

PROCEDURA POBIERANIA I TRANSPORTOWANIA MATERIAŁU KIEROWANEGO DO BADAŃ LABORATORYJNYCH W KOROUN

Poniższa instrukcja opisuje szczegółowe zasady i kryteria postępowania przy pobieraniu oraz transportowaniu izolatów bakteryjnych oraz materiałów klinicznych do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN) działającego w Zakładzie Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej Narodowego Instytutu Leków.

I. Procedura przesyłania IZOLATÓW BAKTERYJNYCH

1. Zasady ogólne

- 1) Kluczowym elementem diagnostyki zakażeń jest wyhodowanie czynnika etiologicznego. Uzyskanie szczepu bakteryjnego pozwala nie tylko na identyfikację drobnoustroju odpowiedzialnego za zakażenie, ale również na jego pełną charakterystykę fenotypową (antybiogram w celu wdrożenia celowanej antybiotykoterapii), serologiczną (ustalenie serogrupy, serotypu) oraz genetyczną. Szczep bakteryjny (dalej określany jako: Izolat) wyhodowany od pacjenta z inwazyjnym zakażeniem jest najlepszym materiałem do dalszych badań.
- 2) KOROUN przeprowadza badania Izolatów bakteryjnych wyhodowanych od pacjentów z zakażeniami inwazyjnymi nabytymi poza szpitalem, w szczególności następujących gatunków:
 - a) *Neisseria meningitidis*,
 - b) *Streptococcus pneumoniae*,
 - c) *Haemophilus influenzae*,
 - d) *Streptococcus agalactiae*,
 - e) *Streptococcus pyogenes*,
 - f) *Listeria monocytogenes*,
 - g) *Escherichia coli* (należy przysyłać wszystkie Izolaty inwazyjne wyhodowane od noworodków; od osób dorosłych tylko Izolaty wyhodowane z płynu mózgowo-rdzeniowego).
- 3) Izolaty bakteryjne przesyłane są do KOROUN w celu potwierdzenia ich identyfikacji i przeprowadzenia dalszych badań serologicznych i molekularnych.

2. Informacje szczegółowe

1) Przygotowanie Izolatu do transportu

- a) Przesyłana hodowla Izolatu powinna być świeża (24 godz.) i czysta.
- b) Żywotność Izolatu należy utrzymywać do trzech dni od dnia wysłania Izolatu do KOROUN (nadawca z Warszawy i okolic) oraz do 7 dni (inny nadawca). W przypadku nieudanego ożywienia Izolatu w KOROUN, jego pracownik poinformuje telefonicznie o konieczności ponownego przesłania Izolatu.
- c) Izolat należy przysyłać na płytce Petriego z odpowiednim podłożem oraz na wymazówce z podłożem transportowym.
- d) Optymalnym podłożem transportowym dla drobnoustrojów wymagających: *Streptococcus* spp., *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus* spp., *Listeria monocytogenes* jest podłoże z dodatkiem węgla aktywnego.

Uwaga! KOROUN wymaga przesyłania Izolatów na dwóch podłożach, ponieważ:

- w sytuacji, gdy w KOROUN nie ożywiono Izolatu i nie ma możliwości jego ponownego przesłania, Izolat nadal można zidentyfikować i określić jego serotyp lub grupę serologiczną metodą niehodowlaną (PCR), wykorzystując w tym celu jego DNA wyizolowany z martwej masy bakteryjnej zebranej z płytki Petriego,
- Izolacja DNA z podłoża transportowego jest na ogół niemożliwa, ale zastosowanie tego podłoża w większości przypadków gwarantuje ożywienie hodowli, szczególnie po długim transporcie drogą pocztową.

2) Opakowanie, oznakowanie i transport Izolatu

- a) Przesyłane płytki Petriego oraz wymazówki z Izolatem należy czytelnie podpisać numerem oryginalnym szczepu.
- b) Przesyłane płytki Petriego oraz wymazówki z Izolatem należy zabezpieczyć przed zgnieceniem, uszkodzeniem oraz zmianami temperatury.
- c) Płytki Petriego oraz wymazówki z Izolatem należy transportować w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznaczonym jako „Materiał zakaźny”.
- d) W przesyłce obok zabezpieczonego Izolatu należy umieścić wypełnione i podpisane „ZLECENIE BADANIA do KOROUN” zapakowane w osobną kopertę (formularz Zlecenia jest dostępny na stronie www.koroun.edu.pl)
- e) Zabezpieczony Izolat należy przesłać do KOROUN w temperaturze pokojowej w możliwie jak najkrótszym czasie.

- f) Zbyt długie przetrzymywanie jak i transport Izolatu może powodować utratę żywotności bakterii, szczególnie tych wrażliwych (pneumokoków, pałeczek hemofilnych czy dwoinek Gram-ujemnych).
- g) Za przygotowanie i przesyłanie Izolatów do KOROUN odpowiada Zleceniodawca.

II. Procedura pobierania i przesyłania Materiału biologicznego do diagnostyki molekularnej.

1. Zasady ogólne

- 1) KOROUN przeprowadza badania molekularne Materiałów biologicznych pobranych od pacjentów z zakażeniami inwazyjnymi nabytymi poza szpitalem.
- 2) Materiał pobrany do badań jest traktowany jako zakaźny.
- 3) Materiały biologiczne (dalej określane jako: Materiały) pobrane bezpośrednio od pacjenta przesyłane są w celu identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia (określenie gatunku, serotypu, grupy serologicznej) z zastosowaniem metody niehodowlanej (PCR).
- 4) Metoda ta polega na wykrywaniu w materiale klinicznym pobranym od pacjenta sekwencji kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) specyficznych dla określonych gatunków, grup i typów drobnoustrojów.
- 5) W przypadku podejrzenia wystąpienia zakażenia inwazyjnego należy przyjąć schemat postępowania diagnostycznego, w którym zabezpiecza się odpowiednią ilość Materiału pobranego od chorego na badania molekularne, przed rozpoczęciem badań mikrobiologicznych i biochemicznych.
- 6) Jeśli wynik preparatu mikroskopowego oraz hodowli prowadzonej w lokalnym laboratorium szpitalnym jest ujemny po 24 godzinach od pobrania Materiału od chorego, próbki przeznaczone na badania molekularne należy przesłać do KOROUN.
- 7) Jeśli po wysłaniu Materiałów na badania molekularne w laboratorium uda się wyhodować czynnik etiologiczny zakażenia, należy o tym bezzwłocznie poinformować KOROUN i wysłać do badań Izolat wyhodowany od pacjenta.
- 8) Jeśli przed ustaleniem etiologii zakażenia doprowadzi do zgonu pacjenta, do badania w KOROUN należy przesłać Materiały pobrane śródsekcyjnie. Należy pamiętać, że identyfikacja rzeczywistych bakteryjnych czynników etiologicznych zakażenia w Materiałach śródsekcyjnych jest trudna i często kończy się niepowodzeniem

z powodu kontaminacji próbek florą endogenną. W krótkim czasie po zgonie pacjenta może dojść i zazwyczaj dochodzi do namnażania i przemieszczania się flory endogennej, która nie była przyczyną zakażenia/zgonu. Dlatego, Materiał powinien być pobierany jak do badań mikrobiologicznych i możliwie szybko po zgonie, z co najmniej dwóch (lepiej więcej) różnych tkanek/narządów i jak najszybciej dostarczony na badania.

UWAGA! W przypadku pobierania materiałów śródsekcyjnych do badań mikrobiologicznych należy stosować te same zasady jak przy pobieraniu materiałów przyżyciowo. Należy unikać kontaminacji próbki i bezwzględnie stosować sterylny sprzęt i pojemniki,

9) Wartość badania mikrobiologicznego zależy w zasadniczy sposób od jakości Materiału przeznaczonego do badania. Dlatego nawet przy zastosowaniu najdokładniejszych technik mikrobiologicznych nie można oczekiwać prawidłowego wyniku, jeśli do badań pobrano niezalecany Materiał lub pozyskano go i transportowano w niewłaściwy sposób. Prawidłowe pobranie Materiału do badania i jego właściwy transport do KOROUN stanowią podstawę prawidłowej diagnostyki.

2. Informacje szczegółowe

1) Sposób pobierania Materiału

- a) Stosowany sposób pobierania Materiału do badań nie może zmieniać jego właściwości.
- b) Materiał pobiera lekarz, profesjonalnie przeszkolona pielęgniarka lub diagnosta laboratoryjny, zgodnie z odpowiednimi procedurami określonymi, w danej jednostce. Materiał należy pobrać możliwie najszybciej, najlepiej przed podaniem pierwszej dawki antybiotyku. Jeśli pacjent jest w trakcie antybiotykoterapii, materiał należy pobrać przed kolejną dawką leku, ale nie później niż w ciągu 72 godzin od włączenia antybiotykoterapii.
- c) KOROUN zastrzega sobie prawo do odmowy wykonania badania Materiałów pobranych później lub nieprawidłowo zabezpieczonych.

2) Rodzaj i objętość pobieranego Materiału

- a) w przypadku Materiałów pobranych przyżyciowo wymagane jest **co najmniej**:
 - 200 µl płynu mózgowo-rdzeniowego (pmr),

- 1,5 – 3 ml krwi pełnej pobranej na antykoagulant (EDTA, cytrynian, heparyna),
- 2 ml surowicy krwi,
- 200 µl płynu z opłucnej, z otrzewnej lub płynu stawowego.

UWAGA! Przesłanie większej objętości Materiału umożliwia, w razie potrzeby, powtórzenie i rozszerzenie badań.

b) w przypadku Materiałów pobranych śródsekcyjnie należy pobrać:

- krew z komór serca; 2-3 ml od osób dorosłych oraz 0,5 – 1 ml od noworodków,
- skrawki śledziony, wątroby, nerek (o wielkości 0,5 x 0,5 x 0,5 cm),
- drobne fragmenty zmienionej chorobowo skóry.

3) Przechowywanie Materiału do momentu wysłania do KOROUN

a) Materiały pobrane przyżyciowo (patrz pkt. 2a) należy przechowywać w lodówce do 7 dni od daty pobrania. W przypadku dłuższego przechowywania (powyżej 7 dni od daty pobrania) Materiał należy zamrozić w -20°C (najlepiej w -70°C).

b) Materiały pobrane śródsekcyjnie (patrz pkt. 2b) należy przechowywać w lodówce do 2 dni, a w przypadku dłuższego przechowywania zamrozić co najmniej w -20°C , a najlepiej w -70°C .

4) Opakowanie, oznakowanie i transport Materiału

- a) Materiał powinien być przesyłany w jałowych szczelnie zamykanych i czytelnie opisanych imieniem i nazwiskiem lub inicjałami pacjenta probówkach lub pojemnikach.
- b) Objętość próbki lub pojemnika powinna być dobrana do objętości Materiału. Należy unikać przesyłania bardzo małych objętości płynów (np. krew, pmr) w dużych probówkach lub pojemnikach.
- c) Probówki lub pojemniki z Materiałem należy zabezpieczyć przed zgnieceniem, uszkodzeniem oraz zmianami temperatury.
- d) Probówki lub pojemniki z Materiałem należy transportować w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznaczonym jako Materiał zakaźny.
- e) W przesyłce obok zabezpieczonego Materiału należy umieścić wypełnione i podpisane „ZLECENIE BADANIA do KOROUN” zapakowane w osobną kopertę (formularz Zlecenia jest dostępny na stronie www.koroun.edu.pl).
- f) Dopuszczalny zakres temperatury transportu:

- Materiał biologiczny pobrany przyżyciowo najlepiej przesyłać kurierem, w temperaturze pokojowej. Jeżeli został zamrożony należy przesłać go na suchym lodzie lub w pojemniku z wkładem chłodzącym.
- Materiał pobrany śródsekcynie należy przesyłać kurierem w pojemnikach z wkładem chłodzącym. Jeżeli Materiał został zamrożony należy go przesłać na suchym lodzie.

UWAGA! Wysyłkę materiałów klinicznych pobranych śródsekcynie należy uzgodnić telefonicznie z KOROUN.

g) Dopuszczalny czas transportu:

- Materiał należy dostarczyć do KOROUN w możliwie najkrótszym czasie.
- KOROUN zastrzega sobie prawo do odmowy wykonania badania Materiału transportowanego dłużej niż dwie doby.
- Zbyt długie przetrzymywanie jak i transport Materiału może powodować rozpad komórek bakteryjnych, szczególnie tych wrażliwych (pneumokoki, pałeczki hemofilii, czy dwoinki Gram-ujemne) oraz degradację ich DNA.
- Za sposób pobierania i przesyłania Materiału do KOROUN odpowiada Zleceniodawca.

Izolaty i Materiały kliniczne należy przesyłać do KOROUN wraz z wypełnionym „ZLECENIEM BADANIA do KOROUN” na adres:

Krajowy Ośrodek Referencyjny

ds. Diagnostyki Bakteryjnych Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN)

Narodowy Instytut Leków

ul. Chełmska 30/34

00-725 Warszawa

Formularz Zlecenia badania znajduje się na stronie KOROUN (www.koroun.edu.pl).

W Zleceniu badania prosimy o zamieszczenie danych o pacjencie, terapii i załączonym materiale do badań oraz dokładny adres i telefon osoby, do której powinien być wysłany wynik badania.