

## Rekomendacje KORLD – 2019r.

Wykrywanie karbapenemaz u pałeczek  
*Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp.

### Test CIM (Carbapenem Inactivation Method)

Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)

Elżbieta Literacka

Test CIM (Carbapenem Inactivation Method) został opisany w literaturze przez zespół holenderski w 2015r. [1] jako test umożliwiający wykrywanie karbapenemaz u pałeczek *Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp. Test cechuje się bardzo wysoką czułością i swoistością, poza tym jest bardzo łatwy do wykonania i interpretacji. Na szczególne podkreślenie zasługuje niski koszt wykonania testu przy użyciu podstawowego, ogólnie dostępnego w każdym laboratorium sprzętu.

Zasada testu polega na hydrolizie karbapenemu (meropenemu) zawartego w krążku antybiogramowym przez karbapenemazę uwolnioną z lizatów komórek bakteryjnych, a następnie wykazanie utraty aktywności krążka (meropenemu) wobec szczepu wzorcowego *E. coli* ATCC 25922.

W celu wykonania oznaczenia, krążek z meropenemem (10µg) umieszcza się w probówce, zawierającej zawiesinę badanego izolatu bakterii, przygotowaną w jałowej wodzie destylowanej i inkubuje w temperaturze  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  przez 2 godziny (*Enterobacterales* i *Pseudomonas* spp.) lub 4 godziny (*Acinetobacter* spp.). W czasie inkubacji karbapenemaza uwolniona z komórek badanego szczepu powoduje hydrolizę meropenemu zawartego w krążku, przez co traci on swoją aktywność. Jeśli badany szczep nie wytwarza karbapenemazy, aktywność meropenemu (krążka antybiogramowego) zostaje zachowana. Po upływie inkubacji krążek przenosi się na podłoże agarowe Mueller-Hinton, posiane zawiesiną szczepu wzorcowego *E. coli* ATCC 25922. Po całonocnej inkubacji w temperaturze  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  odczytuje się strefę zahamowania wzrostu szczepu *E. coli* ATCC 25922 wokół krążka antybiogramowego. W przypadku, gdy badany izolat nie wytwarza karbapenemazy, widoczna jest wyraźna duża strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z meropenemem; w przypadku szczepu wytwarzającego karbapenemazę obserwuje się wyraźne zmniejszenie strefy zahamowania wzrostu. Poniżej zamieszczono szczegółowy opis wykonania i interpretacji wyników uzyskanych w teście CIM.

[1] van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. PLoS One. 2015 Mar 23;10(3):e0123690. doi: 10.1371/journal.pone.0123690. eCollection 2015. PubMed PMID: 25798828; PubMed Central PMCID: PMC4370852.

## Test CIM – procedura

### 1. Wykonanie testu

- I. Dla badanego izolatu bakterii przygotować 1 probówkę typu eppendorf
- II. Probówkę opisać na wieczku numerem badanego izolatu bakterii lub numerem kolejnym, przypisanym do danego izolatu
- III. Do probówki dodać 400 µl jałowej wody destylowanej
- IV. Do probówki dodać masę bakterii w ilości całej oczko ezy o objętości 10 µl  
Uwaga: Test CIM należy wykonywać dla świeżej 18-28 godzinnej hodowli bakterii uzyskanej na podłożu agarowym, zawierającym 5% krwi baraniej.
- V. Masę bakteryjną zawiesić w wodzie poprzez energiczne ruchy obrotowe ezy w palcach
- VI. Zawartość probówki dokładnie wymieszać przy użyciu wortexu przez około 5 sekund
- VII. Do próbki włożyć krążek antybiogramowy, zawierający meropenem (10 µg), starając się delikatnie zanurzyć krążek w zawieszynie bakterii
- VIII. Probówkę umieścić w ciepłarni laboratoryjnej (temp. 35±2°C) na 2 godziny (*Enterobacterales* i *Pseudomonas* spp.) lub na 4 godziny (*Acinetobacter* spp.)
- IX. Pod koniec inkubacji przygotować:
  - a. zawiesinę szczepu wzorcowego *E. coli* ATCC 25922 o gęstości 0,5 McF w soli fizjologicznej
  - b. przygotowaną zawiesinę szczepu wzorcowego posiać wymazówką (posiew w trzech kierunkach, tak jak przy przygotowywaniu antybiogramu) na szalkę Petriego zawierającą podłoże agarowe Mueller-Hinton
- X. Po zakończeniu inkubacji wyjąć krążek z meropenemem, lekko dociskając go do wewnętrznej powierzchni probówki, w celu usunięcia nadmiaru zawiesiny bakteryjnej
- XI. Położyć krążek na powierzchni agaru Mueller-Hinton, posianego uprzednio szczepem wzorcowym *E. coli* ATCC 25922.  
Uwaga: Na jednej szalce można ułożyć maksymalnie 6 krążków.
- XII. Szalkę umieścić w ciepłarni laboratoryjnej (temp. 35±2°C) na 18-28 godzin

## 2. Odczyt testu CIM

Odczyt testu polega na zmierzeniu średnicy strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z meropenemem (pomiąć rozlany wzrost bakterii widoczny bezpośrednio przy krążku z meropenemem).

## 3. Interpretacja testu CIM

- I. **Ø ≤17 mm – wynik dodatni – szczep wytwarza karbapenemazę**  
Uwaga: Dla szczepów wytwarzających karbapenemazę najczęściej obserwujemy całkowity brak strefy zahamowania wzrostu (strefa 6mm).
- II. **Ø 18-19 mm – wynik wątpliwy**
  - a. Test CIM należy powtórzyć:
    - a. użyć większej ilości masy bakteryjnej (*Acinetobacter* spp.)
    - b. przedłużyć inkubację zawiesiny bakteryjnej z krążkiem do 4 godzin (*Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp.);
    - c. próbkę, zawierającą zawiesinę bakterii bardzo dokładnie wymieszać na wortexie (10 sekund)
  - b. wykonać oznaczenie innym testem
- III. **Ø ≥20 mm – wynik ujemny – szczep nie wytwarza karbapenemazy**  
Uwaga: Dla szczepów nie wytwarzających karbapenemazy obserwujemy wyraźną, dużą strefę zahamowania wzrostu.
- IV. **Ø >17mm i pojedyncze kolonie obecne w strefie zahamowania wzrostu.**
  - a. Test CIM należy powtórzyć:
    - a. użyć większej ilości masy bakteryjnej (*Acinetobacter* spp.)
    - b. przedłużyć inkubację zawiesiny bakteryjnej z krążkiem antybiogramowym do 4 godzin (*Enterobacterales*, *Pseudomonas* spp.)
    - c. Uwaga: Pojedyncze kolonie, znajdujące się w strefie zahamowania wzrostu najczęściej wskazują na dodatni wynik testu CIM. U niewielkiego odsetka szczepów wytwarzających karbapenemazę, szczególnie *Acinetobacter* spp., nawet 1 kolonia znajdująca się w strefie zahamowania wzrostu może wskazywać na wynik dodatni.