

Agar chromID™ CARBA (CARB)

Wybiórcze podłoże chromogenne do badań przesiewowych w kierunku *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy (CPE).

WPROWADZENIE

Agar chromID™ CARBA jest wybiórczym podłożem chromogennym do badań przesiewowych w kierunku *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy (CPE), szczególnie KPC oraz NDM-1 u chronicznych nosicieli lub pacjentów z grup ryzyka (1, 2, 7, 8, 9, 10). Podłoże to nie zastępuje konwencjonalnych metod oznaczania lekowrażliwości.

Enterobacteriaceae wytwarzające CPE są wieloopornymi bakteriami, odpowiedzialnymi za zakażenia szpitalne i epidemie szpitalne (3, 4). Wykrywanie nosicieli *Enterobacteriaceae* wytwarzających CPE ma szczególne znaczenie dla zapobiegania i epidemiologicznego monitorowania takich zakażeń. W tym kontekście stosowanie agaru chromID™ CARBA jest elementem aktywnego nadzoru nad *Enterobacteriaceae* wytwarzającymi CPE.

ZASADA DZIAŁANIA

Agar chromID™ CARBA (w trakcie rejestracji patentu) opiera się na różnych, bogatych w substancje odżywcze peptonach. Zawiera on:

- mieszaninę antybiotyków umożliwiającą wybiórczy wzrost *Enterobacteriaceae* wytwarzających CPE.
- Trzy substraty chromogenne umożliwiające identyfikację większości występujących *Enterobacteriaceae* wytwarzających CPE:
 - *Escherichia coli*: spontaniczne zabarwienie (różowe do burgunda) szczepów wytwarzających β -glukuronidazę (β -GUR) oraz/lub β -galaktozydazę (β -GAL) (5).
 - *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (KESC): spontaniczne zielone, brązowo-zielone lub niebieskie zabarwienie szczepów wykazujących ekspresję β -glukozydazy (β -GLU).

ZAWARTOŚĆ ZESTAWU**Podłoże gotowe do użycia:**

REF 43 861

Opakowanie na 20 płytek (90 mm)
CARB *

* wydrukowano na każdej płytce

SKŁAD**Teoretyczna zawartość składników.**

Podłoże to może być dostosowywane i/lub uzupełniane zgodnie z wymaganymi kryteriami:

Pepton kazeinowy (wołowy).....	5 g
Pepton sojowy	5 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy).....	8 g
Węglowodany	1 g
L-Tryptofan	0,9 g
Bufor fosforanowy.....	1 g
Mieszanina chromogenna.....	1,4 g
Mieszanina odżywcza.....	2,8 g
Mieszanina wybiórcza.....	0,3 g
Agar.....	18 g
Oczyszczona woda.....	1 l

pH 7,4

WYPOSAŻENIE WYMAGANE NIE NALEŻĄCE DO ZESTAWU**Odczynnik:**

- Odczynnik do wykrywania oksydazy (Ref. 55 635)

Materiały:

- Inkubator bakteriologiczny.
- Krążki nieimpregnowane (średnica 6 mm) (Ref. 54 991)

MOŻLIWE DODATKOWE ODCZYNNIKI

- Paski Etest®.
- Szczep do kontroli jakości ATCC® LyfoCults® PLUS.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- **Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.**
- **Do wykorzystania wyłącznie przez profesjonalistów.**
- Produkt zawiera materiały pochodzenia zwierzęcego. Świadectwo pochodzenia i/lub stanu sanitarnego zwierząt nie gwarantuje w pełni nieobecności czynników chorobotwórczych. Dlatego należy obchodzić się z nim zgodnie z zasadami postępowania z materiałem potencjalnie zakaźnym (nie spożywać i nie wdychać).
- Wszystkie próbki pobrane od pacjentów, hodowle bakteryjne i wykorzystane produkty są potencjalnie zakaźne i powinny być traktowane zgodnie z zalecanymi środkami ostrożności. Należy stosować techniki aseptyczne i zwykle procedury obowiązujące przy pracy ze szczepami bakteryjnymi zgodnie z "CLSI® M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline* – Bieżąca wersja". Dodatkowe środki ostrożności zawarte są w "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, CDC/NIH, Ostatnie wydanie", lub regulowane przepisami właściwymi dla poszczególnych państw.
- Nie używać płytek po upływie daty ważności.
- Nie używać podłoża, jeśli opakowanie jest uszkodzone.
- Nie używać przerośniętych lub wyschniętych płytek.
- Osoby z zaburzeniami percepcji kolorów mogą mieć problemy ze stosowaniem podłoża.
- Na jednej płytce należy posiewać tylko jeden materiał.
- W celu osiągnięcia odpowiednich wyników należy stosować procedurę zawartą w opakowaniu. Każda modyfikacja procedury może wpływać na wyniki.
- W interpretacji wyników testu należy wziąć pod uwagę makro- i mikroskopową morfologię oraz jeśli będzie konieczne, wyniki innych przeprowadzonych testów.

PRZECCHOWYWANIE

- Płytki przechowywać w pudełku w temperaturze 2-8°C do upłynięcia daty ważności.
- Jeśli nie są w pudełku, płytki mogą być przechowywane przez 2 tygodnie w temperaturze 2-8°C w opakowaniach celofanowych w ciemności.

MATERIAŁ DO BADAŃ

Można badać różne typy materiałów: kał i wymazy z odbytu. Należy posiewać je bezpośrednio na płytkę, bez uprzedniego namnażania.

Należy respektować zasady dobrej praktyki laboratoryjnej dotyczące pobierania i transportu materiału dostosowując je do jego typu.

SPOSÓB WYKONANIA

1. **Doprowadzić płytki do temperatury pokojowej.**
2. Materiał posiać bezpośrednio na agar chromID™ CARBA.
3. Inkubować w $35 \pm 2^\circ\text{C}$ przykrywką do dołu, w warunkach tlenowych. Hodowle są na ogół oceniane po 18-24 godzinach inkubacji.

Użytkownik jest odpowiedzialny za wybór właściwej temperatury inkubacji, zgodnie z zamierzeniami i obowiązującymi standardami.

ODCZYT I INTERPRETACJA

Po inkubacji, obserwować wzrost bakterii i wygląd kolonii.

Enterobacteriaceae wytwarzające CPE dają następujące charakterystyczne kolory:

- Kolonie **różowe do burgunda** lub przezroczyste kolonie ze środkiem w kolorze różowym do burgunda: gatunek *E. coli*.
- Kolonie niebieskawozielone do niebieskawoszarych: grupa **KESC**.
Identyfikację mikroorganizmu do poziomu gatunku należy przeprowadzić przy użyciu testów biochemicznych.

Uwaga: Ze względu na obecność w podłożu tryptofanu, mogą pojawić się beżowe kolonie z brązową otoczką lub brązowe zabarwienie kolonii (tryb *Proteaeae*). W takim przypadku, jeżeli dalsza identyfikacja ma być prowadzona przy użyciu karty VITEK® 2 GN, należy przesiać kolonie na podłoże konwencjonalne.

Wytwarzanie karbapenemazy musi być potwierdzone w każdym przypadku.

KONTROLA JAKOŚCI

Protokół:

Właściwości odżywcze i wybiórczość podłoża można sprawdzać przy użyciu następujących szczepów:

W celu uzyskania inokulum po izolacji na agarze, należy przygotować zawiesinę 0,5 McF a następnie rozcieńczyć jałowym roztworem soli:

- of 10^4 CFU:
dla *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705™
- of 10^5 CFU:
dla *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603™

Zakres spodziewanych wyników:

Szczep	Wyniki w 33-37°C	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705™	Wzrost po 24 godzinach	Kolonie zielone po 24 godzinach
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 700603™	Brak wzrostu po 24 godzinach	

Uwaga:

Obowiązkiem użytkownika jest prowadzenie kontroli jakości biorąc pod uwagę zamierzony sposób wykorzystania podłoża i zgodność z lokalnymi przepisami (częstotliwość, liczba szczepów, temperatura i czas inkubacji itd.).

OGRANICZENIA TESTU

- Niektóre wielooporne drobnoustroje, inne niż *Enterobacteriaceae* wytwarzające CPE mogą wytwarzać na tym podłożu kolonie o typowym zabarwieniu: niektóre, odporne na wankomycynę szczepy enterokoków (szczególnie *E. faecium* Van A: małe, niebiesko-turkusowe kolonie) lub *Enterobacteriaceae* odporne na karbapenemy ze względu na nieprzepuszczalność.
- Niektóre szczepy *Pseudomonas* mogą wytwarzać brązowy pigment. W celu zróżnicowania ich z *Proteaeae* należy wykonać test na oksydazę.
- Zdolność do wykrywania *Proteaeae* wytwarzających karbapenemazy nie była oznaczana na tym podłożu.
- Niektóre szczepy *Enterobacteriaceae* o niskim poziomie produkcji karbapenemazy, jak OXA-48, VIM lub IMP, mogą nie wyrosnąć na tym podłożu.
- Wzrost zależy od indywidualnych wymagań każdego mikroorganizmu. Może zdarzyć się, że jakiś szczep o specyficznych wymaganiach (substrat, temperatura, warunki inkubacji, itd.) nie wyrośnie.

OCENA TESTU

Ocenę testów przeprowadzono w dwóch ośrodkach (Wielka Brytania i Grecja), zgodnie z tym samym protokołem, przy użyciu materiałów klinicznych (kał, wymazy z odbytu) od pacjentów z grup ryzyka i chronicznych nosicieli badanych przesiewowo w kierunku *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy.

Materiały badane posiewano bezpośrednio na agar. Odczyty wykonywano po 18-24 godzinach inkubacji w $35 \pm 2^\circ\text{C}$ w warunkach tlenowych.

Obie oceny (Wielka Brytania i Grecja) przeprowadzono przy użyciu 806 materiałów (88 próbek kału i 718 wymazów z odbytu). Podłoże firmy bioMérieux chromID™ CARBA porównywano 1 agarem Mac Conkey + Imipenem (1 mg/L).

Wszystkie kolonie sprawdzono pod względem barwienia metodą Grama, identyfikacji do poziomu gatunku i produkcji karbapenemazy.

Dla 151 materiałów uzyskano wynik dodatni przynajmniej jedną z metod (podłoże hodowlane z potwierdzeniem kolonii testem PCR oraz zmodyfikowanym testem Hodga).

Czułość (95% współczynnik ufnosci)

chromID CARBA	Mac Conkey + Imipenem
97,4% [93,4-99,3]	82,1% [75,1-87,9]

Specyficzność (95% współczynnik ufnosci)

Bez barwienia metodą Grama		Z barwieniem metodą Grama	
chromID CARBA	Mac Conkey + Imipenem	chromID CARBA	Mac Conkey + Imipenem
90,7% [88,2-92,8]	46,6% [42,7-50,5]	99,7% [98,9-100,0]	83,8% [80,8-86,6]

W jednym ośrodku (Grecja), podłoże porównano z metodą CDC (6) przy użyciu 177 materiałów (wymazy z odbytu) w tym 86 materiałów dodatnich.

Czułość (95% współczynnik ufnosci)

chromID CARBA	Mac Conkey + Imipenem	CDC
96,5% [90,1-99,3]	89,5% [81,1-95,1]	98,8% [93,7-100,0]

Specyficzność (95% współczynnik ufnosci)

Bez barwienia metodą Grama			Z barwieniem metodą Grama		
chromID CARBA	Mac Conkey + Imipenem	CDC	chromID CARBA	Mac Conkey + Imipenem	CDC
91,2% [83,4-96,1]	31,9% [22,5-42,5]	80,2% [70,6-87,8]	100,0% [96,0-100,0]	70,3% [59,8-79,5]	80,2% [70,6-87,8]

POSTĘPOWANIE ZE ZUŻYTYMI TESTAMI



Zużytych i niezużytych odczynników, jak również zanieczyszczonych sprzętów jednorazowych, należy pozbywać się zgodnie z procedurami dla materiałów zakaźnych lub potencjalnie zakaźnych.

Obowiązkiem każdego laboratorium jest pozbywanie się zużytych testów i wytworzonych ścieków w zależności od typu i stopnia zabezpieczenia laboratorium oraz dezynfekować je i usuwać (złocić dezynfekcję i usuwanie) zgodnie z zatwierdzonymi procedurami.

PIŚMIENNICTWO

1. CDC - Guidance for Control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities - MMWR, 2009, 58(10): 256-260.
2. PERRY J. D., NAQVI Sakeenah Hussain, MIRZA Irfan Ali et al. - Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. - Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, ISSN:1460-2091.
3. WALSH T.R. - Emerging carbapenemases: a global perspective. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 36S3: 8-14.
4. NORDMANN P., CUZON G., NAAS T. - The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infectious Disease, 2009, 9: 228-236.
5. ORENGA S., JAMES A.L., PERRY J.D., PINCUS D.H. (2009). Enzymatic substrates in microbiology. Journal of Microbiological Methods, 79: 139-155.
6. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs - www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/Klebsiella_or_Ecoli.pdf
7. VRIONI G., DANIIL I., VOULGARI E., RANELLOU K., KOUMAKI V., GHIRARDI S., KIMOULI M., ZAMBARDI G. and TSAKRIS A. - Comparative evaluation of a prototype medium (chromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J. Clin. Microbiol.*, June 2012, in press.
8. BEREKSI N., GIRAUD D., JOYEUX F. and al. - Evaluation of a chromogenic medium, chromID CARBA, for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. - Poster 1718 - London 2012 - 22nd ECCMID.
9. VRIONI G., DANIIL J., VOULGARI E. and al. - Evaluation of a novel chromogenic medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs - Poster 1717 - London 2012 - 22nd ECCMID.
10. WILKINSON K., ARMES A., RAZA M. and PERRY J.D. - Evaluation of various culture media and procedures recommended for isolation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. - Poster 2316 - London 2012 - 22nd ECCMID.

TABELA SYMBOLI

Symbol	Znaczenie
	Numer katalogowy
	Wyrób do diagnostyki <i>In Vitro</i>
	Producent
	Przestrzegać zakresu temperatury
	Użyć przed
	Kod partii
	Sprawdź w instrukcji obsługi
	Wystarczy na wykonanie <n> testów
	Chronić przed światłem

BIOMERIEUX, logo BIOMERIEUX, CHROMID, ETEST oraz VITEK są znakami towarowymi używanymi, w trakcie rejestracji i/lub zastrzeżonymi, należącymi do bioMérieux, jednego z jego podmiotów zależnych lub jednej z jego firm.

Znak towarowy ATCC i nazwa handlowa oraz wszelkie numery katalogowe ATCC są znakami towarowymi należącymi do American Type Culture Collection.

CLSI jest znakiem towarowym należącym do Clinical Laboratory and Standards Institute, Inc.

Wszelkie inne nazwy i znaki handlowe należą do odpowiednich właścicieli.