

Evaluation of Carba NP Method for Rapid Detection of Pseudomonas aeruginosa Isolates Producing Carbapenemase Enzymes

Masoumeh Beig¹,
Mohammad Reza Arabestani^{2,3}

¹ MSc in Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² Associate professor, Department of Microbiology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

(Received November 11, 2018 ; Accepted January 9, 2018)

Abstract

Background and purpose: Recently, increased resistance to carbapenem antibiotics among *Pseudomonas aeruginosa* has raised concerns. The Carba NP test is used for detection of carbapenemase types. This study aimed at applying Carba NP method for rapid detection of *P. aeruginosa* isolates producing carbapenemase enzymes.

Materials and methods: A total of 97 clinical specimens was collected from patients in educational hospitals between November 2017 and May 2018 in Hamadan, Iran. Antibiotic susceptibility test was performed by disc diffusion method and MIC for imipenem was done by E-test. In order to detect carbapenemases enzymes, combined disk (CDT), CarbaNP, Modified Hodge (MHT), and Polymerase chain reaction (PCR) were performed. Statistical analysis was performed using SPSS V16.

Results: The highest and lowest levels of resistance were found to be to Ceftriaxone 65 (67%) and Piperacilin/Tazobactam 38 (39.2%), respectively. Among 97 clinical isolates of *P.aeruginosa*, 49 (50.51%) were positive for carbapenemase genes by PCR test from which 48 (97.95%) were positive for CarbaNP test. There were 48 (49.48%) PCR negative isolates of which all (100%) showed negative results for CarbaNP test. Compared to PCR, the sensitivity and specificity of this test was 98% and 100%, respectively.

Conclusion: This study showed that a high percentage of *P. aeruginosa* was resistant to Carbapenem antibiotics and the CarbaNP method was highly sensitive and specific for detection of carbapenemase enzymes.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, disk diffusion antibiotic test, PCR, CarbaNP

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (172): 10-21 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Reza Arabestani - Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran (E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com)

ارزیابی روش CarbaNP برای شناسایی سریع ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مولد آنزیم های کارباپنماز

معصومه بیگ^۱

محمد رضا عربستانی^{۲،۳}

چکیده

سابقه و هدف: اخیراً افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک های کارباپنم در بین باکتری سودوموناس آئروژینوزا موجب نگرانی هایی در بیمارستان ها شده است. روش CarbaNP (Cnpt) به منظور شناسایی آنزیم های کارباپنمازها مورد استفاده قرار می گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه استفاده از روش CarbaNP برای شناسایی سریع ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد آنزیم های کارباپنماز می باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۹۷ نمونه بالینی از بیمارستان های آموزشی شهر همدان از آبان ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع آوری شد. آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله ها به روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهاري نمونه ها نسبت به ایمپینم، با استفاده از نوار E test انجام شد. جهت شناسایی آنزیم های کارباپنماز، از روش CDT (combined disc test)، MHT (Modified Hodge Test) و CarbaNP و روش PCR (Polymerase chain reaction) استفاده شد. در نهایت آنالیز آماری تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (Version 16) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی نشان داد، بیشترین و کمترین میزان مقاومت به ترتیب نسبت به آنتی بیوتیک های سفتریاکسون ۶۵ (۶۷ درصد) و پیراسیلین-تازوباکتام ۳۸ (۳۹/۲ درصد) مشاهده شد، از میان ۹۷ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۴۹ (۵۰/۵۱ درصد) ایزوله با تست PCR برای ژن های کارباپنماز، مثبت شدند که از این میان ۴۸ (۹۷/۹۵ درصد) ایزوله از نظر تست CarbaNP مثبت بودند. از میان ۴۸ (۴۹/۴۸ درصد) ایزوله ای که نتایج PCR منفی داشتند، ۴۸ (۱۰۰ درصد) ایزوله ها تست CarbaNP منفی داشتند. بنابراین حساسیت و اختصاصیت این تست در مقایسه با روش PCR به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۸ درصد بود.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که CarbaNP یک روش سریع، ارزان و دارای حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی جهت شناسایی ایزوله های مولد آنزیم های کارباپنماز می باشد.

واژه های کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، تست آنتی بیوگرام دیسک دیفیوژن، PCR، CarbaNP

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی متعلق به عامل عمده عفونت های بیمارستانی با درصد بالایی از مرگ و میر می باشند (۱). مکانیسم های مقاومت این باکتری های غیر تخمیر کننده می باشد. این باکتری ها

E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد رضا عربستانی - همدان: دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی

۱. کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲. دانشیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۸/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۱۹

پلاسمیدهای قابل انتقال و ترانسپوزون‌ها موجب گسترش سریع میان باکتری‌ها شامل کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر، اسیتوباکتر بومانی و سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. کارباپنم آزهای کلاس B به‌عنوان metallo-beta-lactamase (MBL) شناخته می‌شوند که در جایگاه فعالیت آن‌ها ZN وجود دارد (۵). متالو بتالاکتامازها به دلیل ایجاد مقاومت به کارباپنم‌ها که از مؤثرترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده علیه عفونت‌های سودوموناسی هستند، بسیار قابل توجه می‌باشند. آنزیم‌های MBL داخل اینتگرون واقع شده و توانایی ادغام در پلاسمید یا کروموزوم را دارند و قابلیت انتقال به سایر ایزوله‌های سودوموناس و یا باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند. متالو بتالاکتامازها بر اساس ساختار مولکولی به انواع مختلفی تقسیم می‌شوند که عبارت‌اند از Imipenemase (IMP)، German Imipenemase (GIM)، Verona imipenemase (VIM)، Sao Paulo metallo-beta-lactamase (SPM)، New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) که از میان این آنزیم‌ها، IMP در سودوموناس آئروژینوزا بارزتر می‌باشد (۶). بعدها کلاس‌های دیگری از بتالاکتامازهای سرین (کلاس C) نیز یافت شدند که توالی آمینواسیدی آن‌ها مشابه کلاس A بود. اعضای این کلاس به آنزیم‌های AmpC نیز معروف هستند و قادر به هیدرولیز سفومایسین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌باشند. دسته‌ای از بتالاکتامازهای سرین نیز وجود دارند که تشابه اندکی با بتالاکتامازهای کلاس A و C دارند و تحت عنوان Oxacilin-hydrolyzine (OXA) یا اگر اسیلینازها نام‌گذاری می‌شوند. این بتالاکتامازها در کلاس D جای گرفته‌اند (۷). هرچند روش‌های مولکولی به‌عنوان روش‌های مرجع برای شناسایی ایزوله‌های مولد کارباپنم‌ها می‌باشند اما به دلایلی دارای معایب و محدودیت‌هایی جهت به‌کارگیری می‌باشند که شامل هزینه بالا، نیازمندی به افراد متخصص و وجود ژن‌های کارباپنم‌ها متنوع است. تست‌های فنوتیپی متنوعی جهت

باکتری‌ها به کارباپنم‌ها شامل تولید آنزیم‌های کارباپنماز، افزایش ترشح پمپ‌های تراوشی، موتاسیون در پورین‌های غشا خارجی و به دنبال آن کاهش نفوذپذیری غشا خارجی و افزایش تولید AmpC سفالوسپوریناز کروموزومی می‌باشد (۲). از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومتی تولید آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد. هرچند کارباپنم‌ها به‌عنوان آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از سویه‌های Multi Drug Resistance (MDR) سودوموناس آئروژینوزا باقی‌مانده‌اند اما افزایش میزان مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها موجب شکست‌های درمانی شده است. به همین علت شناسایی سریع و دقیق سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های کارباپنماز برای درمان مناسب و جلوگیری از گسترش سویه‌های مقاوم ضروری می‌باشد. CarbaNP تست از جمله روش‌های سریع و مناسب جهت شناسایی سویه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز از جمله سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (۳). نوعی از مقاومت به وسیله تولید آنزیم‌هایی به نام بتالاکتامازها صورت می‌گیرد که عامل مقاومت در برابر بتالاکتامازها می‌باشد. برای طبقه‌بندی بتالاکتامازها روش‌های متعددی وجود دارد که در بین آن‌ها طبقه‌بندی آمبلر و طبقه‌بندی بوش کاربرد بیشتری دارند. در طبقه‌بندی آمبلر بر اساس توالی آمینواسیدی آنزیم‌ها، 4 کلاس مختلف A, B, C, D وجود دارد. کلاس‌های A, C, D به وسیله مکانیسم سرین عمل می‌کنند، در صورتی که کلاس B برای فعالیت خود نیازمند عنصر روی می‌باشد. کارباپنمازهای کلاس A یک سرین بتالاکتاماز هستند که در جایگاه فعال آن‌ها سرین وجود دارد. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) رایج‌ترین کارباپنم‌آز کلاس A هست و دارای تنوعی از KPC₂ تا KPC₁₃ است، که تنها در موتانت‌های آمینواسیدی تفاوت دارند (۴). ژن bla_{kpc} بر روی یک پلاسمید قرار دارد و توسط Tn₃ و Tn₄₄₀₁ در میان سویه‌های باکتریایی منتقل می‌شوند. وجود kpc در

شناسایی سریع ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد آنزیم‌های کارباپنماز هست.

مواد و روش‌ها

در طی دوره ۹ ماهه از آبان ۱۳۹۶ تا اردیبهشت ۱۳۹۷ کلنی‌های باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های بعثت، بهشتی و سینای شهر همدان جمع‌آوری شد. سپس نمونه‌های باکتریایی به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده پزشکی، منتقل شدند. جهت تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رشد در محیط مک کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI، تست OF بررسی تحرک، رشد در محیط ستریماید آگا، رشد در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هیتون آگار استفاده شد (۱۰). برای سنجش مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش استاندارد دیسک دیفیوژن استفاده شد و مطابق با روش ۲۰۱۸ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) صورت گرفت. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده شده از شرکت MAST انگلستان خریداری شدند و شامل پیراسیلین (۱۰۰ µg)، پیراسیلین + تازوباکتام (۱۰۰/۱۰ µg)، سفنازیدیم (۳۰ µg)، سفوتاکسیم (۳۰ µg)، سفتریاکسون (۳۰ µg)، آزترونام (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، مروپنم (۱۰ µg)، دوری پنم (۱۰ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، سیپروفلوکساسین (۵ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg) بودند. جهت کنترل آزمایش‌ها از سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853 استفاده شد. جهت تعیین حداقل غلظت مهارتی (MIC) از نوار Etest ایمپنم و بر اساس پروتکل ۲۰۱۸ CLSI استفاده شد. شناسایی ایزوله‌های مولد MBL با استفاده از مهارکننده (EDTA) Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid. در این روش از باکتری‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک ایمپنم مقاوم بودند سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه

شناسایی سریع و مقرون‌به‌صرفه کارباپنمازها گسترش یافته‌اند. جهت تشخیص اختصاصی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز از مهارکننده‌ها استفاده می‌شود. از معمول‌ترین مهارکننده‌هایی که استفاده می‌شوند می‌توان به Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) و دیپیکولونیک اسید اشاره نمود (۸). EDTA به‌عنوان عامل شلاته‌کننده یون روی دو ظرفیتی عمل کرده و با جمع‌آوری کردن این یون از محیط عملکرد آنزیم مانع از فعالیت آن می‌شود. از این ماده شیمیایی به دو روش دیسک ترکیبی و استفاده از خاصیت سینرژسم بین آن و دیسک ایمی پنم و یا سفنازیدیم جهت شناسایی متالوبتالاکتاماز استفاده می‌شود. براساس دستورالعمل (Clinical and Laboratory Standards Institute) CLSI تست فنوتیپی جهت شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز، Modified Hodge Test (MHT) معرفی شده است. البته مطالعات مختلفی جهت بررسی حساسیت و اختصاصیت این تست در شناسایی سویه‌های تولیدکننده کارباپنماز انجام گرفته است که حساسیت‌های متفاوتی را نشان می‌دهند. این تست با استفاده از سویه اشرشیاکلی با شماره ATCC ۲۵۹۲۲، دیسک ارتاپنم و محیط مولر هیتون آگار انجام می‌گیرد. البته باید به این نکته توجه نمود که این تست دارای اختصاصیت کامل نمی‌باشد، زیرا آنزیم AmpC باعث ایجاد پاسخ‌های مثبت کاذب می‌شود، از طرف دیگر تشخیص ضعیف NDM-1 باعث می‌شود که حساسیت این تست نیز صد درصد نباشد. از جمله روش‌های فنوتیپی که بر پایه تست‌های رنگ سنجی است روش CarbaNP می‌باشد پایه این تست تشخیصی بر اساس تغییر pH محیط می‌باشد که این تغییر pH با استفاده از معرف رنگی (فنل رد) سنجیده و کنترل می‌شود. باکتری که دارای توانایی تولید آنزیم کارباپنماز باشد، آنتی‌بیوتیک کارباپنم را هیدرولیز نموده و باعث تغییر pH محلول می‌شود. در نتیجه معرف رنگ تغییر کرده و نتایج خوانده می‌شود (۹). لذا هدف از این مطالعه ارزیابی روش CarbaNP جهت

در این مطالعه از کلبسیلا پنومونیه استاندارد با شماره ATCC BAA- ۱۷۰۵ به عنوان کنترل مثبت و کلبسیلا پنومونیه استاندارد با شماره ATCC BAA- ۱۷۰۶ به عنوان کنترل منفی استفاده شد. در این مطالعه از سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ به عنوان کنترل منفی و از سودوموناس آئروژینوزا دارای ژن IMP که مورد تایید و سکانس شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تست CarbaNP

تست CarbaNP برای بررسی وجود آنزیم کارباپنماز مطابق با دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸ انجام شد ابتدا یک لوپ پر (۱ میکرو لیتر) از باکتری مورد نظر که به مدت یک شبانه روز بر روی محیط بلاد آگار انکوبه شده بود برداشته و داخل یک میکرو تیوب که محتوی Tris-Hcl به عنوان محلول لیز کننده باکتری بود حل شد. سپس میکرو تیوب به مدت ۵ ثانیه ورتکس شد، در مرحله بعد به مدت ۵ دقیقه محلول باکتریایی را با دور ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوز و سپس ۳۰ میکرو لیتر از محلول رویی را که حاوی آنزیم های باکتریایی بود، برداشته و به دو میکرو تیوب جدید منتقل شد. در یک میکرو تیوب ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول ۳ میلی گرم در میلی لیتر ایمینم مونو هیدرات، محلول فنل رد و هم چنین ZnSO₄ و در میکرو تیوب دوم که به عنوان کنترل بود، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول فوق که فاقد ایمی پنم (شرکت سیگما آلدریج، آمریکا) بود اضافه شد. در صورت مثبت شدن تست CarbaNP، میکرو تیوب کنترل به رنگ قرمز و میکرو تیوب دیگر به رنگ نارنجی / زرد مشاهده می شود (۱۳).

شناسایی ژن های کارباپنماز به روش PCR

الف) استخراج DNA

در این مطالعه استخراج DNA به روش BOILING انجام شد (۱۴). پس از این مرحله لوله ها از بن ماری خارج و پس از چند دقیقه خنک شدن به میکرو تیوب

شد، سپس به صورت چمنی بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد پس از آن از دیسک ایمینم استفاده شد. به این صورت که دیسک ایمینم (۱۰ µg) به تنهایی و در مجاورت یک دیسک IMP-EDTA (ایمینم-EDTA) قرار داده شد، فاصله بین دیسک ایمینم تنها و دیسک ترکیبی IMP-EDTA ۲۰ میلی متر بود. سپس پلیت ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و افزایش ۷ میلی متری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک IMP-EDTA نسبت به دیسک ایمی پنم تنها نشان دهنده حضور آنزیم متالوبتالاکتاماز بود (۱۱).

تست فوتوبی جهت شناسایی آنزیم های کارباپنماز:

Modified Hodge Test

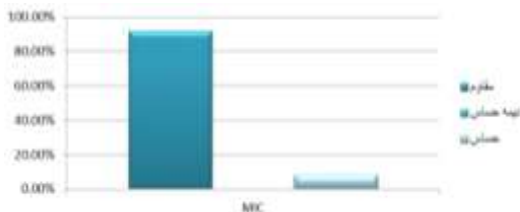
تست MHT برای بررسی وجود آنزیم کارباپنماز مطابق با دستورالعمل CLSI ۲۰۱۳ انجام شد. بدین صورت که سوسپانسیون باکتری با رقت نیم مک فارلند از باکتری ATCC ۲۵۹۲۲ *E.coli* تهیه شد. تهیه رقت ۱/۱۰ با سرم فیزیولوژی از سوسپانسیون مرحله قبل با رقت نیم مک فارلند تهیه شد. سپس کشت چمنی با سواب استریل از سوسپانسیون با رقت ۱/۱۰ *E.coli* ATCC ۲۵۹۲۲ بر روی محیط مولر هیتون آگار انجام شد، در ادامه پلیت در دمای اتاق به مدت ۳ الی ۵ دقیقه نگهداری شد تا جذب محیط شود. سپس یک دیسک ارتاپنم ۱۰ میکرو گرمی در مرکز پلیت قرار داده شد. از سوسپانسیون های ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا که به آنتی بیوتیک کارباپنم مقاوم یا نیمه حساس بودند برای بررسی تولید آنزیم کارباپنماز استفاده شد و بدین منظور از لبه دیسک قرار داده شده در مرکز پلیت به سمت لبه پلیت کشت خطی داده شد (سواب با دیسک برخورد نکند) پس از آن پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت نگهداری شد. هاله ی عدم رشد به شکل برگ شبدری به عنوان سوبه مولد آنزیم کارباپنماز معین شد (۱۲).

آنتی بیوتیک سفتریاکسون ۱۳ (۱۳/۴ درصد) بود (جدول شماره ۲).

از میان ۴۹ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی بیوتیک ایمینم، ۴۵ (۹۱/۸ درصد) ایزوله MIC مقاوم و ۴ (۸/۱۶ درصد) ایزوله MIC حساس نسبت به ایمینم داشتند و هیچ ایزوله دارای MIC حد واسط وجود نداشت (نمودار شماره ۱، تصویر شماره ۱).

جدول شماره ۲: نتایج تست آنتی بیوگرام ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

آنتی بیوتیک	حساس (تعداد (درصد))	حدواسط (تعداد (درصد))	مقاوم (تعداد (درصد))
پیراسیلین	(۴۳/۳)۴۲	(۱۳/۴)۱۳	(۴۳/۳)۴۲
پیراسیلین-تازوباکتام	(۴۹/۴۸)۴۸	(۱۱/۳)۱۱	(۳۹/۲)۳۸
سفتازیدیم	(۵۲/۶)۵۱	(۶/۲)۶	(۴۱/۲)۴۰
ایمینم	(۴۹/۴۸)۴۸	(۱۰/۳)۱۰	(۵۱/۵)۵۰
آزترونام	(۲۸/۹)۲۸	(۱۰/۳)۱۰	(۴۱/۲)۴۰
آمیکاسین	(۴۸/۵)۴۷	(۱۰/۳)۱۰	(۴۱/۲)۴۰
سیروفلوکساسین	(۴۳/۳)۴۲	(۲/۱)۲	(۵۴/۶)۵۳
مروپنم	(۵۳/۶)۵۲	(۵/۲)۵	(۴۱/۲)۴۰
دوری پنم	(۵۱/۵)۵۰	(۲/۱)۲	(۴۶/۴)۴۵
تتراسایکلین	(۴۰/۲)۳۹	(۵/۲)۵	(۵۴/۶)۵۳
سفتریاکسون	(۱۳/۴)۱۳	(۱۹/۵)۱۹	(۶۷)۶۵



نمودار شماره ۱: نتایج MIC نمونه‌های مقاوم به ایمینم



تصویر شماره ۱: MIC سوبه سودوموناس آئروژینوزا

دیسک ترکیبی ایمینم/EDTA (CDT)

آزمون CDT برای ۴۹ ایزوله مقاوم به آنتی بیوتیک

Tris 20 Mm اضافه و سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ rpm قرار داده شد و در نهایت قسمت رویی که حاوی DNA است جدا شد و در یک میکروتیوب جداگانه قرار داده شد. این مایع تا زمان آزمایش PCR در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. روش PCR برای ژن‌های *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{GIM}*, *bla_{AmpC}*, *bla_{OXA48}*, *bla_{OXA10}* در سوبه‌های سودوموناس آئروژینوزا ایزوله شده توسط پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات و توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	پرایمر	توالی	طول پیک	دفرنس
<i>bla_{KPC}</i> - <i>IKPC</i>	KPC-F KPC-R	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	۵۳۸	(۱۵)
<i>IMP</i>	Imp-F Imp-R	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C CCA AAC YAC TAS GTT ATC T	۱۸۸	(۱۶)
<i>VIM</i>	Vim-F Vim-R	GAT GGT GTT TGG TCG CAT A CGA ATG CGC AGC ACC AG	۳۹۰	(۱۶)
<i>AMPC</i>	AMPC-F AMPC-R	ATA ACC ACC CAG TCA CGC CAG TAG CGA GAC TGC GCA	۶۳۰	(۱۷)
<i>OXA48</i>	OXA48-F OXA48-R	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTGTCCGTGGCCGAAA	۲۸۱	(۱۵)

یافته ها

بر اساس تست‌های تشخیص آزمایشگاهی ۹۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌های شهر همدان جداسازی شدند. برای تمامی ۹۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا تست حساسیت آنتی بیوتیکی براساس دستورالعمل CLSI ۲۰۱۸ انجام شد. میزان مقاومت سودوموناس آئروژینوزا جداشده از بیماران بستری در بیمارستان نسبت به آنتی بیوتیک‌های بررسی شده در جدول شماره ۲ ذکر شده است. با توجه به نتایج بالا بیشترین مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک سفوکسیتین و بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک سفتازیدیم مشاهده شد.

با توجه به نتایج بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک سفتریاکسون ۶۵ (۶۷ درصد) و کمترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک پیراسیلین-تازوباکتام ۳۸ (۳۹/۲ درصد) بود. هم‌چنین بیشترین میزان حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک مروپنم ۵۲ (۵۳/۶ درصد) و کمترین میزان حساسیت نسبت به

۳۵ (۷۱/۴ درصد) ایزوله دارای ژن *OXA48* و ۱۱ (۲۲/۴۴ درصد) ایزوله دارای ژن *KPC* بودند (نمودار شماره ۲، تصویر شماره ۵).



تصویر شماره ۲: اثر سینرژسم بین EDTA و ایمپنیم



تصویر شماره ۳: سویه‌های MHT مثبت سودوموناس آئروژینوزا



تصویر شماره ۴: نتایج تست CarbaNP A سویه carbaNP مثبت B سویه carbaNP منفی

کارباپنم برای شناسایی آنزیم‌های متالوبتالاکتاماز (MBL) انجام شد. در این روش افزایش ۷ میلی‌متری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک ایمپنیم به همراه EDTA نسبت به دیسک ایمپنیم تنها نشان‌دهنده حضور آنزیم متالوبتالاکتاماز بود. لذا در این بررسی از ۴۹ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به کارباپنم، ۲۶ (۵۳/۰۶ درصد) ایزوله دارای افزایش قطر هاله عدم رشد حداقل ۷ میلی‌متر و مولد آنزیم متالوبتالاکتاماز و ۲۳ (۴۶/۹۳ درصد) ایزوله‌ها توسط این آزمون دارای نتایج منفی بودند (۱۳) (تصویر شماره ۲).

آزمون (MHT) Modified Hodge Test

آزمون (MHT) برای ۴۹ ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک کارباپنم برای بررسی وجود کارباپنماز طبق CLSI 2013 انجام شد. از ۴۹ ایزوله مقاوم به کارباپنم سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده ۲۵ (۵۱/۰۲ درصد) ایزوله دارای تست مثبت بوده و شکل برگ شبدری در آن‌ها مشاهده شد و ۴۸ (۹۷/۹۷ درصد) ایزوله دارای تست منفی بودند و هاله برگ شبدری در آن‌ها مشاهده نشد (تصویر شماره ۳).

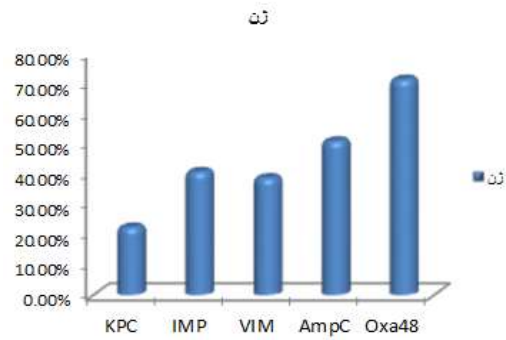
آزمون Carba NP

بر اساس نتایج، از میان ۴۹ ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم، ۴۸ (۹۷/۹۵ درصد) ایزوله تست Carba NP مثبت و ۱ (۲/۰۱ درصد) ایزوله دارای تست Carba NP منفی بودند (تصویر شماره ۴).

تعیین ژنوتیپی سویه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز توسط PCR

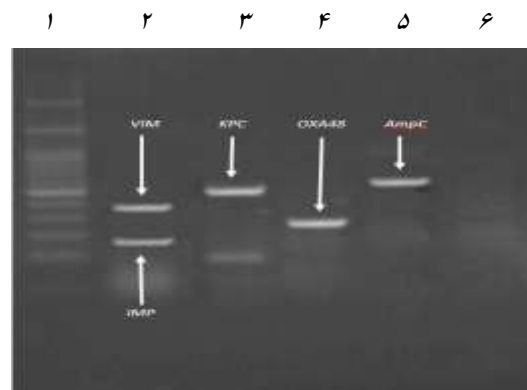
از بین ۹۷ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیمار، ۴۹ (۵۰/۵۱ درصد) ایزوله نسبت به آنتی‌بیوتیک کارباپنم مقاوم بودند که از این میان، ۲۰ (۴۰/۸ درصد) ایزوله دارای ژن *IMP*، ۱۹ (۳۸/۷۷ درصد) ایزوله دارای ژن *VIM*، ۲۵ (۵۱/۰۲ درصد) ایزوله دارای ژن *AMPC*،

نتایج آنالیز SPSS برای تعیین همبستگی و ارتباط بین روش فنوتیپی carbaNP با نتایج PCR (جدول شماره ۵). بر اساس نتایج به دست آمده، p برای تمامی ژن‌ها کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد که بیانگر این می‌باشد که بین نتایج مثبت carbaNP و نتایج مثبت PCR برای ژن‌های *KPC, AmpC, OXA48* و *IMP, VIM, SPM, SIM, GIM* ارتباط معناداری وجود دارد (جدول شماره ۵).



نمودار شماره ۲: فراوانی ژن‌های *IMP, VIM, AMPC, OXA48* و *KPC*

حساسیت، اختصاصیت، *PPV* و *NPV* برای تست *carbaNP* بر اساس نتایج میزان حساسیت، اختصاصیت، *PPV* و *NPV* تست *carbaNP* به ترتیب ۹۸ درصد، ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد و ۹۷ درصد بود.



تصویر شماره ۵: الکتروفورز محصول PCR ژن‌های *KPC, AMPC, VIM, IMP, OXA48* جاهک شماره ۱: مارکر ۱۰۰ bp (فرمتاس)، جاهک شماره ۲: *IMP* (۱۸۸ bp)، *VIM* (۳۹۰ bp)، جاهک شماره ۳: *KPC* (۵۳۸ bp)، جاهک شماره ۴: *OXA48* (۲۸۱ bp)، جاهک شماره ۵: *AmpC* (۶۳۰ bp)، جاهک شماره ۶: کنترل منفی

جدول شماره ۳: نتایج *carba NP*, *CDT, MHT, MIC* و مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا

CarbaNP	CDT	MHT	MIC range (mg/L)	IMP	کاراینامز
۱۱/۱۱	۶/۱۱	۵/۱۱	> ۳۲		<i>KPC</i>
۲۰/۲۰	۱۳/۲۰	۱۵/۲۰	۳۲		<i>IMP</i>
۱۹/۱۹	۱۰/۱۹	۱۴/۱۹	> ۳۲		<i>VIM</i>
۲۵/۲۵	۱۶/۲۵	۱۴/۲۵	۰ تا > ۳۲		<i>AMPC</i>
۳۴/۳۵	۲۰/۳۵	۱۸/۳۵	> ۳۲		<i>OXA48</i>
۲/۲	۲/۲	۲/۲	۰ تا > ۳۲		<i>KPC+IMP+AMPC</i>
۳/۳	۲/۳	۱/۳	۱۶		<i>KPC+AMPC+OXA48</i>
۶/۶	۳/۶	۶/۶	۸		<i>IMP+VIM+OXA48</i>
۵/۵	۳/۵	۴/۵	> ۳۲		<i>IMP+AMPC+OXA48</i>
۲/۲	۲/۲	۲/۲	> ۳۲		<i>IMP+VIM+AMPC+OXA48</i>
۱۴/۱۵	۱۰/۱۵	۱۲/۱۵	۸		<i>AMPC+OXA48</i>
۱۵/۱۵	۱۱/۱۵	۱۵/۱۵	> ۳۲		<i>VIM+OXA48</i>
۱۴/۱۴	۱۱/۱۴	۱۴/۱۴	۱۶		<i>IMP+OXA48</i>
۱/۱	۱/۱	۱/۱	> ۳۲		<i>IMP+KPC+OXA48</i>
۳/۳	۳/۳	۳/۳	> ۳۲		<i>VIM+KPC+AMPC</i>
۱/۱	۱/۱	۱/۱	۸		<i>VIM+KPC+AMPC</i>
۴/۴	۴/۴	۴/۴	۴-۸		<i>IMP+VIM+AMPC</i>
۱/۱	۱/۱	۱/۱	۸		<i>KPC+OXA48+VIM</i>
۱۱/۱۱	۸/۱۱	۱۱/۱۱	۸		<i>IMP+AMPC</i>
۵/۵	۳/۵	۴/۵	۱۶		<i>VIM+KPC</i>
۴۸/۴۸	۴۱/۴۸	۴۵/۴۸	< ۰/۲۵-۲		Not detected

نتایج مقایسه روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی مطابق با جداول ۳ و ۴ و ۵ گزارش شد.

جدول شماره ۴: نتایج مقایسه ژنوتیپی و دیسک دیفیوژن

کاراینامز	IMI			DOR			MEM		
	حساس (درصد)	حد واسط (درصد)	مقاوم (درصد)	حساس (درصد)	حد واسط (درصد)	مقاوم (درصد)	حساس (درصد)	حد واسط (درصد)	مقاوم (درصد)
IMP (۲۰)	(۰)	(۵)	(۹۵)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)	(۵)	(۵)	(۹۰)
VIM (۱۹)	(۰)	(۵)	(۹۴)	(۵)	(۲)	(۸۹)	(۵)	(۲)	(۸۴)
KPC (۱۱)	(۹)	(۰)	(۹۰)	(۰)	(۰)	(۹۰)	(۹)	(۰)	(۸۱)
AmpC (۲۵)	(۰)	(۰)	(۱۰۰)	(۰)	(۰)	(۹۶)	(۴)	(۳)	(۸۴)
OXA48 (۳۵)	(۰)	(۲)	(۹۷)	(۲)	(۸)	(۹۱)	(۵)	(۷)	(۸۲)

جدول شماره ۵: نتایج آنالیز SPSS برای تعیین همبستگی و ارتباط بین روش فنوتیپی CarbaNP با نتایج PCR برای ژن‌های *KPC, IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AmpC, OXA48*:

CarbaNP	سطح معنی داری	کارباپنماز
	۰/۰۰۱	IMP
	۰/۰۰۱	VIM
	۰/۰۰۳	SIM
	۰/۰۰۰	SPM
	۰/۰۰۰	GIM
	۰/۰۰۰	AMPC
	۰/۰۰۰	OXA-48
	۰/۰۰۱	KPC

بحث

در مطالعه حاضر تمام سویه‌های تولیدکننده کارباپنماز CarbaNP Test مثبت داشته به جز یک سویه که دارای آنزیم oxa48 بود اما تست CarbaNP آن منفی شد، این تست در تمام سویه‌هایی که توانایی تولید کارباپنماز را نداشتند، منفی گزارش شد. نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت و اختصاصیت CarbaNP Test در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا جهت شناسایی آنزیم‌های کارباپنماز به ترتیب ۹۸ درصد و ۱۰۰ درصد بود. که نتایج مطالعه حاضر نیز همسو با مطالعات انجام شده، دارای حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی جهت شناسایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مولد آنزیم‌های کارباپنماز بود.

با توجه به مطالعات صورت گرفته می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بیش‌ترین مکانیسم مقاومت مورد انتظار در سودوموناس آئروژینوزا تولید آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد (۱۷). ژن تولیدکننده آنزیم‌های کارباپنماز به‌طور غالب بر روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار دارد و در نتیجه انتقال آن‌ها در میان گونه‌های باکتریایی با سهولت و سرعت انجام و باعث ظهور و پیدایش گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. بدین منظور شناسایی سریع و به‌موقع سویه‌های مولد آنزیم‌های کارباپنماز برای درمان به‌موقع و کنترل چنین سویه‌های مقاومی ضروری می‌باشد. هر چند روش‌های مولکولی به‌عنوان Gold standard در سویه‌های مولد کارباپنماز باقی‌مانده‌اند اما به دلایلی هم چون هزینه بالا و

ناتوانی این روش‌ها در شناسایی ژن‌های کارباپنماز جدید، روش‌های فنوتیپی متفاوت برای شناسایی این ایزوله‌ها گسترش یافته‌اند. روش‌های فنوتیپی از جمله CarbaNP به تازگی توسط CLSI برای شناسایی چنین سویه‌هایی توصیه شده است. این تست دارای حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰ درصد جهت شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز می‌باشد و در مدت ۲ ساعت پس از کشت باکتری نتیجه را نشان می‌دهد. سرعت بالای این تست در مقایسه با سایر تست‌های تشخیصی کارباپنمازها، ۱۰۰ درصد بودن حساسیت و اختصاصیت آن، نیاز نداشتن به تکنسین و کارشناس کارآزموده و ماهر و نیاز نداشتن به دستگاه و وسیله خاص و گران، این تست را به‌عنوان یک گزینه مناسب جهت شناسایی سویه‌های باکتریایی تولیدکننده کارباپنماز در آزمایشگاه‌های بالینی و تحقیقاتی معرفی می‌نماید. در مطالعات مربوط به ارزیابی روش CarbaNP برای شناسایی حضور آنزیم‌های کارباپنماز در خانواده انتروباکتریاسه، اختصاصیت تست CarbaNP، ۱۰۰ درصد گزارش شده است در حالی که حساسیت این تست بین ۸۷-۱۰۰ درصد گزارش شده است. با این حال مطالعاتی وجود دارد که حساسیت کمتر از ۸۰ درصد را گزارش کرده‌اند. نتایج منفی کاذب در مورد شناسایی ژن *OXA48* توسط روش CarbaNP وجود دارد. مطابق با دستورالعمل CLSI روش CarbaNP دارای حساسیت بالای ۹۰ درصد برای شناسایی *KPC, VIM, IMP, SPM, SIM* می‌باشد (۳).

این تست برای اولین بار در سال ۲۰۱۲ در کشور فرانسه توسط پروفیسور Nordmann و همکارانش انجام شد. در مطالعه Nordmann و همکاران حساسیت و اختصاصیت این تست جهت شناسایی انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز ۱۰۰ درصد گزارش شد (۱۸). در مطالعه دیگری که توسط Nordmann و همکاران بر روی سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه‌های تولیدکننده کارباپنماز صورت گرفت مجدداً حساسیت و اختصاصیت Carba NP Test

روش شناسایی سریع می‌تواند انجام شود. در مطالعه دیگری که توسط Shawn Vasoo و همکارانش در آمریکا در سال ۲۰۱۳ از روش CarbaNP و MHT برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده آنزیم کارباپنماز انجام دادند به این نتیجه رسیدند که حساسیت و اختصاصیت روش ۱۰۰ درصد CarbaNP و حساسیت روش MHT، ۹۸ درصد و اختصاصیت این روش، ۸۰ درصد هست (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط Rainer harti و همکارانش در سال ۲۰۱۶ بر روی انتروباکتریاسه و سودوموناس آئروژینوزا به منظور بررسی اثر سیلاستاتین در ترکیب با ایمینم برای انجام CarbaNP تست به منظور شناسایی ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز انجام شد نشان داد که سیلاستاتین اثر مهارتی بر این تست نداشته و کارایی و عملکرد این تست را تغییر نمی‌دهد.

در مطالعه‌ای که توسط Bakour و همکاران در سال ۲۰۱۵ در فرانسه انجام شد، از روش carbaNP تست برای شناسایی سریع باکتری‌های انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا و اسیتتو باکتر بومانی تولیدکننده آنزیم کارباپنماز استفاده کردند (۲۰).

در مطالعه‌ای که توسط Literacka و همکارانش در سال ۲۰۱۷ در لهستان برای شناسایی تولید آنزیم کارباپنماز در باکتری‌های انتروباکتریاسه، سودوموناس آئروژینوزا و اسیتتو باکتر بومانی انجام دادند به این نتیجه رسیدند که حساسیت و اختصاصیت برای انتروباکتریاسه CarbaNP به ترتیب ۹۵/۸ درصد و ۹۳/۳ درصد و برای سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۷/۵ درصد و ۹۹ درصد می‌باشد (۱۸).

در مطالعه‌ای که در ایران توسط عظیمی و همکاران در تبریز انجام شد از روش‌های فنوتیپی CarbaNP، MHT جهت شناسایی ایزوله‌های کلسیلا پنومونیه مولد آنزیم OXA-48 استفاده کردند که اولین گزارش از حضور آنزیم OXA-48 در ایران بود، که این مطالعه تنها مطالعه‌ای بود که در ایران از روش CarbaNP استفاده کرده بود. با توجه به نتایج بالا

جهت شناسایی سویه‌های باکتریایی مولد کارباپنماز ۱۰۰ درصد گزارش شد (۱۸).

در مطالعه دیگری که توسط Michael Hombach و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا برای شناسایی آنزیم‌های کارباپنماز توسط روش CarbaNP انجام شد، میزان حساسیت این تست ۹۰/۲ درصد و اختصاصیت این تست ۱۰۰ درصد بود (۱۸).

در مطالعه‌ای که توسط Banu Bayraktar و همکاران در سال ۲۰۱۸ در ترکیه بر روی خانواده انتروباکتریاسه برای مقایسه روش‌های فنوتیپی مختلف از جمله Carba NP-Direct, Carbapenem Inactivation Tests برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنماز انجام دادند به این نتیجه رسیدند که CarbaNP-direct, CIM, and b-CARBA روش‌های مفیدی برای شناسایی فعالیت تولید کارباپنماز در ایزوله‌های انتروباکتریاسه می‌باشد (۱۸).

در این مطالعه حساسیت و اختصاصیت روش carbaNP به ترتیب ۹۹ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش شد. هم‌چنین گزارش کردند که CarbaNP روش آسان، سریع و کم‌هزینه برای شناسایی این آنزیم‌ها می‌باشد. در مطالعه دیگری که توسط Nathalie Tijeta و همکاران در سال ۲۰۱۳ در کانادا انجام شد و از روش carbaNP برای شناسایی سریع تولید کارباپنماز بر روی سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه استفاده کردند به این نتیجه دست یافتند که این روش‌های فنوتیپی مثل modified Hodge test یا combined disk tests معمولاً نسبت به روش CarbaNP به زمان بیش‌تری نیاز دارند و دقت کم‌تری دارند. هم‌چنین در این مطالعه اختصاصیت این تست را ۱۰۰ درصد و حساسیت آن را ۹۷ درصد گزارش کردند. در مطالعه‌ای که توسط Poirela و همکاران در سوئیس در سال ۲۰۱۵ برای شناسایی سریع سویه‌های تولیدکننده کارباپنماز توسط روش CarbaNP انجام شد نشان دادند که این روش به صورت روتین در آزمایشگاه‌های تشخیصی در سراسر دنیا به عنوان یک

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، به دلیل حساسیت و اختصاصیت بسیار بالای روش CarbaNP و سهولت انجام و سریع بودن این روش می‌توان آن را به‌عنوان روش بسیار مناسبی برای تشخیص ایزوله‌های تولیدکننده آنزیم کارباپنم‌از در کم‌ترین زمان معرفی و در آزمایشگاه‌های بالینی و تشخیص طبی مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1397.273 و شماره طرح ۹۷۰۴۲۶۲۳۹۹ می‌باشد، نویسندگان مراتب تشکر خود را از آن معاونت محترم ابراز می‌دارند.

References

1. Winkler ML, Papp-Wallace KM, Hujer AM, Domitrovic TN, Hujer KM, Hurlless KN, et al. Unexpected challenges in treating multidrug-resistant Gram-negative bacteria: resistance to ceftazidime-avibactam in archived isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(2): 1020-1029.
2. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015; 13(1): 42-51.
3. Bir R, Mohapatra S, Kumar A, Tyagi S, Sood S, Das BK, et al. Comparative evaluation of in ouse Carba NP test with other phenotypic tests for rapid detection of carbapenem resistant Enterobacteriaceae. *J Clin lab Anal* 2018: e22652.
4. Öztürk H, Ozkirimli E, Özgür A. Classification of Beta-lactamases and penicillin binding proteins using ligand-centric network models. *PloS One* 2015; 10(2): e0117874.
5. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SMD, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*. 2015; 22(1): 90-101.
6. Pathak P, Jaishi N, Yadav BK, Shah PK. Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) and Metallo Beta Lactamases (MBL) Mediated Resistance in Gram Negative Bacterial Pathogens. *Microbiologytribhuv* 2017; 4(1): 49.
7. EL-Ganiny AM, EL-Mahdy AM, EL-Latif HKA, Ibrahim RH, Abdelsabour HI. Phenotypic and genotypic detection of lactams resistance in *Klebsiella* species from Egyptian hospitals revealed carbapenem resistance by OXA and NDM genes. *Afr J Microb Res* 2016; 10(10): 339-347.
8. Galvani AA, Tukmechi A. Determination of the prevalence of metallo- β -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* strains

بیش‌ترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوکسیتین و بیش‌ترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک سفتازیدیم بود هم‌چنین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمپنم، مروپنم، دوری پنم به ترتیب ۴۶ (۴۷/۴ درصد)، ۴۰ (۴۱/۲ درصد)، ۴۵ (۴۶/۴ درصد) بود که نشان‌دهنده مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم بود. از مجموع ۹۷ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۴۹ (۵۱/۵۱ درصد) ایزوله مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم و ۴۸ (۴۹/۴۸ درصد) ایزوله حساس به آنتی‌بیوتیک‌های کارباپنم برای ارزیابی تست CarbaNP مورد استفاده قرار گرفتند، که از این تعداد ۴۸ (۹۷/۹۵ درصد) ایزوله نتایج CarbaNP مثبت، و ۴۸ (۱۰۰ درصد) ایزوله نتایج CarbaNP منفی داشتند، که کاهش حساسیت این تست در مورد آنزیم‌های *OXA48* و *AMPC* در یک سویه‌ای که هم‌زمان ژن *OXA48+AMPC* را دارا می‌باشند را نشان می‌دهد.

- from clinical samples by imipenem-EDTA combination disk method in Mottahari and Emam Khomani hospitals of Urmia. *Rep Health Care J* 2015; 1(2): 65-68 (Persian).
9. Walthall K, Anderson K, Reese N, Lonsway D, Kamile Rasheed J, Karlsson M. Evaluation of the RAPIDEC CARBA NP, Conventional CarbaNP, and the Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) Tests for Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms. *Am J Clin Pathol* 2018; 150 (suppl_1): S123-S124.
 10. Gaby WL, Hadley C. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1957; 74(3): 356-358.
 11. Agarwal A, Mohan S, Maheshwari U, Jain S, Akulwar SL. Prevalence of New Delhi metallo- β -lactamase-1 in *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial resistance profile in hospitalized patients in a tertiary care hospital setup. *Int J Health Allied Sci* 2018; 7(4): 250-255.
 12. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4623-4629.
 13. Shinde S, Gupta R, Raut SS, Nataraj G, Mehta PR. Carba NP as a simpler, rapid, cost-effective, and a more sensitive alternative to other phenotypic tests for detection of carbapenem resistance in routine diagnostic laboratories. *J Lab Physicians* 2017; 9(2): 100-103.
 14. Honda K, Muramatsu H, Yano S, Ishizawa F, Iwabuchi Y, Sugano Y. Purification and concentration of DNA using l-fucose-specific lectin. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2017; 6: e177-e179.
 15. Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(3): 490-495.
 16. Wang TH, Leu YS, Wang NY, Liu CP, Yan TR. Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* blood isolates in Taiwan. *Antimicrob Resist Infect Control* 2018; 7(1): 123.
 17. Schill F, Abdulmawjood A, Klein G, Reich F. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *Int J Food Microbiol* 2017; 257: 58-66.
 18. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; 18(9): 1503-1507.
 19. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test with the modified Hodge test for detection of carbapenemase producing gram-negative bacilli. *J Clin Microb* 2013; 51(9): 3097-3101.
 20. Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel J-M, Gharout-Sait A, Touati A, et al. Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect* 2015; 7: 89-93.