

روشن‌های سنجش حساسیت مقاومت آنتی بیوتیکی به کلیستین

دکتر محمد رهبر

بخش میکروب شناسی آزمایشگاه مرجع سلامت

مقاومت به کلیستین

► پیدایش میکروارگانیزم های مقاوم به چند دارو بخصوص کارباپنم ها در باسیل های گرم منفی (انتروباکترال) در تمامی دنیا در حال افزایش می باشد. برای درمان عفونت های ناشی از مقاومت های چند دارویی آنتی بیوتیک های محدودی در دسترس می باشند که یکی از آنها پلی میکسین E یا کلیستین می باشد.

مقاومت به کلیستین

► پیدایش مقاومت در مقابل کلیستین در سال های اخیر یکی از چالش های اساسی در درمان عفونت های مقاوم به چند دارو می باشد و از همه مهمتر آزمایشگاه های میکروب شناسی نیز در تعیین مقاومت به کلیستین با مشکلات عدیده ای روبرو هستند بطوریکه بسیاری از آزمایشگاه ها قادر به راه اندازی یک روش استاندارد در این زمینه نمی باشند.

مقاومت به کلیستین

بطور کلی از لحاظ ژنتیکی مقاومت در مقابل کلیستین شامل دو مکانیسم اساسی می باشد. 1- مقاومت کروموزومی که توسط ژن های متعددی کد میشود که اصلی ترین آنها **mgrb** می باشد 2- مقاومت نوع دوم مقاومت پلاسمیدی می باشد که توسط ژن های تحت عنوان mcr کد میگردند. این ژن ها توسط پلاسمید کد می شوند و براحتی قابل انتقال می باشند. mcr1 برای اولین بار در نوامبر سال 2015 شناسائی گردید و امروزه حداقل 10 نوع ژن (mcr1-mcr10) شناسائی شده اند.

مقاومت به کلیستین

▶ متاسفانه مقاومت در مقابل کلیستین و همراه بودن آن با مقاومت به کاربا پنم ها منجر به پیدایش سویه‌های PDR گردیده است که در بسیاری از موارد درمان اینگونه عفونت ها را عملاً غیر ممکن ساخته است

مقاومت به کلیستین

▶ تشخیص آزمایشگاهی سویه های مقاوم به کلیستین در آزمایشگاه از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد و در حقیقت راه اندازه يك روش ساده با حساسیت و ویژگی بالا از چالش های مهم در آزمایشگاههای تشخیص طبی می باشد

▶ تا چند سال اخیر برای تعیین مقاومت در مقابل کلیستین آزمایشگاهها از روش دیسک دیفیوژن استفاده می کردند ولی امروزه استفاده از این روش توصیه نمی شود.

مقاومت به کلیستین

▶ امروزه روش استاندارد برای آنتی بیوگرام در مقابل کلیستین تعیین MIC به روش میکرودايلوشن می باشد که هم توسط CLSI و هم EUCAST در سال 2016 توصیه گردیده است. استفاده از روش MIC E-test نیز مورد قبول نمی باشد. اگرچه روش های مولکولی جهت تعیین ژن های مقاومت روش پلائی می باشد ولی این روشها بدلیل هزینه های زیاد قابل دسترس نمی باشند

مقاومت به کلیستین

▶ بدلیل مشکلات یاد شده و عدم دسترسی به روشهای مولکولی و تعیین MIC اخیراً یک روش ساده و کم هزینه بنام **Colistin Broth Disk Elution** توسط CLSI ارائه شده است این روش علاوه بر ساده بودن امکانات آن در تمامی آزمایشگاهی موجود می باشد و از حساسیت و ویژگی بالایی نیز برخوردار می باشد در ادامه نحوه انجام این روش شرح داده می شود.

Colistin Broth Disk Elution

▶ محیط کشت مولر هینتون برای آن که مقدار کاتیون های آن کنترل شده است طبق دستورالعمل شرکت سازنده در لوله های در پیچ دار با حجم 10 میلی لیتر تهیه کرده و در یخچال نگهداری کنید.

▶ قبل از آزمایش لوله های حاوی مولر هینتون برای و دیسک های کلیستین 10 میکروگرمی را از یخچال بیرون آورده تا دمای آنها به دمای اتاق برسد.

Celestin Broth Disk Elution

▶ برای هر باکتری مورد آزمایش چهار لوله انتخاب کرده و آنها به ترتیب با شماره های $1\mu\text{g/l}$ و $2\mu\text{g/l}$ و $4\mu\text{g/l}$ و و کنترل C شماره گذاری کنید. (یا خیلی ساده 1 و 2 و 4 و C)

▶ به روش اسپتیک وبا یک پنس استریل به لوله شماره 1 یک عدد دیسک کلیستین به لوله شماره 2 دو عدد دیسک کلیستین و به لوله شماره 4 تعداد چهار دیسک کلیستین بیندازید. در لوله کنترل دیسک کلیستین نیندازید.

Celestin Broth Disk Elution

▶ به آرامي لوله هاي حاوي ديسك كليستين را
ورتكس کرده و حد اقل سي دقيقه صبر كنيد تا
كليستين از ديسك ها در محيط مولر هينتون
براث آزاد شود. در هر حال اين مدت زمان
نبايد بيش از 60 دقيقه باشد.

Colistin Broth Disk Elution

- ▶ از سويه مورد آزمایش يك سوسپانسیون استاندارد معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه فرمایید.
- ▶ 50 لاندا (50 میکرولیتر) از سوسپانسیون سويه مورد آزمایش را به لوله حاوي دیسک هاي کلیستین و همچنین لوله کنترل اضافه کنید.

Colistin Broth Disk Elution

- ▶ درب لوله را بسته و آنها را با ورتکس مخلوط کنید
- ▶ درب لوله ها را کمی شل کنید
- ▶ لوله های در دمای 35 درجه سانتیگراد بمدت 20-16 ساعت گرما گذاری کنید. و سپس نتایج را قرائت کنید.

Colistin Broth Disk Elution

► بررسی نتایج

► یقین داشته باشید که باکتری مورد آزمایش خالص باشد

► - در لوله کنترل باید رشد واضح مشاهده گردد. توجه داشته باشید که بعضی از سویه های سودوموناس آئروژینوزا در سطح لوله آزمایش رشد می کند

► 3- حداقل رشد را در هر کدام از لوله که مانع از رشد باکتری شده است را قرائت کنید

► برای انتروباکترال و سودوموناس آئروژینوزا

► بعنوان مثال اگر کمتر از $2\mu\text{g}/\text{l}$ باشد بینابینی و اگر $4\mu\text{g}/\text{l}$ باشد آنرا مقاوم در نظر بگیرید

Colistin Broth Disk Elution

- ▶ سایر موارد و گزارش آنها
- ▶ در صورتیکه نتایج مبهم و غیر قابل مقایسه مشاهده شد. بعنوان مثال **در لوله شماره 2 رشدی مشاهده نشد** در حالیکه لوله شماره 1 و 4 واجد رشد باشد علت آن ممکن است موارد زیر باشد
- ▶ -آلودگی در غلظت های بالا
- ▶ -مقاومت نا همگون
- ▶ -غلظت های نامناسب از آنتی یوتیک در لوله ها
- ▶ -اشتباه موقع تلقیح لوله ها

تفسير نتائج

A.



GC 1 µg/ml 2 µg/ml 4 µg/ml

B.



GC 1 µg/ml 2 µg/ml 4 µg/ml

(A) Tubes for a non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate with a colistin MIC of ≤ 1 µg/ml.

(B) Tubes for an *mcr-1*-producing *Escherichia coli* isolate (CDC AR Bank accession number 493) with a colistin MIC of 4 µg/ml.

کنترل کیفی

- ▶ Three quality control strains are included : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (colistin MIC: 0.25–2 µg/mL), *Escherichia coli* NCTC 13846 (colistin MIC: 4 µg/mL, positive for *mcr-1* gene by PCR) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (colistin MIC: 0.5–4 µg/mL).

References :

- ▶ CLSI M100 S31 2021
- ▶ [file:///C:/Users/Moahammad%20Rahbar/Downloads/6.interpretations of colistin susceptibility testing journal ar as of 20-05-2019 \(1\).pdf](file:///C:/Users/Moahammad%20Rahbar/Downloads/6.interpretations%20of%20colistin%20susceptibility%20testing%20journal%20ar%20as%20of%2020-05-2019%20(1).pdf)
- ▶ WHO. GLSS The detection and reporting of colistin resistance second edition
- ▶ Romney M. Humphries , Daniel A. Green , Audrey N. Schuetz , Yehudit Bergman^f, Shawna. et al. Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. J Clin Microbiol 57:e01269-19.