PROCEDURA
BADANIA PRZESIEWOWEGO w ognisku epidemicznym w kierunku pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy

(opracowała: Elżbieta Stefaniuk, dr. n.med.; Narodowy Instytut Leków, Warszawa; na podstawie: Lorans K. *et al.* JCM 2010, 48: 836-841; Simner P.J. *et al.* JCM 2015, 53: 105-112; instrukcja testu ChromID CARBA oraz Rekomendacje Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów - KORLD: *www.korld.edu.pl*)

I. Materiał do badania:

- wymaz z odbytu - na wymazówce powinien być widoczny ślad kału

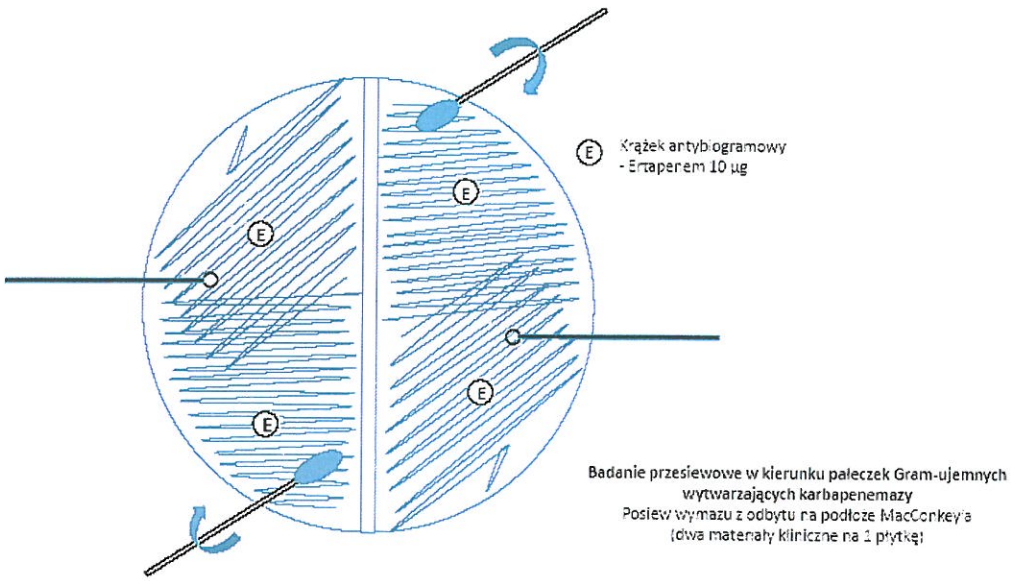
II. Postępowanie:

DZIEŃ I
Posiew materiałów

1. **Pobrany materiał posiać na:**

- **½ płytki z podłożem MacConkey'a** - w I części pola na płytce Petriego wykonać gęsty posiew wymazówką, którą był pobierany materiał wymaz z odbytu, obracając wymazówkę dookoła osi. W cz. II pola posiany materiał rozprowadzić gęsto jałową ezą (patrz: Rys. 1);
- **¼ płytki z podłożem ChromID CARBA** (bioMérieux)* – posiew redukcyjny.

2. Na podłożu MacConkey'a na linii posiewu materiału położyć 2 krążki antybiogramowe z ertapenemem 10 µg (E), zgodnie z Rys. 1:



3. Płytki umieścić w cieplarce (denkami do góry) i inkubować 18-24 godz. w temp. 35±2°C.

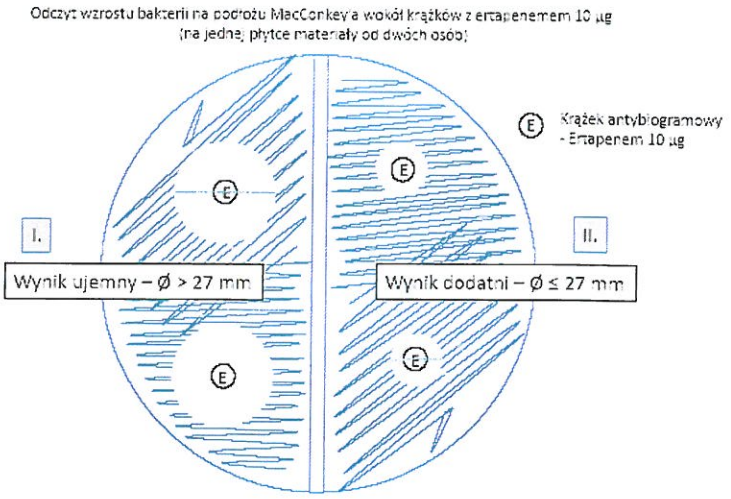
DZIEŃ II (24 godz. od posiewu)
Odczyt posiewów

1. Na podłożu **ChromID CARBA** poszukujemy wzrostu kolonii o charakterystycznym zabarwieniu*:

- kolonie koloru od różowego do burgunda lub kolonie przezroczyste ze środkiem w kolorze różowym do burgunda *(E. coli)*
- kolonie koloru niebieskozielonego do niebieskoszarego (pałeczki z grupy KESC – *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter)*

PROCEDURA BADANIA PRZESIEWOWEGO w ognisku epidemicznym w kierunku pałeczek *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy

2. Na podłożu **MacConkey'a** poszukujemy wzrostu charakterystycznych kolonii (laktozo-dodatnich) wokół krążków z ertapenemem w strefie zahamowania wzrostu o Ø ≤27 mm (Rys.2).



Podłoże ChromID CARBA*	Podłoże MacConkey'a	Dalsze postępowanie	Interpretacja
brak wzrostu kolonii o charakterystycznym zabarwieniu	**brak wzrostu kolonii** wokół krążka z ertapenemem - strefa zahamowania wzrostu >27 mm (Rys. 2 I.)	Koniec badania	**WYNIK UJEMNY** *Nie wyhodowano Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających nabyte karbapenemazy*
wzrost kolonii o charakterystycznym zabarwieniu (rodzina Enterobacteriaceae): **1.** kolonie koloru od różowego do burgunda lub kolonie przezroczyste ze środkiem w kolorze różowym do burgunda ***(E. coli)*** lub **2.** kolonie koloru niebieskozielonego do niebieskoszarego **(pałeczki z grupy KESC – *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter)***	**obecność kolonii** laktozo-dodatnich wokół krążka z ertapenemem - strefa zahamowania wzrostu ≤27 mm (Rys. 2 II.)	**1.** Z kolonii na podłożu ChromID o charakterystycznym zabarwieniu **wykonać test CARBA NP** – zgodnie z procedurą KORLD (www.korld.edu.pl) lub inny komercyjny test CARBA NP** - **odczyt testu CARBA NP – po 2 godz.** → wynik ujemny – postąpić zgodnie z zaleceniami KORLD → przesiew na podłoże krwawe - ponowne oznaczenie na III DZIEŃ **2.** Wykonać **testy fenotypowe identyfikujących karbapenemazy** – KPC, MBL, OXA-48 (zgodnie z procedurą KORLD (www.korld.edu.pl) – **odczyt po 24 godz. – wynik - III DZIEŃ** **3.**Dalsza **identyfikacja do poziomu gatunku** (met. biochemiczna lub met. spektrometrii masowej) - odczyt po 30 min. – 24 godz. w zależności od metody **(II lub III DZIEŃ)***** **4. Przesłać szczepy dodatnie do KORLD do potwierdzenia**	**WYNIK DODATNI** *Wyhodowano Gram-ujemne pałeczki Enterobacteriaceae wytwarzające nabyte karbapenemazy (podejrzenie karbapenemazy typu ...)*

*Jeśli Laboratorium stosuje inne, niż wskazane w niniejszej procedurze, podłoże chromogenne wykrywające pałeczki wytwarzające karbapenemazy, barwę kolonii należy oceniać zgodnie z instrukcją producenta podłoża

** test CARBA NP może być wykonywany z podłoża chromogennego; w sytuacji, gdy kolonii przeznaczonych do dalszej diagnostyki jest zbyt mało, należy namnożyć kolonie na podłożu agarowym z krwią baranią

***identyfikację biochemiczną należy prowadzić z kolonii wyrosłych na podłożu MacConkey'a lub namnożonych na podłożu krwawym; identyfikacja met. spektrometrii masowej może być przeprowadzona z kolonii rosnących na podłożu MacConkey'a, podłoża chromogennego i podłoża krwawego

DZIEŃ III (48 godz. od posiewu)
odczyt wyników testów identyfikacyjnych i testów fenotypowych w kierunku typu karbapenemaz

Szczepy dodatnie – przesłać do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów w celu potwierdzenia mechanizmu oporności

DODATNI WYNIK KOŃCOWY
Wyhodowano Gram-ujemne pałeczki (gatunek) ..... wytwarzające nabyte karbapenemazy typu .....

PODSUMOWANIE

KOSZT ODCZYNNIKOWY BADANIA 1 MATERIAŁU (BRUTTO):

Etap posiewu:	podłoże MacConkey'a (1/2 płytki)	- ok. 1,50 PLN
	krążki antybiogramowe (2 szt.)	- ok. 1,00 PLN
	podłoże ChromID CARBA (1/4 płytki)	- ok. 2,50 PLN
	Razem (maks.)	**- ok. 5,00 PLN**
Etap identyfikacji karbapenemaz (1 izolat):		
	Test CARBA NP (wg Procedury KORLD)	- ok. 3,00 PLN
	Test fenotypowy	- ok. 7,00 PLN

Uwaga: cena testu probówkowego CARBA NP. (wg Procedury KORLD) uwzględnia koszty zakupu poszczególnych odczynników (wyliczone na ok. 1000-1200 próbek)

Identyfikacja gatunkowa – w zależności od metody stosowanej w Laboratorium – 2 - 20 PLN
Potwierdzenie typu karbapenemazy – KORLD (finasowanie w ramach narodowego Programu Ochrony Antybiotyków)

KONSULTANT KRAJOWY
w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej
Prof. dr hab. n. med. Waleria Hryniewicz

Przewodnicząca
Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków

Warszawa, 15 grudnia 2015r.