، باکتری مولد آنزیم بتالاکتام تلقی می‌شود (Garrec et al., 2011).

تست هم‌افزایی دیسک دوتایی (Double Disk Synergy Test - DDST) یک روش فنوتیپی استاندارد برای شناسایی تولید بتا-لاکتامازهای طیف گسترده (ESBLs) در باکتری‌های گرم منفی، به ویژه *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* است. این تست بر اساس افزایش فعالیت سفالوسپورین‌های نسل سوم در حضور کلاولانیک اسید انجام می‌شود. برای اجرای این آزمایش، کشت چمنی از باکتری مورد نظر بر روی محیط مولر-هینتون آگار تهیه شده و دیسک‌های حاوی سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) در فاصله ۳۰ میلی‌متری از یکدیگر روی محیط قرار می‌گیرند. سپس، یک دیسک حاوی آموکسی‌سیلین-کلاولانیک اسید (۱۰/۲۰ میکروگرم) در فاصله ۲۰ تا ۲۵ میلی‌متری از هر دو دیسک سفالوسپورینی قرار داده شده و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت انکوبه می‌شود. در صورت تولید ESBL، افزایش واضحی در منطقه عدم رشد (اثر کلید) به سمت دیسک آموکسی‌سیلین-کلاولانیک اسید مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده مهار فعالیت آنزیم‌های ESBL توسط کلاولانیک اسید است. در صورت عدم وجود ESBL، تغییر محسوسی در اندازه مناطق عدم رشد ایجاد نمی‌شود. این روش به‌عنوان یک آزمون ساده و مقرون‌به‌صرفه برای تشخیص فنوتیپی باکتری‌های مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم شناخته شده و در انتخاب راهکارهای درمانی مؤثر، از جمله استفاده از کرباپنم‌ها یا ترکیبات مهارکننده بتا-لاکتاماز، نقش مهمی ایفا می‌کند. تست هم‌افزایی دیسک دوتایی (DDST) یک روش فنوتیپی برای

کاغذی آغشته به آنتی بیوتیک با غلظت مشخص با استفاده از یک پنس استریل بر روی محیط کشت قرار داده می‌شوند (James H. Jorgensen & John D. Turnidge, 2015). با گذشت زمان دارو در محیط آگار انتشار یافته و غلظت دارو با افزایش فاصله از دیسک کاهش می‌یابد. در صورتی که باکتری به آنتی‌بیوتیک موجود در دیسک حساس باشد، منطقه‌ای از مهار رشد باکتری در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیکی دیده می‌شود که نشان دهنده عدم رشد باکتری و حساسیت باکتری در آن ناحیه است. قطر ناحیه مهار رشد باکتری، علاوه بر میزان حساسیت باکتری به دارو، با ویژگی آبدوستی و اندازه مولکولی دارو که بر روی سرعت انتشار آن دارو در محیط کشت اثر می‌گذارد، نیز ارتباط دارد. به طور کلی هر چه جدایه مورد نظر نسبت به دارو حساس‌تر باشد، قطر ناحیه عدم رشد نیز بزرگ‌تر می‌باشد (J. E. McLain et al., 2016; James H. Jorgensen & John D. Turnidge, 2015). قطر این منطقه به صورت دستی یا خودکار بر حسب میلی متر اندازه گیری شده و توسط استاندارد های EUCAST و CLSI تفسیر می‌شود و در نهایت جدایه مورد نظر به عنوان حساس یا مقاوم نسبت به آنتی‌بیوتیک مورد نظر گزارش می‌شود (Silley, 2012; Turnidge & Bell, 2005). جدایه‌هایی که در این آزمایش به صورت مقاوم گزارش می‌شوند توسط حداقل غلظت بازدارنده از رشد داروی مورد نظر مهار نمی‌شوند ولی جدایه‌های متوسط به صورت نسبی توسط این غلظت دارو مهار می‌شوند، اما برای مهار کامل آن‌ها به غلظت‌های بالاتری از دارو نیاز می‌باشد و در نهایت جدایه‌هایی که به صورت حساس گزارش می‌شوند، قابلیت مهار با MIC را دارند (CLSI, 2015). از این روش برای شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی بتالاکتامازها نیز استفاده می‌شود. اما انجام این تست به تنهایی کافی نیست. معمولاً برای تایید این تست از روش‌هایی مانند دیسک‌های ترکیبی (CDT⁷) و تست هم‌افزایی دو دیسک (DDST⁸) نیز استفاده می‌شود، این آزمایش‌ها امکان ارزیابی باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف قادر به مهار توسط کلاولانیک اسید را فراهم می‌کنند. روش دیسک ترکیبی بر اساس اندازه گیری هاله عدم رشد در اطراف دیسک ترکیبی و مقایسه‌ی آن با

⁷ Combination Disc Test

⁸ Double-Disc Synergy Test

شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی است که بر اساس مهار آنزیم بتا-لاکتاماز توسط کلاولانیک اسید عمل می‌کند. با این حال، وجود بتا-لاکتاماز AmpC (سفالوسپورینازهایی که به‌طور ضعیف‌تری توسط کلاولانیک اسید مهار می‌شوند) می‌تواند منجر به نتایج منفی کاذب شود. این امر به این دلیل است که کلاولانیک اسید می‌تواند تولید بتا-لاکتاماز AmpC را در سطح بالا القا کند، که در نتیجه موجب مقاومت در برابر سفالوسپورین‌های نسل سوم، حتی در ترکیب با کلاولانیک اسید، می‌شود. برای کاهش احتمال نتایج منفی کاذب، استفاده از سفپیم در کنار سفالوسپورین‌های نسل سوم در DDST پیشنهاد شده است (Kaur et al., 2013). از جمله محدودیت‌های روش انتشار دیسک، تأثیرپذیری نتایج از عوامل فیزیکی‌شیمیایی مختلف مانند تبخیر، حلالیت، pH و دما است. علاوه بر این، روش‌های مبتنی بر کشت با محدودیت‌هایی از جمله عدم توانایی تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC)، ناتوانی در تشخیص باکتریوسید یا باکتریوستات بودن آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرپذیری نتایج از فاکتورهایی مانند ضخامت ژل، دما و اندازه دیسک، همراه هستند. همچنین، به دلیل تفاوت در میزان انتشار داروهای مختلف در محیط آگار، استانداردسازی روش‌های انتشار دیسک چالش‌برانگیز بوده و در نتیجه، این روش‌ها از تکرارپذیری پایینی برخوردار هستند. با وجود این محدودیت‌ها، روش انتشار دیسک معمولاً برای انتخاب آنتی‌بیوتیک در درمان عفونت‌های مزمن مقاوم به درمان‌های قبلی ترجیح داده می‌شود. با این حال، به دلیل زمان‌بر بودن این روش، استفاده از آن در عفونت‌های حاد که نیاز به درمان فوری دارند، توصیه نمی‌شود (Sahoo et al., 2024).

تست اپسیلومتر (E-test)

اساس تست اپسیلومتر، تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد آنتی‌بیوتیک مورد نظر (MIC) بر اساس گردان غلظتی آنتی‌بیوتیک مورد نظر در پلیت حاوی آگار می‌باشد، بنابراین همانند روش‌های رقت‌سازی یک تست کمی محسوب می‌شود. در این تست ابتدا باکتری مورد آزمایش به روش خطی در سه جهت بر سطح آگار کشت داده شده و سپس یک نوار پلاستیکی حاوی مقادیر مختلف آنتی‌بیوتیک روی پلیت قرار می‌گیرد. قسمت زیرین که در تماس با آگار می‌باشد حاوی مقادیر مختلف آنتی‌بیوتیک بوده و در قسمت روی آن مقیاس عددی درج شده است، پلیت به

مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و در این زمان، باکتری‌ها تحت تأثیر مقادیر مختلف آنتی‌بیوتیک که در آگار منتشر می‌شود، قرار می‌گیرند، در نهایت حساسیت یا مقاومت میکروارگانیزم نسبت به آنتی‌بیوتیک مورد نظر با اندازه‌گیری هاله عدم رشد، تعیین می‌شود. در مقایسه با روش انتشار دیسک که فقط به صورت کیفی بود، این روش به علت ارائه نتایج کمی می‌تواند ارزش بیشتری داشته باشد. هر دو روش، روش‌های آسانی هستند اما به طور کلی روش اپسیلومتر نسبت به روش انتشار دیسک هزینه بیش‌تری دارد. این روش می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های رقت‌سازی معمولی نیز باشد زیرا بسیار آسان، سریع و قابل اعتماد است (Brown & Brown, 1991; Lalitha, 2004). تفسیر این تست برای سویه‌هایی که دارای چندین مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند دشوار است. مطالعه‌ای توسط عرفانی و همکاران در سال ۱۳۸۷، به منظور مقایسه‌ی دو روش E-test و انتشار دیسک در تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های ائرشیاکلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی تهران صورت گرفت. نتایج حاصل از بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش E-test به مراتب حساسیت و تطابق آنتی‌بیوتیکی بیشتری نسبت به روش دیسک دیفیوژن آگار داشت. به همین خاطر معمولاً دوز موثر آنتی‌بیوتیک برای درمان و جلوگیری از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی، توسط این روش تعیین می‌شود (Erfani et al., 2008). در مطالعه‌ای دیگر توسط Behera و همکاران در سال ۲۰۰۸، چهار تکنیک فوتوبی متالوبتالاکتاماز تشخیص سودوموناس آئروژینوزا تولیدکننده متالوبتالاکتاماز مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که روش دیسک ترکیبی ایمی پنم و EDTA در مقایسه با روش اپسیلومتر ایمی پنم و EDTA برای متالوبتالاکتاماز، دارای هزینه کم‌تر و نتایج مشابهی می‌باشد (Behera et al., 2008). در مطالعه مشابهی که از این تست برای شناسایی بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف با استفاده از یک نوار سفزازیدیم استفاده شده بود، نشان داده شد این تست واجد ۸۱ درصد حساسیت در شناسایی ۸ نوع از آنزیم‌های SHV-like و ۴ نوع از آنزیم‌های TEM-like می‌باشد. در استفاده از این روش وجود جهش‌های پراکنده در منطقه مهار سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید یا نوار سفزازیدیم-کلاولانیک اسید منجر به ایجاد خطاهای

آزمایشگاهی می شود و به طور کلی جوانب مختلف استفاده از این روش برای تعیین مقاومت های آنتی بیوتیکی مرتبط با بتالاکتاماز های وسیع الطیف باید مورد توجه قرار بگیرد (Leverstein-van Hall Maurine et al., 2002).

روش های مبتنی بر رقت سازی

روش های رقت سازی در آگار و برات متداول ترین روش های مورد استفاده در آزمایشگاه برای تعیین حساسیت یا مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها از طریق تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد آن دارو می باشند (M. Balouiri et al., 2016). زمانی که میکروارگانیزم مورد نظر، دارای سرعت رشد متغیر باشد از این روش ها استفاده می شود (M. Balouiri et al., 2016; Schumacher et al., 2018). به طور کلی سهولت انجام این آزمایشات، منجر به تکرار پذیر بودن آزمایش می شود. در این روش ها بر خلاف روش disk diffusion قابلیت تعیین باکتریوسید یا باکتریواستات بودن ترکیب مورد نظر وجود دارد و نتایج MIC ارائه شده در این تست نیز قابل اعتمادتر و دقیق تر از روش های انتشاری می باشد. این روش براساس نحوه انجام آزمایش، به دو دسته رقت سازی در محیط آگار و رقت سازی در محیط مایع تقسیم بندی می شود.

روش رقت سازی در محیط آگار

این روش در سال ۱۹۲۹ معرفی شد و در سال ۱۹۴۰ تکامل یافت و به عنوان تست حساسیت مرجع CLSI در نظر گرفته می شود. روش رقت سازی در محیط آگار روش استاندارد برای میکروارگانیزم های سخت رشد از جمله باکتری های بی هوازی و هلیکوباکتر می باشد (Mounyr et al., 2016). اساس این روش، تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) داروی مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) برای باکتری ها و قارچ ها می باشد. روش رقت سازی در محیط آگار، در آزمایشگاه های تشخیص طبی انجام نشده و بیشتر مناسب آزمایشگاه های مرجع یا آزمایشگاه هایی است که باید تعداد زیادی از جدایه های باکتری را آنالیز کنند (Luber et al., 2003). در این روش آنتی بیوتیک مورد نظر در محیط مولر هینتون آگار با غلظت های مختلف در پلیت های متعدد (روش رقت سازی سریالی two fold dilution) اضافه شده و در مرحله بعد باکتری مورد نظر به داخل آن تلقیح می شود، پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون کلنی های باکتری شمرده شده و سپس حداقل غلظت داروی مورد نظر

(MIC) گزارش می شود بنابراین این روش به عنوان یک روش کمی محسوب می شود. این روش بسیار قابل اعتماد و آسان است و قابلیت باز خوانی راحتی نیز دارد اما زمان انکوباسیون آن برای باکتری های سخت رشد طولانی است. برای حل این مشکل، می توان از محیط آگار کروموزنیک استفاده کرد تا نتایج پس از ۱۸ تا ۲۴ ساعت قابل تشخیص باشد (Schumacher et al., 2018). این روش همبستگی خوبی با روش E test دارد اما در مطالعه ای که توسط Visalli و همکاران به منظور ارزیابی فعالیت آنتی بیوتیک های بتالاکتام در برابر اسپینتو باکتر ها با دو روش رقت سازی در محیط آگار و تست اپسیلومتر صورت گرفت، گزارش شد نتایج حاصل از روش رقت سازی در آگار با روش E-test متفاوت بود. نویسندگان در توضیح علت این تفاوت به تولید انواع مختلف بتالاکتاماز ها اشاره کردند. (Visalli et al., 1997) به مرور زمان اصلاحات زیادی در این روش اعمال شده است که از جمله آن ها می توان به استفاده از چاهک های ۹۶ تایی به جای استفاده از پتری دیش اشاره کرد. این روش منجر به تسریع دستیابی به نتایج می شود. همچنین قابلیت استفاده از این روش برای عصاره های روغنی نیز یکی دیگر از مزیت های آن محسوب می شود زیرا فاز روغنی و آب در این روش از هم جدا نمی شوند (Sahoo et al., 2024). در ادامه به جزئیات این روش اشاره می شود.

روش رقت سازی در محیط مایع

روش رقت سازی در محیط مایع یکی از روش های استاندارد طلایی برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) محسوب می شود. در این روش علاوه بر MIC دارو، حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز قابل ارزیابی است. حداقل غلظت کشندگی دارو حداقل غلظتی از دارو است که در شرایط استاندارد، قادر به کشتن ۹۹/۹٪ باکتری ها است. اساس این تست نیز استفاده از روش های رقت سازی آنتی بیوتیک با روش two fold dilution در محیط کشت مایع می باشد. سپس 10^4 تا 10^5 Cfu/ml باکتری به هر کدام از محیط ها اضافه می شود و انکوباسیون در دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت صورت می گیرد. روش تلقیح باکتری، میزان باکتری مورد استفاده در این روش و همچنین تعیین زمان انکوباسیون توسط استاندارد های EUCAST و

است (Wikler, 2006; Schumacher et al., 2018; Wayne, 2010).

روش های مولکولی

امروزه روش های مولکولی در آزمایشگاه های تحقیقاتی و مرجع یکی از پرطرفدارترین روش ها جهت شناسایی و تشخیص ژن های مربوط به مقاومت های آنتی بیوتیکی است. مزیت اصلی این روش ها این است که بسیار سریع بوده و نیاز به نیروی کار کمتری نیز دارد. اساس این روش ها تشخیص اسید نوکلئیک باکتری هدف می باشد. به طور کلی این روش ها به سه دسته مبتنی بر تقویت، مبتنی بر توالی و مبتنی بر هیبریدیزاسیون طبقه بندی می شوند. در روش های مبتنی بر تقویت مانند PCR ژن مورد نظر تکثیر می شود. تشخیص در روش های مبتنی بر هیبریدیزاسیون مانند DNA microarray بر اساس پروب های هیبرید اسید نوکلئیک می باشد که توالی های ژنی را هدف قرار می دهند، و در روش های مبتنی بر توالی، توالی ژنوم برای شناسایی ژن مرتبط با مقاومت، مورد مطالعه قرار می گیرد (Gajic, Kabic, Kekic, Jovićević, et al., 2022). روش های مولکولی و ژنتیکی سریع تر از روش های فوتویی می باشند زیرا نیازی به سلول زنده ندارند و می توان آزمایش را روی نمونه هایی از جمله مدفوع، ادرار، بزاق و خون نیز انجام داد. مقاومت های میکروبی می توانند در اثر مکانیسم های ژنتیکی مختلفی ایجاد شوند، از جمله این مکانیسم ها بیان ژن های مقاومت به صورت اکتسابی یا به علت جهش در نواحی پرموتور یا تنظیم کننده، جهش در ژن های خانه دار مورد هدف آنتی بیوتیک ها، از دست دادن عملکرد عناصر تنظیمی یا پورین های خاص و قرار دادن محرک های قوی در بالادست ژن های مربوط به مقاومت آنتی بیوتیکی و در نتیجه بیان بیشتر آن ها می باشد. در این روش ها به علت حساسیت بالایی که وجود دارد امکان ایجاد نتایج مثبت کاذب بسیار بالاست. بنابراین باید نمونه گیری در شرایط اسپتیک انجام شود (Sahoo et al., 2024). از دیگر معایب این تست ها می توان به هزینه بالای آن ها اشاره کرد. این روش ها امروزه با وجود معایب ذکر شده به دلیل حساسیت و دقت بسیار مطلوب و همچنین صرف زمان کمتر باز هم به فراوانی مورد استفاده قرار می گیرند. در ادامه به تعدادی از این روش ها اشاره می شود.

CLSI تعیین می شود و اگر طبق دستور العمل نباشد منجر به ایجاد خطا می گردد. نتایج این روش نیز توسط استانداردهای مذکور تفسیر می شود. بر اساس اینکه این روش در چاهک های ۹۶ تایی یا لوله های بزرگ استفاده شود این تست به دو صورت Microdilution و Macrodilution نامگذاری و اجرا می شود. در روش Microdilution مقادیر کم تری از حجم آنگوشت در پلیت های ۹۶ خانه میکرو تیتراسیون استفاده می شود؛ اما در روش دوم از مقادیر بیشتری محیط کشت در لوله آزمایش استفاده می شود. روش میکرو دایلوژن به علت صرفه جویی در مصرف معرف ها، قابلیت تکرار پذیری و فضاگیر نبودن این روش نسبت به روش ماکرودایلوژن موجب برتری این روش شده است (Pierce-Hendry & Dennis, 2010). کدورت داخل لوله یا چاهک نشان دهنده رشد باکتری می باشد. این کدورت در روش Macrodilution توسط چشم غیرمسلح تشخیص داده می شود اما در روش میکرو دایلوژن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر ارزیابی می شود. کمترین غلظتی که در آن کدورت مشاهده نشود به عنوان کمترین غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری تعریف می شود. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC)، معمولاً از چاهک یا لوله فاقد کدورت کشت بر روی مولر هینتون آگار تهیه می شود. کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه باکتری رشد نکند، به عنوان کمترین غلظت کشنده باکتری در نظر گرفته خواهد شد. ترجیح داده می شود که در ابتدا از روش میکرو دایلوژن و سپس به عنوان تست تاییدی از روش ماکرودایلوژن استفاده شود (Sahoo et al., 2024). روش دایلوژن برات در مقایسه با آگار دایلوژن و دیسک دیفیوژن و روش های مولکولی قابل اعتمادتر و دقیق تر است. اما این تست هزینه بیشتری نیز دارد. بزرگ ترین اشکال روش ماکرو دایلوژن این است که هر محلول آنتی بیوتیک باید به صورت دستی تهیه شود که بسیار زمان بر می باشد، بنابراین امروزه تکنیک های سریع تری از جمله میکرو دایلوژن برات جایگزین این روش شده اند (Schumacher et al., 2018). توان عملکردی روش میکرو دایلوژن برات بیشتر است به گونه ای که ۱۲ نوع آنتی بیوتیک در ۹۶ چاهک مورد آزمایش قرار می گیرند و پس از یک شب انکوباسیون، رشد باکتری و تغییر رنگ مشاهده می شود. این روش برای تمام باکتری های هوازی و بی هوازی توسط استاندارد های CLSI مورد استفاده

PCR (واکنش زنجیره ای پلیمرز)

تست PCR یکی از پرکاربردترین روش‌های مولکولی در تشخیص مقاومت های آنتی‌بیوتیکی می باشد که در سال ۱۹۸۰ توسط kary mullis معرفی و اولین بار توسط Saiki و همکاران به منظور تشخیص به کاربرده شد (Fluit et al., 2001; Khan et al., 2019). اساس روش PCR، ازدیاد و تقویت اسید نوکلئیک با کمک آنزیم پلیمرز می‌باشد که می تواند در یافتن و تشخیص یک ویژگی خاص در باکتری‌ها مانند مقاومت یا حساسیت آنتی بیوتیکی، از طریق ازدیاد ژن‌های مربوطه موثر باشد. این روش دارای حساسیت، ویژگی و سرعت بالایی می‌باشد و یکی از مهم ترین مزیت های آن این است که در صورتی که نمونه های مورد استفاده در این تست، غیر استریل، ناخالص و حاوی انواع مختلفی از باکتری ها باشند، با توجه به اختصاصیت زیاد تست، اختلالی در پاسخ ایجاد نخواهد شد (M. Balouiri et al., 2016).

خوشبختانه با گذشت زمان روند انجام آزمون PCR نسبت به گذشته بهبود یافته است. به گونه ای که حساسیت، ویژگی و زمان مصرف روش بهتر شده و این امر موجب کاهش زمان مورد نیاز برای تجزیه و تحلیل نتایج در ژل الکتروفورز، پس از انجام PCR شده است. از جمله روش‌های PCR اصلاح شده، Real-time یا qPCR می باشد که البته نسبت به واکنش زنجیره ای پلیمرز معمولی، هزینه بیشتری دارد. اما تجزیه و تحلیل نتایج در این روش ساده‌تر است. در حال حاضر پس از گستردگی ویروس کوید-۱۹ و گسترش روش PCR در مراکز درمانی، این روش به راحتی قابل دسترس می باشد. همچنین حساسیت بیشتر و نیز کاهش خطر انتقال آلودگی از مزیت های دیگر این تست محسوب می شوند (Sahoo et al., 2024). روند کلی PCR شامل سه مرحله اصلی دنا تورا سیون DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، اتصال پرایمر ها در دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه و در نهایت طولیل سازی و گسترش DNA توسط DNA پلیمرز مقاوم به حرارت در بافر حاوی مواد مورد نیاز می باشد. در ادامه ژن مورد نظر در چندین سیکل به صورت نمایی تکثیر شده و با تکنیک های مختلفی از جمله الکتروفورز، ساترن بلات، انگشت نگاری DNA، پلی مورفیسم ساختاری تک رشته ای

(SSCP)^۹ و پلی مورفیسم طول قطعه بریده شده، مورد ارزیابی نهایی قرار می‌گیرد (Fluit et al., 2001; Khan et al., 2019). در همین راستا، به منظور بررسی میزان شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) گروه CTX-M در سویه های *اشریشیا کلی* جوجه های گوشتی استان سمنان در سال ۲۰۲۰، روش واکنش زنجیره ای پلیمرز به کمک پرایمرهای اختصاصی روی سویه های مورد نظر صورت گرفت و نتایج نشان داد که طيور گوشتی به ظاهر سالم مزارع پرورشی استان سمنان ممکن است به عنوان یکی از منابع سویه های مولد ESBLs باشند (Kafshdouzan, 2020). با این حال یکی از محدودیت های روش PCR این است که گاهی نتایج این تست ممکن است به دلیل آلودگی با موادی مانند هموگلوبین، مواد موجود در محیط‌های کشت، ادرار و خلط مختل شود یا حتی تغییرات ژنتیکی در نواحی هدف منجر به اختلال در اتصال پرایمرها و عدم تکثیر DNA شده و نتایج نهایی تحت تأثیر قرار بگیرد. همچنین در تست PCR معمولاً از مقادیر کمی از نمونه استفاده می‌شود. بنابراین در مواردی که بار میکروبی پایین است، ممکن است DNA هدف به اندازه کافی وجود نداشته باشد و نتیجه منفی کاذب حاصل شود (Jaton et al., 2010; Kralik & Ricchi, 2017). فهرست جامعی از پرایمرهایی که برای تشخیص مقاومت های آنتی‌بیوتیکی در باکتری های مرتبط با حیوانات و مواد غذایی در سایت آزمایشگاه مرجع اروپا مربوط به مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی (EURL AMR)^{۱۰} وجود دارد که در این زمینه می‌تواند کمک کننده باشد (Fluit et al., 2001). دسته‌ای از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی که در اثر جهش های نقطه ای DNA بوجود آمده اند را می‌توان توسط PCR^{۱۱} RT مورد ارزیابی قرار داد در حالی که روش PCR معمولی فقط توانایی تشخیص قطعات بیشتر از ۱۵۰ جفت باز را دارد مگر اینکه توالی یابی sanger برای تشخیص جهش مورد نظر مورد استفاده قرار بگیرد (Anjum et al., 2018). با وجود اینکه روش‌های مبتنی بر PCR، ابزارهای غربالگری قابل اعتماد و سریع با ویژگی و حساسیت بالا هستند و نتایج آزمایش ظرف مدت

^۹ Single strand conformation polymorphism

^{۱۰} European Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance

^{۱۱} Real-Time

کوتاهی (معمولا حدود دوساعت) آماده می شوند. در حال حاضر روش PCR توانایی شناسایی هم زمان تمام بتالاکتامازها و همچنین شناسایی بتالاکتامازهای وسیع الطیف و غیر وسیع الطیف TEM و SHV و کارباینمازها را ندارد. بنابراین بهتر است برای شناسایی همزمان انواع ژنهای مقاومت، از روشهای مولکولی دیگر از جمله DNA Microarray استفاده شود (Naas et al., 2011; Kanlidere et al., 2019).

DNA microarray

اساس این روش هیبریدیزاسیون اسید نوکلئیک می باشد به گونه ای که با استخراج mRNA از باکتری مورد نظر و سنتز cDNA مربوط به ژن هدف، این cDNA به صورت فلورسنت نشان دار شده و سپس به chip دارای پروب های مورد نظر اضافه می شود، بر اساس میزان باند شدن DNA مکمل مورد نظر با پروب های موجود، نوری ساطع می شود که از آن، می توان به میزان بیان ژن هدف دست یافت. در این آزمایش که برای تحلیل بیان ژن ها انجام می شود، استفاده از DNA مکمل (cDNA) به جای RNA به صورت مستقیم ضروری است. دلیل این موضوع به ماهیت و پایداری مولکول های مورد استفاده برمی گردد. از مهم ترین مزایای این روش این است که برای اکثر باکتری هایی که ژنوم آن ها قابل استخراج میباشد، قابل استفاده است. همچنین بر خلاف روش های مبتنی بر PCR که فقط یک یا چند ژن را در واحد زمان بررسی می کنند، این روش می تواند به طور همزمان صد ها هزاران ژن را مورد تحلیل و بررسی قرار دهد. تعیین مقاومت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نسبت به ایزونیاژید (Huang et al., 2014) و شناسایی ژن های مربوط به مقاومت های آنتی بیوتیکی از جمله *blaTEM* و *ermB* در *sul2* در میکروبیوتا های دهانی و مدفوعی (بی هوازی و هوازی) (Anjum et al., 2018)، از مثال های کاربرد این روش در شناسایی مقاومت آنتی بیوتیکی هستند. یکی از علل ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی، انتقال افقی ژن های مقاومت می باشد که در این حالت، امکان انتقال به پلاسمیدها و ترانسپوزون ها و اینتگرون ها و در نهایت ایجاد مقاومت باکتری نسبت به چند دارو وجود دارد. شناسایی هم زمان این نوع مقاومت نیز توسط روش DNA microarray قابل تشخیص می باشد (von Wintersdorff et al., 2016). از آنجایی که این روش

توانایی شناسایی تعداد بسیار زیادی از ژن ها را دارد؛ می تواند جایگزین مناسبی برای روش های مولکولی نظیر PCR باشد. با پیشرفت هایی که امروزه در این روش صورت گرفته است، با وجود مزایای بیان شده، این روش دارای معایب زیادی نیز هست. روش DNA microarray بسیار زمان بر است و به اقدامات فراوانی مانند طراحی پرایمر های خاص هر ژن، خالص سازی PCR و اقدامات دیگری از این قبیل نیاز دارد.

در سال ۲۰۱۶ روش جدیدتری به نام Check-MDRCT103XL با چگالی کم برای شناسایی ژن های مرتبط با بتالاکتامازهای وسیع الطیف به کار گرفته شد که دارای حساسیت و دقت ۱۰۰٪ برای اکثر ژن های *bla* بود. مزایای این روش این است که می توان از آن برای سفالوسپوریناز و کارباینماز نیز استفاده کرده و توان بالای این روش در شناسایی بتالاکتاماز وسیع الطیف و مقاومت های مرتبط با pAmpC در بررسی های اپیدمیولوژیک سبب شده که برای ارزیابی سریع تر این دسته از مقاومت ها از این روش استفاده شود (Bogaerts et al., 2016). این روش، سریع ترین تکنیک موجود در میان روش های مولکولی برای ارزیابی مقاومت های آنتی بیوتیکی است و به همین دلیل برای مواردی که نیاز به تصمیم گیری درمانی فوری دارند، مانند بیماری های حاد، بسیار مناسب است. در این روش از اسلایدهای شیشه ای ریزآرایه ای استفاده می شود که به صورت تجاری قابل تهیه هستند و روی آن ها پروب های مرتبط با ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی چاپ شده است. بنابراین، پزشک می تواند با انجام فرایند کوتاه هیبریداسیون، ژن های مقاوم را در کمترین زمان ممکن شناسایی کند. با این حال، یکی از محدودیت های این روش این است که در صورت بروز جهش در ژن های مرتبط با مقاومت، ممکن است این ژن ها توسط این روش قابل شناسایی نباشند.

در چنین مواردی، نیاز به اصلاح اسلایدهای شیشه ای و طراحی پروب های جدید وجود دارد که این موضوع یکی از مهم ترین چالش های این تکنیک محسوب می شود (Sahoo et al., 2024).

طیف سنجی جرمی دفع لیزر / یونیزاسیون لیزر با کمک ماتریس (MALDI-TOF MS)^{۱۲}

روش طیف سنجی جرمی دفع لیزر در سال ۱۹۸۰ معرفی شد و امروزه به عنوان یک روش امیدبخش در تشخیص مقاومت های آنتی بیوتیکی و تحلیل و طبقه بندی محتوای پروتئینی باکتری ها و بیومارکرهای مرتبط با آنها شناخته می شود. اساس این روش، جداسازی بیومولکول هایی مانند پروتئین ها، پپتیدها، DNA و مولکول های آلی نظیر پلیمرها از طریق لیزر است. در این تکنیک، ترکیبات مولکولی از طریق یونیزاسیون به مولکول های باردار تبدیل شده و سپس نسبت جرم به بار آنها برای تعیین کمیت اندازه گیری می شود. نمونه مورد آزمایش باید با یک ترکیب آلی جاذب انرژی به نام ماتریس مخلوط یا پوشانده شود. پس از تابش لیزر به نمونه و ماتریس، مولکول های مورد نظر یونیزه شده و یون های مثبت بر سطح آن قرار می گیرند. در ادامه، با اعمال ولتاژ، این یون ها وارد محفظه فضای پرواز (Time-of-Flight, TOF) طیف سنج شده و نسبت جرم به بار آنها بر اساس زمان طی مسیر در لوله پرواز اندازه گیری و مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد (Lay Jr, 2001).

سرعت، دقت و حساسیت بالای این روش باعث شده است که در مطالعات متعددی از MALDI-TOF MS برای شناسایی مقاومت های آنتی بیوتیکی استفاده شود. به عنوان نمونه، در ارزیابی مقاومت انتروکوک ها به ونکومايسين، حساسیت این روش بیش از ۹۰٪ گزارش شده است. همچنین، این روش برای تعیین مقاومت گونه های سودوموناس نسبت به سیپروفلوکساسین، مروپنم و توبرامایسین نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Jung et al., 2014). علاوه بر مزایای متعدد مانند نیاز به حجم نمونه کمتر و کاهش هزینه های پردازش هر نمونه، این روش با چالش هایی نیز مواجه است. از جمله معایب آن می توان به هزینه بالای تهیه و نگهداری سیستم، نیاز به بهینه سازی بر اساس هر گونه باکتری و آنتی بیوتیک و همچنین عدم توانایی تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) دارو اشاره کرد (Ma et al., 2023).

روش MBT-ASTRA

MBT-ASTRA^{۱۳} یک تکنیک سریع و نوآورانه برای تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی، به ویژه مقاومت به بتا-لاکتام ها، است. در این روش از ترکیب طیف سنجی جرمی MALDI-TOF MS و یک آزمون اختصاصی برای شناسایی فعالیت آنزیم های بتا-لاکتاماز استفاده می شود. در این روش، ابتدا باکتری های خالص در معرض آنتی بیوتیک های بتا-لاکتام قرار می گیرند. در صورت وجود آنزیم بتا-لاکتاماز، آنتی بیوتیک هیدرولیز خواهد شد. سپس با استفاده از MALDI-TOF MS، حضور یا عدم حضور آنتی بیوتیک دست نخورده بررسی می شود. چنانچه آنتی بیوتیک هیدرولیز شده باشد، باکتری مقاوم در نظر گرفته می شود. این روش به طور خاص برای شناسایی بتا-لاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) و کارباپنمازها مناسب است و نتایج در مدت ۲ تا ۴ ساعت ارائه می گردد. به همین خاطر این روش به عنوان یکی از سریع ترین روش های تشخیص مقاومت شناخته می شود. با این حال، این روش به تجهیزات MALDI-TOF MS نیاز دارد و فقط قادر است مقاومت های ناشی از بتا-لاکتامازها را شناسایی کند. به طور کلی، این روش یک ابزار ارزشمند برای تشخیص سریع مقاومت به بتا-لاکتام ها در شرایط بالینی اورژانسی محسوب می شود (Gajic, Kabic, Kekic, Jovicevic, et al., 2022).

توالی یابی کل ژنوم (WGS)

روش توالی یابی کل ژنوم (WGS) فرآیندی است که در آن کل DNA کروموزومی یا میتوکندریایی یک میکروارگانیسم تعیین توالی می شود تا ژن های مرتبط با مقاومت آنتی بیوتیکی شناسایی شوند. این روش، زیرمجموعه فناوری های توالی یابی نسل جدید (NGS) است و برای اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط Fleischmann و همکاران برای توالی یابی ژنوم یک باکتری به کار رفت. از مزایای WGS می توان به عدم نیاز به کشت باکتری (در برخی موارد)، شناسایی ژن های مقاومت، و توانایی تحلیل پیوندهای ژنتیکی بین گونه ها اشاره کرد. با این حال، هزینه بالا، نیاز به نیروی متخصص، و زمان نسبتاً طولانی (۵-۲ روز) باعث شده است که

¹³ MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay

¹² Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

WGS به‌طور روتین در آزمایشگاه‌های بالینی استفاده نشود. این روش عمدتاً در پژوهش‌ها، ردیابی همه‌گیری‌ها، و مطالعه باکتری‌های سخت‌رشد (مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) کاربرد دارد. مطالعاتی مانند پژوهش Bristow و همکاران (۲۰۲۳) نشان داده‌اند که WGS قادر است ارتباط بین جهش‌های ژنی مانند *gyrA* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آن ژن را به دقت شناسایی کند (Bristow et al., 2023).

این روش معمولاً در آزمایش‌های بالینی روتین به کار نمی‌رود، اما توالی‌یابی کل ژنوم به عنوان ارجح‌ترین روش برای مطالعه و پایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شناخته می‌شود و نقش مهمی در شناسایی جهش‌های جدید و ردیابی مقاومت‌های نوظهور دارد. Bristow و همکاران در سال ۲۰۲۳ با استفاده از روش توالی‌یابی کل ژنوم (WGS)، مقاومت یا حساسیت ۴۸۱ جدایه باکتری *Neisseria gonorrhoeae* را نسبت به سیپروفلوکساسین بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که در باکتری‌هایی که ژن *gyrA* را دارند، هر گونه جهش در این ژن منجر به ایجاد مقاومت نسبت به این دارو می‌شود (Bristow et al., 2023). یکی دیگر از مزایای این روش این است که در روش توالی‌یابی کل ژنوم، امکان تجزیه و تحلیل عمیق پیوند های ژنتیکی بین منابع مختلف و نقش پلاسمید در گسترش مقاومت‌های باکتریایی نسبت به بتالاکتام‌ها قابل شناسایی می‌باشد (Kurittu et al., 2022).

روش‌های نوظهور

با توجه به گسترش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، استفاده از روش‌های نوظهور که سریع‌تر و قابل‌اعتمادتر از روش‌های سنتی هستند، اهمیت ویژه‌ای در شناسایی و مهار این پدیده جهانی دارد. روش‌های قدیمی معمولاً بر اساس کشت و رشد باکتری‌ها، یا استفاده از سیستم‌های خودکار وابسته به رشد باکتری استوار هستند. این روش‌ها به‌طور معمول نیاز به تعداد زیادی ارگانیزم زنده، پردازش پیچیده پیش‌تحلیلی، و زمان طولانی برای دستیابی به نتایج دارند. در مقابل، روش‌هایی مانند میکروکالری متری هم‌دما Isothermal microcalorimetry (IMC)، با اندازه‌گیری تغییرات گرمایی تولیدشده در حین رشد باکتری‌ها، قابلیت شناسایی سریع و دقیق حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم می‌کنند. این روش

می‌تواند به طور موثر حداقل غلظت مهارکننده (MIC) دارو را با دقت بالا مشخص کند و به دلیل عدم نیاز به ماتریکس خاص، محدودیت‌های روش‌های دیگر را ندارد (Tellapragada et al., 2020; von Ah et al., 2022; Sultan et al., 2018). علاوه بر این، روش‌های مبتنی بر باکتریوفاژ که در دهه‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند، می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری از مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مطرح شوند. این روش‌ها بر اساس توانایی فاژها در شناسایی و از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک طراحی شده‌اند و مزایایی چون سرعت بالا (کمتر از ۱۰ ساعت) و حساسیت زیاد دارند. اگرچه هنوز برخی چالش‌ها در تشخیص دقیق باکتری‌ها از طریق فاژها وجود دارد، این روش‌ها می‌توانند در آینده به عنوان ابزارهای ارزشمندی برای مقابله با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفته شوند (Van Belkum & Dunne Jr, 2013).

با پیشرفت‌های اخیر در زمینه تصویربرداری نوری، این روش‌ها به‌عنوان یکی از سریع‌ترین و مؤثرترین تکنیک‌ها برای ارزیابی مقاومت یا حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها شناخته شده‌اند. این تکنیک‌ها با تجزیه و تحلیل تغییرات مورفولوژیکی و رشد باکتری‌ها، امکان تشخیص دقیق حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها را فراهم می‌آورند. یکی از روش‌های برجسته در این زمینه، تصویربرداری نوری در سیستم‌های میکروسپالی است که در آن باکتری‌ها در کانال‌های آگار ثابت شده و پس از افزودن آنتی‌بیوتیک به محیط، تغییرات مساحت اشغال‌شده توسط باکتری‌ها در گذر زمان مورد تصویربرداری گاه‌گذر قرار می‌گیرد. حداقل غلظت آنتی‌بیوتیک که موجب تغییر در این مساحت شود، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکننده (MIC) شناخته می‌شود. اگرچه این روش به دلیل سرعت بالا و دقت در نتایج کاربرد وسیعی دارد، اما محدودیت‌هایی از جمله امکان ارزیابی حداکثر ۶ غلظت مختلف آنتی‌بیوتیک در یک تراشه وجود دارد (Song & Lei, 2021). علاوه بر این، فلوسیتومتری یکی دیگر از روش‌های نوظهور در شناسایی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها است که از ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی باکتری‌ها پس از قرارگیری در معرض دارو استفاده می‌کند. این روش قادر به تفريق سلول‌های زنده از مرده است، زیرا رنگ‌های به‌کاررفته در

که علاوه بر زمان بر بودن، نیاز به نیروی کار ماهر داشتند و قادر به تعیین مکانیسم دقیق مقاومت نبودند. هرچند امروزه نیز به دلیل سادگی و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده، این روش‌ها همچنان در بسیاری از آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Schumacher et al., 2018).

این روش‌ها در مقایسه با روش‌های مولکولی که بر اساس ژنوتیپ باکتریایی عمل می‌کنند، می‌توانند میزان بیان ژن را تشخیص دهند و این یکی از مهم‌ترین نقاط قوت روش‌های مبتنی بر کشت محسوب می‌شود زیرا صرفاً وجود یک ژن و عدم بیان آن نمی‌تواند منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی شود (Jean E. McLain et al., 2016). از میان روش‌های مبتنی بر کشت روش انتشار دیسک آسان‌تر و مقرون به صرفه‌تر است و همچنین می‌تواند نتایج قابل تکراری را نیز ارائه دهد. اگرچه این روش مستلزم استاندارد سازی مناسبی نیز می‌باشد. اما برای میکروارگانیزم‌های سخت رشد بهتر است از روش میکرو دایلوژن برات استفاده کرد

(Lazou & Chaintoutis, 2023). به طور کلی در کنار بررسی‌های مربوط به فنوتیپ‌های مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده از روش‌های مولکولی برای دستیابی به معیارهای ژنوتیپی و دستیابی به ارتباط میان این دو معیار نیز ضروری می‌باشد (Jean E. McLain et al., 2016). برای درک بهتر و داشتن تصویری واضح از مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها، استفاده از روش‌های مولکولی توصیه می‌شود، زیرا این روش‌ها قادر به شناسایی دقیق‌تر و سریع‌تر ژن‌ها و جهش‌های مرتبط با مقاومت هستند. در مقابل، روش‌های مبتنی بر کشت چنین قابلیت‌ای ندارند و معمولاً زمان‌بر و وابسته به رشد باکتری هستند. همچنین، روش‌های ژنتیکی برای میکروارگانیزم‌هایی که رشد سخت یا کندی دارند، نسبت به روش‌های کشت، مناسب‌تر هستند.

با این حال، روش‌های ژنوتیپی در شرایطی که بیماری نهفته است یا ژن‌های مقاومت ناشی از جهش‌های تصادفی باشند، کاربرد محدودی دارند. به عنوان مثال، در مورد آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، روش‌های مبتنی بر کشت و کروموزنیک معمولاً با تأخیر حدود ۱۸ ساعت همراه هستند. روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR نیز به دلیل نیاز به استخراج DNA باکتریایی به عنوان الگو، هنوز تا حدی وابسته به روش‌های کشت بوده و زمان‌بر هستند، اما

آن تنها قادر به نفوذ در دیواره سلول‌های زنده هستند. با این حال، یکی از چالش‌های این تکنیک خاصیت اتوفلورسانس برخی باکتری‌ها و توانایی محدود آن در تشخیص آسیب‌های سلولی ناشی از آنتی‌بیوتیک‌های باکتریوسید و باکتریواستات است (Gajic, Kabic, Kekic, Jovičević, et al., 2022). در همین راستا، تکنیک‌های آژ-تراشه (LoC^{14}) به دلیل مزایای متعدد همچون حجم نمونه کوچک‌تر، سرعت بالای تجزیه و تحلیل، و قابلیت حمل‌پذیری، توجه زیادی را جلب کرده‌اند (Kaprour et al., 2021). این تکنیک‌ها علاوه بر کاهش زمان و هزینه‌های آزمایش، امکان انجام آزمایش‌های دقیق و مؤثر را فراهم می‌آورند. همچنین، سیستم‌های تشخیصی مبتنی بر POC^{۱۴} که از نانومواد و حسگرهای زیستی مقرون به صرفه برای شناسایی سریع پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک استفاده می‌کنند، می‌توانند به طور چشمگیری مشکلات روش‌های سنتی را کاهش دهند و از مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک‌ها جلوگیری کنند (Singh et al., 2022). به عنوان نمونه، دستگاه‌های POC برای تشخیص حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های دستگاه ادراری (UTI) با استفاده از میکروسکوپ کانفوکال مینیاتوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها در زمان واقعی، قادر به انجام تست‌های سریع و بدون نیاز به پیش‌پردازش نمونه‌ها هستند. این ویژگی‌ها از مزایای اصلی این سیستم‌ها محسوب می‌شود و امکان تشخیص سریع و دقیق را در محیط‌های بالینی فراهم می‌آورد (Toosky et al., 2020).

بحث و نتیجه گیری

امروزه با تبدیل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی به یکی از عوامل تهدیدکننده سلامت عمومی، مطالعات گسترده‌ای برای شناسایی روش‌های جدیدتر تشخیص مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی انجام شده است که سریع‌تر، مقرون به صرفه‌تر و دقیق‌تر باشند. با این حال، هیچ‌یک از روش‌های موجود به طور کامل و از تمام جوانب بهینه نیستند. مشکل اصلی در تست‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی، سرعت پایین این روش‌هاست؛ به گونه‌ای که اغلب نیازمند انکوباسیون شبانه و حتی ۴۸ تا ۷۲ ساعت زمان هستند. روش‌های اولیه شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مبتنی بر کشت بوده‌اند

¹⁴ Lab-on-a-chip

¹⁵ point-of-care

پتانسیل بالایی برای توسعه به عنوان روش‌های تشخیصی سریع دارند.

روش‌های مولکولی مبتنی بر ریزآرایه‌ها در سال‌های اخیر پیشرفت‌های چشمگیری داشته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به سیستم Check-MDRCT103XL اشاره کرد که می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روش PCR در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Gazin et al., 2012). به طور کلی، روش‌های مولکولی و ژنتیکی برای استفاده در آزمایشگاه‌های مرجع و مطالعات اپیدمیولوژیک بسیار مناسب هستند. به گونه‌ای که برای مطالعات اپیدمیولوژیک، روش PCR-RFLP به همراه توالی‌یابی نوکلئوتیدها پیشنهاد می‌شود. روش‌های نوین و نوظهور تشخیص مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، با وجود حساسیت و دقت بالایی که دارند، به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته و هزینه‌های زیاد، در حال حاضر برای استفاده در آزمایشگاه‌های بالینی و مراقبت از بیماران مناسب نیستند و بهتر است صرفاً در زمینه تحقیقات به کار گرفته شوند. به نظر می‌رسد حتی با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در این تکنیک‌ها، به کارگیری آن‌ها در محیط‌های بالینی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد.

به طور کلی، روش‌های مبتنی بر فاز نیز گزینه‌های مناسبی برای تشخیص مقاومت آنتی‌بیوتیکی به شمار می‌روند، اما برای کاربرد بالینی گسترده‌تر، لازم است هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی فاز کاهش یابد. با پیشرفت‌های بیشتر در این حوزه، می‌توان انتظار داشت که این روش‌ها به عنوان ابزارهای قابل اعتماد و مقرون به صرفه در تشخیص بالینی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مورد استفاده قرار گیرند. استفاده از فازها در کاربردهای تشخیصی به‌طور کلی ایمن تلقی می‌شود، زیرا فازها ویروس‌هایی هستند که تنها باکتری‌ها را

هدف قرار می‌دهند و هیچ اثر مستقیمی بر سلول‌های انسانی ندارند. با این حال، برای کاربرد بالینی، ضروری است که فازهای مورد استفاده کاملاً خالص‌سازی شوند و عاری از سموم باکتریایی (اندوتوکسین‌ها) و DNA باکتریایی آلوده یا انتقال‌دهنده ژن مقاومت باشند. علاوه بر این، بیشتر فازها خاصیت اختصاصی دارند و تنها به یک گونه یا سویه باکتریایی خاص متصل می‌شوند، بنابراین احتمال انتقال بیماری توسط فاز بسیار نادر است (Matsuzaki et al., 2005).

با توجه به اطلاعات به‌دست‌آمده از مطالعات مختلف، روش تشخیص مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باید با در نظر گرفتن امکانات موجود و هدف مورد نظر انتخاب شود. در پایان، با توجه به عوارض ناشی از درمان نادرست با آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود روش‌هایی که بتوانند در آزمایشگاه‌های بالینی به سرعت و با دقت اثربخشی آنتی‌بیوتیک مناسب را ارزیابی کنند، ضروری است. بنابراین، بهبود روش‌ها و توسعه ابزارهای جدید برای شناسایی مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از اهمیت بالایی برخوردار است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند در این مطالعه هیچگونه تعارض منافی ندارند.

مشارکت‌های نویسندگان

خاطره کفشدوزان: اصلاحات علمی و آماده‌سازی پیش نویس اصلی مقاله، فائزه عمارلو: تحقیق و جمع‌آوری داده‌ها و تهیه پیش نویس و حیدر رحیمی: ویرایش.

منابع مالی

در آماده‌سازی و نگارش این مقاله هیچگونه حمایت مالی از فرد یا سازمانی دریافت نشده است.

References

- Florio, W., Baldeschi, L., Rizzato, C., Tavanti, A., Ghelardi, E., & Lupetti, A. (2020). Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area [Mini Review]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572909>
- Fluit, A. C., Visser, M. R., & Schmitz, F. J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 14(4), 836-871, table of contents. <https://doi.org/10.1128/cmr.14.4.836-871.2001>
- de Kraker, M. E., Stewardson, A. J., & Harbarth, S. (2016). Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med*, 13(11), e1002184. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infect Drug Resist*, 12, 3903-3910. <https://doi.org/10.2147/idr.S234610>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.11.005>
- Silley, P. (2012). Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? *Rev Sci Tech*, 31(1), 33-41. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2097>
- Pierce-Hendry, S. A., & Dennis, J. (2010). Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. *Compend Contin Educ Vet*, 32(7), E1-5; quiz E6.
- Kaur, J., Chopra, S., Sheevani, & Mahajan, G. (2013). Modified Double Disc Synergy Test to Detect ESBL Production in Urinary Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. *J Clin Diagn Res*, 7(2), 229-233. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/4619.2734>
- Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., & Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics (Basel)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>
- Brown, D. F., & Brown, L. (1991). Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *J Antimicrob Chemother*, 27(2), 185-190. <https://doi.org/10.1093/jac/27.2.185>
- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., & Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J Environ Qual*, 45(2), 432-440. <https://doi.org/10.2134/jeq2015.06.0317>
- Erfani, Y., Safdari, R., Chobineh, H., Mir Salehian, A., Rasti, A., Eynollahi, N., Mir Afshar, S. M., Yazdanbod, H., Hamidian, M., & Soltanian, A. (2008). Comparison of E.test and Disk Diffusion Agar in Detection of Antibiotic Susceptibility of E.coli Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Tehran Shariati Hospital [Original]. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*, 15(2), 27-31. <http://sjh.umsha.ac.ir/article-1-367-fa.html>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00016-10>
- Luber, P., Bartelt, E., Genschow, E., Wagner, J., & Hahn, H. (2003). Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *J Clin Microbiol*, 41(3), 1062-1068. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.3.1062-1068.2003>
- Jaton, K., Ninet, B., Bille, J., & Greub, G. (2010). False-negative PCR result due to gene polymorphism: the example of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*, 48(12), 4590-4591. <https://doi.org/10.1128/jcm.01766-10>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Front Microbiol*, 8, 108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
- Naas, T., Cuzon, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., & Nordmann, P. (2011). Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM- β -carbapenemases. *J Clin Microbiol*, 49(4), 1608-1613. <https://doi.org/10.1128/jcm.02607-10>
- Kanlidere, Z., Karatuna, O., & Kocagöz, T. (2019). Rapid detection of beta-lactamase production including carbapenemase by thin layer chromatography. *J Microbiol Methods*, 156, 15-19. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.11.016>
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., Savelkoul, P. H., & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>

- Bristow, C. C., Mortimer, T. D., Morris, S., Grad, Y. H., Soge, O. O., Wakatake, E., Pascual, R., Murphy, S. M., Fryling, K. E., Adamson, P. C., Dillon, J. A., Parmar, N. R., Le, H. H. L., Van Le, H., Ovalles Ureña, R. M., Mitchev, N., Mlisana, K., Wi, T., Dickson, S. P., & Klausner, J. D. (2023). Whole-Genome Sequencing to Predict Antimicrobial Susceptibility Profiles in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis*, 227(7), 917-925. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad027>
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., & Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*, 11(5), 211-219. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0408-9>
- Singh, S., Numan, A., & Cinti, S. (2022). Point-of-Care for Evaluating Antimicrobial Resistance through the Adoption of Functional Materials. *Anal Chem*, 94(1), 26-40. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03856>
- Di Bonaventura, G., Ricci, E., Della Loggia, N., Catamo, G., & Piccolomini, R. (1998). Evaluation of the E test for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with long-term bladder catheterization. *J Clin Microbiol*, 36(3), 824-826. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.3.824-826.1998>
- van Belkum, A., Bachmann, T. T., Lüdke, G., Lisby, J. G., Kahlmeter, G., Mohess, A., Becker, K., Hays, J. P., Woodford, N., Mitsakakis, K., Moran-Gilad, J., Vila, J., Peter, H., Rex, J. H., & Dunne, W. M., Jr. (2019). Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol*, 17(1), 51-62. <https://doi.org/10.1016/j.nrm.2018.09.008>
- Dally, S., Lemuth, K., Kaase, M., Rupp, S., Knabbe, C., & Weile, J. (2013). DNA microarray for genotyping antibiotic resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(10), 4761-4768. <https://doi.org/10.1128/aac.00863-13>
- Reuter, S., Ellington, M. J., Cartwright, E. J., Köser, C. U., Török, M. E., Gouliouris, T., Harris, S. R., Brown, N. M., Holden, M. T., Quail, M., Parkhill, J., Smith, G. P., Bentley, S. D., & Peacock, S. J. (2013). Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. *JAMA Intern Med*, 173(15), 1397-1404. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.7734>
- Behera, B., Mathur, P., Das, A., Kapil, A., & Sharma, V. (2008). AN EVALUATION OF FOUR DIFFERENT PHENOTYPIC TECHNIQUES FOR DETECTION OF METALLO- β -LACTAMASE PRODUCING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26(3), 233-237. [https://doi.org/10.1016/S0255-0857\(21\)01868-5](https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)01868-5)
- Leverstein-van Hall Maurine, A., Fluit Ad, C., Paauw, A., Box Adrienne, T. A., Brisse, S., & Verhoef, J. (2002). Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology*, 40(10), 3703-3711. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.10.3703-3711.2002>
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C., & Habibovic, P. (2018). *In vitro* antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(2), 187-208. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Visalli, M. A., Jacobs, M. R., Moore, T. D., Renzi, F. A., & Appelbaum, P. C. (1997). Activities of beta-lactams against *Acinetobacter* genospecies as determined by agar dilution and E-test MIC methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(4), 767-770.
- Wikler, M. A. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *Clsi (Necls)*, 26, M7-A7.
- Wayne, P. (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2010. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 20, 1-5.
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovičević, M., Milenkovic, M., Mitić-Ćulafić, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*, 11, 427. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>
- Kafshdouzan, K. (2020). Prevalence of CTX-M-1 gene in *Escherichia coli* isolated from broilers in Semnan province of Iran. *Journal of Veterinary Laboratory Research*, 12(1), 79-87.

- Abushaheen, M. A., Fatani, A. J., Alosaimi, M., Mansy, W., George, M., Acharya, S., Rathod, S., Divakar, D. D., Jhugroo, C., & Vellappally, S. (2020). Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. *Disease-a-Month*, 66(6), 100971.
- Lye, D. C., Kwa, A. L., & Chlebicki, P. (2011). World health day 2011: Antimicrobial resistance and practical solutions. *Annals of the Academy of Medicine-Singapore*, 40(4), 156.
- Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2018). Molecular methods for detection of antimicrobial resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, 33-50.
- Ali, J., Rafiq, Q. A., & Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA*, 4(4), FSO290.
- Malekpour, B., Kafshdouzan, K., Javan, A. J., & Bejestani, M. R. S. (2019). Inhibition of TEMbla Producing *Escherichia coli* Isolated From Poultry Colibacillosis Using Cinnamomum camphora and Syzygium aromaticum Essential Oils. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 6(3), 88-94.
- Huang, W.-L., Hsu, Z.-J., Chang, T., & Jou, R. (2014). Rapid and accurate detection of rifampin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* using an oligonucleotide array. *Clinical microbiology and infection*, 20(9), O542-O549.
- Saleh Nia Samak, A., & NOJOOMI, F.. (2019). Phenotypic study of Extended-spectrum Beta lactamase (ESBL) producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in patients referred to a military hospital in Guilan province. *JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR RESEARCH (IRANIAN JOURNAL OF BIOLOGY)*, 32(4), 578-590. SID. <https://sid.ir/paper/369698/en>[Persian]
- Bogaerts, P., Cuzon, G., Evrard, S., Hoebeke, M., Naas, T., & Glupczynski, Y. (2016). Evaluation of a DNA microarray for rapid detection of the most prevalent extended-spectrum β -lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *International journal of antimicrobial agents*, 48(2), 189-193.
- Lay Jr, J. O. (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass spectrometry reviews*, 20(4), 172-194.
- Jung, J., Eberl, T., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S., & Wieser, A. (2014). Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 949-955.
- Ma, S., Amin, M. Y. A., Pawar, J., Akhter, N., & Lucy, I. (2023). Conventional Methods and Future Trends in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30, 103582. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103582>
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics*, 11(4), 427.
- Wooldridge, M. (2012). Evidence for the circulation of antimicrobial-resistant strains and genes in nature and especially between humans and animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 31(1), 231-247.
- Kurittu, P., Khakipoor, B., Jalava, J., Karhukorpi, J., & Heikinheimo, A. (2022). Whole-genome sequencing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from human infections in Finland revealed isolates belonging to internationally successful ST131-C1-M27 subclade but distinct from non-human sources. *Frontiers in Microbiology*, 12, 789280.
- Tellapragada, C., Hasan, B., Antonelli, A., Maruri, A., de Vogel, C., Gijon, D., Coppi, M., Verbon, A., van Wamel, W., & Rossolini, G. (2020). Isothermal microcalorimetry minimal inhibitory concentration testing in extensively drug resistant Gram-negative bacilli: a multicentre study. *Clinical microbiology and infection*, 26(10), 1413. e1411-1413. e1417.
- von Ah, U., Shani, N., Chollet, M., Solokhina, A., & Braissant, O. (2018). Measuring antibiotic resistance in mixed cultures: Isothermal microcalorimetry as a novel analytical tool. *International Dairy Journal*, 77, 73-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.09.007>
- Sultan, A. R., Tavakol, M., Lemmens-den Toom, N. A., Croughs, P. D., Verkaik, N. J., Verbon, A., & van Wamel, W. J. B. (2022). Real time monitoring of *Staphylococcus aureus* biofilm sensitivity towards antibiotics with isothermal microcalorimetry. *PLOS ONE*, 17(2), e0260272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260272>
- Davison, H. C., Woolhouse, M. E. J., & Low, J. C. (2000). What is antibiotic resistance and how can we measure it? *Trends in Microbiology*, 8(12), 554-559. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01873-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01873-4)

- Song, D., & Lei, Y. (2021). Mini-review: Recent advances in imaging-based rapid antibiotic susceptibility testing. *Sensors and Actuators Reports*, 3, 1. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snr.2021.100053>
- Kaprou, G. D., Bergšpica, I., Alexa, E. A., Alvarez-Ordóñez, A., & Prieto, M. (2021). Rapid methods for antimicrobial resistance diagnostics. *Antibiotics*, 10(2), 209.
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1), 55S-64S. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>
- Toosky, M. N., Grunwald, J. T., Pala, D., Shen, B., Zhao, W., D'Agostini, C., Coghe, F., Angioni, G., Motolese, G., & Abram, T. J. (2020). A rapid, point-of-care antibiotic susceptibility test for urinary tract infections. *Journal of Medical Microbiology*, 69(1), 52-62.
- McLain, J. E., Cytryn, E., Durso, L. M., & Young, S. (2016). Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *Journal of Environmental Quality*, 45(2), 432-440. <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/jeq2015.06.0317>
- Lazou, T. P., & Chaintoutis, S. C. (2023). Comparison of disk diffusion and broth microdilution methods for antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter* isolates of meat origin. *Journal of Microbiological Methods*, 204, 106649. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106649>
- Gazin, M., Paasch, F., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2012). Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 50(4), 1140-1146. <https://doi.org/doi:10.1128/JCM.06852-11>
- Van Belkum, A., & Dunne Jr, W. M. (2013). Next-generation antimicrobial susceptibility testing. *Journal of clinical microbiology*, 51(7), 2018-2024.
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, 1253-1273.
- Sahoo, R., Jadhav, S., & Nema, V. (2024). Journey of technological advancements in the detection of antimicrobial resistance. *Journal of the Formosan Medical Association*, 123(4), 430-441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfma.2023.08.008>
- Jorgensen, J. H., & Turnidge, J. D. (2015). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In *Manual of clinical microbiology* (pp. 1253-1273). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch71>
- Turnidge, J., & Bell, J. (2005). Antimicrobial susceptibility on solid media. *Antibiotics in laboratory medicine*, 8-60.
- Garrec, H., Drieux-Rouzet, L., Golmard, J.-L., Jarlier, V & Robert, J. (2011). Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum -beta-Lactamase Production by *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 49(3), 1048-1057. <https://doi.org/doi:10.1128/JCM.02130-10>
- Lalitha, M. (2004). Manual on antimicrobial susceptibility testing. *Performance standards for antimicrobial testing: Twelfth Informational Supplement*, 56238, 454-456.
- Braissant, O., Bonkat, G., & Bachmann, A. (2016). Isothermal Microcalorimetry for the Investigation of Clinical Samples: Past and Present. In (pp. 363-380). <https://doi.org/10.1201/b20161-24>
- Au - Cirnski, K., Au - Coetzee, J., Au - Hermann, J., & Au - Müller, R. (2020). *JoVE*(164), e61703. <https://doi.org/doi:10.3791/61703>