



## **Test Carba NP i CarbAcineto - szybkie testy do wykrywania nabytych karbapenemaz u pałeczek *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. oraz *Acinetobacter* spp.**

### **Rekomendacje 2015**

Elżbieta Literacka<sup>1</sup>, Dorota Żabicka<sup>1</sup>, Marek Gniadkowski<sup>2</sup>, Waleria Hryniewicz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)

<sup>2</sup>Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków w Warszawie  
kontakt: [eliteracka@cls.edu.pl](mailto:eliteracka@cls.edu.pl)

Test Carba NP został opracowany przez zespół badaczy francuskich i opublikowany w 2012 roku, jako bardzo prosty biochemiczny test diagnostyczny dla laboratoriów mikrobiologicznych, umożliwiający szybkie wykrywanie karbapenemaz u pałeczek *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* spp. w czasie do 2 godzin [1, 2]. Test oparty jest na śledzeniu hydrolizy imipenemu przez karbapenemazy uwolnione z lizatów komórek bakteryjnych, zawieszonych w buforze, zawierającym czerwień fenolową. W wyniku hydrolizy imipenemu następuje zmiana pH środowiska reakcji (zakwaszenie), która obserwowana jest wizualnie, jako zmiana barwy czerwieni fenolowej na kolor żółty lub pomarańczowy. Wynik dodatni świadczy o wytwarzaniu karbapenemazy przez badany izolat bakterii. Oryginalne prace podkreślają 100% czułość i 100% swoistość testu Carba NP w przypadku szczepów *Enterobacteriaceae* oraz 100% swoistość i 94.4% czułość dla *Pseudomonas* spp. [1, 2]. W 2014 r. opublikowany został wariant testu, określony jako CarbAcineto, umożliwiający wykrywanie nabytych karbapenemaz u *Acinetobacter* spp., który różni się od testu Carba NP jedynie większą ilością masy bakteryjnej oraz roztworem używanym do lizy komórek bakteryjnych [3].

W Krajowym Ośrodku Referencyjnym ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) przeprowadzono ocenę wykrywania karbapenemaz przy użyciu testu Carba NP/CarbAcineto. Zaobserwowano 100% zgodność otrzymanych wyników z wynikami testów fenotypowych z użyciem inhibitorów karbapenemaz, hydrolizy imipenemu w ekstrakcie białkowym oraz PCR.

Badanie wykonano dla 60 szczepów *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. i *Acinetobacter* spp., wytwarzających karbapenemazy MBL, KPC lub OXA-48. Dla zdecydowanej większości szczepów, dodatni wynik testu obserwowano po 30 – 60 minutach, chociaż dla niektórych izolatów, zwłaszcza pałeczek *Acinetobacter* spp., był on dodatni dopiero po dwóch godzinach inkubacji. Zasadniczo nie obserwowano różnic w odczycie i interpretacji wyników w zależności od gatunku drobnoustroju i rodzaju wytwarzanej karbapenemazy. Dla nielicznych izolatów uzyskano wyniki wątpliwe, które wymagały powtórzenia lub potwierdzenia inną metodą.

**Podłożem zalecanym przez KORLD do hodowli bakterii w celu wykonania testów Carba NP/CarbAcineto jest podłoże Columbia z 5% dodatkiem krwi baraniej ze względu na 100% czułość i swoistość oraz najłatwiejszy odczyt i interpretację uzyskanych wyników.** Ponadto, wysoką czułość i swoistość testu Carba NP uzyskuje się dla komórek bakteryjnych hodowanych na podłożach nieselektywnych, takich jak: CPS (bioMerieux), CHROMagar Orientation (BD), UTI (OXOID), UTI Clarity (OXOID) oraz agar tryptozowo-sojowy (bioMerieux) i UriSelect 4 (Bio-Rad). Należy jednak zaznaczyć, iż barwnik zawarty w podłożach chromogennych ma wpływ na reakcję barwną obserwowaną w teście Carba NP, przez co odczyt testu jest trudniejszy. KORLD zdecydowanie nie zaleca wykonywania testu Carba NP/CarbAcineto z innych podłoży mikrobiologicznych, w tym z podłoża McConkey oraz Mueller-Hinton (także MH z dodatkiem krwi) ze względu na znacznie niższą czułość testów i możliwość stosunkowo częstego otrzymywania wyników fałszywie ujemnych, w zależności od producenta podłoża [4]. (Uwaga: W przypadku wykonania oznaczenia z podłoża innego niż podłoże Columbia z 5% krwią baranią, jedynie uzyskanie wyniku dodatniego testu Carba NP/Carb Acineto jest wynikiem wiarygodnym, natomiast w przypadku otrzymania wyniku ujemnego, test należy powtórzyć dla bakterii hodowanych na podłożu Columbia z dodatkiem krwi baraniej).

**Do badania każdorazowo i obowiązkowo należy dołączyć kontrolę dodatnią (izolat wytwarzający karbapenemazę) i ujemną (izolat niewytwarzający karbapenemazy) w celu oceny poprawności wykonanego oznaczenia.** W każdym laboratorium, które przystępuje do wykonywania testu Carba NP/CarbAcineto, należy równoległe prowadzić też klasyczne oznaczenie karbapenemaz metodami fenotypowymi, przynajmniej przez okres kilku miesięcy, dopóki laboratorium nie nabierze pewności, co do właściwego odczytu i interpretacji wyników testów Carba NP oraz CarbAcineto. Każda niezgodność pomiędzy wynikiem testów Carba NP/CarbAcineto, a testami fenotypowymi i/lub PCR jest zawsze sygnałem do uważnego sprawdzenia wykonanych oznaczeń. Należy również pamiętać o konieczności komunikowania

się z KORLD w sytuacji uzyskania ewidentnie pozytywnych lub niejasnych wyników oznaczeń karbapenemaz oraz nadsyłania szczepów zgodnie z wytycznymi KORLD.



**W świetle własnych doświadczeń, a także bardzo niepokojącego rozprzestrzeniania się szczepów pałeczek Gram-ujemnych, wytwarzających nabyte karbapenemazy w Polsce, uzyskanie wiarygodnego wyniku w krótkim czasie ma niebagatelne znaczenie, zarówno w przypadku postępowania terapeutycznego z pojedynczym pacjentem, jak i wszelkich działań kontrolno-interwencyjnych zgodnych z Rekomendacjami Ministra Zdrowia [5].**

**Testy Carba NP i CarbAcineto są polecane przez Krajowego Konsultanta w dziedzinie mikrobiologii medycznej - Prof. Walerię Hryniewicz oraz przez Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD) do rutynowego stosowania w laboratoriach mikrobiologicznych w diagnostyce izolatów niewrażliwych na karbapenemy. Dodatni wynik testu należy zawsze traktować jako sygnał do bezzwłocznego przekazania informacji Zespołowi ds. Kontroli Zakażeń Szpitalnych oraz lekarzowi prowadzącemu pacjenta.**

Piśmiennictwo

1. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012 Sep;18(9):1503-7
2. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;50(11):3773-6
3. Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. CarbAcineto NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol.* 2014 Jul;52(7):2359-64.
4. Dortet L, Brécard L, Poirel L, Nordmann P. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol.* 2014 May;63(Pt 5):772-6.
5. „Zalecenia dotyczące postępowania w przypadku zachorowań sporadycznych i ognisk epidemicznych wywołanych przez Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zalecenia Ministra Zdrowia dotyczące postępowania w przypadku identyfikacji szczepów bakteryjnych *Enterobacteriaceae* wytwarzających karbapenemazy typu KPC, MBL lub OXA-48”, opublikowane w lipcu 2012r. ([www.antybiotyki.edu.pl](http://www.antybiotyki.edu.pl))

**Test Carba NP****Schemat wykonania testu dla *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* spp.**

Dla każdego izolatu bakterii oznaczenie wykonujemy równocześnie w dwóch probówkach typu eppendorf, które należy opisać na wieczku numerem badanego izolatu bakterii, ponadto jedną z probówek (próbka właściwa) wyraźnie oznaczyć kropką	
 1 - próbka kontrolna	 1° - próbka właściwa
<b>Do obu probówek dodać po 100 µl buforu lizującego B-PER II <sup>1)</sup></b>	
<b>Do obu probówek dodać masę bakterii <sup>2)</sup></b>	
<b>Zawartość probówek dokładnie wymieszać na vorteksie (!)</b>	
<b>Do próbki 1 dodać 100 µl buforu A <sup>3)</sup></b>  Wyjętą z zamrożenia porcję buforu A można przechowywać w temp. pokojowej (na stole laboratoryjnym) i używać przez tydzień; buforu A nie wolno ponownie zamrażać (!)	<b>Do próbki 1° dodać 100 µl roztworu B</b>  Roztwór B otrzymujemy przez dokładne rozpuszczenie 12 mg preparatu TIENAM <sup>4)</sup> (imipenem z cylastatyną) w 1 ml buforu A. Roztwór B zawsze należy przygotować na świeżo, tuż przed dodaniem do próbki (!), w objętości potrzebnej do wykonania oznaczenia.
<b>Próbki dokładnie wymieszać na vorteksie (!)</b>	
<b>Inkubacja do 2 godzin w cieplarni laboratoryjnej (temp. 37°C)</b>	
<b>Odczyt i interpretacja wyników <sup>5)</sup></b>	
Odczytu testu, dla każdego izolatu, za każdym razem, dokonujemy poprzez porównanie barwy mieszaniny w obu probówkach (kontrolnej i właściwej), po dokładnym ich wymieszaniu (!)	

**1) Potrzebne odczynniki**

**Bufor B-PER II**, Bacterial Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Pierce, Cat: 78260 – 250 ml)

**TIENAM** (imipenem 500 mg + cylastatyna 500 mg)

**Czerwień fenolowa**; Phenol-red solution 0,5%, (SIGMA, Nr kat. P0290 – 100ml)

**Siarczan cynku**, heptahydrat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; Merck, Nr kat. 1088830500 – 0,5 kg).

*Siarczan cynku służy do przygotowania roztworu 1M (roztwór wyjściowy) i 10 mM (roztwór roboczy). Aby przygotować roztwór 1 M należy rozpuścić 2,87g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  w 10 ml wody destylowanej (przygotowany roztwór przechowywać w lodówce do wyczerpania). Aby przygotować roztwór 10mM należy roztwór 1M rozcieńczyć 100 razy, czyli 10  $\mu$ l roztworu 1 M dodać do 1ml wody destylowanej; roztwór 10mM należy przygotować na świeżo tuż przed dodaniem do buforu A<sup>3)</sup>.*

**2) Masa bakteryjna**

- KORLD zaleca aby masę bakterii zbierać wyłącznie z hodowli na podłożu agarowym Columbia z 5% dodatkiem krwi baraniej – wynik testu Carba NP jest wówczas najłatwiejszy do interpretacji, a czułość i swoistość testu wynosi 100%.
- Test najlepiej wykonywać ze świeżej hodowli bakterii (tj. na drugi dzień po wysianiu); wyjątkowo masę bakterii można zbierać z hodowli starszej, ale najwyżej 3-4 dniowej; test wykonany ze starszych hodowli jest trudniejszy do interpretacji.
- Orientacyjna ilość masy bakteryjnej, którą należy zawiesić w każdej z probówek (kontrolnej i właściwej) to około ¼ - ½ „oczka“ 10 mikrolitrowej ezy jednorazowej (niebieskiej).
- Masę bakteryjną najłatwiej zawiesić w buforze B-PER II, poprzez energiczne ruchy obrotowe ezy w palcach, znacznie trudniej zawiesić bakterie w roztworze, gdy poruszamy ezą w górę i dół.

**3) Bufor A – przygotowanie**

- Do 16,6 ml wody destylowanej dodać 2 ml 0,5% roztworu czerwieni fenolowej (dobrze wymieszanej).
- Przy użyciu pH-metru dokładnie ustalić pH 7,8 przez dodanie kroplami 1N NaOH.
- Po ustaleniu pH, do roztworu dodać 180  $\mu$ l 10 mM roztworu siarczanu cynku ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ).  
*Zaleca się przygotowywać większą wyjściową objętość buforu A, na przykład poprzez czterokrotne zwiększenie podanych wyżej objętości wody, czerwieni fenolowej i siarczanu cynku. Przygotowany bufor A rozporcjować do plastikowych probówek, na przykład po 5 ml (objętość 5 ml wystarcza do wykonania oznaczenia dla 25 izolatów bakterii) lub w innej objętości, w zależności od potrzeb i zamrozić w temp. minus 20 °C; w zamrożeniu roztwór A może być przechowywany przez kilka miesięcy. Po rozmrożeniu bufor A przechowywać w temp. pokojowej (na stole laboratoryjnym) i używać przez tydzień, buforu A nie wolno ponownie zamrażać (!)*

**4) TIENAM**

- Fiolkę zawierającą TIENAM w postaci proszku przechowywać w temperaturze lodówki.
- Tuż przed wykonaniem testu Carba NP należy odważyć potrzebną ilość preparatu i dokładnie rozpuścić w określonej objętości buforu A, zgodnie z przelicznikiem 12 mg TIENAM + 1 ml buforu A.
- TIENAM bardzo szybko traci swoją aktywność w roztworze dlatego w postaci rozpuszczonej nie może być zamrażany, ani przechowywany w lodówce nawet przez kilka godzin.

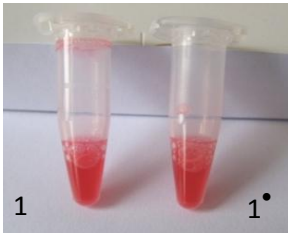
**5) Odczyt i interpretacja wyników**

- *Całkowity czas inkubacji testu Carba NP wynosi 2 godziny, ale odczytu dokonuje się już wcześniej, w trakcie inkubacji, bowiem dla niektórych izolatów bakterii wynik testu jest dodatni już po kilku- lub kilkunastu minutach.*

- Dla izolatów, dla których wynik jest wyraźnie dodatni po czasie krótszym niż 2 godziny, nie ma potrzeby przedłużania inkubacji do 2 godzin.
- Próbkę uznajemy ostatecznie za ujemną, jeśli wynik jest negatywny po upływie 2 godzin inkubacji. Nie należy odczytywać wyników po inkubacji trwającej dłużej niż 2 godziny, ani tym bardziej po 24 godzinach.
- W rzadkich przypadkach, w próbie z imipenemem (1<sup>\*</sup>), po inkubacji, możemy obserwować jedynie niewielką zmianę barwy na kolor lekko pomarańczowy (zmiana barwy budzi wątpliwości): zawsze w takiej sytuacji test należy powtórzyć, a w przypadku dalszych niejasności poczekać na wynik oznaczenia tradycyjną metodą fenotypową.
- Dla niektórych izolatów, po inkubacji, możemy zaobserwować dość wyraźną zmianę barwy w obu probówkach na kolor żółto-pomarańczowy: wynik taki nie podlega interpretacji, zawsze należy go zweryfikować inną metodą.

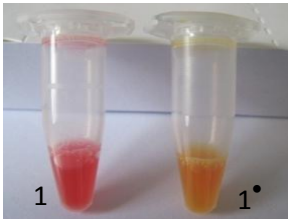
### 5) Interpretacja wyników uzyskanych w teście Carba NP

Odczytu testu, dla każdego izolatu, za każdym razem, dokonujemy poprzez porównanie barwy mieszaniny w obu probówkach (kontrolnej-1 i właściwej-1<sup>\*</sup>), po dokładnym ich wymieszaniu (!)



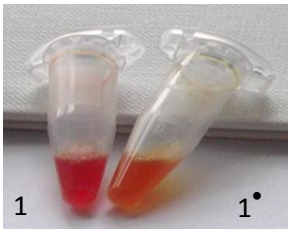
#### Wynik ujemny

Barwa mieszaniny w próbce bez imipenemu (1) i w próbce z imipenemem (1<sup>\*</sup>) jest czerwona.



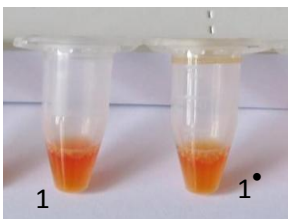
#### Wynik dodatni

Barwa mieszaniny w próbce bez imipenemu (1) jest czerwona, natomiast barwa mieszaniny w próbce z imipenemem (1<sup>\*</sup>) jest żółta lub wyraźnie pomarańczowa.



#### Wynik wątpliwy – zawsze należy go zweryfikować inną metodą

Barwa mieszaniny w próbce z imipenemem (1<sup>\*</sup>) nieznacznie różni się od barwy mieszaniny w próbce kontrolnej bez imipenemu (1). Zmiana barwy mieszaniny w próbce (1<sup>\*</sup>) budzi wątpliwości.

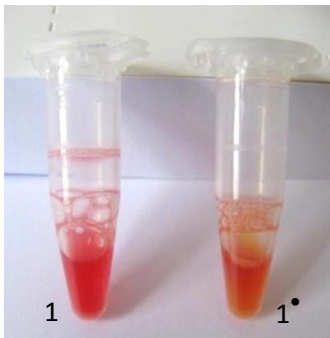


#### Wynik niepodlegający interpretacji – zawsze należy go zweryfikować inną metodą

W obu probówkach (1) i (1<sup>\*</sup>) barwa mieszaniny jest wyraźnie zmieniona.

**Test CarbAcineto – wykrywanie nabytych karbapenemaz u *Acinetobacter* spp.**

**Test CarbAcineto** zasadniczo wykonujemy i interpretujemy tak samo jak test Carba NP, jednakże w teście CarbAcineto **zamiast buforu lizującego B-PER II należy użyć 5M roztwór NaCl** (29,2 g NaCl rozpuścić w 100 ml wody destylowanej, przechowywać w temperaturze pokojowej do wyczerpania roztworu). **Do testu CarbAcineto należy pobrać dużo masy bakteryjnej** (całe oczko 10 mikrolitrowej ezy jednorazowej, niebieskiej). Pozostałe etapy testu oraz odczyt i interpretacja wyników jest identyczna jak w teście Carba NP. Zasadniczo, o dodatnim wyniku testu CarbAcineto świadczy zmiana barwy mieszaniny w probówce (1<sup>•</sup>) z imipenemem na kolor żółty lub pomarańczowy, przy niezmienionej barwie mieszaniny w porobówce kontrolnej (1). Dla niektórych izolatów wynik dodatni testu CarbAcineto obserwujemy dopiero po pełnych dwóch godzinach inkubacji, a o wyniku dodatnim często świadczy zaledwie pomarańczowa barwa mieszaniny w probówce z imipenemem (1<sup>•</sup>) (zdjęcie poniżej).

**Wynik dodatni testu CarbAcineto**

Probówka bez imipenemu (1) - czerwona barwa mieszaniny

Probówka z imipenemem (1<sup>•</sup>) - pomarańczowa/żółta barwa mieszaniny