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

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

Rekomendacje 2015

Elżbieta Literacka[1], Dorota Żabicka[1], Marek Gniadkowski[2], Waleria Hryniewicz[1]

[1] Zakład Epidemiologii i Mikrobiologii Klinicznej, Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów (KORLD)
[2] Zakład Mikrobiologii Molekularnej, Narodowy Instytut Leków w Warszawie
kontakt: 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 równolegle 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, Bréchard 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 wywoływanych 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)

Test Carba NP

Schemat wykonania testu dla *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonas* spp.

<table>
<tr><td colspan="2">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</td></tr>
<tr><td> 1 - próbka kontrolna</td><td> 1*- próbka właściwa</td></tr>
<tr><td colspan="2">Do obu probówek dodać po 100 µl buforu lizującego B-PER II [1)]</td></tr>
<tr><td colspan="2">Do obu probówek dodać masę bakterii [2)]</td></tr>
<tr><td colspan="2">Zawartość probówek dokładnie wymieszać na vorteksie (!)</td></tr>
<tr><td>Do próbki 1 dodać 100 µl buforu A [3)]

Wyjętą z zamrożenia porcję buforu A można przechowywać w temp. pokojowej (na stole laboratoryjnym) i używać przez tydzień; buforu A nie wolno ponownie zamrażać (!)</td><td>Do próbki 1* dodać 100 µl roztworu B

Roztwór B otrzymujemy przez dokładne rozpuszczenie 12 mg preparatu TIENAM [4)] (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.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Próbki dokładnie wymieszać na vorteksie (!)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Inkubacja do 2 godzin w cieplarce laboratoryjnej (temp. 37°C)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Odczyt i interpretacja wyników [5)]

Odczytu testu, dla każdego izolatu, za każdym razem, dokonujemy poprzez porównanie barwy mieszaniny w obu probówkach (kontrolnej i właściwej), po dokładnym ich wymieszaniu (!)</td></tr>
</table>

[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 µl roztworu 1 M dodać do 1ml wody destylowanej; roztwór 10mM należy przygotować na świeżo tuż przed dodaniem do buforu A[3].

[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 µl 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.

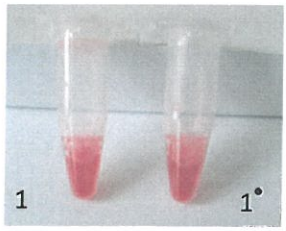
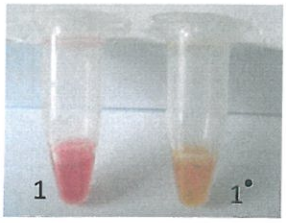
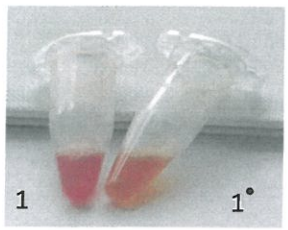
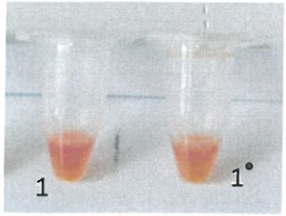
[5] Odczyt i interpretacja wyników

- *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.*
- *Próbki uznajemy ostatecznie za ujemne, 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°), po inubacji, 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.*

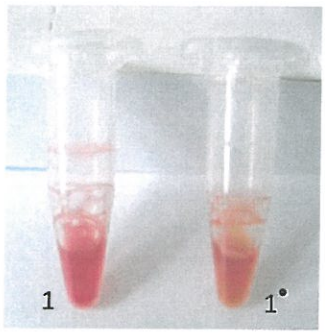
[5] Interpretacja wyników uzyskanych w teście Carba NP

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

	**Wynik ujemny** Barwa mieszaniny w próbce bez imipenemu (1) i w probówce z imipenemem (1°) jest czerwona.
	**Wynik dodatni** Barwa mieszaniny w probówce bez imipenemu (1) jest czerwona, natomiast barwa mieszaniny w probówce z imipenemem (1°) jest żółta lub wyraźnie pomarańczowa.
	**Wynik wątpliwy – zawsze należy go zweryfikować inną metodą** Barwa mieszaniny w probówce z imipenemem (1°) nieznacznie różni się od barwy mieszaniny w probówce kontrolnej bez imipenemu (1). Zmiana barwy mieszaniny w probówce (1°) budzi wątpliwości.
	**Wynik niepodlegający interpretacji – zawsze należy go zweryfikować inną metodą** W obu probówkach (1) i (1°) 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*) z imipenememem 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 imipenememem (1*) (zdjęcie poniżej).

	**Wynik dodatni testu CarbAcineto** Probówka bez imipenemu (1) - czerwona barwa mieszaniny Probówka z imipenememem (1*) - pomarańczowa/żółta barwa mieszaniny