فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۶، تابستان ۱۳۹۲، صفحه ۵۹- ۶۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۱/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۵/۱۵

ارزیابی میزان حساسیت و ویژگی آزمون هوج در تشخیص مقاومت به کارباپنم از نمونه‌های *کلبسیلا پنومونیه*

بهاره حاجی هاشمی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات استان مرکزی، اراک، ایران، ba.hajihashemi@gmail.com *
محمد فرزانه خواه: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات استان مرکزی، اراک، ایران، farzanehkhah@yahoo.com
مسعود حاجیا: دانشیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس ایران، تهران، ایران، massoudhajia@yahoo.com
محمد رهبر: دانشیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های رفرانس ایران، تهران، ایران، rahbar_reflab@yahoo.com **

چکیده

مقدمه: کارباپنم آخرین سد دفاعی در برابر عفونت‌های باکتریایی گرم منفی ای است که بر آنتی بیوتیک‌های با طیف اثر وسیع مقاوم می‌باشند، از این رو استفاده از روشی مناسب، برای تعیین تولید آنزیم کارباپنماز در این عوامل عفونی که مهار کننده آنتی بیوتیک کارباپنم است، امری ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه، بررسی کیفی آزمون هوچ برای یافتن روشی مناسب برای تعیین کارباپنماز است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۶ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* با مقاومت آنتی بیوتیکی چندگانه و مولد آنزیم کارباپنماز از مراکز بیمارستانی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جمع آوری و با کمک روش کروم آگار تایید شد. تمامی نمونه‌ها از نظر هاله عدم رشد برگ شبدری در روش دیسکی آزمون هوج طبق دستورالعمل CLSI بررسی شدند.

نتایج: تمامی نمونه‌ها جمع آوری شده از نظر تولید کارباپنماز با روش کروم آگار تایید و سپس تعداد ۳۰ مورد با روش آزمون هوچ، مثبت گزارش شد. تمامی موارد مثبت آزمون هوچ با کروم آگار تایید شد. حساسیت روش هوچ ۸۳/۳ درصد محاسبه شد. همچنین، تمامی ایزوله‌های کنترل منفی با نتیجه منفی همراه بوده و اختصاصیت آزمون ۱۰۰ درصد گزارش شد. از سوی دیگر مشاهده شد که تمامی موارد مثبت، به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و ایمی پنم مقاوم بوده اند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمون هوج بر روی نمونه‌های جمع آوری شده، استفاده از این روش در تشخیص‌های اولیه و در شرایطی که تهیه محیط‌های اختصاصی و یا استفاده از روش‌های مولکولی مقدور نیست، می‌تواند در امر تشخیص مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، بتالاکتاماز وسیع الطیف، کارباپنماز، آزمون هوج تغییر یافته

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقدمه

امروزه عفونت‌های ناشی از انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کارباپنم رو به گسترش بوده و این امر نگرانی‌هایی را در حیطه درمان ایجاد کرده است. انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کارباپنم به طور معمول نه تنها به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام بلکه به اکثر کلاس‌های ضدمیکروبی نیز مقاوم هستند. کارباپنم آخرین سد دفاعی در برابر عفونت‌های باکتریایی گرم منفی است که بر آنتی بیوتیک‌هایی با طیف اثر وسیع مقاوم است (۱). از جمله کارباپنم‌ها می‌توان ایمی پنم، مروپنم و ارتاپنم را نام برد که طیف اثر گسترده تری نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام دارند. بهترین درمان در عفونت‌های ایجاد شده توسط انتروباکتریاسه‌هایی است که تولید کننده بتالاکتامازهای مختلف هستند. با افزایش استفاده از کارباپنم‌ها، شمار باکتری‌های مقاوم با مکانیزم‌های مقاومتی متفاوت رو به افزایش است (۲). از مهم‌ترین مکانیزم‌های مقاومتی علیه کارباپنم تولید کارباپنماز است که KPC و VIM از شایع‌ترین آن‌ها در انتروباکتریاسه‌ها هستند (۱). کلونی‌های انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کارباپنم که از بیماران جداسازی و نگه‌داری می‌شود خود می‌توانند منبع انتقال این باکتری‌ها باشند.

کارباپنماز، برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ میلادی در ایالات متحده کشف و پس از آن گسترش جهانی یافت (۳). از دیگر کشورهای پیشرو پس از ایالات متحده می‌توان اسرائیل، شمال شرقی آمریکا و یونان را نام برده که تولید آن آندمیک شده است. جدا سازی کارباپنماز از *کلبسیلا پنومونیه* برای اولین بار در سال ۲۰۰۱ میلادی انجام شد (۴) و پس از آن برخی کشورهای اروپایی از جمله فنلاند، آلمان، فرانسه، ایتالیا، نروژ و هلند و همچنین انگلستان موفق به این امر شدند (۵ و ۶). در ادامه نیز برخی کشورهای آسیایی از جمله ایران و ترکیه، عربستان و عراق نیز به مطالعه و جداسازی کارباپنماز پرداختند (۷-۱۰).

از روش‌های قابل انجام برای شناسایی کارباپنماز، می‌توان آزمون هوچ و بررسی مولکولی ژن‌های موثر را نام برد. در کنار روش‌های ذکر شده، استفاده از محیط‌های میکروبیولوژی اختصاصی کروموژنیک نیز از جمله روش‌های مورد اعتماد است (۱۱).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی میزان کارایی تشخیص اختصاصی *کلبسیلا پنومونیه* کارباپنماز مثبت با استفاده از روش آزمون هوچ در سویه با مقاومت چندگانه خواهد بود. در این آزمون، رشد باکتری مورد سنجش در برابر باکتری حساس (*E.coli*) به دیسک آنتی بیوتیک (مروپنم و یا ارتاپنم) کشت داده شده و هاله عدم رشد برگ شبدری باکتری حساس (*E.coli*) بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها

تعداد ۳۶ ایزوله *کلبسیلا پنومونیه* مولد آنزیم کارباپنماز جمع آوری شده از مراکز درمانی دو استان تهران و استان اصفهان، بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد. معیار انتخاب نمونه‌ها، مقاومت‌های چندگانه آنتی بیوتیکی و تولید آنزیم کارباپنماز بودند که در تشخیص‌های ابتدایی برای آن‌ها گزارش شده است. نمونه‌ها شامل: ترشحات‌های ریوی، مایع شکمی، مجاری ادراری، مایع مغزی نخاعی، مایع چشمی، بافت و زخم حاصل از سوختگی بودند.

تشخیص کلبسیلا در مراکز جمع آوری نمونه با توجه به ظاهر کلونی به دلیل وجود کپسول، رنگ‌آمیزی

گرم و پس از آن استفاده از محیط‌های افتراقی شامل: اوره آز، سیمون سیترات، MR-VP, TSI و SIM انجام شد. همچنین، ارزیابی تولید آنزیم کارباپنماز توسط محیط کروموژنیک CHROMagar KPC انجام شد.

آزمون تاییدی آنزیم کارباپنماز

ابتدا تمامی نمونه‌ها در محیط CHROMagar KPC کشت و رشد بر روی آن بررسی شد تا از وجود آنزیم کارباپنماز در نمونه‌ها اطمینان حاصل شود. برای این منظور ابتدا محیط پایه CHROMagar Orientation بر طبق شرکت سازنده به غلظت ۳۳ گرم در لیتر آب مقطر تهیه، جوشانده وسپس اتوکلاو شد. سپس محلول مکملی CHROMagar KPC supplement را با غلظت ۴۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به هر لیتر محیط پایه اضافه شد. تقسیم محیط تهیه شده به پلیت‌ها انجام و پس از سرد شدن آن‌ها، کشت نمونه‌ها بر روی محیط کروم آگار ساخته شده انجام شد. رشد باکتری‌ها - نشان از وجود کارباپنماز و نوع باکتری تولید کننده این آنزیم است -، همراه با رنگ کلونی‌های ایجاد شده بررسی شد. در صورتی‌که باکتری ذکر شده اشریاشیاکلی باشد، کلونی‌های صورتی پررنگ مایل به قرمز، اگر کلبسیلا، سیتروباکتر و انتروباکتر باشد به رنگ آبی متالیک و اگر سودوموناس باشد کلونی‌های کرم، مات و شفاف ایجاد می‌کند.

آزمون هوچ[1]

این آزمون، طبق دستورکار CLSI[2] انجام شد، شرح وقایع بدین شکل است که:

سوسپانسیون باکتری با رقت نیم مک فارلند از باکتری *E.coli* ATCC 25922 تهیه شد. تهیه رقت ۱/۱۰ با محیط مولر هینتون براث و یا سالین از سوسپانسیون مرحله قبل با رقت نیم مک فارلند تهیه شد.

کشت چمنی با سواپ استریل از سوسپانسیون با رقت ۱/۱۰ *E. coli* ATCC 25922 بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. برای خشک شدن کشت مذکور، در دمای اتاق به مدت ۳ الی ۵ دقیقه انکوبه شد.

یک دیسک مروپنم ۱۰ میکروگرمی در مرکز پلیت قرار داده شد.

باکتری مورد آزمایش برای بررسی کارباپنماز از لبه دیسک قرار داده شده در مرکز به سمت لبه پلیت، کشت خطی داده شد. با دقت به این موضوع که سواپ با دیسک برخورد نکند. در ۲ ± ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان انکوبه، بررسی هاله عدم رشد به شکل برگ شبدری در نمونه‌های تولید کننده کارباپنماز انجام شد. مقایسه شکل هاله عدم رشد نمونه کنترل مثبت با نمونه‌های انجام شده برای تشخیص موارد مثبت در آزمون هوچ انجام شد.

تعداد ۱۵ نمونه از سوش‌های *کلبسیلا پنومونیه* ای که تولید کننده کارباپنماز نبودند برای تعیین اختصاصیت آزمایش شدند.

نتایج

تمامی نمونه‌های جامعه آماری با آزمون CHROMagar KPC تایید و مثبت گزارش شدند. ازآنجاکه تمامی نمونه‌های جمع آوری شده *کلبسیلا پنومونیه* بودند، با رنگ آبی بر روی محیط مذکور رشد پیدا کردند.

از ۳۶ ایزوله جمع آوری شده تنها ۳۰ مورد از آن‌ها با ایجاد هاله عدم رشد برگ شبدری در آزمون هوج ثبت شدند. تصاویر برخی از نمونه‌های انجام شده با آزمون هوچ در شکل ۱ قابل مشاهده هستند.

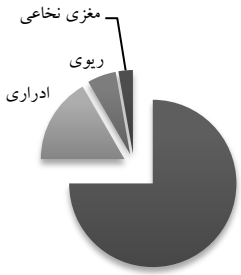
تمامی نمونه‌های کنترل، برای تعیین اختصاصیت که تولید کننده کارباپنماز نبودند در آزمون هوج با نتیجه منفی همراه بودند.

باتوجه به میزان فراوانی مثبت‌ها در روش آزمون هوچ و همچنین نتایج ایزوله‌های کنترل منفی، میزان حساسیت این روش ۸۳/۳ درصد، و اختصاصیت یا ویژگی آن ۱۰۰ درصد محاسبه می‌شود. این مقادیر با توجه به نتایج به‌دست آمده از فراوانی نمونه‌های مثبت واقعی و نمونه‌های منفی واقعی به‌دست آمده است.

در بررسی آنتی بیوگرام گزارش شده از مراکز جمع آوری نمونه‌ها، این نتیجه به دست آمد که تمامی آن‌ها به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، آمیکاسین، جنتامایسین، تتراسایکلین، سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین و ایمی پنم مقاوم هستند.

شکل ۱- تصاویری از نتایج آزمون هوج، نمونه های شماره۲۴۱، ۲۴۲، ۲۴۳، ۲۴۴، ۱۳۴، ۲۲۰، ۲۲۱ مثبت و نمونه های شماره ۱۳۵، ۱۳۶، ۲۱۹ منفی هستند.

فراوانی انواع نمونه‌های مثبت به این شرح گزارش می‌شود: عفونت زخم‌های حاصل از سوختگی با بالاترین درصد به مقدار ۲۷ (۷۵ درصد) و پس از آن به ترتیب نمونه‌های ادراری۶ (۱۶/۷ درصد)، نمونه‌های ریوی ۲ (۵/۶ درصد) و مایع مغزی نخاعی یک مورد(۲/۸ درصد) هستند. نمودار فراوانی نمونه‌ها در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل ۲- نمودار درصد تنوع نمونه های مثبت

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه مقاومت‌های چندگانه باکتریایی مشکلات بسیاری را در زمینه درمان ایجاد کرده است . از این رو مطالعات بسیاری برای شناسایی آن‌ها و راه‌های مناسب برای درمان صحیح انجام می‌شود. از آن‌جایی که عفونت‌های انتروباکتریاسه و در این گروه *کلبسیلا پنومونیه* از موارد شایع در عفونت‌های گزارش شده هستند، لازم است بررسی‌های بسیاری در این زمینه انجام شود. از طرفی انتخاب موثرترین آنتی بیوتیک با کم‌ترین عوارض ناشی از مصرف آن و همچنین، تعیین حداقل‌ترین میزان تجویز یک آنتی بیوتیک بسیار ضروری است. تعیین MIC باکتری و همچنین، شناسایی عامل مقاومت، انتخاب صحیح آنتی بیوتیک را امکان‌پذیر می‌سازد.

در خصوص روش‌های تشخیص عوامل مقاومت، در مطالعه ای که برای شناسایی کارباپنماز از کلبسیلا

پنومنیه در سال ۲۰۰۸ میلادی بر روی ۱۲۲ نمونه *کلبسیلا پنومونیه* جدا شده از مدفوع انجام شد، نتایج چنین گزارش شده بود که ۴۳ مورد(۳۵/۲ درصد) بر روی محیط کروم آگار رشد کلونی داشته و از این تعداد ۳۸ مورد (۳۱/۱ درصد) آن‌ها آزمون هوچ مثبت گزارش شده است. از این رو حساسیت آزمون هوچ را می‌توان در مطالعه یاد شده حدود ۸۸/۳ درصد محاسبه کرد. با توجه به میزان به‌دست آمده در مطالعه حاضر که ۸۳/۳ درصد است، می‌توان حساسیت این دو آزمون را تقریبا مشابه دانست (۱۱).

در مقایسه ای که بین کروم آگار KPC و محیط مکانکی آگار حاوی ایمی پنم انجام شد، اختصاصیت و حساسیت برای کروم آگار به ترتیب ۱۰۰ و ۹۸/۸ درصد و برای محیط مکانکی آگار حاوی ایمی پنم ۹۴/۷ درصد، ۸۸/۶ درصد محاسبه شد (۱۲).

امروزه بررسی مولکولی ژن‌های مقاومت باکتری به دلیل وجود MIC های پایین در برخی ازآن‌ها، مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. حساسیت و اختصاصیت بالای این روش، صرف زمان کمتر در انجام آزمون‌های مورد نظر در مقایسه با روش‌های فنوتیپی ذکر شده، از دیگر دلایلی است که اهمیت آزمون‌های مولکولی را نسبت به روش‌های تشخیصی از جمله تعیین ژن‌های مقاومت در باکتری‌ها بیشتر می‌کند. مهم‌ترین ژن های کارباپنماز در باکتری *کلبسیلا پنومونیه* که در آزمون‌های مولکولی بررسی می‌شوند ژن های bla_{KPC}, bla_{IMP}, bla_{NDM} هستند (۱۳– ۱۵).

با توجه به افزایش و تغییرات میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در گذشت زمان و از سوی دیگر، اهمیت بسیار در سرعت و صحت تشخیص آنتی بیوتیک‌های درمانی، باید روش‌هایی استفاده شود که از اطمینان بیشتری برخوردار باشند. همچنین از آن‌جایی که عفونت‌های کلبسیلایی ازجمله عفونت‌های شایع بیمارستانی هستند و مقاومت‌های چندگانه آنتی بیوتیکی در آن نیز رو به افزایش است، بنابراین روشی با ضریب اطمینان بالا و همچنین، درجه حساسیت و اختصاصیت مطلوب می‌تواند کارساز باشد.

در پایان می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که استفاده از آزمون هوج می‌تواند در بررسی‌های اولیه سنجش کارباپنماز موثر باشد. این در شرایطی است که هزینه‌های ناشی از تهیه محیط‌های اختصاصی کروموژنیک و همچنین، استفاده از روش‌های مولکولی محدودیت‌های دارد. ولی لازم است هنگام استفاده از این آزمون نسبت به درصد احتمال موارد منفی کاذب آن هوشیار بود.

References

(1) Tato M, Morosini M, García L, Albert S, Coque MT, Canton R. Carbapenem Heteroresistance in VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates Belonging to the Same Clone: Consequences for Routine Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(11): 4089–93.

(2) Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemoth*. 2005; 56(1): 128–32.

(3) Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct Ertapenem Disk Screening Method for Identification of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Escherichia coli in Surveillance Swab Specimens. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(3): 836–41.

(4) Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple Disk-Based Method for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Type β-Lactamase by Use of a Boronic Acid Compound. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(12): 4083–6.

(5) Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M, Pappa O, Saroglou G, Vatopoulos A, et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyper epidemic clone. *EuroSurveill*. 2009; 14(21): 19218.

(6) Amirmozafari N, Tehrani HF, Langeroodi Z, Abdullahi A. Survey of drug resistance due to extended spectrum β-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients. *Journal of the faculty of medicine*. 2007; 31(3): 241-5

(7) Shahcheraghi F, Moezi H. ESBLs in *K. pneumoniae* isolates from Tehran's hospitals clinical samples. *J of infectious diseases and tropical Medicine* , 2007; 12(39): 57-60 (article in Persian)

(8) Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1 producing Klebsiella pneumoniae isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12(7):695-6.

(9) Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48–encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3):1369–73.

(10) Guerin F, C.Henegar, G.Spiridon, O.Launay, D.Salmon-Ceron, C.Poyart. Bacterial prostatitis due to P.aeruginosa harboring the blaVIM-2 metallo b-lactamase gene from Saudi Arabia. *J.Antimicrob. Chemother*. 2005; 56(3):601-2

(11) 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 Microbio*l. 2008; 46(9): 3110–11.

(12) Panagea Th, Galani I, Souli M, Adamou P, Antoniadou A, Giamarellou H. Evaluation of CHROMagar KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures. *Int J Antimicrob Ag*. 2011; 37(2): 124-8.

(13) Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, Nolte FS. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. *J Clin Microbiol*. 2009; 47(2): 322–6.

(14) Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Micr Infec Dis*. 2011; 70(1): 119–23.

(15) Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, et al. Rapid Detection of *bla*KPC Carbapenemase Genes by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(9): 2879–83.

[1]. Hodge Test
[2]. Clinical and Laboratory Standards Institute

Evaluation of sensitivity and specificity of Hodge Test in diagnosis of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates

Bahareh Hajihashemi *
MSc of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran, ba.hajihashemi@gmail.com
Mohammad Farzanehkhah
MSc of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran, farzanehkhah@yahoo.com
Masoud Hajia
Associate Professor of Microbiology, Reference Health Laboratories Research Center, Tehran, Iran, massoudhajia@yahoo.com
Mohammad Rahbar **
Associate Professor of Microbiology, Reference Health Laboratories Research Center, Tehran, Iran, rahbar_reflab@yahoo.com

Abstract

Introduction: Carbapenem is the last defensive line against gram negative bacterial infections that are resistant to extended spectrum antibiotics. Hence, using a proper method for determining the production of carbapenemase enzyme which controls the infection factors resistant to carbapenem antibiotic seemed to be essential. The aim of this study was qualitative analysis of Hodge test for finding a suitable method in determining carbapenemase.

Materials and methods: Thirty six samples of *Klebsiella pneumoniae* with multiple antibiotic resistances capable of producing carbapenemase enzyme were collected from medical centers and laboratories, and approved through CHROMagar method. All the samples were analyzed with regards to the form of sensitive zone as clover shape in Hodge test, according to CLSI instruction.

Results: All collected samples were identified for carbapenemase producing with CHROMagar KPC method. Thirty samples were reported positive with Hodge test, respectively. The sensitivity of Hodge test was calculated to be 83.3%. Also, all the negative control isolations were accompanied by negative result and its sensitivity was reported to be 100%. On the other hand, it was observed that all the positive cases were resistant to antibiotics including Ampicillin, Amikacin, Gentamicin, Tetracycline, Ceftazidime, Ciprofloxacin and Imipenem.

Discussion and conclusion: According to the obtained results from Hodge test on the collected samples, using this method was determined to be appropriate in primary diagnosis and under the conditions where preparation of specific culture media or using molecular methods was not possible.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Extended spectrum β-lactamase, Carbapenemase, Modified Hodge test

* Corresponding Author
**Antimicrobial Resistance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Received: April 10, 2013/ **Accepted** August 6, 2013