

## - CARBA NP DIRECT - Detección rápida de carbapenemasas directo de placas de cultivo\*

Protocolo del Servicio ANTIMICROBIANOS, Laboratorio Nacional de Referencia  
en Antimicrobianos, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"  
*Adaptado de Pasteran F. y cols<sup>1</sup>*

(\*) "CARBA NP DIRECT" NO REQUIERE PASO PREVIO DE  
EXTRACCION NI BUFFER DE LISIS  
a diferencia de otras variantes descritas de esta técnica<sup>2-5</sup>

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

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

(i) Disolver 50 miligramos de rojo fenol en 100 ml H<sub>2</sub>O (concentración final 0.05%).

(ii) Disolver en la SN anterior 1,6 miligramos de SO<sub>4</sub>Zn (concentración final 0.1 mmol/L).

*Nota: si utiliza SO<sub>4</sub>Zn·7H<sub>2</sub>O (hepta hidratado) se requerirán 2.87 mg cada 100 ml para lograr la cc de 0.1 milimolar*

(iii) Agregar en la SN anterior, 100 microlitros de Triton X-100 (concentración final 0.1% vol/vol).

*Nota: la formación de espuma no afecta a la SN ni el desempeño posterior del test.*

(iv) Medir pH de la SN y ajustar a pH a 7.8 - **CRITICO !**

Conservar en heladera (extemporánea) y al abrigo de la luz. Vigile que no se produzca decoloración espontánea hacia el naranja/amarillo durante conservación. Si ello ocurre, lleve a pH 7,8 con SN de álcali concentrada.

B) Preparación y almacenamiento de Solución B (csp 1 ml, equivalente a 10 reacciones o cepas): agregue a 1 ml de Solución A, unos 6 mg de imipenem puro (potencia 100%) o 12 mg de la formulación farmacéutica de imipenem/cilastatin (frasco ampolla Tienam-MSD y/o genéricos de potencia aprox. del 50%) (concentración final 6 mg/ml de imipenem).

*Nota: la Solución B tiene que ser preparada en el momento del ensayo. Podrá ser conservada en heladera a 4°C hasta 3-5 días. Se deberá verificar la integridad del imipenem de la solución B mas allá de las 24 hs de su preparación con respectivos controles positivo y negativo.*

*No se recomienda preparar menos de 1 ml de Solución B ya que la pesada equivalente podría estar asociada con errores de magnitud considerable.*

C) Procedimiento:

1. Por cada cepa a ensayar, utilice 2 tubos eppendorf. En cada uno de ellos, agregue:
  - (i) 100 microlitros de Solución A (tubo control)
  - (ii) 100 microlitros de Solución B (tubo de reacción).

*Nota: recuerde incluir siempre 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. Inocule cada tubo con la cepa incógnita, utilizando para cada uno de ellos, una ansada completa de 1 microlitro, partiendo de cultivo fresco crecido en placa de MH, TSA, BHI, Agar Sangre.

*Nota : las especies bacterianas con capacidad de fermentar hidratos de carbono en medios de cultivos como Levine, Mc Conkey o CLDE podrían presentar un test invalido (tubo control amarillo). Si ello ocurriera, repita el ensayo partiendo de otro tipo de agar. Colonias azules en medio ChromKPC® (generalmente Klebsiella pneumoniae) podrían virar el color de la solución al marrón, con una decoloración hacia el verde en caso de un ensayo positivo.*

3. Tape los tubos eppendorf y agite vigorosamente en vórtex por 5 a 10 segundos.
4. Incube a 35-37°C por un máximo de 2 horas. Se recomienda inspeccionar a ojo desnudo los tubos cada 15 minutos.

5. Interpretación

Color tubo control (sin imipenem)	Color tubo reacción (con imipenem)	Interpretación	Criterio No.
Rojo	Naranja	<b>Carbapenemasa positivo</b>	I
Rojo	Amarillo	<b>Carbapenemasa positivo</b>	II
Naranja	Amarillo	<b>Carbapenemasa positivo</b>	III
Rojo	Rojo	Carbapenemasa negativo	IV
Naranja	Naranja	Carbapenemasa negativo	V
Amarillo	Rojo o Naranja 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

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

	Mecanismo de resistencia	Pasteran F. y cols <sup>1</sup>
<b>Sensibilidad</b>	KPC y otras carbapenemasas de clase A	100%
	MBLs	98%
	OXAs	OXA-48: 94% OXAs Acinetob.:95% <b>OXA-163 (Arg.): 20%</b>
<b>Especificidad</b>	No productores de carbapenemasa	100%

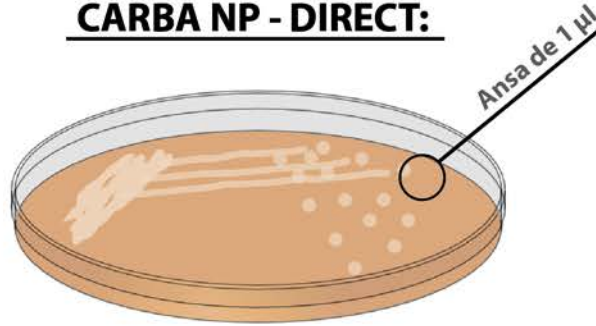
VALOR PREDICTIVO POSITIVO: 100%

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: 97%

### CONSIDERANDO FINAL:

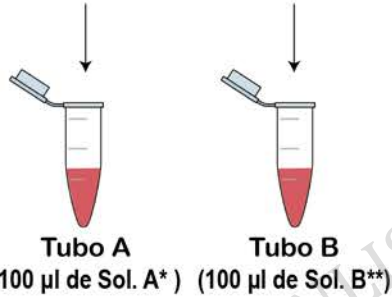
**Un resultado POSITIVO del CARBA-NP DIRECT indicará invariablemente cepa productora de carbapenemasa. Por el contrario, un resultado negativo del CARBA-NP DIRECT podría requerir pruebas adicionales para descartar la presencia de carbapenemasas.**

## **CARBA NP - DIRECT:**



**BACILO GRAM NEGATIVO**  
(cultivo bacteriano puro)

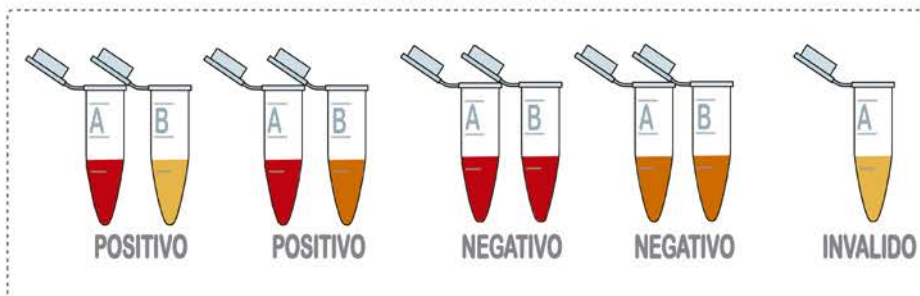
Resuspender ansa completa  
de 1 µl en cada uno de los tubos  
conteniendo 100 µl de Sol. A\* o B\*\*



**Vórtex 5 - 10 segundos**  
(la formación de espuma no interfiere con el test)

**Incubar a 35 °C**  
**y monitorear durante 2 horas**

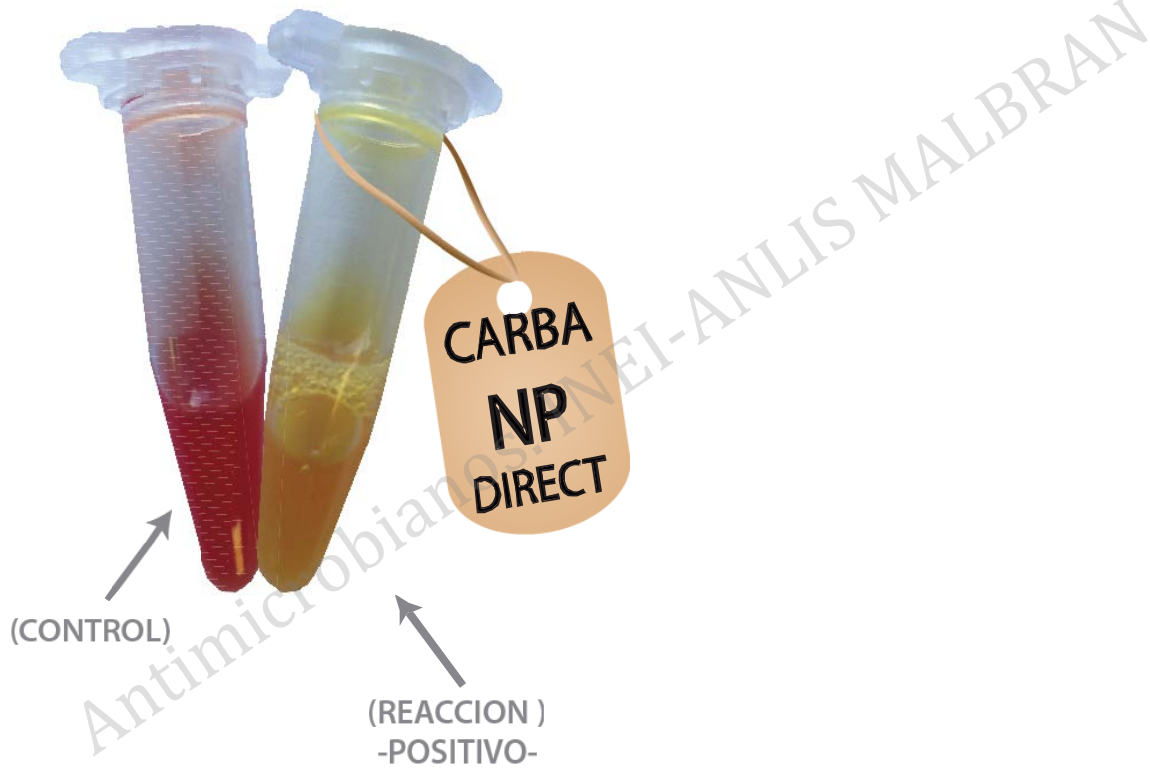
**Interpretación:**



\***Sol. A:** solución acuosa de rojo fenol 0.05% +  $\text{SO}_4\text{Zn}$  10mM + 0.1% (v/v) de Triton X-100.  
Ajustado a pH=7.8.

\*\***Sol. B:** Sol A + 6 mg/ml imipenem o 12 mg/ml imipenem-cilastatin (formulación inyectable)

Ejemplo:



### Bibliografía:

1. Pasteran F, Tijet N., Melano R, Corso A. Simplified protocol for Carba NP Test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2015 Dec;53(12):3908-11.2.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. CLSI M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
3. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 18:1503–1507.
4. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, Hayden MK, Patel R. 2013. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase producing gram-negative.
5. Osterblad M, Hakanen AJ. 2014. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. Antimicrob Agents Chemother 58:7553–7

### Consultas:

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

Tel/Fax 5411 4303 2812