دستورالعمل و راهنمای انجام تست حساسیت آنتی بیوتیک کلیستین به روش CBDE

Instructions and guidelines for carrying out the antibiotic sensitivity test of colistin by the CBDE method

نویسنده:

دکتر فرهاد نیکخواهی

هیئت علمی و رئیس مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

مقدمه

یکی از مشکلات جدی در حوزه بهداشت عمومی انسان و حیوانات، بحث مقاومت آنتی بیوتیکی، خصوصا در پاتوژن های گرم منفی، می باشد که به یک بحران جهانی تبدیل شده است(1). به دلیل ظهور و گسترش جهانی سویه های مقاوم به چند دارو (MDR[1])، به شدت مقاوم به دارو (XDR[2]) و مقاوم به دارو (PDR[3]) گونه‌های *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Acinetobacter baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa* باعث شده است تا درمان عفونت های ناشی از این سویه ها برای پزشکان به یک چالش جدی تبدیل شود(2,3). از آنجایی که آنتی بیوتیک های حیاتی موجود و موثر، از جمله؛ پنی سیلین های وسیع الطیف، فلوروکینولون ها، آمینوگلیکوزیدها و بتالاکتام ها مانند کارباپنم ها، مونوباکتام و سفالوسپورین ها؛ اغلب برای مبارزه با پاتوژن های گرم منفی MDR شکست می خورند و همچنین عدم وجود آنتی بیوتیک های جدید که بتواند این "ابر میکروب ها[4]" را شکست دهد، همه اینها باعث شده است که استفاده از داروهای قدیمی مانند پلی میکسین ها که به عنوان آخرین راه حل برای درمان عفونت های باکتریایی گرم منفی مقاوم به چند دارو (MDR) از جمله عفونت های ناشی از انتروباکتریاسه مقاوم به کارباپنم (CRE[5]) استفاده می شوند، مجددا مورد توجه قرار گیرند. تنها دو پلی میکسین، پلی میکسین E (کولیستین) و پلی میکسین B، در حال حاضر به صورت تجاری در دسترس هستند(4).

کولیستین (پلی میکسین E) یک آنتی بیوتیک پلی میکسین است که از یک پپتید پلی کاتیونی بزرگ تشکیل شده است که به دیواره سلولی با بار منفی باکتری های گرم منفی متصل می شود و باعث اختلال در غشای خارجی می شود و در نهایت منجر به مرگ سلولی می شود(5).

یکی از چالش های استفاده از کولیستین در حوزه بالین مربوط به تست حساسیت ضد میکروبی (AST[6]) دارو بوده است. مسائل مربوط به تست حساسیت آنتی بیوتیکی شامل ۲ مورد است:

۱. فقدان نقاط شکست بالینی برای انتروباکتریاسه
۲. خواص فیزیکوشیمیایی دارو

که این مسائل سبب شده است تا انجام AST در شرایط آزمایشگاهی چالش برانگیز شود. از آنجایی که کولیستین دارای ساختار مولکولی بزرگ می باشد، در محیط‌های مبتنی بر آگار ضعیف منتشر می‌شود،به همین دلیل روش‌های انتشار دیسک و گرادیان توسط موسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI[7])یا کمیته اروپایی تست حساسیت ضد میکروبی (EUCAST[8]) برای آزمایش کولیستین به دلیل نرخ خطای غیرقابل قبولی توصیه نمی‌شوند(4,6) و

---

[1] Multidrug-resistant
[2] Extensively drug-resistant
[3] Pan-drug-resistant
[4] Superbugs
[5] Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*
[6] Antimicrobial susceptibility testing
[7] Clinical & Laboratory Standards Institute
[8] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

به این دلیل که کولیستین یک ماکرومولکول با بار مثبت است به پلاستیک‌های دارای بار منفی مانند نوک پیپت‌ها و لوله‌ها و صفحات پلی استایرن جذب می‌شود. با توجه به CLSI و EUCAST، تنها روش آزمایش معتبر و استاندارد طلایی برای پلی‌میکسین‌ها، میکرورقیق‌سازی براث مرجع (rBMD[9]) است(7,8) که زمان‌بر است و تنها در چند آزمایشگاه بالینی انجام می‌شود. این محدودیت ها، آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی را بدون روش عملی برای شناسایی حساسیت به کولیستین باقی می‌گذارد.

CLSI دو روش جایگزین مبتنی بر MIC را برای آزمایش کولیستین، یعنی انتشار براث دیسک کولیستین (CBDE[10]) و آزمایش کولیستین آگار (CAT[11]) مورد بررسی قرار دادند. مزیت انجام این روش ها این است که به اندازه rBMD دقیق هستند، اما برای استفاده معمول آزمایشگاهی بالینی مناسب‌تر می باشند، به طوریکه با استفاده از مواد معمول در دسترس قابل انجام است و روش انجام آن نیز آسان می باشد. CBDE از دیسک‌های کولیستین در دسترس تجاری استفاده می‌کند، که برای دستیابی به غلظت کولیستین از پیش تعیین‌شده، به براث مولر–هینتون تنظیم‌شده با کاتیون (CA-MHB[12]) عرضه می‌شود(9).

[9] Reference broth microdilution
[10] Colistin broth disk elution
[11] Colistin agar test
[12] Cation-adjusted Mueller-Hinton broth

مواد و روش ها

۱) ابتدا چهار لوله درپیچ دار حاوی ۱۰ میلی لیتر مولر هینتون براث تنظیم شده با کاتیون* به ترتیب به عنوان ۱، ۲، ۴ میکروگرم در میلی لیتر، و شاهد برای این آزمایش برچسب گذاری می شوند. دیسک کولیستین سولفات ($10\mu g$) که به دمای اتاق رسیده است، با استفاده از روش آسپتیک به سه لوله اول اضافه می شود تا غلظت نهایی ۱ میکروگرم در میلی لیتر (یک دیسک در ۱۰ میلی لیتر)، ۲ میکروگرم در میلی لیتر (دو دیسک در ۱۰ میلی لیتر) و چهار میکروگرم بر میلی لیتر (چهار دیسک در ۱۰ میلی لیتر)، به ترتیب به دست آید. هیچ دیسکی به لوله کنترل اضافه نمی شود (۰ میکروگرم بر میلی لیتر؛ ۰ دیسک در ۱۰ میلی لیتر).

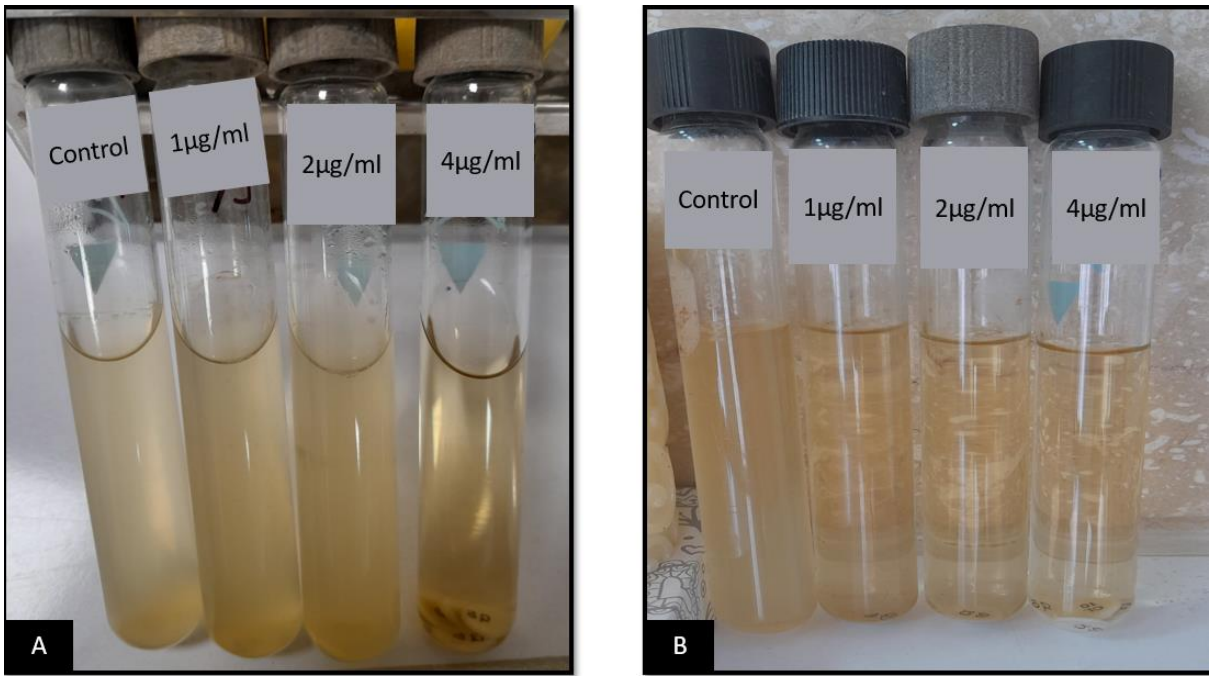
۲) لوله های حاوی دیسک ها به آرامی ورتکس می شوند سپس به مدت ۳۰ دقیقه به منظور انتشار کولیستین از دیسک در دمای اتاق نگهداری می شوند**.

۳) سه تا پنج کلنی از کشت تازه باکتری بر روی محیط کشت غیر انتخابی برداشته می شود و به درون ۵ سی سی سرم فیزیولوژی تلقیح می شود تا کدورتی معادل نیم مک فارلند ایجاد شود.

۴) محلول نیم مک فارلند آماده شده با استفاده از مولر هینتون براث یا سرم فیزیولوژی استریل به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق می شود.

۵) از محلول تهیه شده بالا به اندازه ۵۰ میکرولیتر به لوله های مولر هینتون براث اضافه می شود تا غلظت تلقیح نهایی تقریبا 7.5×10^5 CFU/ml در هر لوله به دست آید***.

۶) لوله ها ورتکس شده و سپس به مدت ۱۸ الی ۲۰ ساعت در شرایط هوازی در دمای ۲±۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه می شود.



* محیط کشت مولر هینتون براث را به لحاظ معیار های کنترل کیفی ارزیابی کنید. محیط کشت کنترل کیفی نشده می تواند بر روی نتیجه ی آزمایش تاثیر بگذارد.

** بیش از ۳۰ دقیقه دیسک را داخل براث نگهداری نکنید، زیرا باعث انتشار بیش از حد آنتی بیوتیک از دیسک ها شده و بر نتیجه آزمایش و تفسیر اشتباه تاثیر می گذارد.

*** در تهیه غلظت نهایی از باکتری دقت نمایید. غلظت کم و یا زیاد باعث به دست آوردن نتیجه ی کاذب از آزمایش می شود.

تفسیر نتایج:

لوله شاهد که هیچ دیسک آنتی بیوتیکی در آن نمی باشد باید بعد از گذشت ۱۸ الی ۲۰ ساعت رشد باکتری در آن قابل مشاهده باشد که به صورت کدورت خود را نشان میدهد. لوله های بعدی به لحاظ رشد باکتری و ایجاد کدورت مورد بررسی قرار می گیرد. غلظت اولین لوله ایی که بعد از آن کدورتی مشاهده نمی شود برابر با MIC آنتی بیوتیک کولیستین برای باکتری آزمایش شده می باشد.

نتیجه گیری:

با توجه به ظهور مقاومت های آنتی بیوتیکی به ویژه در پاتوژن هایی که باعث عفونت های بیمارستانی می شوند و همچنین راکد بودن کشف آنتی بیوتیک های جدید، باعث شده است داروهای قدیمی مانند پلی میکسین ها که برای استفاده بالینی بیش از حد سمی به حساب می آمدند ، مجددا مورد توجه قرار گیرند(10). استاندارد طلایی برای تعیین حساسیت پلی میکسین ها روش rBMD می باشد که علاوه بر زمان بر بودن این روش، در همه ی آزمایشگاه های بالینی امکان انجام آن وجود ندارد. به همین دلیل بر اساس آخرین روش توصیه شده توسط CLSI می توان برای بررسی حساسیت به کولیستین از روش CBDE استفاده کرد. مزیت انجام این روش استفاده از مواد معمول در دسترس در آزمایشگاه می باشد. مزیت بعدی این روش این است که به اندازه rBMD دقیق می باشد. اما معایب این روش این است که CBDE را نمی توان برای آزمایش پلی میکسین B استفاده کرد. با این حال، CLSI اخیراً تأیید کرده است که نتایج کولیستین را می توان برای پیش بینی نتایج پلی میکسین B استفاده کرد. نکته قابل توجه این است که روش CBDE به کیفیت دیسک های کولیستین و براث مولر هینتون تنظیم شده کاتیونی بستگی دارد، بنابراین نتایج تست حساسیت آزمایش CBDE ممکن است زمانی که دیسک های کولیستین و مولر هینتون براث از مارک های مختلف استفاده می شود، متفاوت باشد.

منابع:

1. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):868–85.

2. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. Int J Antimicrob Agents. 2017 May;49(5):526–35.

3. Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. Curr Infect Dis Rep. 2017 Sep 11;19(11):38.

4. Singh A, Bhatia M, Rekha S, Rani D, Kamboj P, Chakraborty D, et al. Comparative Evaluation of Colistin Broth Disk Elution Method With Two Commercially Available Systems for Colistin Susceptibility Testing Against Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: A Single-Center Exploratory Study. Cureus [Internet]. [cited 2024 Jan 25];14(5):e25549. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9246699/

5. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014;5:643.

6. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2013 Jun;51(6):1678–84.

7. Patel JB. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement [Internet]. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015 [cited 2024 Jan 26]. Available from: http://125.212.201.8:6008/handle/DHKTYTHD_123/12009

8. v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf [Internet]. [cited 2024 Jan 26]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf

9. Humphries RM, Green DA, Schuetz AN, Bergman Y, Lewis S, Yee R, 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 [Internet]. 2019 Oct 23 [cited 2024 Jan 25];57(11):e01269-19. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6813006/

10. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG, et al. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2006 Mar 1;42(5):657–68.