

- BLUE CARBA -
Detección rápida de carbapenemasas
directo de placas de cultivo¹

Protocolo del Servicio ANTIMICROBIANOS, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"
Adaptado de Pires J. y cols²

Alcance del ensayo:
se podrán evaluar **todos** los bacilos gram negativos

A) Preparación y almacenamiento de Solución A (csp 100 ml):

- (i) Disolver 40 miligramos de azul de bromotimol en 100 ml H₂O (concentración final 0.04%). Se encuentra disponible comercialmente solución de esta concentración.
- (ii) Disolver en la SN anterior 1,6 miligramos de SO₄Zn (concentración final 0.1 mmol/L). *Nota 1: algunas sales de SO₄Zn son penta o hepta hidratadas, por lo que deberá realizar los ajustes de cálculos correspondientes para lograr la cc de 0.1 milimolar*
- (iii) Medir pH de la SN y ajustar a pH a 7.0. CRITICO !!!
- (iv) Filtrar con Millipore (opcional)

Conservar en heladera (extemporánea). Vigile que no se produzca decoloración espontanea hacia el verde/amarillo durante conservación.

B) Procedimiento:

1. Por cada cepa a ensayar, utilice 2 pocillos de una policubeta de 96 pocillos o dos tubos eppendorf. En cada uno de ellos, agregue:
 - (i) 100 microlitros de Solución A (pocillo/tubo control) o
 - (ii) 100 microlitros Solución A + imipenem 3 mg/ml (pocillo/tubo de reacción).

Nota 2: Se puede utilizar la formulación farmacéutica de imipenem (frasco ampolla Tienam-MSD y/o genéricos). La Solución A + imipenem (3 mg / ml) tiene que ser preparado en el momento del ensayo. Sin embargo, pueden ser preparados de antemano los lotes de polvos de imipenem (pesadas) y mantenerse a 4 ° C durante 2 semanas o > de 2 meses en freezer, si no se añade la solución A.

Nota 3: recuerde incluir una cepa control positivo (cuyo genotipo de productor de carbapenemasa sea conocido, por ejemplo alguna perteneciente a la colección de cepas enviadas en el Programa Nacional de Control de Calidad en

Bacteriología) y un control negativo (cuyo genotipo de NO productor de carbapenemasa sea conocido, por ejemplo alguna perteneciente a la colección de cepas ATCC).

2. Agregue en cada pocillo o tubo, con ansa o palillo de madera, > 5 colonias crecidas en placa de MH, TSA, BHI, CLDE, placa colorimétrica (MH+resazurina), Agar Sangre o ChromKPC® y resuspéndala en el líquido de reacción.

Nota 4: nunca utilice medios basados en la fermentación de hidratos de carbono como Levine o Mc Conkey que producirán un test invalido. Si ello ocurriera, repita el ensayo partiendo de otro tipo de agar.

Nota 5: la hemoglobina de los medios suplementados con sangre podría producir un viraje espontáneo del tubo control del azul a verde. En caso que ello ocurriera, utilice los criterios III y V para interpretar el ensayo como positivo o negativo, respectivamente (ver abajo punto 6)

3. Tape la policubeta o los tubos eppendorf.
4. Incube a 35-37°C por un máximo de 2 horas en agitación (si no cuenta con un agitador continuo, agite manualmente cada 15 minutos).
5. Lectura a ojo desnudo del color de cada pocillo/tubo.
6. Interpretación

Color pocillo/tubo control (sin imipenem)	Color pocillo/tubo reacción (con imipenem)	Interpretación	Criterio No.
Azul	Amarillo	Carbapenemasa positivo	I
Azul	verde	Carbapenemasa positivo	II
Verde	Amarillo	Carbapenemasa positivo	III
Azul	Azul	Carbapenemasa negativo	IV
Verde	Verde	Carbapenemasa negativo	V
Amarillo	Azul o verde o amarillo	Test inválido	VI

El tiempo de reacción usualmente requerido por los distintos mecanismos es:

KPC: 2 a 30 minutos

MBLs (NDM, VIM, IMP, SPM): 30 min a 1 hora

OXAs: 1 a 2 horas

7. Desempeño: la eficiencia final del método dependerá de la prevalencia local de mecanismos circulantes, a saber:

	Mecanismo de resistencia	Pires J. y cols ²	Pasteran F. y cols ¹
Sensibilidad	KPC	100%	100%
	MBLs	100%	100%
	OXAs	OXA-48: 100% OXAs Acinetob.: 100%	OXA-48: 90% OXAs Acinetob.:100% OXA-163/247 (Arg.): 20%
Especificidad	No productores de carbapenemasa	100%	100%

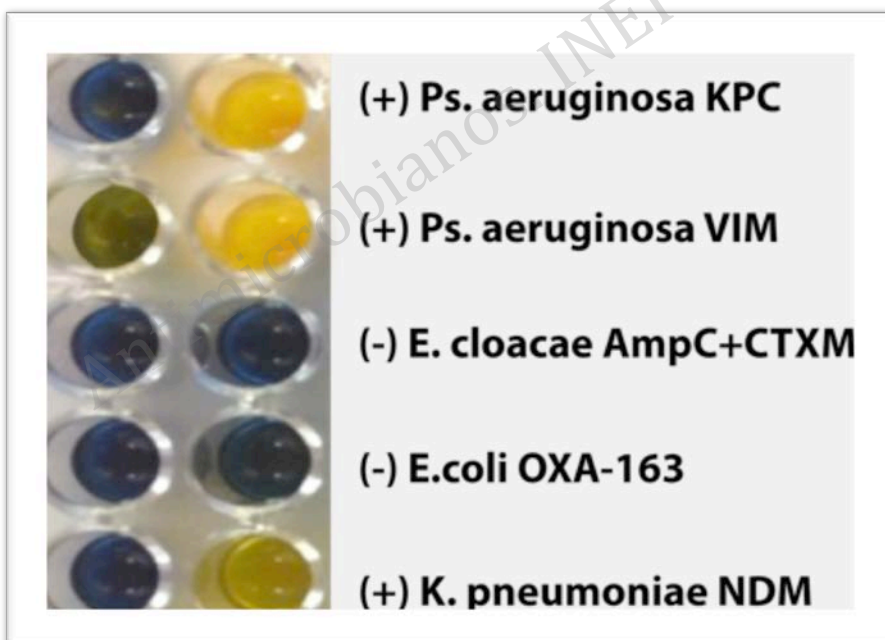
CONSIDERANDO FINAL:

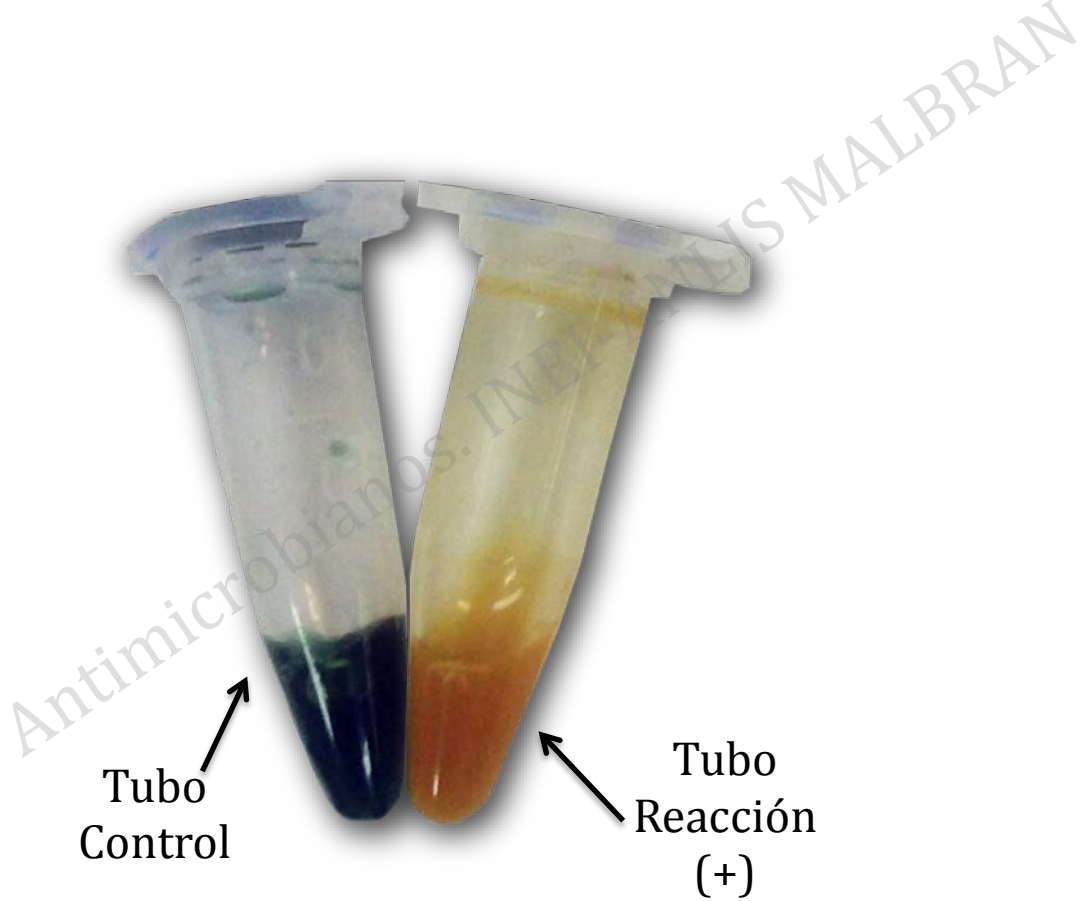
Un resultado POSITIVO del BLUE-CARBA indicará invariablemente cepa productora de carbapenemasa. Por el contrario, en escenarios con aumento de la prevalencia de OXA-48/OXA-48-like, como en Argentina, un resultado negativo con el BLUE-CARBA requerirá de pruebas adicionales para definir la presencia de esta carbapenemasa.

Ejemplo:

La interpretación del BLUE-CARBA se muestra entre paréntesis

Control Reacción





Bibliografía:

1. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, Gomez S, Corso A; ReLAVRA Network Group. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar 25. pii: JCM.03026-14
2. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 4281-3.

Consultas:

atb@anlis.gov.ar
fpasteran@anlis.gov.ar

Tel/Fax 5411 4303 2812

Versión 2
© 07-04-2015