**4. انتروباکترال و سودوموناس آئروجینوزا**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **اسم آزمایشگاه:** | {{LabName}} | |
| **اسم سند:** | **دستورالعمل انجام و گزارش مقاومت های آنتی بیوتیکی در انتروباکترال ها و سودوموناس آئروجینوزا** | |
| **کد سند:** | D-007-0027 | |
| **دسته بندی سند:** | دستورالعمل و کنترل کیفی آنتی بیوگرام | |
| **شماره ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ ویرایش:** | {{EditeNumber}} | |
| **تاریخ بازنگری سند:** | {{ReviewDate}} | |
| **تهیه کننده:** | **تایید کننده:** | **تصدیق و امضاء :** |
| شرکت دارا ویرا آزما  دکتر داریوش شکری | {{ConfirmerOneName}} | {{ConfirmerTwoName}} |

مکانیسم مقاومت در انترباکترال‌ها که قابل گزارش هستند شامل 3 مورد زیر هستند:

1. بتالاکتاماز‌های با طیف گستردهیا ESBLs β-Lactamases: Extended-Spectrum
2. مقاومت به کارباپنم‌ها
3. مقاومت به پلی‌میکسین ها

**1) مقاومت بتالاکتاماز‌های با طیف گسترده (ESBLs)**

* مکانیسم اصلی مقاومت به عوامل بتالاکتام در باسیل‌های گرم منفی، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. انواع مختلفی از این آنزیمها گزارش شده‌اند که می‌توان آنها را در کلاس‌های مولکولی C ،B ،A و D طبق دسته‌بندی آمبلر تقسیم‌بندی کرد (جدول 4).
* اغلب بتالاکتاماز‌های وسیع‌الطیف به نام ESBLs در دسته A قرار می‌گیرند و شامل آنزیم‌هایی هستند که می‌توانند موجب مقاومت انتروباکترالها (و برخی دیگر از باسیل‌‌های گرم منفی) در مقابل پنی‌سیلین‌ها، بسیاری از سفالوسپورین‌ها و آزترئونام شوند.
* بررسی مقاومت ESBLs یکی از آزمایش‌های قابل انجام و گزارش در تست آنتی‌بیوگرام برای برخی از اعضای انتروباکتریال می‌باشد و هرچند تست اجباری نیست ولی برای مدیریت درمانی یا برای اهداف اپیدمیولوژیک یا پیشگیری از عفونت می‌تواند به انجام برسد.
* هر چند در بقیه گونه‌های انتروباکترال این آنزیمها یافت شده‌اند اما تست ESBL فقط باید برای باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسی توکا، اشریشیاکلی و پروتئوس میرابیلیس انجام و گزارش شود.
* داروهایی که در بسیاری از کشورها به صورت محدود در دسترس هستند (مثلاً موکسالاکتام، سفونیسید، سفاماندول و سفوپرازون) برای تست ESBL ارزیابی نشده‌اند. در صورت در نظر گرفتن استفاده از این داروها برای چهار باکتری فوق، باید آزمایش ESBL انجام شود. اگر ESBL ایزوله‌ها مثبت باشد، نتایج مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های فوق باید به عنوان مقاوم گزارش شود.

جدول 4. دسته‌بندی بتالاکتامازها.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **کلاس آمبلر** | **سایت فعال** | **مثالها** |
| دسته A | سرین | TEM، SHV، اغلب ژن‌های ESBL شامل CTX-M-1 |
| دسته B | زینک | متالوبتالاکتامازها، SPM، IMP ،VIM |
| دسته C | سرین | AmpC |
| دسته D | سرین | OXA |

**تست اولیه شناسایی ESBLs**

* شناسایی اولیه این آنزیم‌ها با دو روش انتشار از دیسک و روش رقیق‌سازی میکرودایلوشن در محیط آبگوشت قابل انجام است.
* در آزمایشگاه روش انتشار از دیسک به راحتی قابل انجام است و بنابراین اینجا توضیح داده می‌شود.
* در سه باکتری اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا از دیسک های سفالوسپورین نسل سوم سفپودوکسیم 10 میکروگرمی، سفتازیدیم 30 میکروگرمی، آزترئونام 30 میکروگرمی، سفوتاکسیم 30 میکروگرمی یا سفتریاکسون 30 میکروگرمی می‌توان استفاده کرد.
* برای باکتری پروتئوس میرابیلیس از سه دیسک سفپودوکسیم، سفتازیدیم یا سفتریاکسون می‌توان استفاده کرد.
* استفاده از یک دیسک کافی است اما استفاده از دو دیسک همزمان توانایی شناسایی آنزیم‌های ESBL را افزایش می‌دهد چون ممکن است برخی از باکتری‌های دارای این آنزیمها، به برخی از این آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت داشته باشند و مقاومت فقط به یکی از این عوامل نشان‌دهنده احتمال حضور این آنزیم‌ها می‌باشد.
* به طور خلاصه هنگام انجام آنتی‌بیوگرام برای انتروباکترال‌ها، بر روی محیط مولر هینتون آگار دیسک سفوتاکسیم یا سفتازیدیم (یا بهتر است هر دو به طور همزمان) برای شناسایی اولیه آنزیم‌های ESBL گذاشته می‌شوند و در روز بعد نتیجه هاله عدم رشد آنها تفسیر می‌شود.
* دقت شود معیار شناسایی باکتری به عنوان ESBL مقاوم بودن باکتری به دیسک های مورد استفاده طبق قطر هاله عدم رشد که در جدول استاندارد انتروباکترالها گفته شد نیست بلکه از معیار‌های مختص خود طبق جدول 5 استفاده می‌شود.
* تعیین این ملاک سختگیرانه باعث می‌شود سویه‌های احتمالی دارای این آنزیم‌ها شناسایی اولیه شوند.
* دقت شود با مثبت بودن تست ESBL با این روش اولیه یا روش تأییدی که جلوتر گفته شده است نباید تفسیر قطر هاله‌های عدم رشد به دست آمده برای این دیسک ها را تغییر داد و اگر باکتری حساس است همان نتیجه حساس باید گزارش شود هرچند در جواب بیمار، وجود آنزیم ESBL گزارش خواهد شد و باید به پزشک توصیه شود به علت حضور احتمالی آنزیم‌های ESBL استفاده از سفالوسپورین‌های نسل سوم به پایین توصیه نمی‌شود که نحوه گزارش در پایان این مبحث آمده است.

**تست فنوتیپی تأییدی ESBLs:**

* در باکتری‌‌هایی که با کمک دیسک های گفته شده تست اولیه ESBL مثبت است، آزمایش تأییدی به کمک آزمایش دیسک ترکیبی می‌تواند به انجام برسد. به این ترتیب که از دیسک سفتازیدیم (یا سفوتاکسیم) تنها و دیسک ترکیبی آنها با کلاولانیک اسید (به عنوان مهارکننده آنزیم‌‌های ESBLs) استفاده می‌شود.
* با روش استاندارد گفته شده برای آنتی‌بیوگرام، دو دیسک (سفتازیدیم و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید یا سفوتاکسیم و سفوتاکسیم-کلاولانیک) روی محیط مولر هینتون آگار قرار گرفته و بعد از یک شبانه روز انکوباسیون خوانش می‌شوند.
* **تفسیر تست:** اگر معیار اولیه ESBL با سفتازیدیم (یا سفوتاکسیم) که در بالا گفته شد مثبت باشد و در دیسک ترکیبی آنها با کلاولانیک، افزایش 5 یا بیشتر از 5 میلی‌متری قطر هاله عدم رشد نسبت به دیسک تنهای آنها دیده شود تأییدکننده حضور آنزیم‌‌های ESBLs می‌باشد.

جدول 5. معیار گزارش باکتری به عنوان ESBL برای هر دیسک.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا** | | **پروتئوس میرابیلیس** | | **قطر هاله مقاومت در حالت استاندارد** |
| **آنتی‌بیوتیک** | **قطر هاله معیار ESBL** | **آنتی‌بیوتیک** | **قطر هاله معیار ESBL** |
| **سفپودوکسیم** | ≤ 17 (mm) | **سفپودوکسیم** | ≤ 22 (mm) | ≤ 17 (mm) |
| **سفتازیدیم** | ≤ 22 (mm) | **سفتازیدیم** | ≤ 22 (mm) | ≤ 17 (mm) |
| **سفوتاکسیم** | ≤ 27 (mm) | **سفوتاکسیم** | ≤ 27 (mm) | ≤ 22 (mm) |
| **آزترئونام** | ≤ 27 (mm) | **-** | - | ≤ 17 (mm) |
| **سفتریاکسون** | ≤ 25 (mm) | **-** | - | ≤ 19 (mm) |

**گزارش مکانیسم مقاومتESBL :**

* اگر فقط تست اولیه با دیسک انجام شده است (تست تأییدی انجام نشده است):

**Resis‌tant Mechanism:** Potential Extended-spectrum β-lactamases (ESBL)-producing s‌train.

* اگر تست تأییدی انجام شده است:

**Resis‌tant Mechanism:** Confirmed Extended-spectrum β-lactamases (ESBL)-producing s‌train.

* در هر دو حالت فوق در جواب نهایی می‌توان توصیه زیر را اضافه نمود که به پزشک مقاومت این سویه به داروهایی مختلف به علت وجود آنزیم‌های ESBL گزارش شده است:

**Comment:** All ESBL-producing s‌trains may be resis‌tant to mos‌t penicillins, cephalosporins, and aztreonam.

**2) مقاومت به کارباپنم‌ها**

**تست شناسایی کارباپنمازها در انتروباکترال‌ها و سودوموناس آئروجینوزا**

* یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت به کارباپنم‌ها در باسیل‌های گرم منفی تولید آنزیم‌های کارباپنماز می‌باشد.
* کارباپنمازها بتالاکتامازهایی با ظرفیت هیدرولیتیک همه کاره هستند که توانایی هیدرولیز پنی‌سیلین‌ها، سفالوسپورین‌ها، مونوباکتام‌ها و کارباپنم‌ها را دارند.
* کارباپنمازها در دسته‌بندی آمبلر در کلاس‌های مولکولی A، B و D بتالاکتامازها قرار می‌گیرند. آنزیم‌های کلاس A و D دارای مکانیسم هیدرولیتیک مبتنی بر جایگاه فعال سرین هستند، در حالی که آنزیم‌های کلاس B دارای فلز روی (زینک) در محل فعال خود هستند و به همین دلیل به آنها متالوبتالاکتاماز گفته می‌شود (متالو یعنی فلز). به این دلیل این آنزیم‌ها برای فعالیت نیاز به فلز روی دارند و توسط موادی نظیر اتیلن دیامین تترا استیک اسید (EDTA) که به روی وصل می‌شود، مهار می‌گردند.
* گروه کارباپنماز کلاس A شامل اعضای خانواده**‌**های SME ،IMI ،NMC ،GES و KPC است که از این میان، کارباپنماز‌های KPC در آمریکا شایع‌ترین هستند و بیشتر روی پلاسمید‌های کلبسیلا پنومونیه یافت می‌شوند.
* کارباپنماز‌های کلاس D شامل بتاکتاماز‌های نوع OXA هستند که اغلب در آسینتوباکتر بومانی شناسایی شده‌اند. متالوبتالاکتامازها به خانواده هایIMP ،VIM ،SPM ،GIM و SIM تعلق دارند و عمدتاً در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده‌اند، با این حال، تعداد فزاینده‌ای از گزارش‌ها در سراسر جهان از حضور این گروه در انتروباکتریاسه وجود دارد.
* در دستورالعمل CLSI نحوه انجام و گزارش تست شناسایی کارباپنمازها در انتروباکترال‌ها و سودوموناس آئروجینوزا آمده است اما انجام آن اجباری نبوده و طبق دستورالعمل‌‌های داخل سازمانی بر اساس سیاست هر مرکز، با صلاحدید مرکز کنترل عفونت یا به منظور بررسی‌‌های اپیدمیولوژیک ممکن است نیاز به انجام داشته باشد.
* ایزوله‌‌های تولیدکننده کارباپنماز در انتروباکترال‌ها معمولاً سطح نیمه حساس یا مقاوم به یک یا چند کارباپنم را با استفاده جدول تفسیری انتروباکترال‌ها دارند (**توجه:** حساس‌ترین شاخص تولید کارباپنماز دیسک ارتاپنم است) و معمولاً به یک یا چند عامل سفالوسپورین‌های نسل سه به عنوان مثال، سفوپرازون، سفوتاکسیم، سفتازیدیم، سفتیزوکسیم، و سفتریاکسون مقاوم هستند. با این حال، برخی از جدایه‌هایی که کارباپنماز تولید می‌کنند (مانند کارباپنماز‌های SME یاIMI) اغلب نسبت به این سفالوسپورین‌ها حساس هستند.
* به طور کلی اگر باکتری‌های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، کلبسیلا اکسی توکا، پروتئوس میرابیلیس و بقیه باکتری‌های این گروه به یکی از آنتی‌بیوتیک‌‌های دوریپنم، ارتاپنم، ایمیپنم و مروپنم مقاوم باشند، مکانیسم مقاومت ممکن است در اثر تولید کارباپنماز باشد.
* تست شناسایی کارباپنمازها با سه روش تست Carba NP، روش های ملکولی و روش mCIM (یا روش تغییر یافته غیرفعالسازی کارباپنم) قابل انجام است که دو روش اول نیاز به مواد اختصاصی دارد و در آزمایشگاه به راحتی قابل انجام نیستند (دستورالعمل آنها در CLSI آمده است) و به همین دلیل روش mCIM که به راحتی قابل انجام است توضیح داده می‌شود.

**روش mCIM و روش تکمیلی eCIM**

* تست mCIMبرای تشخیص کلی کارباپنمازها در انتروباکترال‌ها و سودوموناس آئروجینوزا استفاده می‌شود. تست تکمیلی eCIM یا "روش تغییریافته-EDTA برای غیرفعالسازی کارباپنم" همراه با mCIM برای افتراق کارباپنماز‌های نوع متالوبتالاکتاماز از کارباپنماز‌های نوع سرین در انتروباکترال‌ها استفاده می‌شود.
* mCIM را می‌توان به تنهایی انجام داد اما eCIM باید همراه با mCIM انجام شود و وقتی نتیجه آن صحیح است که تست mCIM مثبت باشد.
* **توجه:** هیچ تغییری در تفسیر نتایج به دست آمده برای تست حساسیت کارباپنم‌ها برای نتایج mCIM و eCIM مثبت ضروری نیست.

**روش انجام تست mCIM:**

1. برای هر ایزوله که باید آزمایش شود، یک لوپ پر 1 میکرولیتری برای انتروباکترال‌ها یا لوپ پر 10 میکرولیتری برای سودوموناس آئروجینوزا از یک پلیت بلاد آگار تازه یک شبه را در 2 میلی‌لیتر TSB حل و به مدت 10 تا 15 ثانیه ورتکس کنید (تنها تفاوت انجام تست در انتروباکترال‌ها و سودوموناس آئروجینوزا همین میزان تلقیح اولیه می‌باشد).
2. یک دیسک مروپنم 10 میکروگرمی را با استفاده از پنس استریل به لوله فوق اضافه کنید و اطمینان حاصل کنید که کل دیسک در لوله غوطه ور شده است.
3. لوله حاوی دیسک را در دمای 2±35 درجه سانتی‌گراد در هوای محیط به مدت 4 ساعت (± 15دقیقه) انکوبه کنید.
4. کمی قبل یا بلافاصله پس از اتمام انکوباسیون 4 ساعته فوق، یک سوسپانسیون نیم مک فارلند (با استفاده از روش تعلیق کلنی) از باکتری استاندارد E. coli ATCC 25922 که حساس به مروپنم است را در نرمال سالین یا محیط آبگوشت مغذی (TSB) تهیه کنید.
5. استاندارد تهیه شده از باکتری اشریشیاکلی فوق را روی یک پلیت مولر هینتون آگار به روش چمنی مانند روش معمول انتشار دیسک تلقیح کنید. مطمئن شوید که مراحل آماده‌سازی سوسپانسیون تلقیح و مراحل تلقیح پلیت مولر هر کدام در عرض 15 دقیقه تکمیل شود. اجازه دهید پلیت به مدت 3 تا 10 دقیقه بماند تا باکتری جذب شود.
6. دیسک مروپنم را از مایع سوسپانسیون TSB با استفاده از یک لوپ 10 میکرولیتری خارج کنید و دیسک را به کمک لوپ در امتداد لبه داخلی لوله فشار دهید تا مایع اضافی از دیسک خارج شود و سپس این دیسک را روی پلیت مولر هینتون تلقیح شده با باکتری استاندارد اشریشیاکلی قرار دهید. بر روی یک پلیت 10 سانتی متری می‌توان 4 دیسک (یعنی 4 باکتری مختلف) و روی پلیت 15 سانتی**‌**متری می‌توان 8 دیسک مختلف (یعنی 8 باکتری مختلف) را آزمایش نمود.
7. بعد از دیسک**‌**گذاری، پلیت مولر را به صورت معکوس در انکوباتور یا دمای 2±35 درجه سانتی‌گراد در هوای محیط به مدت 18 تا 24 ساعت انکوبه کنید.
8. پس از انکوباسیون، قطر مناطق مهار را مانند روش معمول انتشار دیسک اندازه‌گیری کنید.

**روش انجام تست eCIM:**

1. برای هر ایزوله، یک لوله TSB 2 میلی‌لیتری را برای آزمایش eCIM برچسب بزنید.
2. مقدار 20 میکرولیتر از 5/0 EDTA مولار را به لوله 2 میلی‌لیتری TSB فوق اضافه کنید تا غلظت نهایی 5 میلی مولار EDTA به دست آید.
3. مراحل 1 تا 8 گفته شده در روش mCIM را انجام دهید. لوله‌های mCIM و eCIM را به صورت موازی انجام و پردازش کنید.
4. دیسک های مروپنم را پس از خروج از لوله‌های TSB برای دو تست mCIM و eCIM می‌توان روی یک پلیت مولر تلقیح شده با سویه استاندارد اشریشیاکلی قرار داد.

**تفسیر تست mCIM**

**کارباپنماز مثبت:**

* ایجاد هاله عدم رشد با قطر کمتر از 15 میلی‌متر یا قطر هاله 18-16 میلی‌متری ولی وجود کلنی‌های ریز داخل هاله نشان‌دهنده مثبت بودن تست است.
* مکانیسم این تست به این صورت است که اگر سویه مورد آزمایش یک کارباپنماز تولید کند، مروپنم موجود در دیسک توسط این آنزیم داخل محیط TSB طی 4 ساعت انکوباسیون هیدرولیز می‌شود و بعد از گذاشتن این دیسک روی اشریشیاکلی استاندارد چون هیچ مروپنمی وجود ندارد یا اکثر آن هیدرولیز شده است، بنابراین باعث مهار باکتری و ایجاد هاله عدم رشد نمی‌شود یا هاله عدم رشد کوچکی ایجاد می‌کند.

**کارباپنماز منفی:**

* قطر هاله شفاف برابر یا بیشتر از 19 میلی‌متر نشان‌دهنده منفی بودن تست است چون ایزوله مورد آزمایش کارباپنماز تولید نکرده است و بنابراین مروپنم موجود در دیسک هیدرولیز نشده و روی اشریشیاکلی استاندارد که حساس به مروپنم است باعث ایجاد هاله شفاف با قطر برابر یا بیشتر از 19 میلی‌متر شده است.

**کارباپنماز نامشخصیا بدون نتیجه:**

* با ایجاد قطر هاله شفاف 18-16 میلی‌متری (بدون وجود کلنی داخل هاله) یا قطر هاله مساوی یا بیشتر از 19 میلی‌متر ولی وجود کلنی‌های ریز در داخل هاله، وجود یا عدم وجود کارباپنماز را نمی‌توان تأیید و گزارش کرد.
* در این حالت اقداماتی لازم است: ابتدا سویه استاندارد اشریشیاکلی را از نظر خلوص چک کنید. دیسک مروپنم را از نظر کیفیت کنترل کنید (کنترل کیفی). مجدد تست را تکرار کنید.
* بعد از تکرار تست و به دست آمدن نتایج مشابه، نیاز به استفاده از تست‌های تکمیلی در صورت امکان (مثل روش ملکولی) برای مشخص کردن حضور کارباپنمازها می‌باشد و این روش فنوتیپی قابل استفاده و گزارش نیست.

**تفسیر تست eCIM**

این تست فقط زمانی که تست mCIM مثبت است باید تفسیر شود و نوع کارباپنماز را مشخص می‌کند.

**متالوبتالاکتاماز مثبت:**

* افزایش برابر یا بیشتر از 5 میلی‌متری قطر هاله عدم رشد برای دیسک مروپنم در تست eCIM در مقابل قطر هاله عدم رشد برای mCIM نشان‌دهنده مثبت بودن تست است. به عنوان مثال، قطر 6 mCIM= میلی‌متر و قطر 15 eCIM= میلی‌متر که اختلاف قطر ناحیه 9 میلی‌متر بوده و بیشتر از 5 میلی‌متر است و بنابراین تست مثبت است.
* مکانیسم این تست به این صورت است که EDTA باعث مهار فلز زینک در جایگاه فعال آنزیم متالوبتالاکتاماز و غیر فعال شدن این آنزیم می‌شود. بنابراین اگر ایزوله مورد آزمایش متالوبتالاکتاماز تولید کند، فعالیت متالوبتالاکتاماز در حضور EDTA مهار می‌شود به طوری که مروپنم موجود در تست eCIM کمتر از مروپنم موجود در تست mCIMهیدرولیز می‌شود و قطر هاله 5 یا بزرگتر از آن تشکیل می‌دهد. در این حالت چون آنزیم کارباپنماز موجود از نوع متالوبتالاکتاماز بوده ولی توسط EDTA موجود در محیط TSB مهار شده است، دیسک مروپنم هیدرولیز نمی‌شود و باعث ایجاد هاله حساس باکتری اشریشیاکلی استاندارد می‌شود.
* دقت شود به همین دلیل گفته شد که این تست فقط زمانی که تست mCIM مثبت است باید تفسیر شود چون اگر تست mCIM منفی باشد بنابراین نتیجه به دست آمده در تست eCIM هم نشان‌دهنده عدم وجود آنزیم کارباپنماز است.

**متالوبتالاکتاماز منفی:**

* افزایش برابر 4 میلی‌متر یا کمتر در قطر هالهeCIM در مقابل قطر هاله mCIM نشان‌دهنده منفی بودن تست است. مثلاً قطر هاله mCIM =6 میلی**‌**متر و قطر هاله eCIM = 8 میلی‌متر که اختلاف قطر هاله برابر 2 میلی‌متر است.
* مکانیسم در اینجا به این صورت است که اگر ایزوله مورد آزمایش یک کارباپنماز نوع سرین تولید کند، فعالیت کارباپنماز تحت تأثیر حضور EDTA قرار نمی‌گیرد و در حضور EDTA در مقایسه با ناحیه mCIM، قطر هاله هیچ افزایشی نخواهد داشت یا افزایش مساوی یا کمتر از 4 میلی‌متر وجود دارد.

**نکته 1:** در تست mCIM گاهی کلنی‌‌های ریز اشریشیاکلی استاندارد ممکن است در داخل هاله مهار مشاهده شوند. اگر کلنی‌ها در ناحیه مهار 6 تا 18 میلی‌متری وجود داشته باشند، آزمایش باید کارباپنماز مثبت در نظر گرفته شود. اگر کلنی‌ها در یک منطقه برابر یا بیشتر از 19 میلی‌متری وجود داشته باشند، آزمایش باید نامشخص (بی**‌**نتیجه) در نظر گرفته شود. بر خلاف تست mCIM در مورد آزمایش eCIM، کلنی‌های ریز در منطقه مهار نادیده گرفته می‌شوند و فقط قطر هاله اصلی به دست آمده با قطر هاله تست mCIM مقایسه می‌شود.

**نکته 2:** نتایج mCIM منفی و eCIM مثبت نباید رخ دهد و اگر این اتفاق افتاد، اقداماتی که در مورد حالت کارباپنماز نامشخص گفته شد (کنترل کیفی مروپنم و خلوص سویه استاندارد اشریشیاکلی) را انجام دهید و مجدد تست را تکرار کنید و اگر نتیجه مشابه به دست آمده تست‌ها نامعتبر در نظر گرفته شده و گزارش نمی‌شود.

**نکته 3:** اگر به طور نادر هر دو کارباپنماز نوع سرین و متالوبتالاکتاماز به طور مشترک توسط یک ارگانیسم تولید شوند (گزارشاتی در جهان موجود است)، تمایز بین آنزیم‌ها امکان پذیر نخواهد بود. نتایج در این حالت مشابه تستeCIM مثبت خواهد بود (هر دو تست eCIM و mCIM مثبت). تفکیک ژنها در این حالت فقط با روش ملکولی قابل تشخیص خواهد بود. چون این حالت بسیار نادر است مثبت بودن هر دو تست به عنوان تست مثبت متالوبتالاکتاماز در نظر گرفته می‌شود.

**نکته 4:** در بررسی‌های انجام گرفته توسط CLSI روش mCIM دارای حساسیت و اختصاصیت بیشتر از 99 درصد برای تشخیص KPC ،NDM ،VIM ،IMP ،IMI ،SPM ،SME و کارباپنماز‌های نوع OXA در بین جدایه‌‌های انتروباکترال را نشان داده است. این روش حساسیت 97 درصد و اختصاصیت 100 درصد برای تشخیص کارباپنمازهایKPC ،NDM ،VIM ،IMP ،IMI ،SPM و OXA در بین جدایه‌های سودوموناس آئروجینوزا را نشان داده است. عملکرد برای سایر کارباپنمازها یا برای آزمایش ایزوله‌های غیر انتروباکترال و غیر از سودوموناس آئروجینوزا ثابت نشده است. بررسی mCIM با گونه‌های آسینتوباکتر اختصاصیت ضعیف و تکرارپذیری ضعیف بین آزمایشگاه‌ها را نشان داد و انجام این تست با گونه‌‌های آسینتوباکتر توسط CLSI تأیید نشده است. در مطالعات CLSI، یک ایزوله کلبسیلا پنومونیه تولید کننده OXA-232 با این روش در 4 از 9 مرکز اعتبارسنجی منفی بود.

**نکته 5:** روش eCIMحساسیت بیشتر از 95 درصد و اختصاصیت بیشتر از 92 درصد را برای تمایز متالوبتالاکتامازها   
(NDM ،VIM ،IMP) از کارباپنماز‌های سرین (KPC ،OXA ،SME) در بین جدایه‌‌های انتروباکترال‌‌ها در مطالعات CLSI نشان داد. یک سویه از کلبسیلا پنومونیه که NDM و OXA-181 را به طور همزمان تولید می‌کرد، نتیجه منفی کاذب در 3 از 4 مرکز اعتبارسنجی به همراه داشت.

**گزارش نتایج**

* اگر فقط روش mCIM انجام گرفته است گزارش به صورت کلی فقط برای کارباپنماز به صورت زیر 2 حالت خواهد بود:

**الف) اگر تست منفی است:** carbapenemase not detected (در این حالت نیازی به انجام تست eCIM نیست)

**ب) اگر تست مثبت است:** فقط به طور کلی وجود کارباپنماز گزارش می‌شود (نوع آنزیم توسط روش eCIM تعیین می‌شود):

**Report:** Carbapenemase detected.

* اگر هر دو تست mCIM و eCIM انجام گرفته است گزارش به صورت زیر 2 حالت خواهد بود:

الف) اگر تست mCIM مثبت و تست eCIM منفی است یعنی نوع آنزیم سرین بوده و به صورت زیر گزارش می‌شود:

**Report:** Serine carbapenemase detected.

ب) اگر تست mCIM مثبت و تست eCIM هم مثبت است یعنی نوع آنزیم متالوبتالاکتاماز بوده و به صورت زیر گزارش می‌شود:

**Report:** Metallo-β-lactamase carbapenemase  
 detected.

* در حالت تست کارباپنماز بدون نتیجه که نمی‌توان جواب آنزیم را گزارش نمود باید به صورت زیر با توصیه به انجام تست‌های تکمیلی مانند تست‌های ملکولی گزارش را انجام داد:

**Report:** Tes‌t was inconclusive for the presence of carbapenemase. carbapenemase genes detection by molecular assays or send isolate to a referral laboratory for further tes‌ting is needed.

**کنترل کیفی:**

هر روزی که این تست بررسی می شود باید کنترل کیفی با سویه های QC مثبت و منفی طبق جدول 6 انجام شود.

جدول 6. کنترل کیفی تست های mCIM و eCIM.

|  |  |
| --- | --- |
| سویه کنترل کیفی | نتایج مورد انتظار |
| Klebsiella pneumoniae ATCC® BAA-1705™ | mCIM: مثبت  eCIM: منفی |
| K. pneumoniae ATCC® BAA-1706™ | mCIM: منفی |
| K. pneumoniae ATCC® BAA-2146™ | mCIM: مثبت  eCIM: مثبت |

**3) بررسی مقاومت ترکیب آزترئونام با سفتازیدیم-آویباکتام**

* با توجه به گزینه‌های درمانی محدود، ممکن است نیاز بالینی به ارزیابی فعالیت آزمایشگاهی ترکیب آزترئونام و سفتازیدیم-آوی‌باکتام برای هدایت درمان عفونت‌های باکتریایی گرم منفی مقاوم به چند دارو، به ویژه آنهایی که توسط تولیدکنندگان متالوبتالاکتاماز (MBL) ایجاد می‌شوند، وجود داشته باشد.
* برای این بررسی به طور موقتی روش غرقه‌سازی دیسک های آزترونام به علاوه سفتازیدیم-آوی‌باکتام در محیط براث تا زمانی که داده‌های اضافی توسط CLSI ارزیابی شود و مطابق با راهنمای CLSI M232 نشان داده شود، در نظر گرفته می‌شود.
* این روش فعلاً برای انتروباکترالها و استنوتروفوموناس مالتوفیلیا قابل استفاده می باشد.

**زمان انجام:** دستور پزشک یا بررسی در ایزوله های مقاوم به چند دارو، به ویژه تولیدکنندگان MBL

**محیط کشت لازم:** لوله های 5 میلی لیتری مولر هینتون براث کاتیون تنظیم شده (CAMHB)

**غلظت دیسک ها:** آزترئونام (ATM)20 میکروگرمی، سفتازیدیم (CZA) 30 میکروگرمی و سفتازیدیم-آویباکتام (ATM + CZA) 30/20 میکروگرمی(غلظت نهایی دیسک ها در محیط: آزترئونام: µg/mL 6، سفتازیدیم: µg/mL 6 و آویباکتام: µg/mL 4)

**روش انجام:**

1. محیط CAMHB را طبق دستور سازنده آماده کنید و به میزان 5 میلی‌لیتر داخل لوله‌های درب پیچ‌دار بریزید و داخل یخچال نگهداری کنید. هنگام انجام تست اجازه دهید این محیط های لوله‌ای و دیسک ها تا دمای اتاق گرم شوند.
2. تعداد 4 لوله CAMHB را برای هر ایزوله مورد آزمایش به صورت ATM، CZA، ATM + CZA و یک لوله هم به عنوان لوله کنترل شاهد مثبت رشد (GC) برچسب بزنید.
3. تحت شرایط آسپتیک، به لوله شماره 1 یک عدد دیسک ATM، به لوله دوم یک عدد دیسک CZA و به لوله سوم همزمان یک عدد دیسکATM و یک عدد دیسک CZAاضافه کنید. به لوله چهارم به عنوان لوله کنترل شاهد مثبت رشد دیسک اضافه نمی‌شود.
4. لوله‌ها را به آرامی با دیسک اضافه شده ورتکس کنید و اجازه دهید در دمای اتاق لوله‌ها برای حداقل 30 دقیقه بمانند تا داروها از دیسک ها خارج و وارد محلول شود (زمان بیشتر از 60 دقیقه نشود).
5. در مدتی که مرحله 4 آماده می‌شود، از باکتری مورد آزمایش یک تلقیح استاندارد نیم مک فارلند آماده کنید. چند کلنی از محیط آگار غیرانتخابی (مثلا بلادآگار) بردارید و در یک لوله حاوی 4 تا 5 میلی‌لیتر نرمال سالین حل کنید و از آن کدورتی برابر نیم مک فارلند بسازید.
6. از مایع تلقیح استاندارد آماده شده در مرحله ۵ میزان 25 میکرولیتر را به لوله کنترل و لوله‌های 1 تا 4 اضافه کنید. غلظت نهایی در همه لوله‌ها در این حالت برابر تقریباً CFU/ml10۵× ۵/7 می‌باشد.
7. برای چک کردن خلوص باکتری مورد آزمایش، یک لوپ 10 میکرولیتری پر از مایع تلقیح استاندارد اصلی که در مرحله ۵ آماده کرده اید را به محیط بلادآگار اضافه و کشت دهید.
8. لوله‌ها را محکم ببندید و هر لوله تلقیح شده را با سرعت کم ورتکس کنید تا مخلوط شود. سرعت آهسته برای جلوگیری از چسبیدن دیسک ها به درپوش و سطح داخلی لوله رعایت شود.
9. قبل از انکوباسیون درپوش لوله‌ها را کمی باز (شل) کنید و سپس لوله‌ها و پلیت بلادآگار کشت شده در مرحله 7 را در دمای 33 تا 3۵ درجه سانتی‌گراد در هوای معمولی داخل انکوباتور برای 16 تا 20 ساعت انکوبه کنید.

**تفسیر نتایج بعد از انکوباسیون**

* در مرحله اول خلوص پلیت بلادآگار تهیه شده در مرحله 7 را چک کنید. در مرحله بعدی لوله کنترل مثبت را چک کنید که باید رشد باکتری با کدورت مناسب را ببینید.
* سه لوله دیگر را از نظر کدورت بررسی کنید. عدم کدورت به منزله اثربخشی آن دارو (حساسیت) و ایجاد کدورت به معنی مقاومت می باشد.
* اگر همه لوله‌ها کدورت داشتند یعنی باکتری کاملاً به همه داروها و ترکیب آنها مقاوم است.

**نکته:** اگر نتیجه غیرقابل قبول مشاهده شود (مثلاً عدم رشد در لوله آزترئونام ولی رشد در دو لوله سفتازیدیم و آزترئونام+ سفتازیدیم)، نتیجه نباید گزارش شود و باید آزمایش تکرار شود. این نتایج غلط در اثر آلودگی یا غلظت غیریکنواخت در لوله‌ها و یا خطای انسانی در هنگام انجام یکی از مراحل آزمایش ممکن است رخ دهد.

**کنترل کیفی:**

اگر تست کمتر از یک بار در هفته انجام می شود باید به صورت روزانه کنترل کیفی طبق جدول 7 انجام شود. اگر حداقل یک بار در هفته این تست در آزمایشگاه انجام می شود می توان زمان کمتری کنترل کیفی را انجام داد (مثلاً هفتگی).

جدول 7. کنترل کیفی تست ترکیبی آزترئونام و سفتازیدیم.

|  |  |
| --- | --- |
| سویه کنترل کیفی | نتایج مورد انتظار |
| Escherichia coli ATCC®d 25922 | آزترئونام: عدم کدورت (حساس)  سفتازیدیم: عدم کدورت (حساس)  آزترئونام+ سفتازیدیم: عدم کدورت (حساس) |
| Klebsiella pneumoniae ATCC® BAA-1705™ | آزترئونام: کدورت (مقاوم)  سفتازیدیم: عدم کدورت (حساس)  آزترئونام+ سفتازیدیم: عدم کدورت (حساس) |
| K. pneumoniae ATCC® BAA-2146™ | آزترئونام: کدورت (مقاوم)  سفتازیدیم: کدورت (مقاوم)  آزترئونام+ سفتازیدیم: عدم کدورت (حساس) |
| E. coli AR Bank #0348 یا  E coli AR Bank #0434 یا  E coli AR Bank #0450 | آزترئونام: کدورت (مقاوم)  سفتازیدیم: کدورت (مقاوم)  آزترئونام+ سفتازیدیم: کدورت (مقاوم) |

**4) مقاومت به پلی‌میکسین‌ها**

**تست‌ مقاومت به کولیستین برای انتروباکترال‌ها و سودوموناس آئروژینوزا**

* پلی‌میکسین‌ها (پلی‌میکسینE یا کولیستین و پلی**‌**میکسین B) جزو آخرین راه حل‌های ضد میکروبی برای درمان عفونت‌های مقاوم به چند دارو هستند.
* داده‌های بالینی و PK/PD نشان می‌دهد که این عوامل اثربخشی بالینی محدودی دارند و عوامل جایگزین به شدت ترجیح داده می‌شوند اما اگر این عوامل در دسترس نباشند، آگاهی از MIC کولیستین ممکن است برای اطلاع از تصمیمات درمانی مفید باشد.
* برای کولیستین، روش های میکرودیلوشن براث، روش غرقه‌سازی دیسک کولیستین در محیط براث (یا روش CBDE) و روش های MIC رقیق‌سازی آگار (یا روش CAT) قابل قبول است.
* برای پلی‌میکسینB، میکرودایلوشن براث تنها روش تأیید شده است. روش های انتشار دیسک و گرادیان غلظت (مانند روش Etes‌t) قابل قبول نیستند و نباید انجام شود.
* کولیستین و پلی‌میکسین B به عنوان عوامل قابل تعمیم به یکدیگر در نظر گرفته می‌شوند، بنابراین MIC‌های به دست آمده از آزمایش کولیستین، برای پلی‌میکسین B و بالعکس قابل پیش**‌**بینی هستند.
* در حال حاضر، CLSI روش های آزمایش پلی‌میکسین B را ارزیابی نکرده است، و روش های زیر نباید با پلی‌میکسین B انجام شوند.
* روش‌ ساده قابل انجام برای تعیین MIC کولیستین در آزمایشگاه، روش غرقه‌سازی دیسک کولیستین در محیط براث می‌باشد که در زیر توضیح داده می‌شود. این روش برای گونه‌‌های آسینتوباکتر ارزیابی نشده و بنابراین نباید انجام شود.

**روش انجام غرقه‌سازی دیسک کولیستین در محیط براث (روش CBDE)**

1. محیط مولر هینتون براث کاتیون تنظیم شده (CAMHB) را طبق دستور سازنده آماده کنید و به میزان 10 میلی‌لیتر داخل لوله‌های درب پیچ‌دار بریزید و داخل یخچال نگهداری کنید. هنگام انجام تست اجازه دهید این محیط های لوله‌ای و دیسک های کولیستین سولفات 10 میکروگرمی تا دمای اتاق گرم شوند.
2. تعداد 4 لوله CAMHB را برای هر ایزوله مورد آزمایش به صورت 1، 2، و 4 میکروگرم در میلی‌لیتر و یک لوله هم به عنوان لوله کنترل مثبت رشد آزمایش برچسب بزنید.
3. تحت شرایط آسپتیک، به لوله شماره 1 حاوی 10 میلی‌لیتر محیط براث، یک عدد دیسک 10 میکروگرمی کولیستین اضافه کنید (غلظت 1 میکروگرم در لیتر از کولیستین به دست می‌آید). به لوله دوم هم 2 عدد دیسک کولیستین (غلظت 2 میکروگرم در میلی‌لیتر) و به لوله سوم 4 عدد دیسک کولیستین (غلظت 4 میکروگرم در میلی‌لیتر) اضافه کنید. در نهایت به لوله چهارم به عنوان لوله کنترل دیسک اضافه نمی‌شود (غلظت صفر میکروگرم در میلی‌لیتر).
4. لوله‌ها را به آرامی با دیسک اضافه شده ورتکس کنید و اجازه دهید در دمای اتاق لوله‌ها برای حداقل 30 دقیقه بمانند تا کولیستین از دیسک ها خارج و وارد محلول شود (زمان بیشتر از 60 دقیقه نشود).
5. در مدتی که مرحله 4 آماده می‌شود، از باکتری مورد آزمایش یک تلقیح استاندارد نیم مک فارلند آماده کنید. چند کلنی از محیط آگار غیرانتخابی (مثلا بلادآگار) بردارید و در یک لوله حاوی 4 میلی‌لیتر نرمال سالین حل کنید و از آن کدورتی برابر نیم مک فارلند بسازید.
6. از مایع تلقیح استاندارد آماده شده در مرحله ۵ میزان ۵0 میکرولیتر را به لوله کنترل و لوله‌های 1 تا 3 اضافه کنید. غلظت نهایی در همه لوله‌ها در این حالت برابر تقریباً CFU/ml105× ۵/7 می‌باشد.
7. برای چک کردن خلوص باکتری مورد آزمایش، یک لوپ 10 میکرولیتری پر از مایع تلقیح استاندارد اصلی که در مرحله ۵ آماده کرده اید را به محیط بلادآگار اضافه و کشت دهید.
8. لوله‌ها را محکم ببندید و هر لوله تلقیح شده را با سرعت کم ورتکس کنید تا مخلوط شود. سرعت آهسته برای جلوگیری از چسبیدن دیسک های کولیستین به درپوش و سطح داخلی لوله رعایت شود.
9. قبل از انکوباسیون درپوش لوله‌ها را کمی باز (شل) کنید و سپس لوله‌ها و پلیت بلادآگار کشت شده در مرحله 7 را در دمای 33 تا 3۵ درجه سانتی‌گراد در هوای معمولی داخل انکوباتور برای 16 تا 20 ساعت انکوبه کنید.

**تفسیر نتایج بعد از انکوباسیون**

* در مرحله اول خلوص پلیت بلادآگار تهیه شده در مرحله 7 را چک کنید. در مرحله بعدی لوله کنترل مثبت را چک کنید که باید رشد باکتری با کدورت مناسب را ببینید. بعضی از سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا ممکن است فقط در سطح رشد کنند (چون هوازی هستند).
* سه لوله دیگر را از نظر کدورت بررسی کنید. لوله‌ای که دارای کمترین غلظت کولیستین است که کدورتی در آن مشاهده نمی‌شود به عنوان لوله MIC خواهد بود. مثلاً اگر هیچ لوله‌ای کدورت نداشت عدد MIC برابر 1 میکروگرم در میلی‌لیتر خواهد بود (نتیجه اینجا به صورت نیمه حساس است چون برای این آنتی‌بیوتیک گزارش حساس در CLSI وجود ندارد).
* اگر لوله اول کدورت داشت ولی لوله دوم و سوم کدورت نداشت عدد MIC برابر 2 (نتیجه اینجا هم نیمه حساس است) و اگر فقط لوله چهارم کدورت نداشت عدد MIC برابر 4 خواهد بود.
* اگر همه لوله‌ها کدورت داشتند یعنی باکتری کاملاً به کولیستین مقاوم است (عدد MIC بیشتر از 4 میکروگرم در میلی‌لیتر).

**نکته:** اگر نتیجه غیرقابل قبول مشاهده شود مثلاً عدم کدورت در لوله اول اما کدورت در لوله 2 یا 4 (چون غلظت بیشتر است باید اینجا هم کدورت دیده نشود)، نتیجه نباید گزارش شود و باید آزمایش تکرار شود. این نتایج غلط در اثر آلودگی در لوله‌های 2 یا 3 یا غلظت غیریکنواخت در لوله‌ها و یا خطای انسانی در هنگام انجام یکی از مراحل آزمایش ممکن است رخ دهد و گاهی ممکن است به علت مقاومت هترو (Heteroresis‌tance) باشد.

**کنترل کیفی:**

اگر تست کمتر از یک بار در هفته انجام می شود باید به صورت روزانه کنترل کیفی طبق جدول 8 انجام شود. اگر حداقل یک بار در هفته این تست در آزمایشگاه انجام می شود می توان زمان کمتری کنترل کیفی را انجام داد (مثلاً هفتگی).

جدول 8. کنترل کیفی آزمایش غرقه سازی دیسک کولیستین.

|  |  |
| --- | --- |
| سویه کنترل کیفی | نتایج مورد انتظار (بر حسب μg/mL) |
| Escherichia coli ATCC®d BAA-3170™ | 4-1 ≥ با میانگین μg/mL 2 |
| P. aeruginosa ATCC® 27853 | 4-1 ≥ |

**مقاومت‌ها در باکتری سودوموناس آئروژینوزا**

**تست شناسایی کارباپنمازها:**

برای شناسایی کارباپنمازها در سودوموناس آئروجینوزا در آزمایشگاه روش mCIM و روش eCIM، آسان‌ترین روش می‌باشد که در قسمت انتروباکترال‌ها گفته شد.

**تست‌ مقاومت به کولیستین:**

طبق روش غرقه‌سازی دیسک کولیستین در محیط براث (روشCBDE) به انجام می‌رسد که در قسمت انتروباکترال‌ها گفته شد.