UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2017 THESE 2017 TOU3 2016

THESE

DETECTION DES CARBAPENEMASES CHEZ LES ENTEROBACTERIES

Revue de la littérature et évaluation de techniques phénotypiques

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

obtenu après soutenance

du Mémoire du DIPLÔME d'ETUDES SPECIALISEES de BIOLOGIE MEDICALE

(conformément à l'article 25 de l'arrêté du 8 avril 2013 relatif au régime des études en vue du diplôme d'état de Docteur en Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement
par
Aurélie LECOUR
née le 16/10/1989 à Figeac

le 24 avril 2017 à Toulouse

CO-DIRECTEURS DE THESE :

Dr Christophe GARCIE – Dr Damien DUBOIS

JURY

M^me^ le Professeur Christine ROQUES-CESCHIN	**Président**
M. le Professeur Pierre DELOBEL	**Assesseur**
M. le Docteur Damien DUBOIS	**Co-directeur**
M. le Docteur Christophe GARCIE	**Co-directeur**

Remerciements

A mon président du jury,
Madame le Professeur Christine Roques-Ceschin,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury, vous avez pris part à ma formation depuis la faculté et je vous en suis très reconnaissante.
Veuillez recevoir ici l'expression de mes sentiments les plus respectueux.

A Monsieur le Professeur Pierre Delobel,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je souhaitais vraiment inclure votre vision dans cette discussion clinico-biologique, vous qui êtes confronté directement à l'attente de nos résultats pour leur interprétation clinique.
Soyez assuré de ma sincère considération.

A mon directeur de thèse,
Monsieur le Docteur Christophe Garcie,

Tu me fais l'honneur d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.
Tu as énormément contribué à ma formation en bactériologie, en tant que co-interne tout d'abord. Je tiens à te remercier pour ta disponibilité dans l'avancée de ce travail ainsi que tes précieux conseils. Ta vision rigoureuse et scientifique, m'a vraiment beaucoup apportée.
Je souhaite t'exprimer ma profonde reconnaissance pour ton soutien et ta confiance.

A Monsieur le Docteur Damien Dubois,

Je souhaite te remercier d'avoir accepté de co-diriger ce travail de thèse. Ce travail n'aurait pas abouti sans ta participation active. Tu as particulièrement bien ciblé le sujet que je souhaitais développer pour ma thèse. Les échanges constructifs que nous avons pu avoir ont permis l'orientation de mon travail et l'optimisation des résultats.
Reçois ici l'expression de ma profonde gratitude.

A mes amis,

A mes Fuckettes,

Heloïse, mon foufou, merci d'avoir été là depuis cette 2ème année à la fac avec tous ces délires en TP, toutes ces soirées et ces voyages. Tu es une meilleure amie en or sur qui on peut toujours compter. Même si la distance nous éloigne un peu maintenant, tu es toujours là pour moi et j'espère que tu vas pouvoir construire la vie que tu espères à Paris (et rencontrer le prince charmant !). Tu es et seras toujours dans mon cœur et dans ma famille.

Quiterie, ma Quit, avec toi on ne s'ennuie jamais, tu as toujours un nouveau projet ou une nouvelle idée ! On peut toujours compter sur toi, que tu sois à Toulouse ou à l'autre bout du monde. Merci d'être là, merci pour tes messages à toute heure qui remontent le moral ! Je ne te dirai jamais assez à quel point tu es géniale et une amie parfaite.

Céline, ma bébé, une amie comme tout le monde rêverait d'avoir, toujours la pour faire la fête et se retrouver pour papoter pendant des heures. Merci pour tout !!

Lulu, ma pioup, je me souviendrais toujours de ce crit toutes les 2, abandonnées par toutes les autres fuckettes ! Merci d'être toujours là (de rester à Toulouse !) et d'être toujours autant motivée pour organiser des repas et des brunchs ! Merci également pour tous tes super conseils pharmaceutiques, grâce à toi Albane est en pleine forme !

Marine, mon boubou, merci pour toutes ces années de délires à la fac, tu as été un binôme en or, heureusement que tu étais là pour qu'on ait de bonnes notes en TP ! Merci également d'avoir été là pendant nos révisions de l'internat et nos longues après-midis à faire des dossiers d'annales. Merci au DU qualité (génial !) qui te fait revenir à Toulouse et qui nous permet de te voir plus souvent !

Lolo, alias la Paste ! Merci de nous faire autant rire, avec ta folle playlist deezer et ta super Bose qui tombe en rade de batterie en plein milieu de la soirée ! On ne s'ennuie jamais avec toi (les chauffeurs de camion en Scandinavie se souviennent encore de toi dans les embouteillages !) J'espère avoir l'occasion et l'honneur de rencontrer un jour Tim !

Florie, ma Flo, Merci de nous régaler avec tes photos ensoleillées! Vous avez l'air de vous régaler à l'autre bout du monde, mais j'espère que vous allez rentrer un de ces 4, on aimerait bien vous retrouver (et on espère encore vous voir cet été !). Merci pour ces soirées au foyer

en première année, autour d'une petite tisane pour papoter entre les révisions ! Tu me manques ma flo, alors pense à revenir !!

Ade, même si tu es partie loin (on imagine encore que tu es dans le grand Nord !), c'est toujours un plaisir de te retrouver. Et Merci de nous ramener en fin de soirée ! ;-)

Sissou, tu es partie dans mon pays natal ! Merci d'être toujours présente et de nous faire rêver quand tu t'endors sur un canapé en milieu de soirée !

Aux bozos, pour toutes super soirées à la fac, WEI, WED, WE ski, semaine à Platja… J'espère qu'il y en aura encore plein !
Jérôme, le roi de la night, merci d'être toujours aussi motivé, and thank you for your English speaking! Doudou et Solène, merci pour cette folle soirée à votre mariage, on est ravis de vous voir cet été ! Toto (j'ai toujours la vidéo de la soirée à Platja !) et Alexandra, Mathieu (ce serait bien que tu sortes des Pyrénées un peu !!), Buff, mon poussin, et Lucie, Nico et Lucille (et vos petits bouts, merci pour tous les conseils « baby » !).

A Inès, Mathilde, Marie, Camille, et Margaux, merci pour cette première année à Toulouse, sans vous, rien de tout ça n'aurait été pareil, de belles amitiés sont nées dans son foyer, je vous souhaite à toutes beaucoup de bonheur.

A mes amis de Castres,
Lucie, ma choupi, il s'en est passé du temps depuis cette coloc rue Parga avec ces soirées interminables chez Tonton, mais c'est toujours un bonheur de te retrouver, tu me manques beaucoup à Toulouse. Et Amélie, je croise fort les doigts pour ton concours et j'espère que tu trouveras un poste à Toulouse!

Nico et Cécile, merci pour ces super repas et soirées ensemble, vous êtes un couple en or, des amis toujours présents, sur qui on peut toujours compter. Votre mariage était une soirée inoubliable.

Camille T., merci pour toutes ces belles et nombreuses années, ces séjours à La Llagonne, à Beauséjour ou Oléron. Je te souhaite plein de bonheur avec Olivier et le futur baby !

A la team Bonnery, Jojo, Benja, Clayre, Martin, Elsa, Marie, Camille, merci pour toutes ces belles années, tous ces moments passés avec vous et toutes ces belles amitiés !

A toutes les belles rencontres de la fac : Jeff (le super DJ pour animer nos soirées !), Loïc et Charlotte (pour toutes ces belles vacances ensemble, vivement qu'on reparte au ski !), Ruff et Camille (pour ces grosses nights pendant la semaine au ski !), Julien et Pauline, Lolo et Marion…
Merci également à Paul G pour toutes ces prises de décision et pour ces WE dans le Lot !! Edouard, merci pour ta potion magique, je ne suis pas sûre de la re-goûter !!

A mes co-internes et rencontres de l'internat, Catherine, pour avoir gardé le secret l'année dernière, et pour ces pauses interminables à papoter en stage, Cédric, pour tes super goûters en DU, Jess et Yannick pour ces cours d'anglais, Sandrine, pour ce super stage de parasito, Brice, la gestion de l'emploi du temps stage/piscine, Marie L., pour cette super session ski. Merci également à Hugo, Laure, JB, Carole, Vincent, Juliette, Shérazade, Alice-Anne…

Aux amis d'Arnaud, pour tous ces apéros interminables, Benjamin et Cyrielle (et le futur baby !), Patrice et Amanda (encore merci pour les tapas !), Pierre et Laure (nos nouveaux voisins !), Jean-Phi (j'attends la photo cet été !), Greg et Julie (merci de m'avoir permis d'avancer ma thèse et merci pour tous ces brunchs, désolée qu'Albane soit aussi entreprenante avec Gabin !), Rémi et Geneviève (merci pour ce super séjour au Québec et à New-York)…

Merci également **à toute l'équipe de l'hôpital Joseph Ducuing** pour m'avoir permis de passer un dernier stage dans la bonne humeur, la rigolade (et le travail !). Vous êtes une super équipe, je vous souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite.

A ma belle-famille,

Christian et Josette, merci de m'avoir accueillie dans votre famille, et merci de nous aider dans l'organisation des évènements de cette année !
Guillaume, Sylvie, Clément et Mathilde, une belle famille avec qui on partage de beaux moments.

A mes parents,
Merci d'avoir toujours été là pour moi. Si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à vous. Vous avez su m'accorder votre confiance dans mes choix et êtes toujours là pour m'aider et m'écouter. Merci à tous les 2 pour votre soutien et votre patience au quotidien!

A mes sœurs, mes confidentes, mes meilleures amies,
Delphine, pour ton sens de l'organisation et ton écoute, tu m'as beaucoup manquée au cours de cette dernière année… Je suis ravie que tu sois (enfin !) rentrée même si je sais que ce ne sera que de courte durée, on viendra te voir là ou tu seras !

Charlotte, pour ta connerie et ta motivation permanente ! Merci d'avoir toujours été là, les soirs où j'étais seule à l'appartement, à regarder des films neuneus toute la soirée. C'est dommage que tu sois à Montpellier (mais c'est déjà mieux qu'en Australie !!)

Je vous aime mes sisters, merci d'être toujours présentes, dans les bons moments comme dans les moins bons.

A **Albane**, mon petit rayon de soleil, toujours là pour nous donner le sourire (et nous empêcher de bosser la thèse !!), tu as changé notre vie il y a maintenant 10 mois, pour le plus grand bonheur de sa maman.

A **Arnaud**, merci pour tout, je ne te le dirai jamais assez. Merci d'avoir relu ma thèse et merci de me supporter au quotidien. Tu es mon pilier, la personne qui me donne le sourire et bientôt mon mari ! Je t'aime … et vivement 2018 !! ;-)

TABLES DES MATIÈRES

I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 18

I.A LA RESISTANCE AUX CARBAPENEMES CHEZ LES ENTEROBACTERIES 18

I.A.1 Les entérobactéries 18

I.A.1.1 Introduction 18

I.A.1.2 Écologie 18

I.A.1.3 Pouvoir pathogène 18

I.A.1.4 Caractères morphologiques et culturaux 19

I.A.1.5 Caractères enzymatiques et biochimiques 19

I.A.1.6 Phénotypes de résistance aux β-lactamines des entérobactéries 19

I.A.2 Les carbapénèmes 26

I.A.2.1 Structure chimique des carbapénèmes 27

I.A.2.2 Spectre 28

I.A.2.3 Mécanisme d'action 29

I.A.2.4 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques 29

I.A.3 Les mécanismes de résistance 30

I.A.3.1 Association de mécanismes 30

I.A.3.2 Mécanisme enzymatique : carbapénèmases 31

I.A.4 Épidémiologie de la résistance 35

I.A.4.1 EPC dans le monde 35

I.A.4.2 EPC en Europe 37

I.A.4.3 EPC en France et épidémiologie des souches envoyées au centre national de référence 39

I.A.5 Traitement et prévention des infections à souches productrices de carbapénèmases 44

I.A.5.1 Recommandations de bon usage des carbapénèmes 44

I.A.5.2 Indications du traitement par carbapénèmes 45

I.A.5.3 Traitement des infections causées par des EPC 46

I.A.5.4 Prévention de la transmission croisée 50

I.B DETECTION DES CARBAPENEMASES AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MEDICALE 52

I.B.1 Difficultés de détection des EPC 53

I.B.2 Méthodes phénotypiques 56

I.B.2.1 Tests d'hydrolyse de l'activité carbapénèmase 56

I.B.2.2 Méthode immunochromatographique : OXA-48/KPC K-set® 71

I.B.2.3 Tests d'inhibition 72
I.B.3 Méthodes moléculaires 73
I.B.3.1 Amplification génique 74
I.B.3.2 Séquençage 78
I.B.4 Milieux de dépistage des EPC 78
I.B.5 Synthèse des caractéristiques des tests de détection des EPC 81
I.B.6 Algorithme de détection du CASFM-EUCAST 2015 83

II TRAVAIL EXPERIMENTAL 85

II.A CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE 85

II.B MATERIEL ET METHODES 86
II.B.1 Isolats bactériens 86
II.B.2 Tests phénotypiques 95
II.B.2.1 Tests en milieu gélosé par disques additionnés d'inhibiteurs 95
II.B.2.2 Test CIM (Carbapenem Inactivation Method) 98
II.B.2.3 Repiquage des souches sur milieux chromogènes ChromID® 100

II.C RESULTATS ET DISCUSSION 101
II.C.1 Synthèse des résultats de l'étude 101
II.C.2 Résultats et comparaison des tests ROSCO Neo-Sensitabs™ et MAST DISCS® 106
II.C.2.1 Performances du test CAT-ID pour la détection des EPC 106
II.C.2.2 Comparaison des tests ROSCO et MAST 108
II.C.2.3 Comparaison des disques de témocilline (Bio-Rad/Mast) 109
II.C.2.4 Comparaison des tests ROSCO et MAST avec addition de témocilline 110
II.C.2.5 Comparaison des tests ROSCO et MAST avec addition de CAT-ID 111
II.C.2.6 Comparaison des tests ROSCO et MAST avec témocilline et CAT-ID ... 112
II.C.2.7 Synthèse des performances des différentes combinaisons utilisant les tests ROSCO et MAST ainsi que la témocilline et le disque CAT-ID 113
II.C.3 Performances des milieux chromogènes 114
II.C.4 Résultats et performances du test CIM 117

II.D CONCLUSION DE L'ETUDE 122

III Conclusion 125

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ac. : Acide
AMC. : Amoxicilline + acie clavulanique
AMX. : Amoxicilline
ARS. : Agence régionale de santé
ATCC. : American type culture collection (contrôle de qualité)
ATM. : Aztréonam
BCP. : Bromocrésol Pourpre
BGN. : Bacille Gram négatif
BGNNF. : Bacille Gram négatif non-fermentant
BHRe. : Bactérie hautement résistante émergente
BLSE. : β-lactamase à spectre étendu
BMR. : Bactérie multi-résistante
C1G. : Céphalosporines de 1ère génération
C2G. : Céphalosporines de 2ème génération
C3G. : Céphalosporines de 3ème génération
CASFM. : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie
CAZ. : Ceftazidime
CCLIN. : Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales
CF. : Céfalotine
CHU. : Centre hospitalier universitaire
CIM. : Carbapenem inactivation method
CLSI. : Clinical & laboratory standards institute
CMI. : Concentration minimal inhibitrice
CNR. : Centre national de référence
CTX. : céfotaxime
DHP. : Dihydropeptidase
EARS-Net : European antimicrobial resistance surveillance Network
EBLSE. : entérobactérie productrice de β-lactamase à spectre étendu
ECDC. : European center for disease prevention and control
EDTA. : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
EHPAD. : Etablissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes
EPC. : Entérobactérie productrice de carbapénèmase
ERT. : Ertapénème
EUCAST. : European committee on antimicrobial susceptibility testing
FEP. : Céfépime
FOX. : Céfoxitine
FQ. : Fluoroquinolones
HCSP. : Haut conseil de santé publique
IMP. : Imipénème
IN. : Infection nosocomiale
InVS. : Institut national de veille sanitaire
IU. : Infection urinaire

KPC. : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MALDI-TOF. : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight

MBL. : Métallo-β-lactamase

MH. : Mueller-Hinton

MHT. : Test de Hodge modifié

NDM. : New-Delhi métallo-β-lactamase

ONERBA. : Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques

PAVM. : Pneumopathie acquise par ventilation mécanique

PCC. : Précautions complémentaires contact

PCR. : Réaction de polymérisation en chaîne

PIP. : Pipéracilline

PLP. : Protéines liant les pénicillines

RFE. : Recommandations formalisées d'expert

SFAR. : Société française d'anesthésie et réanimation

SM. : Spectrométrie de masse

SPILF. : Société de pathologie infectieuse de langue française

SRLF. : Société de réanimation de langue française

TCC. : Ticarcilline + acide clavulanique

TIC. : Ticarcilline

TZP. : Pipéracilline + tazobactam

VPN. : Valeur prédictive négative

VPP. : Valeur prédictive positive

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification d'Ambler des β-lactamases 22

Tableau 2. Classification des entérobactéries et profil de résistance naturelle aux β-lactamines (d'après (15)) 23

Tableau 3. Phénotypes de résistance acquise des entérobactéries 24

Tableau 4. CASFM-EUCAST – Recommandations 2017 (version 1.0) 25

Tableau 5. Activité *in vitro* des carbapénèmes sur les bactéries à Gram négatif (19) 29

Tableau 6. Caractéristiques des principales carbapénèmases acquises chez les BGN 32

Tableau 7. Répartition des entérobactéries productrices de carbapénèmases sans lien rapporté avec l'étranger en France signalés à l'InVS entre 2004 et 2015, selon le mécanisme de résistance (4) 40

Tableau 8. Synergie *in vitro* entre les molécules efficaces *in vivo* sur des EPC (34) 50

Tableau 9. Critères de sensibilité/résistance selon les recommandations américaines (CLSI) et européennes (EUCAST) - (41) 53

Tableau 10. Performances des automates pour la détection des souches productrices de KPC (44) 54

Tableau 11. Protocoles de spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la détection de la production de carbapénèmase selon différentes études 61

Tableau 12. Performances du RAPIDEC® CARBA NP, du Rapid CARB Screen® et du Carba NP test et caractéristiques comparées des différents tests (7) 62

Tableau 13. Comparaison de 4 tests phénotypiques de détection des EPC (65) 69

Tableau 14. Comparaison des performances de différents milieux pour la détection d'EPC, d'après G. Arlet(8) 80

Tableau 15. Comparaison des différents tests disponibles pour la détection des EPC 82

Tableau 16. Espèces et méthodes de détermination du mécanisme de résistance des 58 souches d'entérobactéries inclues dans l'étude. 90

Tableau 17. Règles d'interprétation du test ROSCO Neo-Sensitabs™ 96

Tableau 18. Règles d'interprétation du test MAST DISCS® 98

Tableau 19. Résultats des tests réalisés pour les différentes souches 102

Tableau 20. Performances du disque CAT-ID 107

Tableau 21. Comparaison des performances de détection du faropénème par rapport aux autres carbapénèmes d'après Day *et al.* (18) 107

Tableau 22. Test ROSCO *versus* test MAST 109

Tableau 23. Témocilline Bio-Rad *versus* témocilline MAST pour la détection des OXA-48 109

Tableau 24. Test ROSCO + témocilline Bio-Rad *versus* test MAST + témocilline Mast ... 111

Tableau 25. Test ROSCO + CAT-ID *versus* test MAST + CAT-ID 112

Tableau 26. ROSCO + témocilline Bio-Rad + CAT-ID *versus* MAST + témocilline Mast + CAT-ID 112

Tableau 27. Performances des différents tests et combinaisons pour la détection des EPC 113

Tableau 28. Évaluation des milieux chromogènes pour les différentes types de souches 115

Tableau 29. Nombre de souches ayant poussé sur les différents milieux (83) 116

Tableau 30. CAT-ID + ChromID OXA-48 *versus* MAST + témocilline + CAT-ID + ChromID OXA-48 117

Tableau 31. Résultats du test CIM réalisé à la fois en solution aqueuse et en solution saline 117

Tableau 32. Performances du test CIM selon Zwaluw *et al.* (45) 118

Tableau 33. Comparaison des conditions du test CIM selon différentes études 120

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure chimique de base des carbapénèmes (19) 27

Figure 2. Structure chimique des différents carbapénèmes (20) 28

Figure 3. Hétérogénéité d'activité hydrolytique des carbapénèmases des entérobactéries (8) 31

Figure 4. Distribution mondiale des EPC KPC (25) 36

Figure 5. Distribution mondiale des EPC NDM (25) 36

Figure 6. Distribution mondiale des EPC OXA-48-like (25) 37

Figure 7. *Escherichia coli* : pourcentage de souches invasives résistantes aux carbapénèmes par pays - Données EARS-Net, 2015 *(27)* 38

Figure 8. *Klebsiella pneumoniae* : pourcentage de souches invasives résistantes aux carbapénèmes par pays - Données EARS-Net, 2015 *(27)* 39

Figure 9. Évolution du nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases en France signalés à l'InVS entre 2009 et 2015, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger (*n*=2376). (4) 40

Figure 10. Répartition des épisodes impliquant des bactéries productrices de carbapénèmases en France signalées entre 2009 et 2015, selon les mécanismes de résistance et l'année de signalement (*n* = 2376) - (4) 42

Figure 11. Résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries en France (31) 43

Figure 12. Difficultés de lecture des CMI dues à des micro-colonies dans la zone d'inhibition (23) 54

Figure 13. Difficultés de criblage des carbapénèmases 55

Figure 14. Test de Hodge modifié 57

Figure 15. Détection de l'activité carbapénèmase par spectrométrie de masse MALDI-TOF (47) 59

Figure 16. Spectre de masse (MALDI-TOF) permettant la détection de l'activité carbapénèmase (48) 59

Figure 17. Principe du Carba NP test à gauche et RAPIDEC® CARBA NP à droite, ... 63

Figure 18. Résultats du test Blue-Carba pour les souches productrices de carbapénèmases (A, B, C) et non productrices de carbapénèmases (D) - (63) 65

Figure 19. Potentiostat « fait-maison » et électrode avec 8 sondes 68

Figure 20. Courbes obtenues en temps-réel par le BYG Carba test 68

Figure 21. Étapes de réalisation du test Coris Bioconcept 71

Figure 22. Automate GeneXpert® (à gauche) et cassette Xpert® Carba-R (à droite) 75

Figure 23. Représentation schématique de la méthode Check-point (biopuce à ADN) pour la recherche de carbapénèmase 77

Figure 24. ChromID® CARBA 79

Figure 25. CHROMagar KPC 79

Figure 26. Brilliance® CRE 79

Figure 27. SuperCarba 79

Figure 28. Algorithme phénotypique de criblage des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases au sein des souches non-sensibles aux carbapénèmes (2015) : recommandations (2017) du CASFM/EUCAST. (16) 84

Figure 29. Répartition des mécanismes de résistance ainsi que des β-lactamases de notre collection 87

Figure 30. Répartition des espèces d'EPC isolées au CHU de Toulouse de janvier 2013 à avril 2016 87

Figure 32. Exemple de recherche de BLSE (image de synergie) 88

Figure 33. Interprétation du test MAST DISCS® CAT-ID™ - (Mast Diagnostics) 97

Figure 34. Présentation schématique du test CIM (45) 99

Figure 34. Répartition des carbapénèmases isolées d'entérobactéries entre 2013 et avril 2016 au CHU de Toulouse 101

Figure 35. Algorithme de détection des EPC 124

Figure 36. Résultats des disques MAST et ROSCO pour *K.pneumoniae productrice d'*OXA-48 127

Figure 37. Résultats des disques MAST et ROSCO pour *M.morganii* productrice de NDM 128

Figure 38. Résultats des disques MAST et ROSCO pour *Citrobacter freundii productruce de* VIM 129

Figure 39. Gélose sélective ChromID® OXA-48 : *K.pneumoniae* productrice d' OXA-48 130

Figure 40. Gélose sélective ChromID® CARBA : *E.coli* producteur de NDM 130

Figure 41. Comparaison test CIM en solutions NaCl (en haut) et aqueuse (en bas) 131

INTRODUCTION

L'émergence de bactéries multi-résistantes est devenue un enjeu majeur de santé publique. De nombreux germes ont développé des résistances aux β-lactamines, qui sont les antibiotiques les plus prescrits.

Les carbapénèmes sont, parmi les β-lactamines, les antibiotiques ayant le spectre le plus large. Trois molécules sont commercialisées en France : l'ertapénème, le méropénème et l'imipénème. Devant l'utilisation croissante de ces antibiotiques, des entérobactéries jouant un rôle majeur en pathologie humaine, telles que *Escherichia coli (E.coli), Klebsiella pneumoniae (K.pneumoniae)* ou encore *Enterobacter cloacae* (*E.cloacae*) ont développé des résistances à l'ensemble des molécules de cette famille d'antibiotiques (1). Les carbapénèmases sont des β-lactamases hydrolysant les pénicillines, et à un degré variable, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Ces enzymes acquises sont codées par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles, expliquant leur importante dissémination.

Les carbapénèmases de type KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ont été décrites pour la première fois en 1996 chez une souche de *K.pneumoniae* en Caroline du Nord aux États-Unis (2). Depuis 2008, les carbapénèmases de type NDM (New-Delhi Metallo-β-lactamase) de la famille des métallo-β-lactamases (MBL) ont largement diffusé à travers le monde (3). Les carbapénèmases les plus fréquentes en France sont de type OXA-48 (4), découvertes initialement chez une entérobactérie en Turquie (2).

En raison de leur fort potentiel de dissémination, l'identification rapide de ces souches apparaît comme une nécessité. En effet, les entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) sont souvent résistantes à d'autres familles d'antibiotiques, engendrant une multi-résistance des souches et des options thérapeutiques limitées, voire des impasses thérapeutiques (5). Ainsi, une infection à EPC est un facteur de risque d'échec thérapeutique car les β-lactamines sont les antibiotiques les plus prescrits et la mise en place retardée d'un traitement efficace impacte l'amélioration clinique (6).

Du fait de l'important pouvoir de dissémination des souches productrices de carbapénèmases et des options thérapeutiques restreintes pour le traitement des infections à EPC, la détection rapide et efficace des EPC est devenue un point majeur (7).

Les carbapénèmases présentent des niveaux d'activité variables et diffèrent à la fois dans leurs caractéristiques biochimiques et leur capacité d'hydrolyse des β-lactamines. Le niveau d'expression, les propriétés des différentes carbapénèmases et leur fréquente association à d'autres mécanismes de résistance rendent l'identification de ces souches parfois difficile (8). La diminution de sensibilité aux carbapénèmes peut également être liée à

une association de β-lactamase à spectre élargi (BLSE) ou de céphalosporinase avec imperméabilité causée par une perte de porines (9).

Dans ce contexte, nous avons choisi de comparer trois techniques phénotypiques utilisées pour la détection des EPC : le test d'inhibition Rosco NEO-SENSITABS KPC/MBL® Confirm kit (Rosco Diagnostica) associé à la témocilline, actuellement utilisé au laboratoire du centre hospitalier universitaire de Toulouse, le test d'inhibition MAST DISCS® (Mast groups) associé à la témocilline et au disque CAT-ID (Carbapenemase Activity Test), le test CIM (Carbapenem Inactivation Method). Ces trois tests ont été comparés aux techniques de biologie moléculaire, méthode de référence pour la détection des EPC.

Les objectifs de ce travail sont, d'une part de réaliser une revue bibliographique des tests disponibles pour la détection des EPC ; et, d'autre part, de comparer ces 3 techniques afin d'établir un nouvel algorithme de détection des EPC.

I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.A LA RESISTANCE AUX CARBAPENEMES CHEZ LES ENTEROBACTERIES

I.A.1 Les entérobactéries

I.A.1.1 Introduction

La famille des *Enterobacteriaceae* ou Entérobactéries comprend des bacilles à Gram négatif regroupant 53 genres bactériens ayant des caractères généraux communs :

- un habitat : le tube digestif de l'homme ou des animaux, et l'environnement ;
- une mobilité éventuelle, dépendante de la présence ou non de flagelles péritriches ;
- un métabolisme aéro-anaérobie facultatif ;
- une capacité de réduction des nitrites en nitrates ;
- une fermentation du glucose avec ou sans production de gaz ;
- une absence de spores.

Cette famille comprend plus de 100 espèces identifiées mais une vingtaine d'entre elles représentent 99% des souches en médecine humaine, classées en 6 groupes (développés ultérieurement) en fonction de leur phénotype de résistance naturelle. Les 3 espèces les plus fréquemment identifiées à partir de prélèvements humains sont : *E.coli, K.pneumoniae* et *Proteus mirabilis (P.mirabilis).*

I.A.1.2 Écologie

Les entérobactéries sont des hôtes normaux du tube digestif de l'homme et des animaux et représentent la grande majorité de la flore intestinale aérobie. L'entérobactérie majoritaire chez l'homme est *E.coli.* Ces bactéries peuvent se transmettre par manuportage ainsi que par de l'eau ou des aliments souillés.

I.A.1.3 Pouvoir pathogène

Ce sont les principales bactéries retrouvées en pathogénicité humaine ou animale, en milieu communautaire ou hospitalier. Certaines espèces sont des pathogènes stricts (ex : *Shigella* sp.) alors que d'autres sont des pathogènes occasionnels ou opportunistes. Elles peuvent être responsables de nombreuses pathologies, telles que des infections urinaires,

pulmonaires, abdominales mais également de sepsis graves. Du fait de leur capacité à acquérir du matériel génétique et de leur fort potentiel de diffusion, les entérobactéries peuvent être à l'origine d'épidémies nosocomiales et faire l'objet d'une surveillance particulière.

I.A.1.4 Caractères morphologiques et culturaux

Les entérobactéries se cultivent sur milieux usuels non enrichis à 37°C et n'ont pas d'exigence particulière. Elles sont fréquemment isolées sur gélose au sang, gélose au sang cuit (chocolat) ou encore sur milieu BCP (Bromocrésol pourpre).

I.A.1.5 Caractères enzymatiques et biochimiques

Les entérobactéries sont oxydase (-) et possèdent généralement une catalase (à l'exception du genre *Shigella*). Elles réduisent les nitrates en nitrites grâce à la présence de leur nitrate réductase et fermentent le glucose (10).

I.A.1.6 Phénotypes de résistance aux β-lactamines des entérobactéries

I.A.1.6.1 Résistance bactérienne : généralités

La résistance aux antibiotiques est liée à la capacité des bactéries à s'adapter et résister aux effets des antibiotiques. Les principales causes de résistance aux antibiotiques sont (11) :

- une imperméabilité naturelle ou acquise : ce mécanisme explique la résistance naturelle de nombreux bacilles à Gram négatif (BGN) aux antibiotiques hydrophobes, tels que certaines β-lactamines (pénicilline G) ou la vancomycine ;
- une inactivation enzymatique : cette résistance peut être naturelle, ou acquise (plus fréquemment) ;
- un mécanisme d'efflux (interférant avec le mécanisme de transport) : mécanisme fréquent chez les bactéries à Gram négatif, divers gènes codent pour des protéines membranaires d'efflux (nommées pompes) entraînant l'expulsion de l'antibiotique du cytoplasme bactérien vers le milieu extérieur de manière très efficace et donc empêchant son accumulation dans le cytoplasme ou l'espace périplasmique. Cet efflux augmente le niveau de résistance de nombreux antibiotiques, dont les β-lactamines ;
- une modification d'activité de la cible : ce mécanisme, peu fréquent chez les bactéries à gram négatif, est souvent retrouvé chez les bactéries à Gram positif ;
- une substitution de cible, peu fréquente chez les bactéries à Gram négatif ;

Le mécanisme le plus fréquent de résistance aux β-lactamines chez les BGN est l'inactivation enzymatique liée à la production d'une β-lactamase, entraînant une hydrolyse plus ou moins totale de l'antibiotique par la bactérie (11). C'est lors de l'apparition des céphalosporines de troisième génération (C3G) dans les années 1980-1985, puis des carbapénèmes, que ces enzymes ont « explosé » chez les entérobactéries, mais également chez *Pseudomonas aeruginosa (P.aeruginosa)* et *Acinetobacter baumanii (A.baumanii)* - (9). Depuis les années 1980, de nombreuses enzymes inactivant les β-lactamines, les β-lactamases, ont émergé (12). Elles sont réparties en 4 classes selon la classification d'Ambler.

I.A.1.6.2 Classification d'Ambler

D'après la classification d'Ambler (Tableau 1), les β-lactamases sont réparties en 4 classes en fonction de leur structure primaire (13). Les enzymes de classe A, C et D sont dites à sérine active (type sérine) tandis que la classe B regroupe les métallo-β-lactamases (métallo-enzymes) nécessitant la présence d'un ion Zn^{2+} au niveau de leur site actif. Une autre classification existe, la classification fonctionnelle de Bush, mais est peu utilisée dans le monde médical, en raison de sa complexité.

Enzymes de classe A

La classe A comprend des enzymes de type pénicillinases à spectre restreint (TEM-1, TEM-2, SHV-1), des β-lactamases résistantes aux inhibiteurs (TEM-30 à 45, TEM-59), des BLSE (SHV-2 à SHV-9, TEM-3 à TEM-29, CTX-M, PER-1, VEB-1) et des carbapénèmases (IMI-1, KPC…). Les enzymes de classe A sont totalement ou partiellement inhibées par les inhibiteurs de β-lactamases (tazobactam et acide clavulanique). Leur support génétique peut être chromosomique ou plasmidique. Les BLSE les plus fréquemment identifiées à ce jour sont les CTX-M, suivies des dérivées de TEM et SHV (6).

Enzymes de classe B

Les enzymes de classe B sont des métallo-β-lactamases (MBL), qui possèdent des ions zinc dans leur site actif. Elles hydrolysent toutes les β-lactamines à l'exception de l'aztréonam. Elles ne sont pas inhibées par les inhibiteurs de β-lactamases, mais sont inhibées par des chélateurs d'ions, comme l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique) ou l'acide dipicolinique. Ces enzymes sont à l'origine d'une résistance acquise aux C3G et carbapénèmes.

Certaines MBL chromosomiques sont retrouvées chez des bactéries de l'environnement, telles que *Stenotrophomas maltophilia* ou *Burkholderia cepacia*, à l'origine de phénotypes de résistance complexes (12). D'autres bactéries peuvent également en posséder mais ce point ne sera pas développé ici. Les MBL plasmidiques, à l'origine chez *P.aeruginosa* et *A.baumanii*, sont ensuite apparues chez les entérobactéries (12). Les carbapénèmases de type MBL seront développées ultérieurement.

Enzymes de classe C

Les enzymes de classe C sont des céphalosporinases ou appelées AmpC. Elles se distinguent en 2 groupes :

- **AmpC chromosomiques**

Certaines AmpC sont retrouvées de façon naturelle chez les bactéries : c'est le cas d'*E.coli,* des entérobactéries des groupes 3 et 4, qui seront détaillées plus loin, ou encore de bacilles à Gram négatif non-fermentants (BGNNF) tels que *P.aeruginosa.*

Ce gène *ampC,* inductible, est sous la dépendance d'un système de régulation complexe impliquant les gènes régulateurs a*mpR* et *ampD*, sauf pour *E.coli. (12)*. Chez les entérobactéries du groupe 3, l'expression d'AmpC est induite après une exposition aux β-lactamines (14).

- **AmpC plasmidiques**

Les premières souches d'AmpC plasmidiques sont apparues chez les souches du genre *Klebsiella* en 1988 (12). Ces souches présentent un phénotype de résistance semblable aux souches d'entérobactéries hyperproduisant leur céphalosporinase naturelle. Ces enzymes, sont généralement non inductibles, exceptées ACT-1, le groupe DHA-1 et CFE-1 (12).

Enzymes de classe D

Les oxacillinases sont des pénicillinases dont le spectre peut être élargi aux céphalosporines ou aux carbapénèmes. Les oxacillinases hydrolysent particulièrement l'oxacilline et ses dérivés. Ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam, mais possèdent une faible activité vis-à-vis des céphalosporines de spectre étroit. Des oxacillinases chromosomiques peuvent être retrouvées chez certains BGNNF.

Tableau 1. Classification d'Ambler des β-lactamases

Ambler	Site Actif	Enzymes	Inhibiteur	Substrats
A	**Sérine**	Pases à spectre restreint	Clavulanate	Péncillines
A	**Sérine**	Pases à large spectre	Clavulanate	Pénicillines + C1G
A	**Sérine**	β-lactamases à spectre étendu	Clavulanate	Pénicillines + céphalosporines
A	**Sérine**	Pases résistante aux inhibiteurs	-	Pénicillines
A	**Sérine**	Carbénicillinases	Clavulanate	Pénicillines dont Carbénicilline
A	**Sérine**	Céfuroximases	Clavulanate	Céphalosporines
A	**Sérine**	Carbapénèmases	Clavulanate	Péni. + céphalo. + carbapénèmes
B	**Zn^{2+}**	Carbapénèmases	EDTA	Péni. + céphalo. + carbapénèmes
C	**Sérine**	Céphalosporinases	Cloxacilline	Céphalosporines
D	**Sérine**	Oxacillinases	+/- Clavulanate	Pénicilline dont cloxacilline / carba.

Pases : pénicillinases ; péni. : pénicillines ; céphalo. : céphalosporines, C1G : céphalosporines de 1ère génération

I.A.1.6.3 Sensibilité des entérobactéries aux β-lactamines

Les entérobactéries sont actuellement classées en 6 groupes, en fonction de leur phénotype de résistance naturelle aux β-lactamines (2). La classification a évolué à partir de l'approche phénotypique de l'antibiogramme. Elle a permis de revoir les groupes pour inclure les nouvelles espèces et a été adaptée en fonction des caractéristiques génomiques des β-lactamases et des résistances identifiées (Tableau 2).

Tableau 2. Classification des entérobactéries et profil de résistance naturelle aux β-lactamines (d'après (15))

	Groupe 0	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5	Groupe 6
Principales bactéries d'intérêt médical	*P.mirabilis* *Salmonella spp.*	*E.coli* *Shigella spp.*	*Klebsiella spp.* *C.koseri* *C.amalonaticus* *E.hermanii*	*Enterobacter spp.* *C.freundii, M.morganii* *P.agglomerans* *P.rettgeri, P.stuartii*	*Y.enterocolitica* *S.fonticola*	*P.vulgaris* *P.penneri*	*K.ascorbata* *K.cryocrescens* *R.aquatilis*
Mécanisme de résistance	Absence de β-lactamase	AmpC faiblement exprimée	Pénicillinase de bas niveau	AmpC de bas niveau	Pénicillinase + AmpC	Céfuroximase	BLSE chromosomique
AMX AMC	S S	S/R S/R	R S	R R	R R	R S	R S
TIC TCC	S S	S S	R S	S S	I/R S	R S	R S
PIP TZP	S S	S S	R S	S S	I/R S	R S	S/R S
CF	S	S/R	S	R	R	R	R
C2G FOX	S S	S S	S S	S S	R	R S	R S
CTX CAZ	S S	S S	S S	S S	S S	S S	S/R S/R
FEP	S	S	S	S	S	S	S
IMP ERT	S S	S S	S S	S S	S S	S S	S S
ATM	S	S	S	S	S	S	S

S : sensible ; I : intermédiaire ; R : résistant ; antibiotiques : voir liste des abréviations ; C.koseri : Citrobacter koseri ; C.amalonaticus : Citrobacter amalonaticus ; E.hermanii : Escherichia hermanii ; P.agglomerans : Pantoea agglomerans ; P.rettgeri : Providencia rettgeri ; P.stuarti : Providencia stuarti ; Y.enterocolitica : Yersinia enterocolitica ; S.fonticola : Serratia fonticola ; P.penneri : Proteus penneri ; K.ascorbata : Kluyvera ascorbata ; K.cryocrescens : Kluyvera cryocrescens ; R.aquatilis : Roseateles aquatilis

I.A.1.6.4 Phénotypes de résistance acquise des β-lactamines

Les phénotypes de résistance acquise des entérobactéries pour les β-lactamines sont décrits dans le Tableau 3.

Tableau 3. Phénotypes de résistance acquise des entérobactéries

Phénotype	Pase bas niveau	Pase haut niveau	Pase R IβL	Case de bas niveau	Case de haut niveau	BLSE	Carbapénèmase		
							A	B	D
AMX	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMC	S	(S)/I/R	R	R	R	S/I	S/I/R	R	S/I/R
TIC	R	R	R	S	R	R	R	R	R
TCC	S	(S)/I/R	R	S	R	S/I	S/I/R	R	S/I/R
PIP	I	I/R	I/R	S	R	R	R	R	R
TZP	S	S/I	I/R	S	I/R	S/I	S/I/R	R	S/I/R
CF	S/I	(S)/I/R	S	R	R	R	R	R	R
C2G	S	(S)/I/R	S	S	I/R	R	I/R	I/R	S/I/R
FOX	S	S	S	S	I/R	S	I/R	I/R	S/I/R
CTX	S	S	S	S	S/I/R	S/I/R	I/R	I/R	S/I/R
CAZ	S	S	S	S	S/I/R	S/I/R	I/R	I/R	S/I/R
FEP	S	S	S	S	S	S/I/R	I/R	I/R	S/I/R
IMP	S	S	S	S	S	S	I/R	I/R	S/I/R
ERT	S		S	S	S/I	S	I/R	I/R	S/I/R
ATM	S	S	S	S	I/R	S/I/R	I/R	I/R	S/I/R

Pase : pénicillinase ; Case : céphalosporinase ; IβL : inhibiteur de β-lactamases ; S : sensible ; I : intermédiaire ; R : résistant ; antibiotiques : voir liste des abréviations.

Antibiogramme

Selon les recommandations 2017 (version 1.0) du CASFM (Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie) et de l'European Comittee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) (16), l'antibiogramme des entérobactéries est réalisé par diffusion en milieu gélosé, sur gélose MH (Müeller-Hinton) avec un inoculum de 0.5 McFarland. Il est ensuite incubé à 35 +/- 2°C pendant 20 +/- 4h. Les antibiotiques classiquement testés sont décrits dans le Tableau 4.

Tableau 4. CASFM-EUCAST – Recommandations 2017 (version 1.0)

Liste standard	Liste complémentaire
Ampicilline ou Amoxicilline	Céfuroxime
Amoxicilline/acide clavulanique	Aztréonam
Ticarcilline	Netilmicine
Ticarcilline/acide clavulanique[1]	Tobramycine
Mécillinam	Lévofloxacine
Témocilline[1]	Chloramphénicol
Pipéracilline	Tigécycline
Pipéracilline/tazobactam	Triméthoprime
Cefadroxil ou céfalexine	Colistine
Céfoxitine	Azithromycine
Céfotaxime ou ceftriaxone	
Ceftazidime	
Céfépime	
Céfixime	
Imipénème ou méropénème ou doripénème	
Ertapénème	
Amikacine	
Gentamicine	
Acide nalidixique	
Ofloxacine ou norfloxacine	
Ciprofloxacine	
Cotrimoxazole	
Nitrofuranes	
Fosfomycine	
Ciprofloxacine	
Gentamicine	

[1]*Utiles pour l'algorithme de détection des carbapénèmases*

La liste standard suffit, dans un premier temps, aux choix thérapeutiques. En cas de multirésistance, il est possible de tester certains antibiotiques de la liste complémentaire. La présence d'une synergie entre l'acide clavulanique et un disque de ceftazidime, d'aztréonam ou de céfépime est en faveur d'une BLSE. En cas de résistance isolée à un carbapénème, une imperméabilité spécifique est suspectée. La résistance n'est pas croisée avec les autres β-lactamines.

I.A.2 Les carbapénèmes

Les β-lactamines sont les antibiotiques les plus utilisés en pratique médicale en raison de leurs propriétés : ils possèdent une activité bactéricide, une faible toxicité avec relativement peu d'effets indésirables, un large spectre, d'excellents paramètres pharmacocinétiques, ainsi qu'un coût relativement bas pour certaines classes (6).

Les carbapénèmes sont des antibiotiques majeurs de la famille des β-lactamines, en raison notamment de leur très large spectre : ils sont actifs sur les bactéries aérobies et anaérobies à Gram positif et négatif, à l'exclusion des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline, d'*Enterococcus faecium,* de *Stenotrophomonas maltophila,* et des germes intra-cellulaires (2).

Les carbapénèmes sont des antibiotiques à usage hospitalier pouvant être utilisés en traitement probabiliste en cas de suspicion d'infection à une bactérie multi-résistante. Leur utilisation est justifiée en raison de leur activité conservée à l'égard des BGN (y compris *P.aeruginosa* et *A.baumanii*) résistants aux céphalosporines de troisième génération, par production d'une BLSE ou hyperproduction d'une céphalosporinase (17). En effet, ils possèdent une excellente activité antibactérienne en raison de leur bonne pénétration à travers la membrane externe des bactéries, et de leur bonne stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse de la plupart des β-lactamases. Les molécules actuellement commercialisées en France sont l'imipénème (Tienam®), le méropénème (Méronem®) et l'ertapénème (Invanz®), dont le spectre est plus restreint ; le doripénème (Doribax®) ayant été retiré du marché en 2014. D'autres carbapénèmes ont été développés mais ne sont pas disponibles en France, comme le faropénème par exemple. Le faropénème medoxomil est un carbapénème utilisable *per* os : il est le premier carbapénème à avoir une bonne biodisponibilité par voie orale (72 à 84%) (18). Il est utilisable dans le traitement des infections communautaires à entérobactéries, notamment à souches productrices de BLSE ou hyperproduisant une céphalosporinase. Cependant, s'il n'est pas commercialisé en France, il est très utile pour la détection microbiologique des carbapénèmases.

En tant qu'antibiotiques à très large spectre, les carbapénèmes ont été de plus en plus prescrits pour le traitement des infections nosocomiales ou à bactéries multi-résistantes (BLSE le plus souvent). L'utilisation croissante des carbapénèmes est en lien avec la croissance des souches BMR. Ceci a entraîné l'apparition de mutants résistants par production d'enzymes inactivatrices : les carbapénèmases, des β-lactamases dont l'émergence et la diffusion représentent une grande menace pour le futur. En effet, les gènes codant pour ces enzymes sont portés par des éléments génétiques mobiles, donc transmissibles entre souches ; et ces souches sont généralement résistantes à la quasi-totalité des β-lactamines.

I.A.2.1 Structure chimique des carbapénèmes

La structure des carbapénèmes comprend un noyau β-lactame auquel est fusionné un cycle distinct de celui des pénicillines (l'atome de soufre est remplacé par un carbone en position 1 et le cycle comporte une liaison C2-C3 insaturée – (Figure 1).

Cette structure présente une grande stabilité grâce à 2 éléments :

- les atomes d'hydrogène en C5 et C6 sont orientés en *trans ;*
- une chaîne hydroxyéthyl en C6.

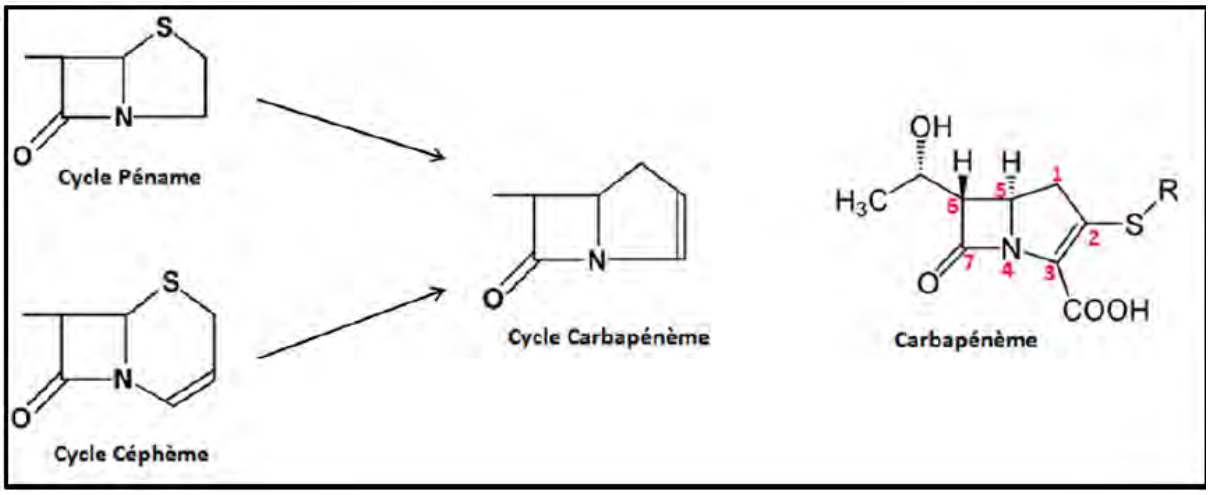


Figure 1. Structure chimique de base des carbapénèmes (19)

Cycle carbapénème : atome de carbone en position 1, liaison insaturée en C2-C3, transorientation des atomes d'hydrogène en C5 et C6, chaîne hydroxyéthyl en C6

L'imipénème présente la particularité d'être hydrolysé par la dihydro-peptidase rénale DHP-1. Il est donc co-administré avec la cilastatine, inhibiteur de cette enzyme. La cilastatine permet de prévenir la néphrotoxicité de l'imipénème mais majore le risque d'effet indésirable de type convulsions. Les autres carbapénèmes sont protégés de cette hydrolyse grâce au groupement β-méthyl en C1 et ne sont pas associés à la cilastatine. La substitution en C2 permet de caractériser les différents carbapénèmes (**Figure 2**).

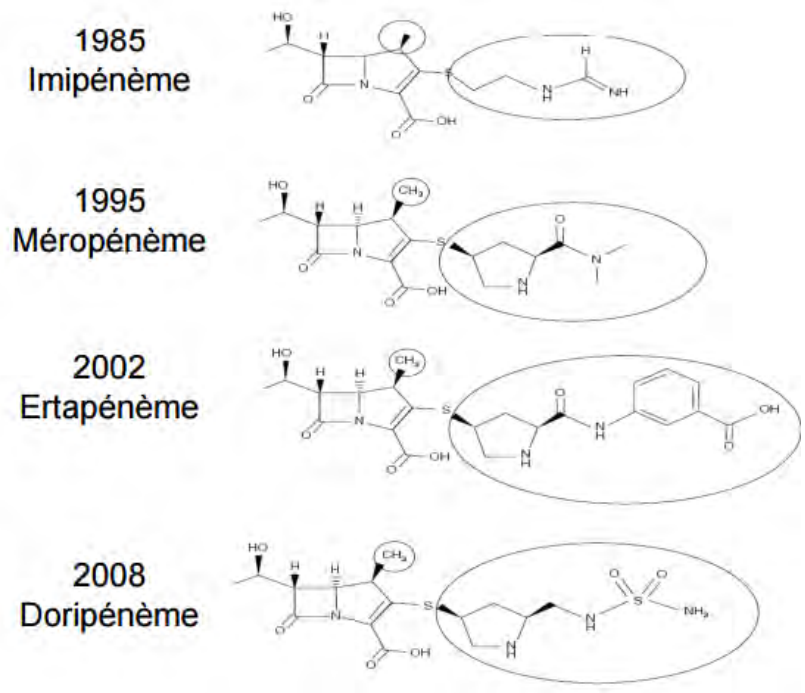


Figure 2. Structure chimique des différents carbapénèmes (20)

La substitution en C2 du méropénème est différente de celle de l'imipénème, expliquant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) plus basses. En ce qui concerne l'ertapénème, cette substitution est responsable d'une plus longue demi-vie. (2)

I.A.2.2 Spectre

Les carbapénèmes sont actifs sur les bactéries à gram négatif ainsi que les bactéries à gram positif, incluant les bactéries anaérobies. Cependant, ils ne peuvent pas être utilisés pour le traitement des infections à staphylocoques résistants à l'oxacilline ou à entérocoques du fait de leur absence d'activité sur les PLP2a des staphylocoques ou sur les PLP5 des entérocoques (seul l'imipénème possède une activité sur *Enterococcus faecalis).* Les profils de sensibilité des différentes molécules vis-à-vis des BGN sont sensiblement différents. L'ertapénème a un spectre restreint aux entérobactéries : il est inactif sur *P.aeruginosa* et *A.baumanii*, et ne peut donc pas être utilisé pour le traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères (2). Les genres *Proteus* et *Morganella* sont moins sensibles aux pénèmes, et en particulier à l'imipénème, que les autres entérobactéries du fait d'une moindre affinité de la PLP2 et d'une diminution de quantité de la PLP1a (2). Le Tableau 5 indique les concentrations minimales inhibitrices des différents carbapénèmes, en fonction du germe.

Tableau 5. Activité *in vitro* des carbapénèmes sur les bactéries à Gram négatif (19)

Bactéries	Imipénème	Méropénème	Doripénème	Ertapénème
E. coli	0,12/0,25	0,016/0,03	0,03/0,06	≤0,015/≤0,015
E. coli BLSE	0,25/0,5	0,03/0,06	0,03/0,06	0,03/0,25
K. pneumoniae	≤0,06/1	0,03/0,12	0,06/0,12	≤0,015/0,12
K. pneumoniae BLSE	0,25/1	0,03/0,12	0,06/0,12	0,06/0,25
Proteus mirabilis	0,5/2	0,06/0,06	0,12/0,25	≤0,06/≤0,06
Morganella morganii	2/8	0,12/0,25	0,25/0,5	≤0,015/0,03
E. cloacae	0,5/2	0,03/0,06	0,03/0,06	≤0,015/0,06
Citrobacter freundii	1/1	0,03/0,06	0,03/0,03	≤0,015/0,06
Serratia marcescens	1/2	0,06/0,12	0,12/0,25	0,03/0,12
H. influenzae	0,5/1	0,12/1	0,12/1	0,06/0,25
Moraxella catarrhalis	0,06/0,12	≤0,015/≤0,015	0,12/0,25	0,06/0,25
Salmonella sp	≤0,5/≤0,5	0,03/0,03	0,06/0,06	≤0,06/≤0,06
P. aeruginosa	1/32	0,5/32	0,5/8	>8/>8
Acinetobacter baumannii	0,25/0,25	0,25/1	0,25/1	4/>8
Stenotrophomonas maltophilia	>8/>8	>16/>16	>16/>16	>8/>8
Bacteroides fragilis	0,25/1	0,12/1	0,25/1	0,25/1
Prevotella spp	0,03/0,5	0,12/0,25	0,12/0,25	0,25–1
Fusobacterium spp	0,12/1	0,12/0,25	0,12/0,25	0,25/4

NB : les données présentées correspondent aux CMI_{50} et CMI_{90} exprimées en mg/L

I.A.2.3 Mécanisme d'action

De même que les autres β-lactamines, les carbapénèmes ont une activité bactéricide par inhibition des PLP (« protéines liant les pénicillines ») ancrées dans la membrane cytoplasmique de la bactérie.

Les PLP sont des enzymes, de type transpeptidases et carboxypeptidases, dont le rôle physiologique est de synthétiser le peptidoglycane, élément essentiel de la paroi bactérienne. Des autolysines détruisent le peptidoglycane et permettent l'élongation et la scission des bactéries, à l'origine de l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane et donc la lyse de la paroi et la destruction de la bactérie. Leurs cibles privilégiées sont les PLP1a, 1b et 2, de haut poids moléculaire (2). Les aminopénicillines et céphalosporines se lient à la PLP3, ce qui a pour conséquence une lyse bactérienne sans filamentation préalable en présence de carbapénèmes, ainsi qu'une libération moindre d'endotoxines (19).

I.A.2.4 Propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

L'imipénème et le méropénème ont des propriétés semblables avec une demi-vie de l'ordre d'une heure, un volume de distribution « moyen », une faible liaison aux protéines plasmatiques et une élimination rénale sous formes inchangée de 70%. Les propriétés pharmacocinétiques de l'ertapénème diffèrent sensiblement, avec une demi-vie quatre fois supérieure, permettant l'administration en dose unique quotidienne, un volume de distribution élevé, une forte liaison aux protéines plasmatiques et une élimination rénale sous forme inchangée de 40% (19).

Les carbapénèmes ont une activité bactéricide plus rapide que pour les autres β-lactamines (17). De même que les autres antibiotiques de la famille, leur activité est temps-dépendante : afin d'obtenir une efficacité bactériologique, il faut que la concentration plasmatique soit supérieure à la CMI pendant au moins 40% du temps entre 2 injections (19). Idéalement, une administration par perfusion continue est à préférer à une administration intermittente. Les carbapénèmes présentent une efficacité majorée lorsque la concentration plasmatique est 5 à 10 fois supérieure à la CMI : ils ont donc également un effet concentration-dépendant, à l'inverse des autres β-lactamines (17). Ce sont donc des antibiotiques à effet mixte car ils sont à la fois concentration-dépendants et temps-dépendants (17).

I.A.3 Les mécanismes de résistance

De même que pour les autres β-lactamines, des résistances aux carbapénèmes sont apparues (5). La résistance aux carbapénèmes peut-être liée à deux types de mécanismes :

- soit à l'association de la production de BLSE ou l'hyperproduction de céphalosporinase chromosomique ou acquise (phénotype hyperAmpC) associé à une imperméabilité. Ce phénomène est peu inquiétant en cas de céphalosporinase chromosomique, car non transmissible (5) ;
- soit à l'acquisition de carbapénèmase : ce phénomène est alarmant car la résistance est portée par des éléments génétiques mobiles donc transmissibles entre souches.

I.A.3.1 Association de mécanismes

La résistance aux carbapénèmes due à l'association de β-lactamase (BLSE ou céphalosporinase) à une imperméabilité (déficit ou altération des porines) est le mécanisme le plus fréquent chez les entérobactéries (5). Les souches productrices de BLSE ou de céphalosporinase restent sensibles aux carbapénèmes, malgré des CMI pouvant être augmentées (5).

Pour atteindre leur cible à la surface de la membrane cytoplasmique, les antibiotiques doivent traverser les porines, protéines de structure de la membrane externe des BGN permettant le passage des molécules hydrophiles de faible poids moléculaire. En cas d'altération des porines par mutation (modification structurale d'une porine essentielle ou diminution quantitative des porines), une augmentation des CMI des antibiotiques les utilisant, tels que les β-lactamines, est observée. Ces souches peuvent alors devenir intermédiaires ou résistantes aux carbapénèmes (5).

Le carbapénème le plus fréquemment inactivé par l'association d'une imperméabilité avec certaines BLSE ou une hyperproduction de céphalosporinase est l'ertapénème. Ces combinaisons sont le plus fréquemment rencontrées chez les genres *Klebsiella* et *Enterobacter.* Ces souches résistantes aux carbapénèmes par association de mécanismes présentent généralement moins de résistances aux autres familles d'antibiotiques que les EPC (3).

I.A.3.2 Mécanisme enzymatique : carbapénèmases

Les carbapénèmases appartiennent aux β-lactamases, enzymes capables d'hydrolyser le cycle β-lactame des β-lactamines. Elles hydrolysent les carbapénèmes, avec une plus ou moins grande efficacité, l'hydrolyse des autres β-lactamines étant variable, en fonction du type d'enzyme. En présence de carbapénèmases, la résistance aux carbapénèmes est souvent majeure, avec des CMI très élevées, à l'exception des enzymes de type OXA-48 et apparentées. Ces CMI présentent une grande variabilité en fonction des enzymes produites, rendant leur détection difficile, comme nous le verrons dans la prochaine partie. Des sensibilités apparentes sur l'antibiogramme peuvent ainsi être retrouvées chez des germes producteurs de carbapénèmase (Figure 3).

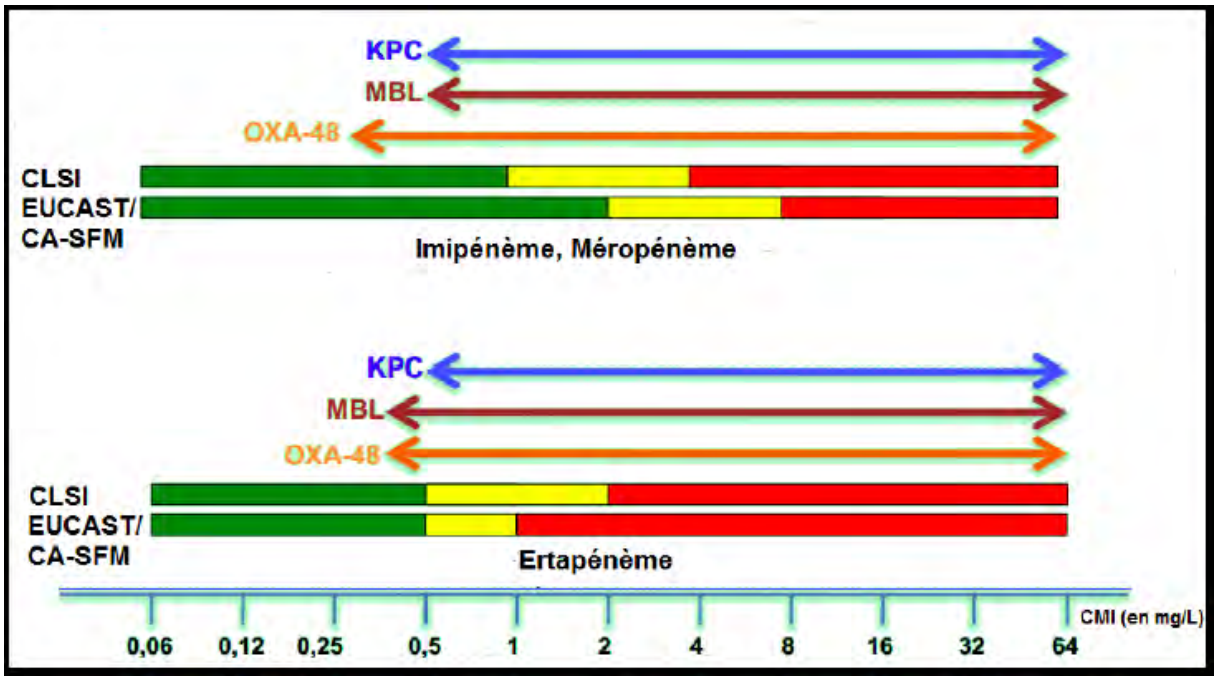


Figure 3. Hétérogénéité d'activité hydrolytique des carbapénèmases des entérobactéries (8)

I.A.3.2.1 Classification et propriétés des carbapénèmases

Les carbapénèmases sont des β-lactamases de classes A, B ou D. Les β-lactamases de classe C sont exclusivement des céphalosporinases AmpC chromosomiques ou plasmidiques (Tableau 6).

Tableau 6. Caractéristiques des principales carbapénèmases acquises chez les BGN

Classification d'Ambler	Enzymes	Espèces	Hydrolyse	Inhibition
Classe A	**KPC, GES, IMI** NMC, SME	**Entérobactéries** *P.aeruginosa*	Toutes les β-lactamines	+/- (ac. boronique, ac. clavulanique)
Classe B (MBL)	**NDM, VIM, IMP**, GIM, SPM	***P.aeruginosa*** Entérobactéries *A.baumanii*	Toutes les β-lactamines (sauf aztréonam)	Chélateurs cations divalents (EDTA, ac. dipicolinique)
Classe C (AmpC)	-	-	-	Cloxacilline
Classe D (oxacillinases)	**OXA-48 et dérivées** OXA-163, OXA-23	**Entérobactéries *A.baumanii***	Pénicillines, +/- carbapénèmes Pas les C3G/C4G	-

Ac. : acide ; C4G : céphalosporines de 4ème génération

Enzymes de classe A

Les carbapénèmases de classe A hydrolysent toutes les β-lactamines. Les céphamycines et la ceftazidime sont faiblement hydrolysés. Le degré de résistance aux carbapénèmes est variable, ils sont hydrolysés de façon moins efficace que les pénicillines et céphalosporines de 1ère et 2ème génération. L'ertapénème présente la sensibilité la plus élevée à l'activité hydrolytique de ces carbapénèmases. Cette classe comprend les carbapénèmases de type KPC (KPC-1, KPC-2, les plus fréquentes) ou GES ayant un support plasmidique (5).

La première KPC a été découverte en 1996 aux États-Unis chez une souche de *K.pneumoniae* (2). Les KPC sont les carbapénèmases de classe A les plus fréquentes et les plus menaçantes, du fait d'un important pouvoir de dissémination (5). Les souches productrices d'enzymes KPC expriment souvent différents types de BLSE en association (TEM, SHV, CTX-M) et ont également un certain degré d'imperméabilité associé, majorant la résistance aux carbapénèmes (21).

Enzymes de classe B : Métallo- β-lactamases

Les carbapénèmases de classe B hydrolysent toutes les β-lactamines et très fortement les carbapénèmases. Les MBL plus fréquentes initialement étaient les VIM (Verona integron-encoded metallo-β-lactamase) et IMP (Imipenemase). Depuis 2008, les MBL de la famille des NDM ont largement diffusé à travers le monde (3). Chez les entérobactéries, VIM-2 est la MBL la plus fréquente à travers le monde (2).

IMP-1 a été isolée pour la première fois chez une souche de *P.aeruginosa* au Japon en 1990 et a rapidement diffusé chez les entérobactéries et *A.baumanii* à travers le monde (2). NDM-1 a été découverte plus récemment chez les entérobactéries, en Inde et au Pakistan, puis a rapidement été retrouvée à travers le monde. L'isolement de souches productrices de MBL transférables est de plus en plus fréquent (2).

Enzymes de classe D : oxacillinases

Les oxacillinases sont des pénicillinases dont le spectre peut être élargi aux céphalosporines ou aux carbapénèmes. La première carbapénèmase de type OXA a été décrite en 1993 chez une souche d'*Acinetobacter baumanii*, isolée en 1985 en Ecosse, alors que le groupe OXA-48 a été identifié en Turquie pour la première fois (2).

Les carbapénèmases de classe D sont classées en 9 sous-groupes : OXA-23, OXA-51, OXA-24, OXA-58, OXA-48, OXA-55, OXA-50, OXA-62 et OXA-60. Le groupe OXA-48 n'a été décrit que chez les entérobactéries, à l'inverse des autres OXA, retrouvées essentiellement chez *Acinetobacter* spp. (2). Les carbapénèmases de type OXA-48 présentent de nombreux variants, ils diffèrent de quelques acides-aminés (substitution ou délétion). Ces variants ont été identifiés à travers le monde (OXA-162, OXA-181, OXA-163, OXA-204 et OXA-232) - (22), certains possèdent une faible activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes.

La particularité des carbapénèmases de type OXA est l'absence d'hydrolyse des C3G avec une hydrolyse importante des pénicillines et variable des carbapénèmes. Elles ne sont peu ou pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam.

I.A.3.2.2 Supports moléculaires de gènes de carbapénèmases et transmission

Les vecteurs de la diffusion des carbapénèmases sont soit les souches elles-mêmes, soit les éléments génétiques mobiles et transférables, qui portent les gènes codant les carbapénèmases (plasmides, transposons ou intégrons). Les transposons sont des séquences d'ADN capables de se déplacer et de se multiplier de façon autonome. Les intégrons sont intégrés dans des cassettes et constituent un système de capture, d'expression et de dissémination des gènes. Les gènes portés par un plasmide, un

transposon ou un intégron sont transférables et peuvent donc diffuser vers d'autres bactéries, leur conférant un pouvoir de dissémination entre souches réceptives ou transmission horizontale. Il est donc important d'identifier rapidement ce mécanisme de résistance.

Les gènes *bla*$_{KPC}$ sont systématiquement localisés au sein de l'intégron Tn4401, qui a été identifié chez des entérobactéries et *P.aeruginosa* d'origines géographiques différentes (3). De plus, ce transposon est généralement retrouvé sur des grands plasmides de tailles et structures différentes, associant des gènes codant d'autres résistances (23).

Les gènes codant pour les MBL sont souvent décrits sous forme de cassettes au sein d'intégrons. Ces intégrons sont capables d'intégrer plusieurs gènes cassettes (codant pour la résistance), ce qui entraîne une accumulation de gènes de résistance à de nombreuses familles, au sein d'une même souche. Ces intégrons, non mobiles, sont généralement localisés sur des plasmides (3). Ces gènes codant les MBL sont retrouvés chez des entérobactéries mais également chez *P.aeruginosa* ou *A.baumanii* (24).
Les plasmides porteurs de ces intégrons sont souvent porteurs d'autres gènes de résistance à d'autres familles d'antibiotiques, tels que les β-lactamines (*bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$, *bla*$_{CTX-M}$, *bla*$_{CMY}$, *bla*$_{OXA-48}$ ou *bla*$_{KPC}$), les quinolones (*qnrA*, *qnrB*), les aminosides (gènes *armA*, *rmtA*, *rmtC*, codant les méthylases), la rifampicine (*arr-2*), les sulfamides (*sul-2*), le chloramphénicol (*cmlA*) et les macrolides (*ereC*). Ces souches peuvent donc devenir pan-résistantes (3).

Le gène *bla*$_{OXA-48}$, codant la carbapénèmase OXA-48, est porté par un unique plasmide chez les entérobactéries, ce gène ne porte pas d'autres résistances. Les résistances associées, liées à la production de BLSE ou céphalosporinases, sont généralement portées par des plasmides additionnels (3).
Parmi les carbapénèmases de type OXA, seuls les gènes *bla*$_{OXA-23}$, *bla*$_{OXA-40}$ et *bla*$_{OXA-58}$ chez *A.baumanii* et *bla*$_{OXA-48}$ sont de support plasmidique et ont un important pouvoir de dissémination. Elles sont très fréquemment associées à d'autres β-lactamases, notamment des BLSE, expliquant la multi-résistance de ces souches, et notamment la résistance aux C3G (5).

A l'inverse des carbapénèmases, la résistance aux carbapénèmes par modification des porines n'est pas transférable entre souches. Le phénomène est donc moins menaçant en terme d'épidémiologie. Cependant, cette imperméabilité peut être associée à la production d'une carbapénèmase et majorer la résistance aux carbapénèmes.

I.A.4 Épidémiologie de la résistance

L'épidémiologie des carbapénèmases est actuellement très variable selon les régions du monde, et extrêmement évolutive. Devant l'émergence croissante des résistances aux antibiotiques, il a été mis en place, en France, un observatoire national de l'épidémiologie et de la résistance bactérienne aux antibiotiques (ONERBA) et en Europe, un réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques : European antimicrobial surveillance Network (EARS-Net), coordonné par l'ECDC (European Center for disease Prevention and Control) pour la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques en santé humaine. Il a également été nécessaire de promouvoir le bon usage des antibiotiques, tant au niveau des médecins prescripteurs que dans la population générale.

Le mécanisme de résistance le plus fréquent actuellement chez les entérobactéries est la production de BLSE. Cependant, les souches productrices de carbapénèmases sont encore plus inquiétantes : la plupart du temps, les souches sont résistantes à toutes les β-lactamines ainsi qu'à de nombreuses autres familles d'antibiotiques, d'où l'apparition de souches pan-résistantes, à l'origine de nombreuses difficultés thérapeutiques. En raison d'une part de leur support génétique plasmidique, et d'autre part de l'utilisation massive des carbapénèmes, la dissémination des carbapénèmases est facilitée.

Les carbapénèmases les plus fréquemment retrouvées chez les entérobactéries sont de type KPC, NDM et OXA-48 et l'espèce la plus souvent en cause est *K.pneumoniae,* qui constitue le réservoir majeur de ces enzymes (4). Mais la fréquence de carbapénèmases est également élevée chez *Escherichia coli, Enterobacter* spp*., Citrobacter freundii (C.freundii)* et *Serratia marcescens (S.marcescens).* Certaines souches ont diffusé à une vitesse alarmante à travers le monde et ont atteint de hauts niveaux d'endémicité (5). Les principaux réservoirs de KPC sont *K.pneumoniae* aux États-Unis, en Israël et en Grèce, ceux de NDM sont *K.pneumoniae* et *E.coli* en Inde et ceux d'OXA-48 sont *K.pneumoniae* et *E.coli* en Afrique du Nord et en Turquie (25).

I.A.4.1 EPC dans le monde

La diffusion des enzymes de type KPC est actuellement préoccupante. Leur dissémination n'a cessé d'augmenter depuis leur découverte en 1996 aux États-Unis, notamment dans l'État de New-York, à Porto Ricco, en Colombie, en Israël, en Italie et en Grèce (23). Les enzymes de type KPC, endémiques actuellement en Israël, sont de plus en plus fréquentes en Chine ou encore en Amérique du Sud (Figure 4) - (26).

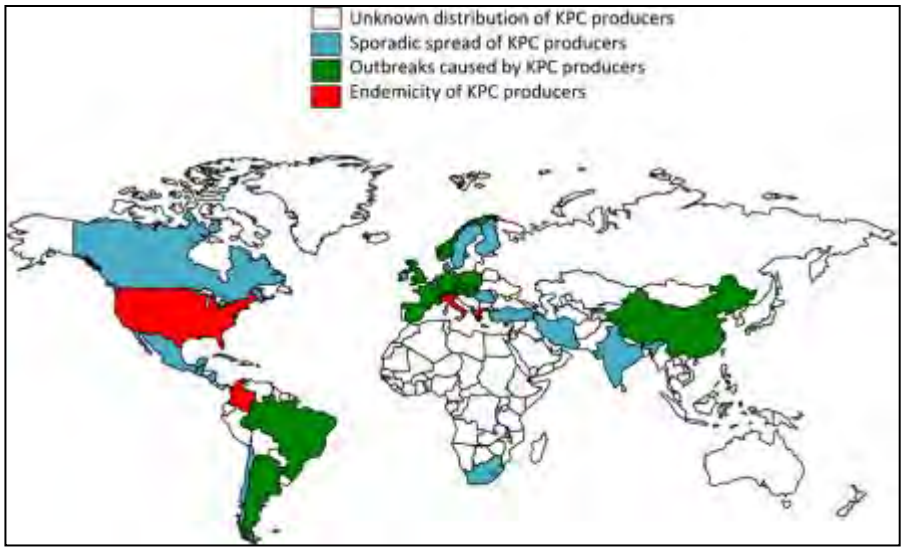


Figure 4. Distribution mondiale des EPC KPC (25)

VIM-2 est endémique en Asie du Sud-Est ainsi qu'en Europe du Sud (Grèce, Italie et Espagne). La Grèce est considérée comme l'épicentre du bassin méditerranéen de la dissémination des entérobactéries productrices de VIM.

Une diffusion endémique des plasmides et des souches productrices de NDM au niveau mondial, notamment en Inde et au Pakistan est observée pour les souches de *K.pneumoniae* et *E.coli* productrices de NDM-1 (Figure 5). Certaines souches productrices de NDM ont également été isolées en Europe (France, Royaume-Uni, Hollande, Belgique, Suède, Autriche, Italie), en Asie et en Australie (2).

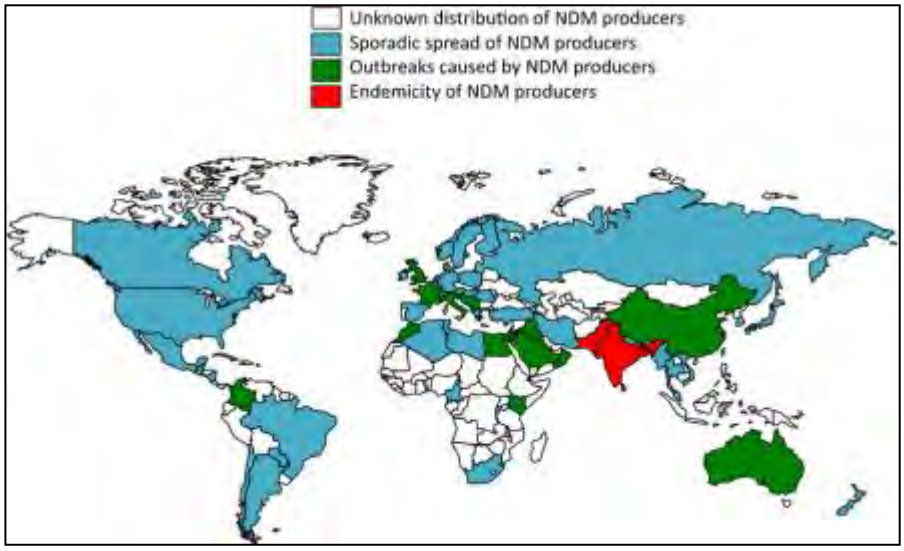


Figure 5. Distribution mondiale des EPC NDM (25)

Les carbapénèmases de classe D sont les plus fréquentes actuellement chez les entérobactéries (2). Les souches de types OXA-48 sont endémiques en Turquie, où elles ont diffusé dans de nombreux hôpitaux. La prévalence est également élevée dans les pays du pourtour Méditerranéen (Maroc, Tunisie, Liban, Egypte, Israël, France) mais des cas ont également été rapportés dans d'autres pays d'Europe tels que l'Allemagne, le Royaume-Uni ou la Belgique. L'Inde est, par ailleurs, également concernée par une diffusion endémique des souches productrices d'OXA-48 (3) - (Figure 6).

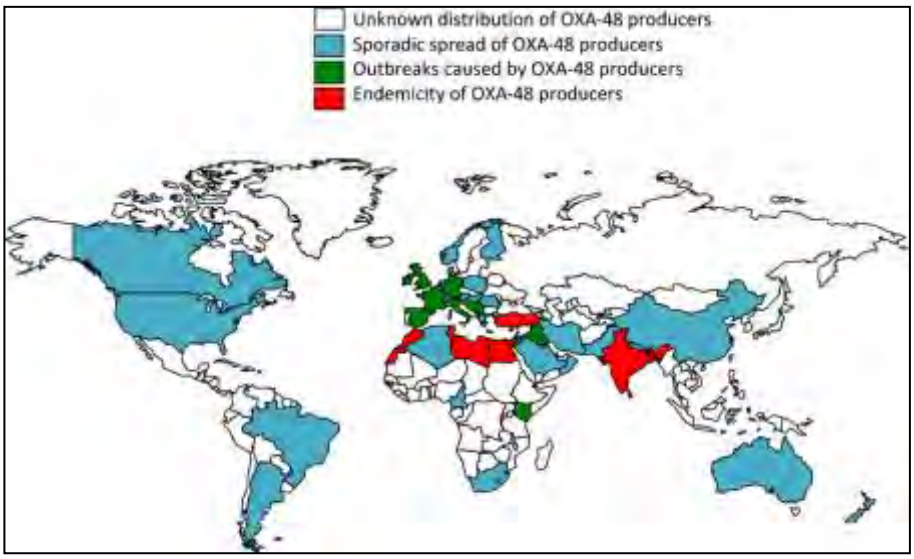


Figure 6. Distribution mondiale des EPC OXA-48-like (25)

I.A.4.2 EPC en Europe

Selon le dernier rapport (2015) EARS-Net piloté par l'organisation European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) (27), la situation s'est aggravée en Europe au cours des dernières années. En effet, les EPC productrices d'OXA-48 ou de MBL de type NDM se sont rapidement propagées.

En 2012, la résistance aux carbapénèmes était rare en Europe et représentait moins de 1% des souches de *E.coli* et *K.pneumoniae* responsables d'infections invasives (27). En 2015, le pourcentage moyen de souches d'*E.coli* résistantes aux carbapénèmes en Europe était de 0.1%. Les pays ayant le pourcentage le plus important étaient la Grèce (1.2%) et la Roumanie (1.9%). Aucune différence significative n'a été observée entre 2012 et 2015 (27) - (Figure 7).

Cependant, une augmentation significative du nombre de souches de *K.pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes a été observée entre 2012 et 2015 : passant de 6.2% en 2012 à 8.1% en 2015. Trois pays présentent un pourcentage significativement supérieur : ce sont la Grèce (61.9%), l'Italie (33.5%) et la Roumanie (24.7%) - (Figure 8). Les pays présentant un fort taux de résistance aux carbapénèmes ont également un haut niveau de

résistance pour les fluoroquinolones, les C3G ou encore les aminosides. Cependant, il faut noter qu'il existe un biais de recueil d'informations pour la Roumanie et la Slovaquie, les données ne concernent que les laboratoires ayant réalisé un rapport au cours des 4 dernières années.

La plupart des épidémies liées à des souches productrices de KPC dans le bassin méditerranéen ont été décrites en Grèce. En effet, KPC-2 a été décrite pour la première fois chez *K.pneumoniae* en Grèce en 2008. Depuis, la diffusion continue de ces souches est à l'origine d'une épidémie nationale. Des épidémies à *E.coli* producteur de KPC ont également été décrites dans des unités de soins de longue durée, soulignant la faculté des souches productrices de KPC à circuler dans l'environnement hospitalier et communautaire (28). KPC est également la carbapénèmase la plus fréquente en Italie (28).

Figure 7. *Escherichia coli* : pourcentage de souches invasives résistantes aux carbapénèmes par pays - Données EARS-Net, 2015 *(27)*

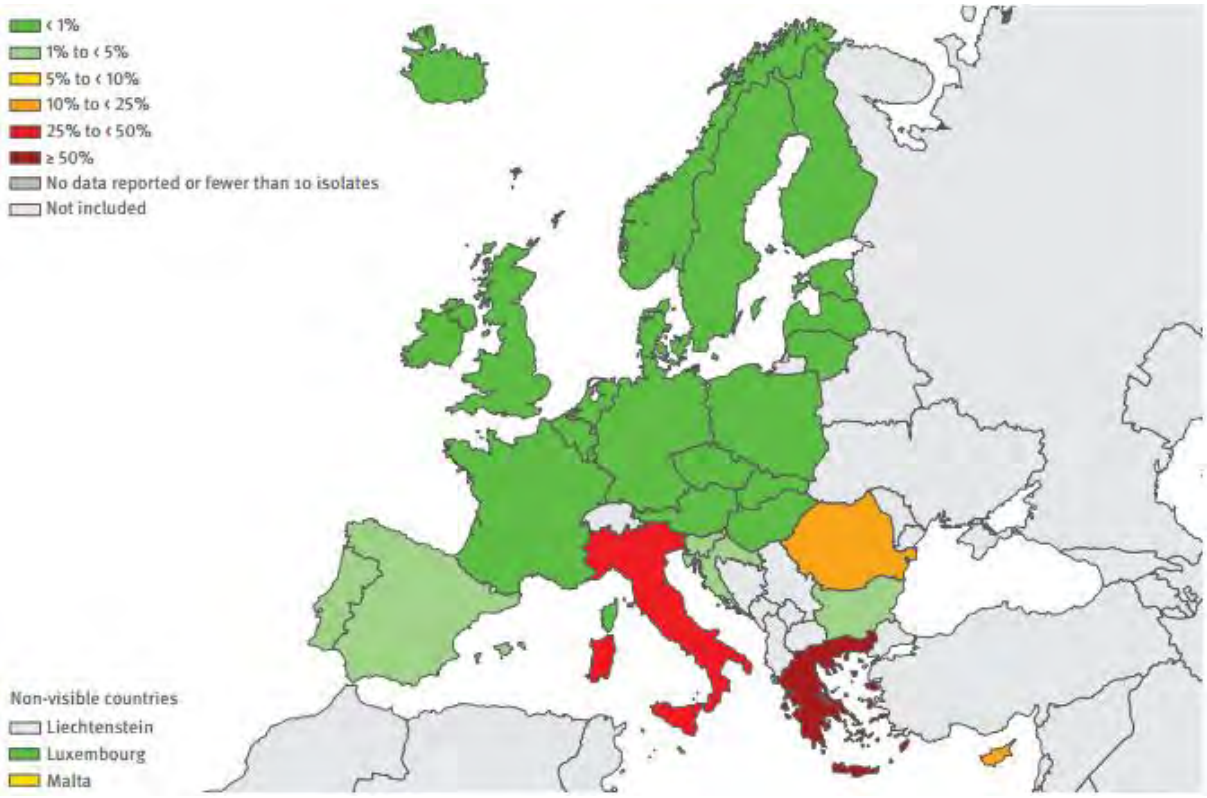


Figure 8. *Klebsiella pneumoniae* : pourcentage de souches invasives résistantes aux carbapénèmes par pays - Données EARS-Net, 2015 *(27)*

I.A.4.3 EPC en France et épidémiologie des souches envoyées au centre national de référence

Actuellement, la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes est relativement limitée en France, mais a cependant significativement augmenté au cours des 4 dernières années. Le signalement des infections nosocomiales (IN) a été mis en place par décret en 2001. En 2004, la colonisation et l'infection à EPC ont été inclues dans les IN (4).

En France, le premier cas d'EPC a été déclaré à l'institut national de veille sanitaire (InVS) en 2004. Entre 2004 et le 31 décembre 2015, 2385 épisodes ont été déclarés par les établissements de santé ou le centre national de référence (CNR) associé de la résistance aux antibiotiques, « Entérobactéries productrices de carbapénèmases » (CHRU de Bicêtre). Entre 2009 et 2013, on observe une nette augmentation du nombre de cas rapportés. A partir de 2013, un pic d'épisodes est observé pendant les mois d'été (Figure 9). Le faible nombre de cas d'EPC observés avant 2009 serait probablement sous-estimé en raison notamment de la méconnaissance des techniques de détection et d'identification des carbapénèmases, notamment d'OXA-48 (25).

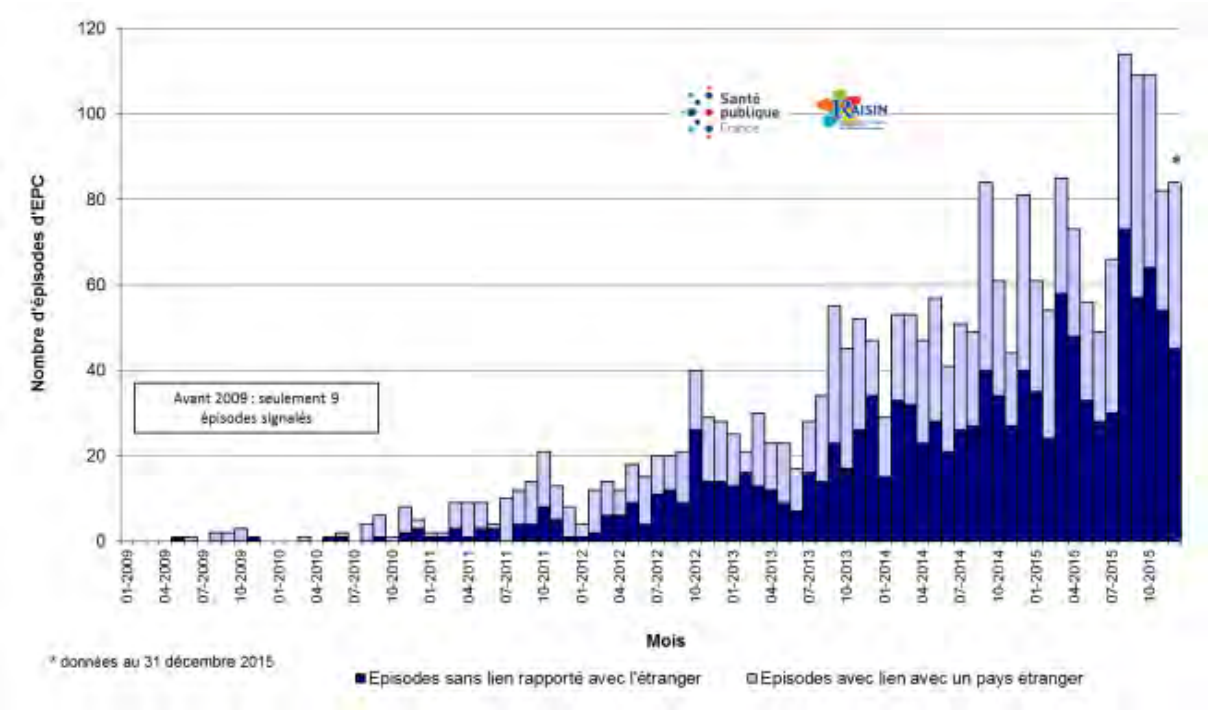


Figure 9. Évolution du nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases en France signalés à l'InVS entre 2009 et 2015, selon la mise en évidence ou non d'un lien avec un pays étranger (*n*=2376). (4)

Entre 2013 et 2015, la moitié (47%) des épisodes présentaient un lien avec un voyage à l'étranger, qu'il s'agisse d'un rapatriement sanitaire ou d'une hospitalisation. Les pays les plus fréquemment en cause étaient le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, l'Égypte, la Turquie et le Sénégal pour OXA-48 puis l'Inde pour NDM et l'Italie pour KPC. Ce pourcentage est très vraisemblablement sous-estimé en raison de l'absence de recherche du cas index. Cependant, une diminution de la proportion d'épisodes en lien avec l'étranger est constatée depuis 2009, date à laquelle 80% des épisodes étaient en lien avec l'étranger (4). Concernant les 1254 épisodes sans lien avec un pays étranger (53%), le mécanisme OXA-48-like est le plus fréquent. Le Tableau 7 regroupe la répartition des différents mécanismes de résistance pour les épisodes sans lien avec un pays étranger.

Tableau 7. Répartition des entérobactéries productrices de carbapénèmases sans lien rapporté avec l'étranger en France signalés à l'InVS entre 2004 et 2015, selon le mécanisme de résistance (4)

	CARBAPENEMASE						
Aucun lien identifié avec l'étranger	OXA-48 like	NDM	VIM	KPC	IMI	IMP	GES-6
	82%	9%	6%	3%	<1%	<1%	<1%

NB : le total est supérieur à 100% car plusieurs mécanismes peuvent être identifiés pour un même cas.

En France, une répartition géographique hétérogène est observée : la plupart des épisodes concerne l'Ile de France, avec 1152 épisodes (45%) entre 2004 et 2015, suivie de la région Provence-Alpes-Côte d'Azur avec 290 épisodes (12%). Cependant, une augmentation du nombre d'épisodes est observées dans toutes les régions (4).

Les espèces les plus fréquemment en cause sont *K.pneumoniae* (58% des épisodes), suivie de *E.coli* (36%). On retrouve également *E.cloacae*-(12%), *C.freundii* (6%) ainsi que *Klebsiella oxytoca* (*K.oxytoca*) - (3%) (4).

En ce qui concerne le mécanisme de résistance en cause, entre janvier 2004 et septembre 2015, 97% des épisodes impliquaient un seul type de carbapénèmase. La carbapénèmase la plus fréquente est OXA-48 et OXA-48-like avec 78% des épisodes, une augmentation des souches productrices d'OXA-181 isolées est également observée. Par ordre de fréquence, on retrouve ensuite NDM (14%), KPC (5%) et VIM (5%). Les autres enzymes étant plus rares. La Figure 10 rapporte l'évolution des mécanismes de résistance entre 2009 et 2015 : une forte augmentation du nombre d'épisodes liées à OXA-48 est observée. Les mécanismes NDM et VIM croissent également, alors que le mécanisme KPC est relativement stable.

Dortet *et al.* (29) ont rapporté en 2016, une épidémie locale à NDM-1 à Castres (Tarn). Après analyse par séquençage du génome, ils ont montré que 20 souches de *M.morganii* productrices de NDM-1, isolées de 3 hôpitaux proches, dans le Sud de la France et une à l'Ile de La Réunion, provenaient de 4 clones. Le dernier clone (C4) comptait 17 souches provenant de patients n'ayant jamais été hospitalisés à l'étranger. Les clones C2 et C3 comportaient chacun une souche, isolée de patients ayant déjà été hospitalisés en Inde. Le clone C1 est constitué de la souche isolée chez le patient hospitalisé à La Réunion. Bien que ces 3 clones ne soient pas identiques, leurs séquences génomiques sont relativement proches, suggérent une épidémie locale ou une faible diversité des NDM-1 dans les pays endémiques comme l'Inde.

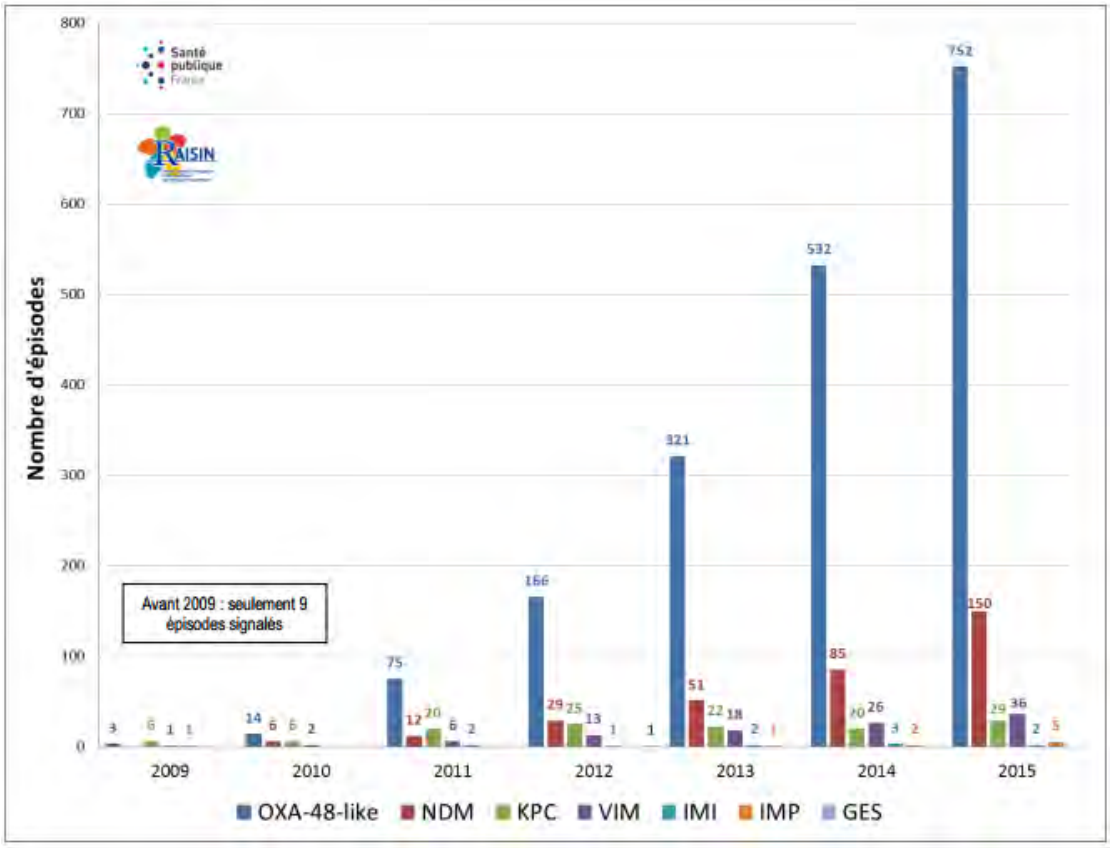


Figure 10. Répartition des épisodes impliquant des bactéries productrices de carbapénèmases en France signalées entre 2009 et 2015, selon les mécanismes de résistance et l'année de signalement (*n* = 2376) - (4)

Au final, parmi les EPC, on observe une nette augmentation du nombre de souches signalées au cours des dernières années. Malgré un plateau observé entre 2013 et 2014, le nombre de signalement est largement reparti à la hausse depuis 2015. La moitié des souches est importée d'un autre pays. Cependant, on assiste à une large croissance du nombre de souches d'EPC « autochtones », en particulier des enzymes de type OXA-48.

Le nombre de souches résistantes aux carbapénèmes envoyées au CNR de Bicêtre a doublé entre 2012 et 2014, passant de 1485 à 2972, puis a diminué en 2015 (2801 souches envoyées). Ceci correspond à une demande du CNR de limiter les envois et de réaliser, dans la mesure du possible, l'expertise des souches. Pour autant, la proportion de souches productrices de carbapénèmases parmi les souches reçues a doublé entre 2012 et 2015, passant de 23.1% à 45.4% (Figure 11) - (30).

Au regard des souches analysées entre 2012 et 2015, les observations faites par le CNR, en plus de l'augmentation du nombre de souches productrices de carbapénèmases, sont :

- une augmentation du nombre de souches productrices d'OXA-48 ;
- une diversification des carbapénèmases de type OXA avec l'émergence des OXA-181 ;
- une augmentation du nombre de souches productrices de NDM ;
- une diminution du nombre de souches productrices de KPC ;
- une augmentation du nombre de souches reçues de laboratoires extrahospitaliers, faisant craindre une diffusion autochtone dans la population générale.

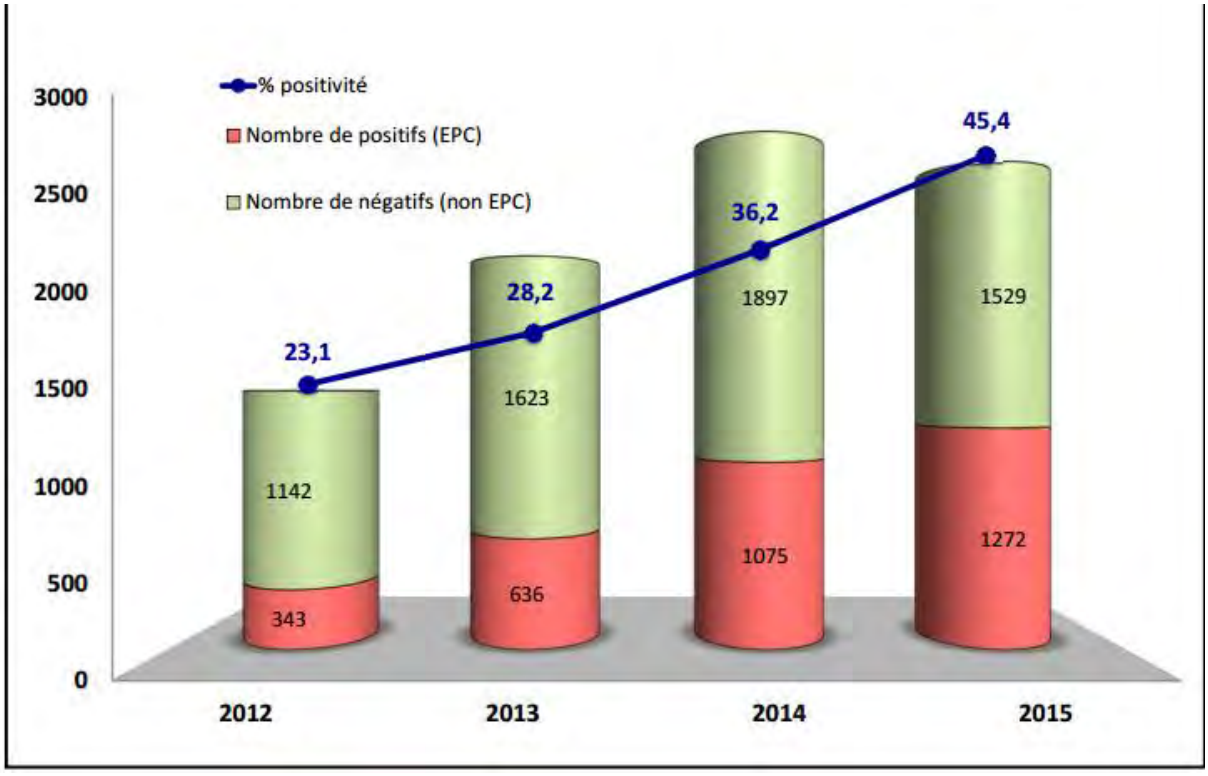


Figure 11. Résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries en France (31)

I.A.5 Traitement et prévention des infections à souches productrices de carbapénèmases

I.A.5.1 Recommandations de bon usage des carbapénèmes

Les indications théoriques des carbapénèmes sont nombreuses, du fait de leur très large spectre, de leur activité bactéricide, de leur diffusion correcte dans tout l'organisme, mais l'émergence de résistance engendre la nécessité d'une politique d'épargne de ces antibiotiques (17). Il est donc indispensable de réduire la prescription d'antibiotiques en général, et de carbapénèmes en particulier, pour limiter la pression de sélection et donc l'émergence de bactéries résistantes.

D'après une étude réalisée dans différents établissements de santé en France (251 établissements) en 2011 (Spa-Carb) - (32), regroupant 2338 malades, il a été démontré que dans seulement 1/3 des cas la prescription de carbapénèmes était justifiée par une multi-résistance retrouvée à l'antibiogramme. Les principales indications de traitement par carbapénème étaient un sepsis sévère et un traitement probabiliste dans respectivement 35% et 18% des cas. Malgré une prescription contrôlée et réévaluée systématiquement dans la grande majorité des cas, il a été mis en évidence que les carbapénèmes étaient prescrits :

- sans prélèvement microbiologique dans 17% des cas ;
- dans des infections communautaires dans 34% des cas ;
- sans motif réel de prescription dans 21% des cas (alternative possible) ;
- sans désescalade optimale après obtention des résultats microbiologiques.

D'après les recommandations formalisées d'expert (RFE SRLF/SFAR/SPILF 2014) organisées en juin 2014 par la Société de réanimation de langue française (SRLF), la société française d'anesthésie et réanimation (SFAR) et la société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF), un Accord Fort a été formulé : « après documentation bactériologique, il faut rechercher une alternative aux carbapénèmes en fonction du site infecté et après discussion entre microbiologistes et cliniciens ».

La commission des anti-infectieux de l'assistance publique des hôpitaux de Paris (1) a émis des recommandations pour favoriser le bon usage des carbapénèmes. Ces recommandations émanent de plusieurs observations :

- « les différents carbapénèmes présentent des profils de sensibilité différents ;
- les conditions d'utilisation décrites dans l'autorisation de mise sur le marché ne reflètent pas les conditions réelles en usage empirique ou documenté ;
- ce sont des molécules de dernier recours mais dont le besoin est croissant en raison de l'augmentation de l'antibiorésistance ;
- des mécanismes de résistance à ces molécules, dont la diffusion est rapide (production de carbapénèmases), sont déjà apparus ».

L'utilisation de carbapénèmes expose à un risque majeur de résistance à ces molécules, quel que soit le mécanisme impliqué.

I.A.5.2 Indications du traitement par carbapénèmes

L'utilisation des carbapénèmes doit être réservée au traitement d'une infection sévère ou prouvée à BMR en l'absence d'alternative (17). Afin d'épargner les carbapénèmes, le traitement d'une infection à entérobactérie productrice de BLSE (EBLSE) doit utiliser, le plus possible, des alternatives thérapeutiques, en particulier pour le traitement des infections urinaires (IU), qui sont :

- associations pénicillines – inhibiteurs de β-lactamases ;
- céfoxitine ;
- fosfomycine ;
- furanes (IU basses) ;
- fosfomycine-trométamol (IU basses) ;
- cotrimoxazole (IU) ;
- témocilline et pivmecillinam, des anciennes molécules de la famille des β-lactamines, récemment réintroduites pour les traitements des IU.

En traitement probabiliste, les carbapénèmes sont utilisables en cas de facteurs de risques de BMR (en particulier de BLSE), dans le cadre d'une infection nosocomiale. D'après les recommandations émises en 2014 par le groupe de travail composé de la SPILF, du CCLIN (Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales) et de l'ONERBA (Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques), les facteurs de risques d'infection à BMR sont :

- « traitement par C3G ou fluoroquinolones (FQ) < 3 mois ;
- portage d'une EBLSE ou *P.aeruginosa* résistant à la ceftazidime, sur un prélèvement de moins de 3 mois, quel que soit le site ;

- hospitalisation à l'étranger < 12 mois ;
- patient vivant en établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) médicalisé ou de soins longue durée ET porteur d'une sonde à demeure et/ou d'une gastrostomie ;
- échec d'une antibiothérapie à large spectre par C3G ou FQ ou pipéracilline-tazobactam ;
- récidive précoce (< 15 jours) d'une infection traitée par pipéracilline-tazobactam pendant au moins 3 jours ».

D'après les RFE SRLF/SFAR/SPILF 2014, il n'est pas recommandé d'utiliser les carbapénèmes en traitement probabiliste en cas d'infection bactérienne communautaire.

L'instauration d'un traitement par carbapénèmes doit obligatoirement être réévaluée après 48 à 72 heures, en fonction des résultats microbiologiques.
En cas de sepsis sévère, il est nécessaire d'administrer de fortes posologies, en particulier à l'initiation du traitement, afin de réduire au maximum l'inoculum bactérien et diminuer ainsi l'émergence de résistance. La durée de traitement doit être la plus courte possible (17).

I.A.5.3 Traitement des infections causées par des EPC

L'émergence d'une carbapénèmase est généralement liée à une pression de sélection importante avec sur-utilisation des carbapénèmes.

Les infections à BGN producteurs de carbapénèmases posent actuellement un problème en termes de thérapeutique (33). En effet :

- ces germes sont généralement résistants à de nombreuses familles d'antibiotiques ;
- les alternatives thérapeutiques sont restreintes ;
- l'expérience est relativement limitée ;
- les coûts (hospitalisation, précautions d'hygiène…) sont élevés.

Peu d'études cliniques, souvent de taille limitée et rétrospectives, sont disponibles et la plupart concernent *K.pneumoniae* productrice de KPC. En effet, aucun essai randomisé contrôlé n'est disponible.

Pour déterminer le traitement de ces infections, il faut :

- évaluer la gravité de l'infection pour déterminer la nécessité d'un traitement systémique ou non ;
- connaître la bactérie en cause : les résistances naturelles des entérobactéries diffèrent de celles d'autres BGN ;

- connaître l'antibiogramme pour distinguer les molécules sensibles *in vitro* de celles qui sont résistantes mais potentiellement utilisables en association. Le type de carbapénèmase produite permet également d'orienter le traitement (20).

Les associations sont à utiliser en priorité car elles diminuent la morbi-mortalité et limitent le risque de sélection de résistances (33). Elles sont définies à partir d'associations synergiques observées *in vitro* (Tableau 8). Le traitement doit être de longue durée, en particulier lorsque l'antibiotique utilisé est bactériostatique (34), afin de faciliter l'éradication bactérienne. Les molécules pouvant être utilisées pour le traitement de ces infections sont : les β-lactamines (carbapénèmes, aztréonam, C3G et témocilline), la colistine, la polymyxine B, la tigécycline, les aminosides et la fosfomycine.

Les infections à EPC doivent être traitées, mais l'éradication du portage digestif est actuellement controversée (33). Deux études israéliennes ont évalué l'efficacité de l'éradication du portage digestif après décontamination digestive par Gentamicine – colistine *per os*. Malgré une efficacité significative de la décontamination digestive par rapport au placebo dans les deux études, celle-ci semblait limitée après plusieurs semaines. Cette décontamination digestive n'est donc pas recommandée en raison de son impact écologique et du risque de développement de résistances additionnelles pouvant compromettre un éventuel traitement ultérieur en cas d'infection grave.

- **Carbapénèmes**

Bien que les carbapénèmes soient normalement hydrolysés par les carbapénèmases, certaines souches peuvent apparaître sensibles aux carbapénèmes et donc potentiellement utilisables. De plus, ces molécules, temps-dépendantes, doivent être administrées en perfusion prolongée. Lorsque les CMI aux carbapénèmes restent sensibles, les associations suivantes restent synergiques *in vitro* : carbapénème + aminoside, carbapénème + colistine et carbapénème + fosfomycine. La synergie peut être conservée *in vitro* malgré des CMI élevées aux carbapénèmes (34).

Qureshi et al (35) ont rapporté une étude de cohortes rétrospective chez 41 patients présentant une bactériémie à *K.pneumoniae* productrice de KPC. La mortalité globale est de 39% à J28. L'étude des combinaisons d'antibiotiques en analyse multivariée montre une meilleure survie avec l'association colistine + carbapénème (12,5% de mortalité), par rapport à l'association colistine + polymyxine B ou tigécycline (66,7%). La majorité des isolats présentaient une CMI à l'imipénème à 4 mg/L, donc rendus résistants selon l'EUCAST.

Il est également possible d'utiliser une association de carbapénèmes : méropénème + ertapénème. L'ertapénème à 1 g/j, en association avec l'injection de méropénème, joue alors un rôle de « substrat suicide » : du fait de sa haute affinité pour les carbapénèmases, en particulier KPC, l'enzyme est partiellement inhibée (29).

Cette stratégie d'association de deux carbapénèmes a pu montrer son succès dans une étude réalisée chez 3 patients infectés par des souches de *K.pneumoniae* productrices de KPC-2 (36). Deux patients présentaient une bactériémie et le troisième une infection urinaire. Après un succès thérapeutique grâce à l'association de l'ertapénème au méropénème ou doripénème, aucun des 3 patients n'a présenté de rechute. Toutes les souches présentaient des CMI au méropénème et à l'imipénème > 16 mg/L et à l'ertapénème > 8 mg/L. Les carbapénèmes pourraient donc être utilisés pour le traitement des infections à germes producteurs de carbapénèmases, surtout si la CMI est ≤ 8 mg/L (34).

- **β-lactamines : aztreonam, C3G et témocilline**

L'aztréonam n'est pas hydrolysé par les MBL et pourrait donc avoir une efficacité dans le traitement des infections dues à des EPC. D'après une étude réalisée dans un modèle d'abcès intra-abdominal à *E.coli* NDM-1 chez le lapin, 100% de survie était observée après traitement par aztréonam. Cependant, ces enzymes sont souvent coproduites avec des BLSE ou céphalosporinases plasmidiques, hydrolysant l'aztréonam (33).

Les OXA-48 hydrolysent peu ou pas les C3G et l'aztréonam, et de façon variable les carbapénèmes. Wiskirchen *et al.* (37) ont montré, sur un modèle expérimental murin à *E.coli*, que la ceftazidime était la plus bactéricide en 24h si la CMI est strictement inférieure à 1 mg/L. La ceftazidime pourrait donc constituer, dans certains cas, une alternative thérapeutique pour le traitement des *E.coli* producteurs d'OXA-48. Cependant, aucune étude clinique n'a confirmé cette efficacité, et étant donné la co-production fréquente (10-20% des cas) de BLSE ou de céphalosporinase plasmidique, l'efficacité n'est pas toujours conservée (33). La témocilline présente souvent une activité chez les souches productrices de KPC (38).

- **Polymyxines (colistine, polymyxine B)**

Afin de déterminer la sensibilité de la colistine, il est nécessaire de réaliser systématiquement une CMI en milieu liquide. Cependant, des faux négatifs sont souvent observés en cas de résistance acquise (39). La colistine, à effet bactéricide, agit par déstabilisation électrostatique de la paroi bactérienne. il est ainsi possible d'avoir une synergie avec des antibiotiques présentant des CMI élevées *in vitro*, d'où l'intérêt de tester des associations avec la colistine. Une synergie de la colistine est souvent retrouvée *in vitro* avec les carbapénèmes, la fosfomycine ou encore la tigécycline (Tableau 8) - (34).

- **Tigécycline**

La tigécycline présente une activité *in vitro* sur de nombreux BGN multi-résistants mais de nombreux échecs thérapeutiques sont constatés, essentiellement lorsqu'elle est utilisée en monothérapie. Bien qu'elle présente une grande synergie *in vitro* avec la colistine, il n'est pas recommandé d'utiliser la tigécycline pour le traitement des infections sévères (34).

- **Aminosides**

Les germes producteurs de carbapénèmases sont souvent sensibles aux aminosides, surtout pour les KPC et VIM, les germes producteurs de NDM sont par contre souvent résistants, en particulier pour l'amikacine et la gentamicine (34). Ils peuvent être utilisés en monothérapie dans le traitement des infections urinaires ou en association dans le traitement des infections graves : infection associée à des hémocultures positives ou à une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) (34). Les aminosides ont une activité synergique avec les β-lactamines ou la fosfomycine, mais aucune synergie n'est observée avec la colistine. Ils doivent être prescrits en respectant les recommandations spécifiques de ces molécules (adaptation à la fonction rénale, administration en dose unique quotidienne, durée maximale de 5 jours, réalisation de dosage plasmatique en cas de traitement de plus de 48h) – (Tableau 8).

- **Fosfomycine**

La fosfomycine doit toujours être utilisée en association, en raison du risque de sélection de mutants résistants. Malgré des cas de succès cliniques avec la fosfomycine, des émergences de résistance sous traitement ont également été décrits, limitant l'intérêt de la fosfomycine (33). Une synergie *in vitro* peut être observée avec les carbapénèmes ou la tigécycline, et non avec la colistine (Tableau 8). La fosfomycine peut être utilisée par voie orale, sous forme de fosfomycine-trométamol, dans le traitement des infections urinaires basses.

Tableau 8. Synergie *in vitro* entre les molécules efficaces *in vivo* sur des EPC (34)

	Amino-glycosides	Colistine	Fosfomycine	Tigécycline	Carbapénème efficace in vitro
Aminoglycosides		Non	Oui	ND	Oui
Colistine	Non		Oui	Oui	Oui
Fosfomycine	Oui	Oui		Oui	Oui
Tigécycline	ND	Oui	Oui		Non
Carbapénème efficace in vitro	Oui	Oui	Oui	Non	

ND : données non disponibles.

I.A.5.4 Prévention de la transmission croisée

Afin de prévenir la transmission croisée des souches, il est nécessaire de prévenir la diffusion à partir des patients porteurs grâce à la mise en place de précautions d'hygiène et du dépistage des porteurs. Il a été démontré que la mise en place de mesures complémentaires d'hygiène dans les premières 48 heures de l'hospitalisation d'un porteur de BMR était associée à une réduction significative du nombre de cas secondaires (6).

I.A.5.4.1 Précautions d'hygiène

En France, des mesures de prévention drastiques ont été mises en place et des recommandations ont été émises en 2013 par le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) pour les patients infectés ou colonisés.

Le HCSP a classé les EPC, avec les entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) parmi les Bactéries Hautement Résistantes émergentes (BHRe). Ce sont des bactéries commensales du tube digestif, résistantes à de nombreux antibiotiques, avec des mécanismes de résistance transférables. La maîtrise de la transmission croisée des bactéries comprend 3 niveaux de recommandations (40) :

1) précautions standard : ce sont des mesures d'hygiène à appliquer chez **tous** les patients afin de limiter la transmission d'agents pathogènes et de protéger le personnel soignant, les autres patients et l'environnement. Elles comprennent l'hygiène des mains, les recommandations concernant le port des gants, la tenue professionnelle, la gestion des excréta. Il n'est pas possible de rechercher une BMR en systématique, c'est pourquoi il est très important d'appliquer les précautions standard chez tout patient ;

2) précautions complémentaires : elles sont appliquées lors de la mise en évidence d'une BMR (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ou EBLSE) ou d'une pathologie très contagieuse, telle qu'une infection à *Clostridium difficile*, la coqueluche, la tuberculose respiratoire, etc. Dans le cas d'une BMR, ce sont les précautions complémentaires de type contact (PCC) qui sont appliquées. Les principes sont les suivants : chambre individuelle, signalisation pour les intervenants, soins personnalisés, petit matériel dédié dans la chambre. D'autres mesures pourront être appliquées selon les cas ;

3) précautions spécifiques de type BHRe : elles dépendent du type de résistance et de la situation épidémiologique locale. Ces mesures sont généralement supervisées par l'équipe opérationnelle d'hygiène. Les principes généraux de ces précautions reposent sur :
   - l'identification des patients à risque et la recherche du portage digestif de BHRe ;
   - l'application très rigoureuse des PCC ;
   - l'organisation spécifique des soins.

I.A.5.4.2 Dépistage des porteurs

La prévention de la diffusion vise à dépister les patients porteurs, dès les stades précoces de leur hospitalisation, et à mettre en place des précautions d'hygiène complémentaires adéquates afin de limiter la dissémination des mécanismes de résistance. Le problème majeur est la sélection des patients à dépister, ceux-ci étant le plus souvent asymptomatiques. Ce dépistage est réalisé chez des patients à risque d'être porteurs :

- patients concernés : rapatriement sanitaire, hospitalisation à l'étranger, voyage à l'étranger sans hospitalisation (selon interrogatoire) ; l'identification des facteurs de risque est insuffisante à ce jour pour sélectionner ces voyageurs ;
- services cliniques à sensibiliser en priorité : unités de soins intensifs, service d'oncologie/hématologie (patients immunodéprimés, greffés).

Il est également important que ces patients soient signalés lors d'un transfert inter-établissements.

I.B DETECTION DES CARBAPENEMASES AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MEDICALE

L'identification des souches productrices de carbapénèmases doit être la plus rapide possible afin de permettre d'adapter au mieux la thérapeutique des patients infectés et de limiter au maximum la dissémination des souches en identifiant les patients infectés ou colonisés. La distinction rapide des souches résistantes aux carbapénèmes par production de carbapénèmases ou par association de mécanismes, à moindre risque de dissémination, permet d'éviter la mise en place inutile des précautions d'hygiène complémentaires, dont le coût est important.

Selon les recommandations du Haut conseil de santé publique (HCSP) émises en 2013, il est obligatoire de signaler les infections rares ou graves pour des phénotypes de résistance rares ou émergents. Ainsi, toute souche suspecte de produire une carbapénèmase doit faire l'objet d'un signalement à l'ARS (agence régionale de santé) et au CCLIN. Dans la mesure du possible, l'expertise doit être réalisée dans le laboratoire ayant isolé la souche. En cas d'impossibilité, celle-ci peut être envoyée dans un laboratoire expert ou au centre national de référence pour expertise.

La détection des carbapénèmases relève de deux contextes :

- découverte fortuite sur l'antibiogramme (sur un prélèvement à visée diagnostique) ;
- dépistage d'un portage.

La recherche de carbapénèmases devra être réalisée devant toute souche ayant une diminution de sensibilité à l'un des carbapénèmes. Lorsqu'on suspecte une carbapénèmase, il est important :

- de vérifier le dossier du patient et rechercher une éventuelle souche déjà isolée antérieurement qui serait devenue intermédiaire ou résistante à au moins un carbapénème par imperméabilité du fait des traitements reçus par le patient ;
- de rechercher la notion d'une hospitalisation ou d'un voyage à l'étranger dans le cas d'un patient non connu.

I.B.1 Difficultés de détection des EPC

Les CMI peuvent être déterminées par une méthode E-test® ou par méthode automatisée en milieu liquide. Les résultats des CMI sont obtenus à J1 de la culture. Les critères de sensibilité/résistance aux carbapénèmes sont définis selon les recommandations européennes (EUCAST) ou selon les recommandations américaines du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). L'ertapénème présente les valeurs seuils les plus basses pour les entérobactéries (Tableau 9). Cependant, l'EUCAST a diminué le seuil de sensibilité des carbapénèmes pour permettre la détection des EPC ayant des CMI modérément augmentées.

Tableau 9. Critères de sensibilité/résistance selon les recommandations américaines (CLSI) et européennes (EUCAST) - (41)

	CLSI		CASFM/EUCAST	
	S (≤)	R (>)	S (≤)	R (>)
Imipénème	4	8	2	8
Méropénème	4	8	2	8
Ertapénème	2	4	0,5	1

Les systèmes automatisés présentent de bonnes performances, en particulier le Vitek® 2 (bioMérieux), utilisé au laboratoire du CHU de Toulouse, pour la détection des EPC. Les performances pour la détection des KPC l'illustrent dans le Tableau 10. Si l'automate rend « suspicion de carbapénèmase » ou si les CMI sont augmentées, il est nécessaire de réaliser des tests complémentaires. Les bonnes performances de l'automate Vitek® 2 sont illustrées par une étude rapportée par Pailhoriès *et al.* (42). À la suite d'une épidémie à *K.pneumoniae* productrice d'OXA-48 au CHU d'Angers en 2013, une nouvelle méthodologie de dépistage des carbapénèmases a été mise à place. Jusque là, les souches pour lesquelles une diminution de sensibilité ou une résistance à l'ertapénème était observée au Vitek® 2, un contrôle de CMI était réalisé par méthode E-test, sans dépistage de carbapénèmase. L'objectif de cette étude était de déterminer s'il y avait eu des souches productrices OXA-48 dans cet hôpital avant l'épidémie. 21 souches de *K.pneumoniae* ont été sélectionnées, les CMI de l'ertapénème au Vitek® 2 étaient toujours > 0,5 mg/L (comprises entre 1 et 8) et celles en E-test étaient toujours < 0,5 mg/L. Parmi ces 21 souches, le kit Rosco était positif pour 3 d'entre elles et la PCR GeneXpert a confirmé la production d'OXA-48. Cette étude rétrospective illustre la nécessité de rechercher une carbapénèmase par des méthodes complémentaires devant une CMI à l'ertapénème > 0,5 mg/L au Vitek® 2, même lorsque la CMI par méthode E-test ne confirme pas cette résistance.

Une étude rapportée par Woodford *et al.* (43) compare les performances pour la détection des EPC de 3 automates utilisés pour la réalisation d'antibiogramme en milieu liquide : BD Phoenix™, Vitek® 2 et MicroScan Walk-Away®. Les sensibilités et spécificités à détecter une suspicion de carbapénèmase sont respectivement de 100% et 0% pour BD Phoenix™, 82 à 85% et 6 à 19% pour MicroScan Walk-Away® et 74% et 38% pour Vitek® 2. Alors que tous les systèmes ont permis une bonne détection des KPC, la sensibilité de détection des OXA-48 était faible pour les 3 automates. Bien que le système Vitek® 2 présente une meilleure spécificité, en lien avec un système expert plus complexe, il présente une plus faible sensibilité de détection des EPC.

Tableau 10. Performances des automates pour la détection des souches productrices de KPC (44)

TABLE 1. Performance of susceptibility testing methods for detecting KPC-mediated resistance

Method	Sensitivity (%)/specificity (%) of:					
	Intermediate or resistant susceptibility result[a]			Carbapenem MIC of >1 μg/ml		
	Meropenem	Imipenem	Ertapenem	Meropenem	Imipenem	Ertapenem
Reference BMD	94/98	94/93	97/89	100/93	100/93	100/89
Etest	58/96	55/96	90/84	84/91	90/89	100/84
Disk diffusion	71/96	42/96	97/87	NA[b]	NA	NA
~~Vitek Legacy~~	~~52/98~~	~~55/96~~	~~NA[d]~~	~~NA[c]~~	~~NA[c]~~	~~NA[d]~~
Vitek 2	48/96	71/96	94/93	71/93	94/89	94/89
MicroScan	84/98	74/96	100/89	100/93	100/93	NA[c]
~~Phoenix~~	~~61/98~~	~~81/96~~	~~NA[d]~~	~~74/96~~	~~87/93~~	~~NA[d]~~
Sensititre	42/98	29/96	NA[d]	81/96	NA[c]	NA[d]

[a] Interpretive criteria were based upon CLSI criteria.
[b] NA, not applicable.
[c] Not applicable because the MIC range tested was not low enough (e.g., lowest dilution tested was either 2 μg/ml or 4 μg/ml) for the identification of a carbapenem MIC of >1 μg/ml.
[d] Not applicable because ertapenem was not available on a panel.

Le criblage des souches à partir de la détermination des CMI peut parfois poser quelques problèmes. En méthode E-test, les CMI peuvent parfois être difficiles à lire et à interpréter, en raison de la possible présence de micro-colonies dans la zone d'inhibition, qui sont à prendre en compte ou non en fonction de l'espèce et de l'enzyme (Figure 12).

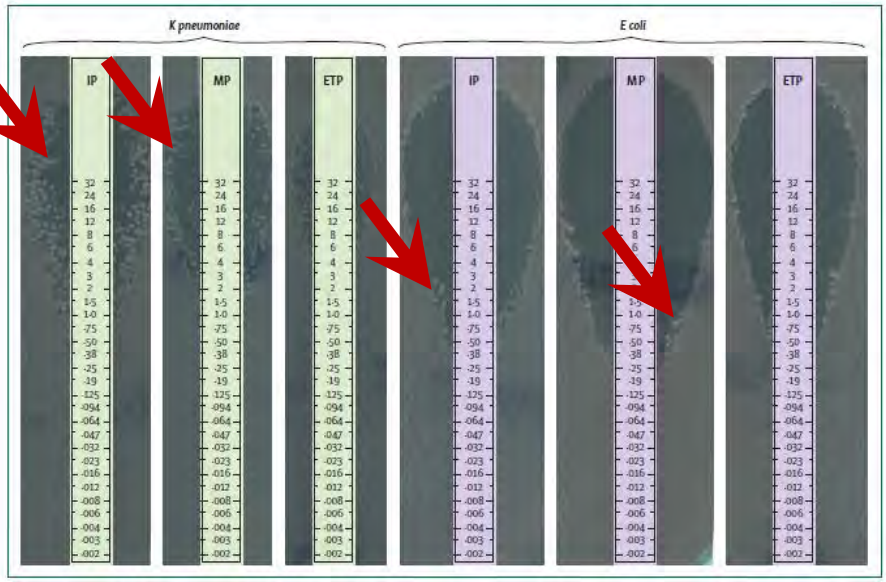


Figure 12. Difficultés de lecture des CMI dues à des micro-colonies dans la zone d'inhibition (23)

La détection d'une souche productrice de carbapénèmase par de simples tests phénotypiques n'est pas aisée car le niveau de résistance aux carbapénèmes est variable et peut parfois être limite au seuil de sensibilité (Figure 3).

Selon le CASFM, l'ertapénème permet de dépister les souches résistantes aux carbapénèmes et est sensible pour la détection des EPC en particulier en cas de CMI élevée (Figure 13) - (16). Cependant selon les recommandations de l'EUCAST pour la détection des mécanismes de résistance, l'ertapénème présente une haute sensibilité mais une faible spécificité et ne devrait donc pas être utilisé en routine ; le méropénème présenterait la meilleure sensibilité et spécificité pour la détection des EPC.

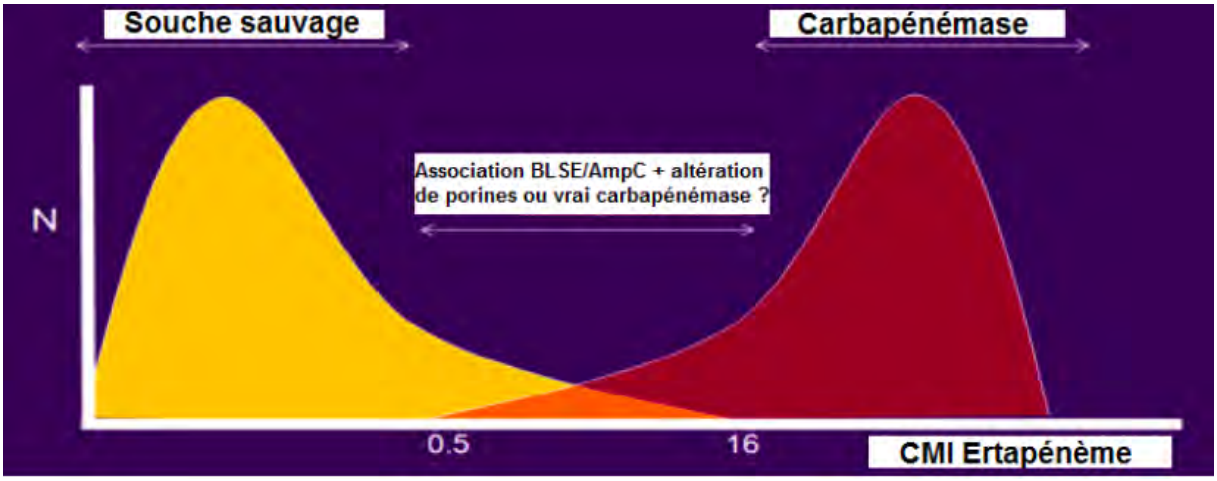


Figure 13. Difficultés de criblage des carbapénèmases

d'après Public Health England, « UK standards for microbiology investigations» - www.hpa.org.uk

Les EPC de type OXA-48 représentent plus de la moitié des EPC en France, il est donc important de trouver des tests qui permettent de les identifier rapidement et de façon fiable. Concernant les oxacillinases (essentiellement les OXA-48), leur détection est difficile car :

- une production de BLSE est fréquemment associée expliquant la résistance aux C3G fréquemment observée ;
- elles présentent un bas niveau de résistance aux carbapénèmes : les CMI aux carbapénèmes peuvent être sensibles (42) ;
- leur détection phénotypique est difficile du fait de l'absence d'inhibiteur d'enzyme de classe D.

Il est souvent difficile d'identifier le mécanisme d'une souche résistante aux carbapénèmes, en raison d'une association fréquente de différents mécanismes de résistance. De plus, les carbapénèmases présentent des niveaux très variables de résistance aux carbapénèmes.

I.B.2 Méthodes phénotypiques

Les tests phénotypiques de détection des carbapénèmases regroupent les tests d'hydrolyse, dont certains permettent d'obtenir un résultat rapide et les méthodes d'inhibition, ainsi que des méthodes immunochromatographiques.

I.B.2.1 Tests d'hydrolyse de l'activité carbapénèmase

Les tests d'hydrolyse pour la détection des carbapénèmases sont : le test de Hodge (à abandonner en raison de ses faibles performances), la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, les tests colorimétriques et le test CIM (Carbapenem inactivation method). Les méthodes colorimétriques reposent sur le principe du test Carba NP, des kits commerciaux sont disponibles. Le test CIM (Carbapenem Inactivation Method) a récemment été développé par Zwaluw *et al.* (45). Les performances du test CIM seront évaluées dans la deuxième partie de ce travail.

I.B.2.1.1 Test de Hodge modifié

Le test de Hodge modifié (MHT) permet de mettre en évidence une carbapénèmase par détection d'une synergie entre une souche productrice de carbapénèmase (souche à tester) et une souche sauvage sensible (de référence) dite indicatrice. Ce test consiste à ensemencer une gélose Muller-Hinton avec une suspension d'une souche bactérienne indicatrice : Escherichia coli ATCC 25922 sauvage à 0,5 Mc Farland diluée au 1/10. Un disque d'ertapénème à 10 µg est déposé au centre de la boîte. Les souches à tester et le contrôle positif sont ensuite déposés en stries à partir du disque.

Le test est positif lorsqu'on observe une image en forme de trèfle correspondant à une distorsion de la zone d'inhibition autour du disque d'ertapénème, après une incubation de 18h à 37°C, comme on peut le voir sur la Figure 14. Le test de Hodge modifié mettant en évidence l'hydrolyse des carbapénèmes est aujourd'hui à abandonner car il est sensible pour la détection des producteurs de KPC et OXA-48 mais de nombreux faux-positifs sont observés, en particulier pour les souches d'*Enterobacter* spp. surexprimant leur céphalosporinases naturelle (3).

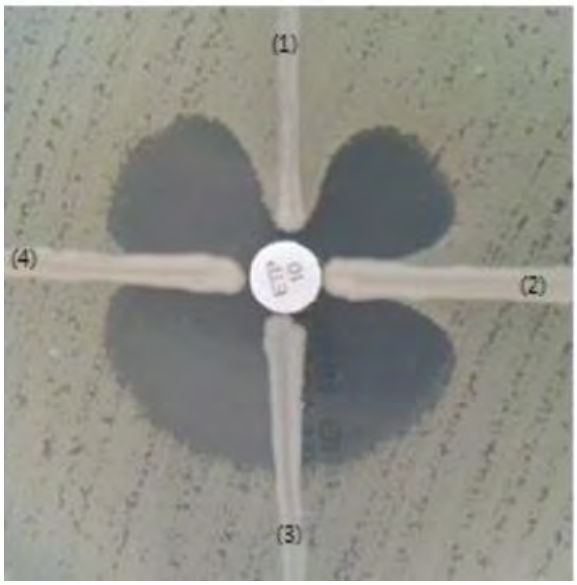


Figure 14. Test de Hodge modifié

(1) et (2) : souches patient productrices de carbapénèmase ; (3) : contrôle négatif ; (4) : contrôle positif

Avantages :

- technique peu coûteuse ;
- bonne sensibilité de détection des enzymes de classes A et D.

Anderson *et al.* (44) ont montré qu'une résistance à l'ertapénème, combinée à un test de Hodge positif, était suffisamment sensible pour la détection des KPC.

Inconvénients :

- la réalisation et l'interprétation sont parfois difficiles ;
- la détection des MBL présente un défaut de sensibilité, en particulier pour les souches de type NDM.

En effet, Girlich *et al.* (46) ont montré que le défaut de détection des producteurs de NDM pourrait être expliqué par la sécrétion d'un peptide bactérien, libéré par certaines bactéries, qui inhiberait la pousse de la souche indicatrice et interfèrerait donc avec les résultats du test.

- manque de spécificité : nombreux faux positifs, en particulier pour les souches d'*Enterobacter* spp. surexprimant leur céphalosporinase naturelle ou pour les entérobactéries productrices de BLSE de type CTX-M ;
- délai d'obtention du résultat : ≥ 24h après obtention de l'antibiogramme.

Malgré le fait que cette méthode soit facile et peu couteuse, elle est aujourd'hui à abandonner dans l'algorithme de détection des carbapénèmases, en raison d'un manque de sensibilité et spécificité.

I.B.2.1.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse (SM) de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) a été implantée dans de nombreux laboratoires de microbiologie clinique pour l'identification bactérienne, et a permis de réduire le délai de rendu de résultats. En effet, après avoir déposé une colonie à partir d'une culture et ajouté une matrice sur la plaque, l'identification de la bactérie est obtenue en moins d'une minute (6). Le principe de cette méthode est basé sur l'ionisation de la cible (constituée de l'échantillon à analyser et de la matrice), à partir d'une source laser. Les ions sont ensuite accélérés dans un champ électrique et projetés vers un détecteur. Ces ions sont séparés et analysés en fonction de leur temps de vol, dépendant de leur masse. Les automates commercialisés les plus répandus sont : MALDI Biotyper® (Bruker), Vitek® MS (bioMérieux), et Andromas® (Beckman Coulter).

La technique MALDI-TOF peut également, à partir d'une culture bactérienne, mettre en évidence la modification du spectre d'un carbapénème en présence d'une carbapénèmase.

Protocole de réalisation du test (Figure 15) :

- bactéries suspectes de produire une carbapénèmase à partir d'une culture

→ incubation dans une solution de carbapénème ;

- centrifugation de cette solution ;
- récupération du surnageant et dépôt sur une cible puis ajout de la matrice ;
- analyse en MALDI-TOF ;
- interprétation des spectres (par l'opérateur ou par un logiciel dédié).

On observe une diminution du pic de masse du carbapénème natif et l'apparition de produits de dégradation qui correspond à un gain d'une molécule d'eau, ou à un gain d'une molécule d'eau associée à une perte d'une molécule de dioxyde de carbone (Figure16).

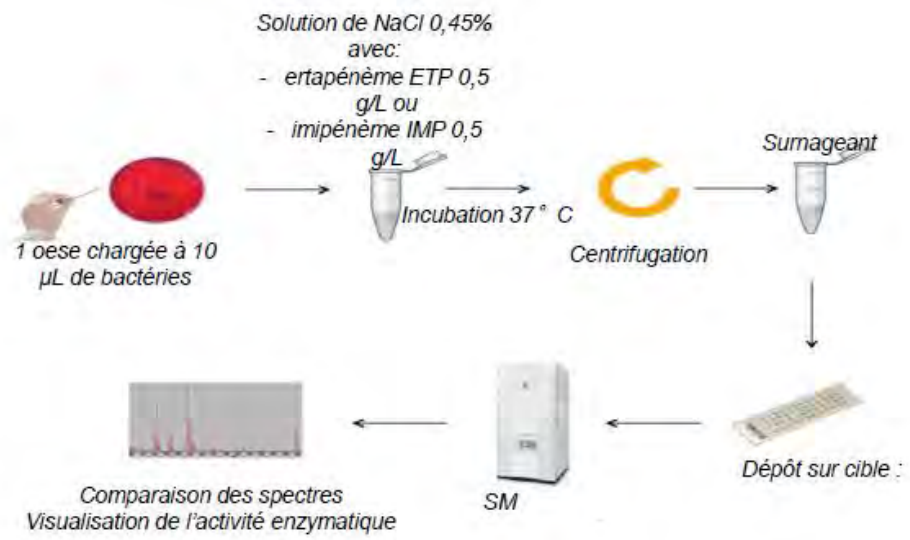


Figure 15. Détection de l'activité carbapénèmase par spectrométrie de masse MALDI-TOF (47)

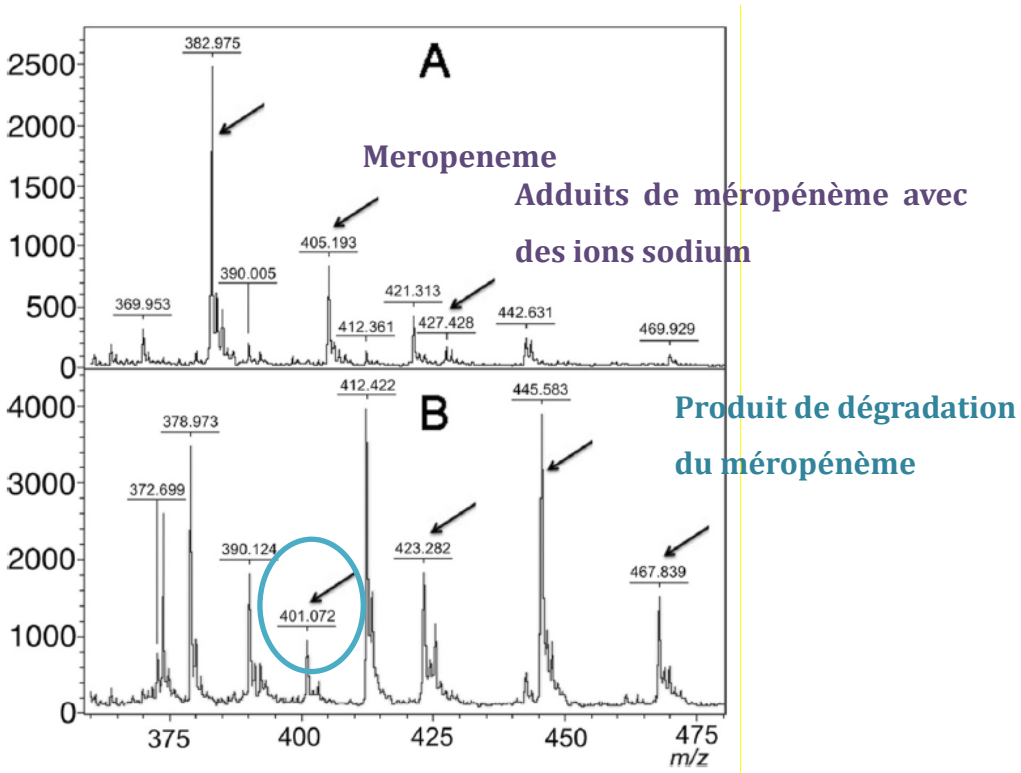


Figure 16. Spectre de masse (MALDI-TOF) permettant la détection de l'activité carbapénèmase (48)

Spectre de masse du méropénème (masse détectée 389,975 m/z) et ses sels (405, 193 m/z et 427, 428 m/z)
Méropénème avec liaison amide modifiée (401, 072 m/z) et ses sels (423,282 / 445, 583 et 467, 839 m/z)
Les pics correspondants aux molécules testées sont marqués de flèches. Les unités sur l'axe des y correspondent à l'intensité relative.

Avantages:

- bonnes performances, y compris pour les OXA-48 (Tableau 11) ;
- technique rapide (2-3h) ;
- identification de tout type de carbapénèmases ;
- réalisable sur souches isolées ou directement à partir de flacons d'hémocultures ;
- faible coût en réactif (mais le kit commercialisé par Bruker pour la détection des carbapénèmases présente un coût important).

Inconvénients:

- nécessité de posséder un spectromètre de masse ;
- absence de protocole standardisé ;
- mise au point délicate de la technique, nécessitant un système d'acquisition et d'analyse des spectres ouvert ou un logiciel d'interprétation automatique des spectres disponible par le fournisseur ;
- expertise nécessaire (personnel entraîné) en l'absence de logiciel disponible ;
- problème de détection de certains *Proteus* spp. ou *Morganella* spp. producteurs de NDM ou VIM dans certaines études. Les hypothèses concernant ces faux-négatifs sont : un problème de disponibilité de l'enzyme avec cette méthode n'utilisant pas d'étape de lyse, ou bien le carbapénème utilisé (imipénème). Ce problème n'est pas rapporté dans d'autres études utilisant l'ertapénème ou le méropénème comme substrats (6).

La détection des carbapénèmases par MALDI-TOF a également été validée pour les souches de *Pseudomonas* spp. et d'*Acinetobacter* spp. Différents protocoles peuvent être utilisés pour détecter une activité carbapénèmase par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) avec :

- différents substrats (ertapénème, imipénème, méropénème, faropénème) ;
- différentes conditions de lyse ;
- différents temps d'incubation ;
- différents paramètres ou critères de positivité ;
- différents calibrants (pic HCCA, pic du carbapénème ou de ses métabolites).

Ces différentes conditions ont été comparées dans le Tableau 11.

Un module spécifique est commercialisié : MALDI Biotyper STAR BL®, Bruker (49).

Tableau 11. Protocoles de spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la détection de la production de carbapénèmase selon différentes études

Auteurs	carbapénème testé	Enzymes / germes testés		Nb souches CARBA +	Nb souches CARBA-	Calibration	Critère de positivité	Spectro utilisé	Performances techniques
Hrabak *et al.* (2011) (48)	Méropénème	Entérobactéries : VIM, KPC, NDM-1 *P.aeruginosa* (14) : VIM, IMP		30	94 (55 souches R et 39 souches S)	MRP et ses produits de dégradation obtenus par hydrolyse par NaOH	Absence du pic à 383 et/ou 405 m/z	Bruker	Se = 96.67% Sp = 97.87% (FP et FN pour Pyo)
Burckhardt *et al.* (2011) (50)	Ertapénème	NDM-1, VIM-1, VIM-2, KPC-2, différentes IMP	Entérobactéries *P.aeruginosa* (10)	47	30	Pic HCCA (379 Da)	Disparition complète des pics de l'ertapénème	Bruker	Comparaison vs Test de Hodge : Se = 100% vs 85% Sp = 100% vs 100%
Kempf *et al.* (2012) (51)	imipénème	KPC-1, NDM, VIM-2 OXA-23-like, OXA-24-like	*A. baumanii* KP *P.aeruginosa*	70	79	IMP pur (pic IMP + métabolite)	Disparition complète du pic de l'imipenème et augmentation du pic du métabolite	Bruker	Après 2h d'incubation : Se = 95.2% et Sp = 100% Après 4h d'incubation : Se = 100% et Sp = 100%
Sparbier *et al.* (2012) (52)	Imipénème Méropénème Ertapénème	?	*E.coli* KP	2	7	Pic HCCA, pics bradykinine (1-5) et pics bradykinine (1-7)	Intensité des formes hydrolysées ≥ 80% des formes totales IMP/MRP : disparition complète des pics des formes natives	Bruker	Se = 100% Sp ? (absence de souches CARBA-)
Hrabak *et al.* (2012) (53)	Méropénème	NDM-1, VIM-1, KPC-2, KPC-3, OXA-48/162	Entérobactéries *A. baumanii* (NDM-1)	110	35	Méropèneme et ses 2 sels de sodium	≥ 1 pic d'une forme décarboxylée et absence des 2 pics de formes primaires	Bruker	Se = 100% Sp = 100% (après 2h d'incubation)
Lee *et al.* (2013) (54)	Ertapénème	Acinetobacter spp. (IMP-6, VIM-2, SIM-1, OXA-23, OXA-51) Pyo (IMP-6, VIM-2) KP (NDM-1, KPC-1)		80	17 + 4 souches carbapénèmes S	pics de la matrice HCCA	détection de 3 pics correspondants aux formes hydrolysées (sauf celui à 450)	Bruker	Sp = 100% - 20µL sol° tampon/4h incubation : Se = 100% - 50µL sol° tampon/12h incubation : Se = 100%
Carvalhaes *et al.* (2013) (55)	Ertapénème	*P.aeruginosa* : SPM-1, GIM-1, GES-5 *A.baumanii* : OXA-143, IMP-10, OXA-58		52	21	Pic HCCA et pic bradykinine (1-7)	Disparition complète des pics de l'ertapénème intact (475m/z) et de son sel monosodique (497 m/z)	Bruker	Enzymes classe A et B / 2h d'incubation Enzymes classe D / 4h d'incubation Sensibilité = 100% Spécificité = 100%
Hoyos *et al.* (2014) (56)	Ertapénème	6 entérobactéries (2 IMP, 3 VIM, 1 KPC) 8 *P.aeruginosa* (7 VIM et 1 IMP)		14	49 (29 entérobactéries et 20 *P.aeruginosa*)	Pic HCCA, et pics standard externe : bradykinine (1-5 bradykinine (1-7)	Disparition des 3 pics correspondants à l'ertapénème non hydrolysés (sels mono/di sodiques)	Bruker	Sp = 100% Se = 100%

Se : Sensibilité ; Sp : spécificité ; Nb : nombre ; R : résistant ; S : sensible ; MRP :méropénème ; IMP : imipénème
CARBA - : souches résistantes aux carbapénèmes mais non productrices de carbapénèmase, CARBA + productrices de carbapénèmases
HCCA : acide α-cyano-4-hydroxycinnamique = matrice ; spectro : spectromètre de masse

I.B.2.1.3 Méthodes colorimétriques

Les tests d'hydrolyse basés sur des méthodes colorimétriques détectent l'activité carbapénèmase grâce à une variation de couleur du milieu réactif liée à l'activité hydrolytique qui modifie la composition biochimique du milieu.

I.B.2.1.3.1 Carba NP test (Carba Nordmann-Poirel Test)

Le Carba NP test est une méthode biochimique de détection des carbapénèmases développée par Nordmann et son équipe. Ce test met en évidence l'acidification du milieu grâce à un indicateur coloré lors de l'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénèmase.
L'indicateur coloré, le rouge de phénol, vire au jaune lors de l'hydrolyse de l'imipénème par production d'acide et donc diminution du pH (Figure 17). Ce test a été évalué au CNR, à partir de plus de 4000 souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes. Le Carba NP est un test rapide et peu onéreux dont la mise en place peut se faire dans tout laboratoire de microbiologie (3), il est actuellement recommandé en première ligne pour le dépistage de l'activité carbapénèmase par le CLSI aux États-Unis (6). Deux tests, utilisant le principe du Carba NP ont été commercialisés. Il s'agit du RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux) et du Neo-Rapid Carb Screen® (anciennement Rapid Carb Screen®) - (Rosco diagnostics) – (Figure 17).

Une étude a été réalisée au CNR par Dortet *et al.* (2015) - afin de comparer les kits commerciaux, RAPIDEC® CARBA NP, et Rapid Carba Screen®, dérivés du Carba NP test, avec la technique « maison ». Cette étude a été réalisée à partir de 55 non–EPC et 95 EPC (21 productrices de KPC, 21 productrices de NDM, 17 productrices de VIM, 11 productrices d'IMP, 16 productrices d'OXA-48 et 9 productrices d'OXA-48-like). Les performances des 3 tests selon cette étude sont regroupées dans le Tableau 12.

Tableau 12. Performances du RAPIDEC® CARBA NP, du Rapid CARB Screen® et du Carba NP test et caractéristiques comparées des différents tests (7)

	RAPIDEC® CARBA NP (bioMérieux)	Rapid CARB Screen® (ROSCO)	Carba NP test (méthode « maison »)
Sensibilité	99%	89.5%	96.8%
Spécificité	100%	70.9%	100%
Délai - 1ers résultats	Immédiat	30min	Immédiat
Délai – résultats définitifs	2h	2h	2h
Coût	10€	3€	<1€

Le RAPIDEC® CARBA NP possède donc les meilleures performances pour la détection des EPC, malgré un inoculum difficile à standardiser. Une plus faible sensibilité de détection des OXA-48 a été observée pouvant être liée à une faible activité hydrolytique des enzymes, des cultures « anciennes » ou encore un inoculum trop faible. Le RAPIDEC® CARBA NP ne nécessite pas de matériel supplémentaire (en dehors d'une öese de 10µL), contrairement au Rapid Carb Screen® et au Carba NP test.

Les performances du Rapid Carb Screen®, démontrées par l'équipe du CNR concordent avec ce qu'ont rapporté Yusuf *et al.* Ils ont montré que ce kit commercial présentait des performances bien inférieures au Carba NP test (sensibilités et spécificités respectives : 73.3% et 100% : Rapid CARB Screen® ; 91.1% et 100% : Carba NP test). De même, la nouvelle version de ce kit commercial (Neo Rapid Carba Screen®) présente des performances inférieures au RAPIDEC® CARBA NP selon Tamma *et al.* (57) avec une sensibilité et une spécificité respectives de 89,2% et 89,7%.

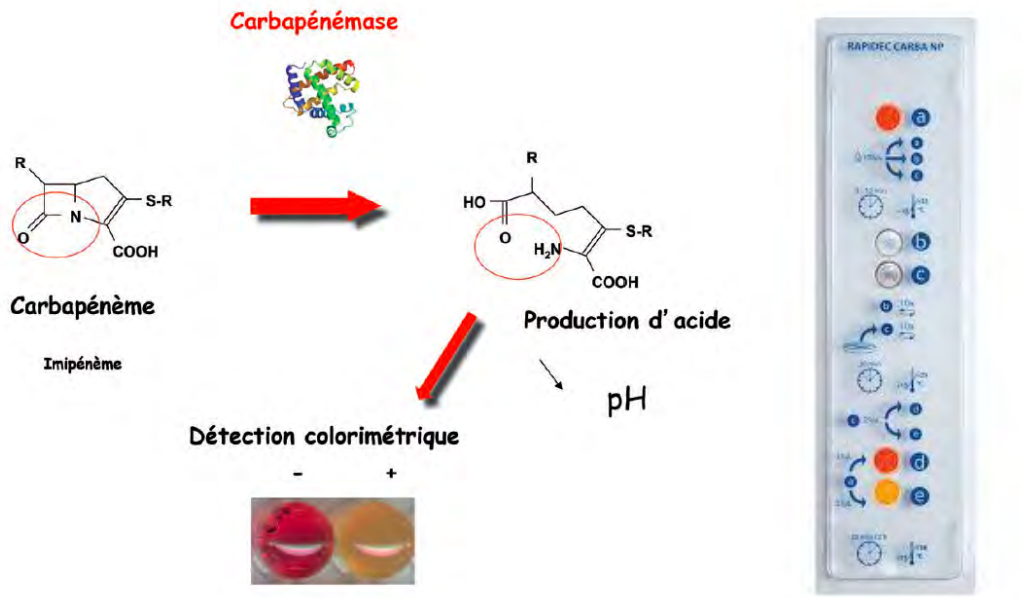


Figure 17. Principe du Carba NP test à gauche et RAPIDEC® CARBA NP à droite, tests colorimétriques de diagnostic rapide de l'activité carbapénèmase (58)

En présence d'une carbapénèmase, le réactif vire du rouge au orange, en lien avec la production d'acide. Test + (EPC) : orange / test – (non-EPC) : rouge

Avantages :

- obtention rapide du résultat (<1h) sur des souches isolées ou directement à partir de prélèvements d'hémocultures (59) ;
- détection de tout type de carbapénèmases ;
- très sensible et spécifique selon l'équipe l'ayant développé. Cependant, Tijet *et al* (60) ont rapporté une sensibilité du Carba NP test de 72.5 % dans une étude réalisée à partir de 244 entérobactéries et *P.aeruginosa* (dont 145 producteurs de carbapénèmases et 99 non-producteurs). Ils ont notamment montré des faux-négatifs pour la détection des souches productrices d'OXA-48 ;
- technique simple à mettre en place .

Inconvénients :

- difficulté de lecture en pratique entre les couleurs orange et jaune qui sont positives et celles correspondant à une recherche négative (l'expérience sur un faible nombre de souches au CHU de Toulouse confirme cette difficulté de lecture) et hétérogénéité de rendu des résultats entre différents lecteurs (61) ;
- présence de faux-négatifs : en particulier avec les souches mucoïdes ou des souches produisant des enzymes à faible activité carbapénèmase (OXA-48+++) - (59) ;
- changement de couleur plus lent pour certaines souches (certaines colonies VIM+ ou certaines souches ayant de faibles CMI aux carbapénèmes) - (62) ;
- ne permet pas l'identification du type de carbapénèmases

Une autre version du Carba NP test, le test Carba NP II a également été développé incluant des puits supplémentaires avec des inhibiteurs spécifiques de β-lactamases. Ceci permet de caractériser plus précisément le type de carbapénèmase : les enzymes de classe A sont identifiées grâce à l'inhibition de l'activité hydrolytique par l'acide clavulanique, celles de classe B par l'EDTA et les enzymes de classe D par une absence d'inhibition par ces 2 inhibiteurs. Cette deuxième version du Carba NP n'a cependant pas encore été commercialisée à ce jour (6).

Chong *et al.* ont comparé la technique MALDI-TOF au Carba NP test pour la détection des BGN producteurs de carbapénèmases. En utilisant un panel de 64 souches (53 productrices de carbapénèmases et 11 non-productrices), les sensibilités respectives du MALDI-TOF et du Carba NP étaient de 96% et 85%. Ainsi que l'ont montré Tijet *et al.* (60), des faux-négatifs ont été observés avec le Carba NP en présence de souches productrices d'OXA-48. Concernant les souches non-productrices de carbapénèmase, la spécificité du

MALDI-TOF était de 72%, alors que celle du Carba NP était de 100%. La technique MALDI-TOF, selon Chong *et al.,* présente donc une meilleure sensibilité de détection des carbapénèmases mais une moins bonne spécificité.

I.B.2.1.3.2 Blue-Carba

Le Blue-Carba est un test biochimique de détection des carbapénèmases dérivé du Carba NP test, réalisable directement à partir de souches en culture. Le principe de ce test est le même que le Carba NP : une hydrolyse du cycle β-lactame des carbapénèmes en présence d'une carbapénèmase est mise en évidence par acidification du milieu. Dans le test Blue-Carba, le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur coloré, étant donné que sa gamme de pH (6.0 à 7.6) comprend le pH optimal pour la plupart des β-lactamases (pH=6.8) – (63). L'activité carbapénèmase est révélée lorsque les couleurs des puits sont, respectivement pour la souche testée et le contrôle interne négatif : jaune/bleu, jaune/vert ou vert/bleu. Pour les souches non-productrices de carbapénèmases, les 2 puits restent bleus ou verts (Figure 18). Les premiers résultats sont obtenus en 30 min, et jusqu'à 2h pour les souches productrices d'oxacillinases.

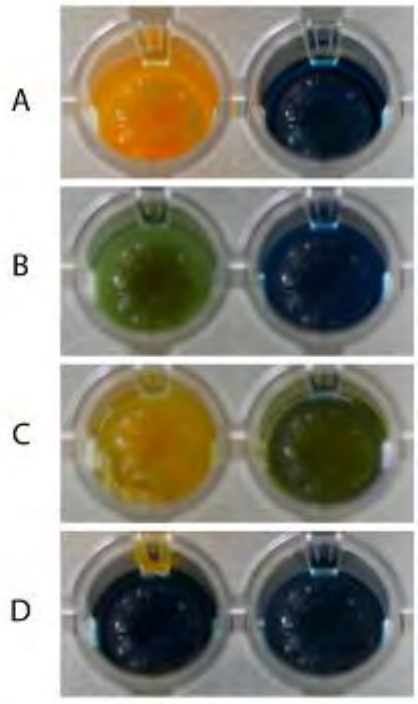


Figure 18. Résultats du test Blue-Carba pour les souches productrices de carbapénèmases (A, B, C) et non productrices de carbapénèmases (D) - (63)

Avantages :

- obtention rapide du résultat (2h) ;
- détection de tout type de carbapénèmases ;
- ne nécessite pas d'équipement particulie ;
- réalisable sur souches isolées ou directement à partir de flacons d'hémocultures ;
- simplicité de réalisation du test ;
- excellentes performances : 100% de sensibilité et spécificité (63); 100% de sensibilité et 97.1% de spécificité (61) ;
- meilleure détection des producteurs d'OXA-48 qu'avec le Carba NP test (61) ;
- faible coût.

Inconvénients :

- manque de standardisation de l'inoculum pouvant engendrer des faux-négatifs en cas d'inoculum insuffisant (61) ;
- ne permet pas l'identification du type de carbapénèmase.

Un kit commercial développé sur le principe du Blue-Carba test a été développé, le Rapid Carb Blue Screen®. Il présente une sensibilité de détection des EPC de 89% et une spécificité de 100% (57).

I.B.2.1.3.3 β-Carba test

Le β-Carba test est une nouvelle technique électrochimique, réalisable à partir de colonies bactériennes. L'hydrolyse de l'imipénème par une carbapénèmase entraîne une modification du pH. Grâce à un substrat chromogène, le changement de couleur du milieu réactif est visible à l'œil nu en 30 minutes.

A l'aide d'une öese de 1 µL, des colonies bactériennes sont récupérées à partir d'une culture « fraîche » et ajoutées à 40µL au réactif dans 2 microtubes. Après 30 min, le résultat est interprété selon la couleur du milieu :

- jaune : négatif → EPC
- orange – rouge – violet : positif → non EPC

Le fournisseur a montré une sensibilité et une spécificité respectives de 100% et 97,8%. Cependant, la sensibilité diminue en utilisant des bactéries cultivées sur milieu chromogène (98,6%) ou sur milieu Drigalski (77,6%) (6). Compain *et al.* (64) ont testé le β-Carba test sur 42 entérobactéries résistantes aux carbapénèmes dont 30 EPC. 4 souches productrices d'OXA-48 n'ont pas été détectées après 30 min (recommandations fournisseur), mais le test était positif en prolongeant l'incubation à 1h. La sensibilité et la spécificité de ce test après 1h d'incubation étaient donc de 100%.

Avantages :

- réalisation rapide (< 3 minutes) : absence d'extraction protéique ou de réalisation de solution antibiotique (64) ;
- bonnes performances (sensibilité : 100% / spécificité 97,8%) et notamment bonne sensibilité de détection des OXA-48 (97,1% *versus* 87% et 82,6% pour le Rapid Carba NP et le Neo-Rapid Carb respectivement) en prolongeant l'incubation (1h) – (65) ;
- résultat rapide (30 min) ;
- ne nécessite pas d'équipement particulier ;
- détecte tout type de carbapénèmases ;
- absence d'ambiguïté de lecture (jaune : négatif / non-jaune : positif).

Inconvénients :

- incubation de 30 minutes insuffisante pour les carbapénèmases à faible activité hydrolytique (OXA-48) – (64).

I.B.2.1.4 BYG Carba test

Le BYG Carba test est une nouvelle méthode électrochimique de détection de l'activité carbapénèmase. Ce test détecte la variation de conductivité d'une électrode recouverte de polyaniline (polymère conducteur), très sensible aux variations de pH et du potentiel d'oxydo-réduction de la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'imipénème. Les modifications de conductivité sont analysées et enregistrées en temps réel par le logiciel. Une valeur seuil de 3,5 (unité arbitraire) permet d'indiquer la présence ou non d'EPC. Le potentiostat utilisé est un dispositif « fait-maison » par les personnes l'ayant développé (le fonctionnement exact ne sera pas développé ici) – (66) – (Figure19).

Afin de réaliser le test, les colonies de bactéries récupérées avec une öese de 10µL à partir d'une culture sont suspendues dans une solution de 400µL de $ZnSO_4$, avec ou sans une solution d'imipénème à 3mg/mL. Les aliquots de 50µL de ces solutions (avec et sans imipénème) sont déposés sur les sondes. Le résultat, sous forme de signal, est obtenu en 30min environ (Figure20).

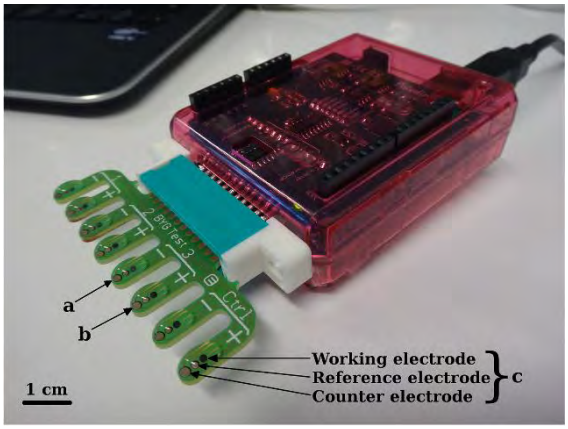


Figure 19. Potentiostat « fait-maison » et électrode avec 8 sondes

4 souches analysées en parallèle (3 échantillons + 1 contrôle), dépôt de la solution bactérienne sur la sonde (-) en (a) sans imipénème ou (+) en (b) avec imipénème / (c) électrode de travail (en haut), de référence (au milieu) et de comptage (en bas)

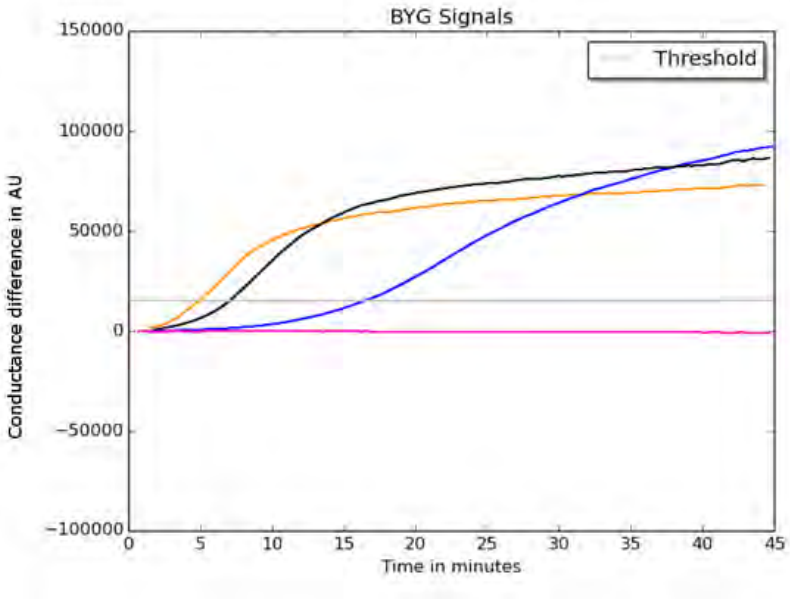


Figure 20. Courbes obtenues en temps-réel par le BYG Carba test

La ligne grise horizontale représente la valeur seuil. Les courbes de couleur représentent les résultats obtenus pour les différentes souches. Axe des y : conductivité de la polyaninline (unités arbitraires)
Résultats positifs (EPC) : Orange : K.pneumoniae productrice d'OXA-48, bleue : K.pneumoniae productrice de VIM, noire : K.pneumoniae productrice d'OXA-48 ;
résultat négatif: rose : Enterobacter aerogenes non-EPC

Bogaerts *et al.* (66) ont réalisé une évaluation prospective de cette méthode à partir de 342 entérobactéries (146 non-EPC et 178 EPC). Parmi les EPC, les carbapénèmases présentes étaient de type OXA-48, KPC, NDM et VIM. En comparant ce test avec le Carba NP, la sensibilité et la spécificité étaient de 95% et 100% respectivement pour BYG et de 89% et 100% pour le Carba NP.

Avantages

- résultat rapide (≈30 minutes) et disponible en 5 minutes dans 50% des cas (66) ;
- résultat sans équivoque : résultat quantitatif et objectif (généré automatiquement en temps réel) – (65) ;
- bonnes performances (sensibilité : 95% et spécificité 100%) et notamment bonne détection des enzymes de type OXA-48 (sensibilité de 93,2%) ;
- test réalisable à température ambiante (pas d'incubation à 37°C) ;
- analyse de 3 souches en même temps (+ le contrôle).

Inconvénients

- absence de kit commercialisé ;
- coût exact inconnu (méthode « maison ») ;
- équipement spécifique requis.

Noël *et al.* (65) ont réalisé une évaluation comparative du test BYG avec les méthodes colorimétriques suivantes : β-Carba test, Neo-rapid Carb® test et Rapidec Carba NP test (198 entérobactéries). Bien que le test BYG ne soit pas une méthode colorimétrique, le principe repose également, entre autre, sur une variation de pH. Les sensibilités et spécificités des différents tests sont regroupées dans le Tableau 13. Cette étude a été réalisée à partir de 198 entérobactéries, réparties en 111 EPC (produisant des carbapénèmases de type KPC, NDM, VIM, OXA-48) et 87 non-EPC. Cette étude a également été réalisée sur des souches de *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. Alors que les performances restent acceptables pour les souches de *Pseudomonas* spp. (sensibilités > 87% et spécificités > 88%), les sensibilités sont largement insuffisantes pour les souches de *Acinetobacter* spp. (comprises entre 27,3% et 75,8% selon les tests).

Tableau 13. Comparaison de 4 tests phénotypiques de détection des EPC (65)

Paramètres	BYG	β-Carba	Neo-rapid Carb	Rapidec Carba NP
Sensibilité globale	100%	97,3%	89,2%	91,9%
Spécificité globale	98,9%	97,7%	89,7%	83,9%

Ils ont démontré que le β-Carba test était le plus pratique et présentait les meilleures performances pour la détection des EPC en routine.

I.B.2.1.5 Test CIM (Carbapenem Inactivation Method) (45)

Le test CIM (Carbapenem Inactivation Method) a été développé comme un test sensible, spécifique et peu couteux pour la détection des carbapénèmases. Le principe de ce test est basé sur l'inactivation *in vitro* du méropénème contenu dans un disque chargé à 10µg par les souches productrices de carbapénèmases. La méthode de ce test est la suivante :

1) incubation d'un disque de méropénème dans une suspension de la souche à tester ;
2) incubation de ce disque de méropénème avec une souche d'*Escherichia coli* de référence sensible au méropénème ;
3) après cette étape d'incubation, détection de l'activité carbapénèmase :

- l'absence de zone d'inhibition autour du disque de méropénème signe une hydrolyse de ce carbapénème au cours de la première incubation ;
- une zone nette d'inhibition autour du disque montre l'absence d'activité carbapénèmase.

Le mode opératoire détaillé est décrit dans la partie V.B. Les données initiales de ce test ont montré une sensibilité comprise entre 98 et 100% (45).

Avantages

- faible coût (< 3€) ;
- réalisation facile, ressources nécessaires limitées, sans équipement ni formation du personnel spécifique ;
- bonne spécificité de détection des MBL, sensibilité discutée : bonne performances dans les résultats de la publication mais moins bonne dans notre étude (détaillées dans la deuxième partie de ce travail).

Inconvénients

- résultat à J+1 ;
- manque de reproductibilité des résultats de la publication ;
- faible sensibilité de détection des enzymes de type OXA-48.

I.B.2.2 Méthode immunochromatographique : OXA-48/KPC K-set®

Les tests OXA-48/KPC K-set® (Coris Bioconept, Belgique) permettent la détection rapide des souches productrices de KPC et OXA-48 produites par des isolats bactériens, en 15 minutes, par méthode immunochromatographique, selon le protocole présenté en Figure 21. Une cassette est disponible pour chacune de ces 2 carbapénèmases. Les variants d'OXA-48 sont également détectés grâce à la cassette OXA-48. Les performances de ce test sont excellentes (sensibilité et spécificités de 100%), comme le rapportent Glupczynski *et al.* (67) dans une étude regroupant 342 isolats. Wareham *et al.* (68) ont testé le test OXA-48 K-set afin d'évaluer les performances de détection des carbapénèmases de type OXA-48, à partir de 82 entérobactéries. La sensibilité et la spécificité ont atteint 100% et le résultat a été obtenu en moins de 10 minutes. De plus, ce test est également réalisable directement à partir de flacons d'hémocultures positifs. Meunier et *al.* ont également décrit des performances similaires pour la détection des enzymes KPC et OXA-48 like à partir de 101 souches, dont 92 productrices de carbapénèmases. Aucun faux positif n'a été détecté en présence de souches productrices d'autres carbapénèmases, comme les MBL par exemple (69).

<u>Réalisation du test Coris Bioconcept</u> (Figure 21) :

1- introduire 10 gouttes de tampon dans un tube ;
2- ajouter le(s) colonie(s) suspecte(s) ;
3- homogénéiser la solution ;
4- ajouter le capuchon compte-goutte sur le tube ;
5- déposer 3 gouttes de solution dans la fenêtre de la cassette ;
6- attendre 15 minutes et lire le résultat :

- résultat positif : bande contrôle (C) + bande test (T) ;
- résultat négatif : bande (C) seule ;
- résultat invalide : bande (C) absente (avec ou sans bande test).

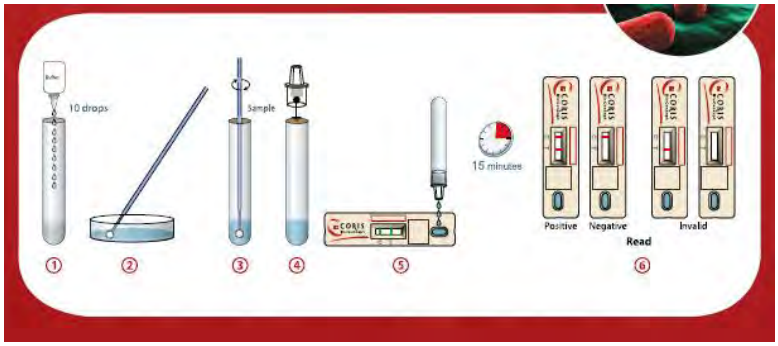


Figure 21. Étapes de réalisation du test Coris Bioconcept

Avantages

- rapidité (15 à 20 minutes) ;
- facile à réaliser, à intégrer en routine et à interpréter ;
- excellentes performances de détection (100% de sensibilité et spécificité) ;
- détections fiables des OXA - 48 et dérivées ;
- utilisable par tous les laboratoires (aucun équipement spécifique n'est requis).

Inconvénients

- faible panel d'enzymes détectées : détection de KPC et OXA-48 uniquement (NDM, VIM et IMP en cours de développement) ;
- tests multiples si le type de carbapénèmase n'est pas orienté par le phénotype (non utilisable en dépistage) ;
- coût unitaire élevé (environ 10€).

Cette technique, bien que très performante, ne peut être utilisée en test de dépistage. En effet, il est nécessaire de réaliser un test pour chaque enzyme suspectée, ce qui représente un coût important. Ce test pourrait cependant présenter un intérêt dans la gestion d'une situation épidémique, notamment pour le dépistage des porteurs, ou lorsqu'un type de carbapénèmase prédomine largement au niveau de l'épidémiologie locale (57).

I.B.2.3 Tests d'inhibition

Les tests d'inhibition sont basés sur les propriétés inhibitrices de l'acide boronique vis-à-vis des carbapénèmases de classe A, de l'acide dipicolinique ou de l'EDTA vis-à-vis des enzymes de classe B et de la cloxacilline vis-à-vis des céphalosporinases (AmpC), comme présenté au paragraphe I.A.3.2 (résistance aux carbapénèmes par mécanisme enzymatique) dans le Tableau 6. Récemment, il a été montré qu'un disque de témocilline est également ajouté pour permettre la détection des souches productrices d'OXA-48. En effet, 98,2% des souches produisant une OXA-48 sont très résistantes à la témocilline (70).
Mast groups a également commercialisé un disque CAT-ID (pour carbapenemase activity test – identification) contenant du faropénème afin d'améliorer la sensibilité de détection des carbapénèmases, et en particulier des OXA-48. Différents kits commerciaux sont disponibles : Rosco NEO-SENSITABS KPC/MBL® Confirm kit (Rosco Diagnostica), MAST DISCS® (Mast groups). Ces kits utilisent des disques de carbapénème additionnés ou non des inhibiteurs cités précédemment.

La technique E-test MBL® (bioMérieux) est basée sur le même principe : elle utilise des bandelettes chargées en concentrations croissantes d'imipénème d'une part et d'imipénème associé à l'EDTA d'autre part.

Avantages :

- faible coût (~ 3€), ce qui peut présenter un avantage en fonction de l'épidémiologie locale, en particulier lorsque la prévalence des souches productrices de carbapénèmases est inférieure à celles associant d'autres mécanismes ;
- facilité de mise en œuvre.

Inconvénients :

- délai important : résultats 24h après obtention de l'antibiogramme, non adapté en cas d'épidémie ;
- E-test IMP/IMP-EDTA : problème de détection des souches productrices de MBL en cas de faible niveau de résistance à l'imipénème, et détection des MBL uniquement.

Les performances de ces tests d'inhibition seront développées dans la deuxième partie de ce manuscrit.

I.B.3 Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires comprennent la PCR, incluant la PCR en temps réel, permettant la réalisation d'identification bactérienne ainsi que la détection de gènes de résistance, les techniques de PCR avec hybridation, incluant les biopuces à ADN par technologie PCR-ligase de l'ADN (check-points) ainsi que le séquençage du génome entier (uniquement réalisé dans les laboratoires de référence). Seules les méthodes moléculaires permettent à ce jour la confirmation ainsi que l'identification précise et exacte des carbapénèmases, et constituent la méthode de référence. Elles présentent une grande utilité pendant les épidémies ainsi que pour des enquêtes épidémiologiques. En effet, ces techniques permettent la détection des principaux gènes de carbapénèmases à partir d'écouvillons ou directement à partir de flacons d'hémocultures. Les méthodes moléculaires doivent permettre la détection des gènes codant pour les carbapénèmases de type OXA-48, NDM, KPC et VIM, qui sont les plus fréquentes en France.

Cependant, bien que les méthodes moléculaires soient considérées comme étant la référence pour l'identification des gènes de carbapénèmase, elles présentent certaines limites clairement reconnues. Leur principal inconvénient est la non-détection des nouveaux (et possiblement émergents) gènes de résistance, engendrant des résultats faussement négatifs. Une autre limite de ces méthodes est la possible détection de bactéries « mortes »

et donc de gènes inactifs. Ces techniques peuvent ainsi engendrer un retard dans l'instauration des mesures de contrôle et de prévention, ou à l'inverse, une détection de résistante non-significative cliniquement. De plus, le choix des gènes contenus dans les kits de PCR multiplex sont les plus significatifs d'une aire géographique et d'un temps donnés. Les kits développés pour le marché américain, par exemple, ne sont donc pas forcément utilisables en France (6). Certaines techniques peuvent présenter un coût élevé ou nécessiter du personnel qualifié. Ceci explique le besoin de développer des méthodes peu coûteuses, phénotypiques de préférence, rapides et adaptables en routine à de nombreux laboratoires.

I.B.3.1 Amplification génique

La PCR permet de confirmer la présence du gène d'une carbapénèmase dans l'isolat et l'identification précise du type, à des fins épidémiologiques. Il existe des méthodes de PCR « maison » ou des méthodes commerciales incluant différentes PCR multiplex telles que:

- Xpert® Carba-R (Cepheid) : détectant KPC, NDM, VIM, IMP-1, OXA-48, OXA-181 et OXA-232
- Check direct CPE (Check-points) : détectant KPC, NDM, VIM et OXA-48 (71)

D'autres systèmes sont également commercialisés pour la détection ou la confirmation de gènes de résistance. Ils se différencient entre eux par des principes théoriques ou des panels de gènes cibles différents (6). Tous ces tests présentent d'excellentes performances avec des sensibilités comprises entre 97% et 100%. La PCR consiste à rechercher les gènes codant pour les différentes carbapénèmases, par amplification spécifique d'une séquence cible.

Xpert® Carba-R (Cepheid)

La société Cepheid a développé le système GeneXpert de PCR en temps réel entièrement automatisée, avec des cartouches prêtes à l'emploi. A l'aide des cartouches Xpert® Carba-R, ce système permet la détection des gènes : bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP-1}, bla_{OXA-48}, et depuis peu ses dérivés $bla_{OXA-181}$ et $bla_{OXA-232}$, codant pour les enzymes les plus fréquentes en France. Cette technique est utilisée au CHU de Toulouse (Figure 22). Cette technique de biologie moléculaire peut être utilisée en dépistage, directement à partir d'un écouvillonnage rectal, ou sur des colonies, lors d'une suspicion de production de carbapénèmase à partir de l'antibiogramme. Le résultat est obtenu en 48 minutes (6).

Figure 22. Automate GeneXpert® (à gauche) et cassette Xpert® Carba-R (à droite)

Le système automatisé GeneXpert intègre la purification de l'échantillon, l'amplification d'acides nucléiques ainsi que la détection de séquences cibles dans divers échantillons, grâce à l'utilisation de tests de PCR en temps réel. Ce système requiert l'utilisation de cartouches Xpert® Carba-R jetables, à usage unique et prêtes à l'emploi, contenant les réactifs de PCR. Le résultat est obtenu en 48 minutes.

Avantages

- résultat rapide (<1h) ;
- facilité de mise en œuvre ;
- absence d'interprétation ;
- excellentes sensibilité et spécificité ;
- détermination du type de carbapénèmase.

Inconvénients

- coût élevé (35 €) ;
- accessibilité de l'automate ;
- absence de détection des nouveaux mécanismes de résistance, non inclus dans les trousses commerciales (système fermé). Par exemple, de nombreux échecs de détection de variants d'OXA-48, tels qu'OXA-181, ont été rapportés avec le kit Xpert® Carba-R. Une nouvelle version de ce kit a donc été développée et intègre les variants *bla*$_{\text{OXA-181}}$ et *bla*$_{\text{OXA-232}}$ (72).

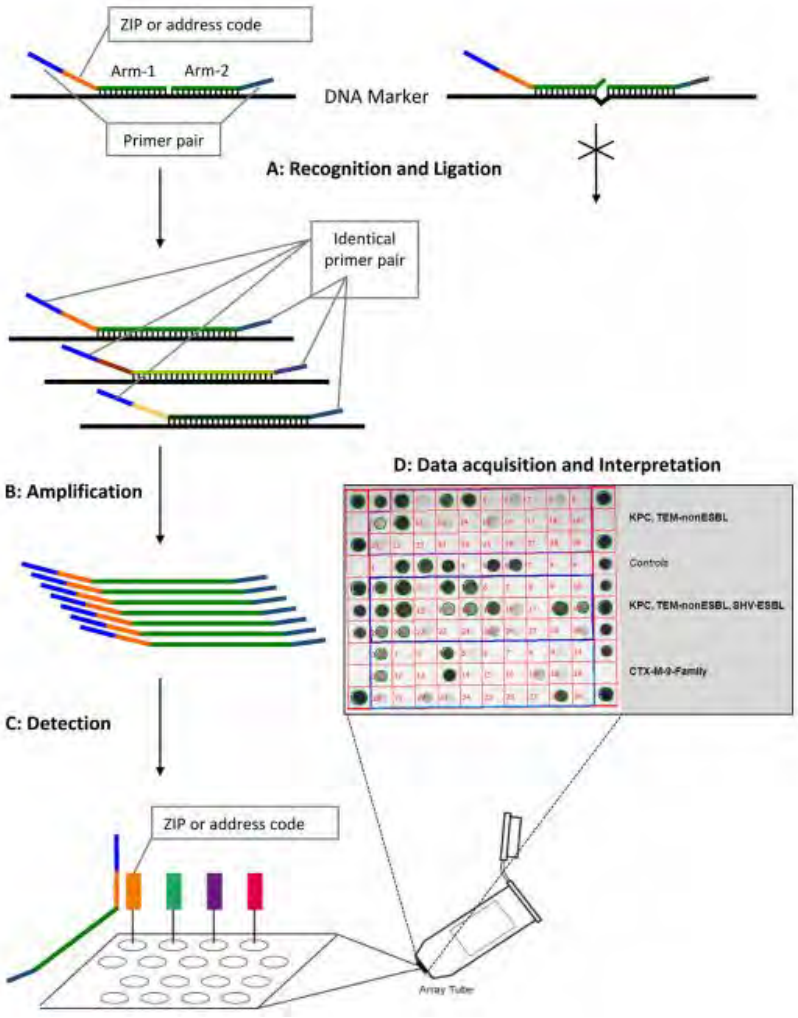
Biopuces à ADN : Check assays® (Check-points)

Une puce à ADN est un support rigide sur lequel sont déposées des courtes séquences d'ADN appelées « sondes », ciblant les gènes de résistance. Ces sondes sont des oligonucléotides de synthèse ou des produits de PCR, spécifiques d'un gène unique. A partir de l'échantillon à analyser, des ADNs cibles sont extraits, et amplifiés par PCR par incorporation de radioéléments ou de fluorochromes. Ils sont ensuite incubés avec les sondes déposées sur la puce. Après hybridation, la quantification des signaux permet de détecter la présence ou l'absence de chacun des gènes représentés sur la plaque (Figure 23).

Les Check assays® (Check-points) incluent un large panel de différents kits de PCR en temps réel utilisant différentes sondes dont une permettant de détecter un contrôle interne. Le nombre et le type de gènes cibles varie en fonction du kit, incluant des gènes codant pour tous types de β-lactamases. Bien que cette technique puisse être considérée comme coûteuse, longue et de réalisation lourde, elle est considérée comme la technique de référence pour la caractérisation des gènes de β-lactamases à partir de colonies isolées (6).

Un de ces tests est le « Check-MDR CT-103 » (59) (73) permettant la détection simultanée de différents mécanismes de résistance. Ce test détecte les gènes codant pour des BLSE (TEM, SHV et CTX-M), des céphalosporinases plasmidiques (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR et CMY-1-like/MOX) ainsi que les carbapénèmases KPC, OXA-48, VIM, IMP et NDM. Le test Check-MDR CT103 est sensible et spécifique (73) et permet la détection d'enzymes BLSE et non-BLSE. Ce test permet donc de faire facilement la différence entre une résistance aux carbapénèmes liée à une carbapénèmase ou liée à une association d'une BLSE ou céphalosporinase avec une modification des porines (imperméabilité).

Cette technique rapide est entièrement automatisée pour les étapes d'extraction de l'ADN et PCR. Cependant, l'étape d'hybridation est manuelle, mais relativement facile à réaliser. D'après une étude regroupant 149 entérobactéries, 29 *Pseudomonas spp., 8 Acinetobacter* spp*.* et 2 *Aeromonas* spp*.,* Couzon *et al.* (73) ont montré que la sensibilité et la spécificité étaient de 100% pour l'ensemble des gènes ; à l'exception de la sensibilité de détection des enzymes de type OXA-48, qui était de 95%.



(A) reconnaissance et liaison de l'ADN cible
(B) amplification par PCR des séquences d'ADN cibles
(C) détection des produits amplifiés
(D) acquisition des données et interprétation

Figure 23. Représentation schématique de la méthode Check-point (biopuce à ADN) pour la recherche de carbapénèmase

Avantages

- résultat rapide (rendu en 6h / 1-2h de temps technicien) ;
- excellentes performances (sensibilité et spécificité > 90%) ;
- techniques commerciales ;
- Interprétation facile grâce au logiciel fourni.

Inconvénients

- nécessite un laboratoire spécialisé (matériel dédié) ;
- long à réaliser (temps technicien +++) ;
- délai long de rendu de résultat (24h car nécessite une culture bactérienne) ;
- coût (80€ par échantillon pour le kit Check-MDR CT103) et équipement coûteux.

I.B.3.2 Séquençage

Les méthodes de séquençage haut-débit de l'ADN permettent la détermination de la séquence d'acides nucléiques de millions de gènes. Actuellement ces méthodes permettent la détermination du génome entier en quelques heures à quelques jours, au lieu de plusieurs mois auparavant (6). Cette technologie, dont le principe et la méthode ne seront pas détaillées ici, peut identifier des gènes de résistance, pouvant aider au développement d'outils diagnostic mais pouvant également aider au diagnostic clinique. Des nouvelles β-lactamases ou des nouvelles mutations à l'origine de résistance pourraient être identifiées grâce à cette technologie. Cependant, les techniques de séquençage sont actuellement limitées par le coût, le délai de rendu des résultats et sont réservées aux laboratoires spécialisés ou de recherche. Ces méthodes seront néanmoins de plus en plus utilisées dans un futur prochain.

I.B.4 Milieux de dépistage des EPC

Les entérobactéries étant normalement présentes dans la flore intestinale, le dépistage des patients porteurs est réalisé à partir d'un prélèvement de selles ou par écouvillonnage rectal, ensemencés sur milieux sélectifs. (74)

Plusieurs milieux sont potentiellement utilisables :

- gélose Drigalski avec un disque d'ertapénème ;
- gélose BLSE (additionnée d'une céphalosporine de 3ème génération) puis réalisation d'un antibiogramme des souches poussant sur ce milieu (résistantes aux C3G) et sélection des souches résistantes aux carbapénèmes. L'utilisation de gélose BLSE pose un problème de détection des souches productrices d'OXA-48 en l'absence de BLSE associée. En effet, ces souches peuvent présenter une sensibilité conservée aux C3G ;
- géloses additionnées de carbapénème (Figure 24 - Figure 25 - Figure 26 - Figure 27)

Ces milieux spécifiques contiennent un carbapénème et des substances chromogènes (à l'exception du milieu SuperCarba) pour faciliter l'identification rapide des espèces bactériennes. Cependant, les concentrations en carbapénème sont généralement élevées, ne permettant pas la détection des souches hydrolysant faiblement les carbapénèmes (détection inconstante des OXA-48 ou certaines MBLs). Ces milieux permettent de mettre en évidence des colonies suspectes mais le profil de résistance et l'identification de l'espèce doivent être confirmés par d'autres techniques. Les sensibilités et spécificités sont très variables en fonction des différents milieux commercialisés (Tableau 14).

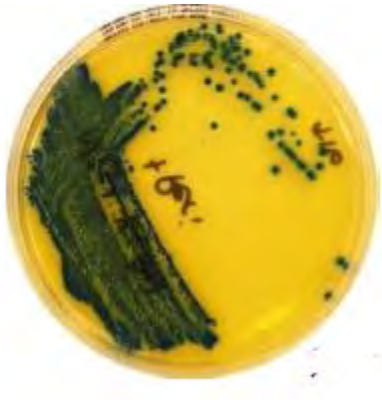


Figure 24. ChromID® CARBA

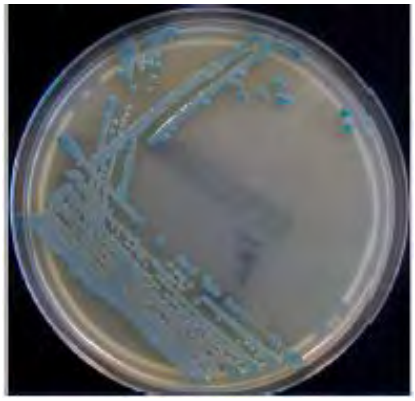


Figure 25. CHROMagar KPC

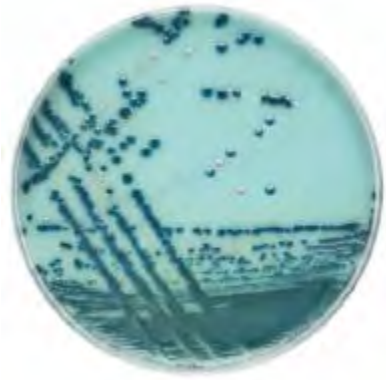


Figure 26. Brilliance® CRE

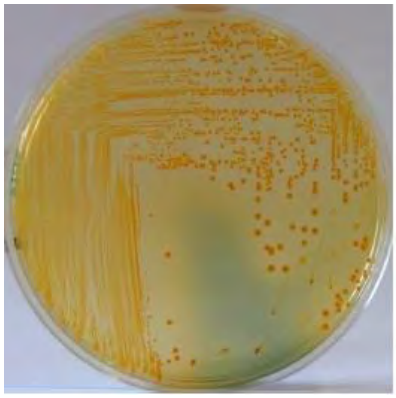


Figure 27. SuperCarba

Le milieu ChromID® OXA-48 – bioMérieux (France) est sensible (100%) et spécifique (99%) des entérobactéries productrices d'OXA-48 (75), la base de ce milieu restant un secret industriel.

Tableau 14. Comparaison des performances de différents milieux pour la détection d'EPC, d'après G. Arlet(8)

	Sensibilité	Spécificité	Commentaires
ChromID ESBL (cefpodoxime)	**88-96%**	**20-85%**	**BLSE : OK OXA-48 +/-**
ChromID CARBA (bioMérieux)	**92.4%**	**89-97%**	**Problème si bas niveau de résistance (OXA-48)**
CHROMagar KPC (Chromagar)	**85%**	**40-89%**	**OXA-48 +/- Problème si bas niveau de résistance (disponible sous forme déshydratée)**
Colorex KPC	**56%**	**47%**	
Brillance CRE (Oxoid)	**78%**	**66%**	**Problème si bas niveau de résistance**
SuperCarba	**95.5%**	**82.2%**	**Non chromogène (disponible sous forme déshydratée)**

NB : la gélose ChromID OXA-48 n'est pas intégrée dans ce tableau car elle n'est pas destinée au dépistage de tous les EPC, mais commercialisée spécifiquement pour la détection des OXA-48.

Un nouveau milieu a récemment été décrit (76) : SuperCarba par l'unité INSERM U914 « résistance émergente aux antibiotiques » pour le screening des carbapénèmases. Ce milieu à base de Zinc, de cloxacilline et d'ertapénème aurait une excellente sensibilité et spécificité pour la détection des EPC, dont les souches OXA-48. Le but du développement de ce milieu est de détecter les producteurs de carbapénèmase ayant un faible niveau de résistance aux carbapénèmes et d'inhiber au mieux les souches résistantes aux carbapénèmes mais non productrices de carbapénèmases. De l'ertapénème à une concentration de 0.25 µg/mL est additionné à un milieu Drigalski. Le Zinc ($ZnSO_4$ à 70 µg/mL) permet d'améliorer l'expression des metallo-β-lactamases et la cloxacilline (250 µg/mL), agent inhibiteur de céphalosporinase, est utilisée pour prévenir la pousse de souches exprimant fortement une céphalosporinase, telles que *E.cloacae, Enterobacter aerogenes (E.aerogenes), Morganella morganii (M.morganii)* ou encore *S.marcescens.* En effet, ces souches sont le plus souvent résistantes aux carbapénèmes par association d'une hyperproduction de céphalosporinase avec un défaut de perméabilité membranaire. Cette équipe a montré que ce milieu présentait une sensibilité et une spécificité respectivement de 95.6% et 82.2%. Les sensibilités de détection en fonction de la classe d'Ambler étaient de 100% pour la classe A, 90% pour la classe B et 100% pour la classe D. Pour autant, le

milieu SuperCarba nécessite la reconstitution de solution mère d'ertapénème, la fabrication de géloses ainsi que la réalisation d'examens complémentaires en raison de son manque de spécificité (74).

Aucun milieu ne permet la détection de toutes les carbapénèmases avec de bonnes sensibilité et spécificité. Une association de milieux est généralement utilisée afin d'optimiser la détection de toutes les enzymes, le but est d'avoir la combinaison la plus sensible possible car ces milieux sont utilisés pour les prélèvements de dépistage. Au laboratoire de microbiologie du CHU Toulouse, l'association des milieux ChromID® CARBA et OXA-48 est utilisée. Les performances des géloses ChromID® CARBA et ChromID® OXA-48 seront développées dans la deuxième partie.

I.B.5 Synthèse des caractéristiques des tests de détection des EPC

Le Tableau 15 regroupe les caractéristiques comparées des différentes techniques utilisées pour la détection des EPC, avec notamment le coût, le délai d'obtention du résultat (essentiellement si le résultat est obtenu le jour même ou le lendemain), les performances (sensibilités et spécificités) prenant en compte différentes études, la simplicité de réalisation et le critère de positivité du test. Les principales limites de chaque test sont également renseignées.

Les données concernant le coût, dans ce tableau, ne concernent que le coût du test et/ou de l'équipement nécessaire pour sa réalisation. Cependant, ce coût est à nuancer avec l'économie potentiellement réalisable. En effet, l'identification rapide d'un mécanisme de résistance transmissible permet de diminuer le coût des mesures de précautions complémentaires inutiles en cas de souches non-EPC. En cas de non-détection d'EPC, le coût d'une potentielle épidémie est considérable, prenant en compte le dépistage des porteurs, voire la réalisation de cohortes et la mise à disposition de personnel dédié. En cas de détection d'EPC, la mise en place rapide de précautions complémentaires permet de réduire le nombre de cas secondaires (6)

Tableau 15. Comparaison des différents tests disponibles pour la détection des EPC

	Tests phénotypiques									Tests moléculaires
	Tests d'inhibition	Test antigénique	Tests d'hydrolyse							
	ROSCO/ MAST	**KPC/OXA-48 K-set**	**MHT**	**Carba NP [a]**	**Blue Carba [b]**	**β-Carba test**	**BYG**	**CIM**	**MALDI-TOF**	**Xpert Carba-R / Check-point**
Coût	++	+++	+	+ à ++	+ à ++	++	++ ?[c]	+	+ [d]	+++
délai (à partir de la colonie)	J+1	J0 (< 1h)	J+1	J0 (30' à 2h)	J0 (30' à 2h)	J0 (30' à 1h)	J0 (30')	J+1	J0 (2-3h)	< 1h (Xpert) à 7h (Check-point)
Information fournie	Détection KPC, MBL ou OXA-48	Détection des enzymes du kit	Détection de l'activité carbapénèmase							Détection gènes spécifiques de carbapénèmase
Performances *	Hautes	Hautes	Moyennes à hautes	Moyennes à hautes	Hautes	Hautes	Hautes	Moyennes [e]	Hautes	Hautes
mise en œuvre facile	+	++	+	+ à ++	++	++	+	+	- (expertise ++)	+ [f]
Interprétation du résultat	lecture du diamètre d'inhibition	lecture visuelle	image de synergie	changement de couleur			courbe interprétée par logiciel	lecture du diamètre d'inhibition	interprétation des spectres	logiciel
Limites	Témocilline requise pour OXA-48	détection KPC - OXA-48 uniquement	nombreux FP et FN (pb Se NDM)	FN avec OXA-48 + avec souches mucoïdes pour Carba NP	FN avec OXA-48	FN avec OXA-48 après incubation de 30'	équipement spécifique non commercialisé	nombreux FN +++	expertise, mise en place délicate	coût +++/ pb détection nouvelles enzymes

Se : sensibilité ; Sp : spécificité ; FP : faux-positifs ; FN : faux-négatifs, CARBA : carbapénèmase ; pb : problème
*performances (en raison d'une diversité de valeurs selon les études): haute : > 90% Se et Sp ; moyenne : 70-90% Se et Sp; basse : < 70% Se et Sp
a : Carba NP et kits commerciaux (RAPIDEC CARBA NP et Neo-Carb Screen) ; **b** : Blue Carba et kit commercial (Rapid Blue Carb Screen) ; **c** : cout BYG inconnu
d : MALDI-TOF : coût (du test uniquement) et mise en œuvre sans logiciel MALDI Biotyper STAR BL® ; **e** : performances CIM moyennes mais hautes pour CIM modifié (TSB, incubation prolongée) ; **f** : réalisation longue pour Check-point

I.B.6 Algorithme de détection du CASFM-EUCAST 2015

Un algorithme de détection phénotypique a été proposé par le CASFM depuis 2015 (Figure 28) afin de permettre :

- de repérer toute EPC grâce à une bonne sensibilité, nécessitant ensuite des tests de confirmation ;
- de s'intégrer à la routine grâce à l'utilisation de tests simples.

Cet algorithme de dépistage présente une sensibilité de 100% et une spécificité qui varie de 79% à 69% en fonction de l'utilisation ou non d'une gélose Müeller-Hinton contenant de la cloxacilline pour les souches d'entérobactéries du groupe III. Les entérobactéries du groupe III, produisant naturellement une céphalosporinase présentent souvent une résistance aux carbapénèmes par hyperexpression de cette enzyme en association à un certain degré d'imperméabilité. Lorsque la sensibilité aux carbapénèmes est complètement restaurée sur milieu additionné de cloxacilline, la résistance aux carbapénèmes est alors liée à une association de mécanismes. Dans le cas d'une non-restauration ou d'une restauration incomplète, une carbapénèmase est alors fortement suspectée.

Cet algorithme a été évalué au CNR « associé de la résistance aux antibiotiques, entérobactéries productrices de carbapénèmases » à partir de 621 souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes. Il présente l'avantage d'être peu coûteux et permet d'éliminer la suspicion de production d'une carbapénèmase pour environ 1/3 des souches. L'interprétation peut également être subjective en cas de « diamètre limite ».

Cette grande sensibilité a l'avantage de limiter le nombre de patients nécessitant la mise en place de précautions complémentaires et également de limiter le nombre de souches envoyées au CNR pour les laboratoires ne disposant pas d'une activité suffisante pour mettre en place des tests de confirmation au sein de leur laboratoire.

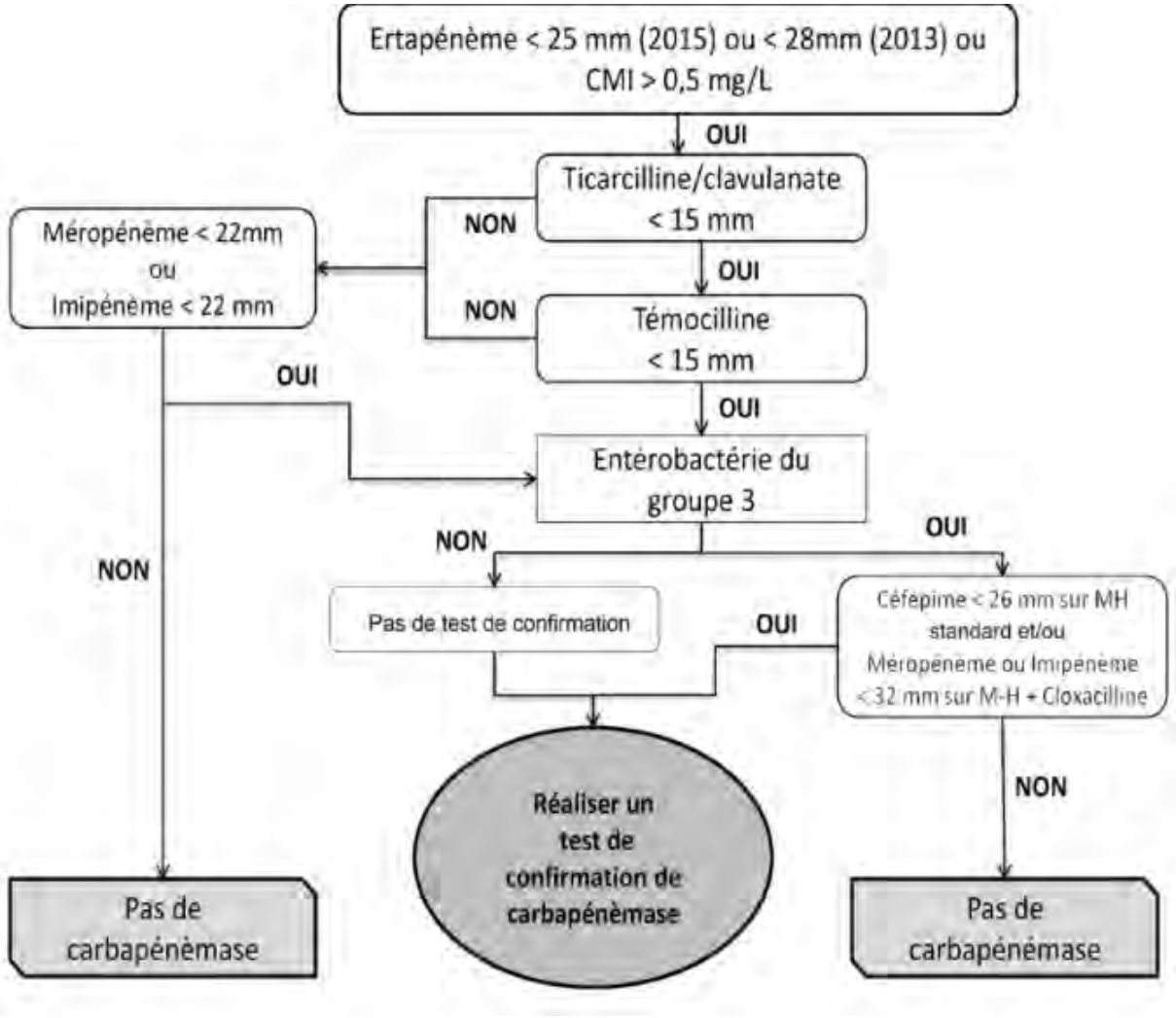


Figure 28. Algorithme phénotypique de criblage des souches d'entérobactéries productrices de carbapénèmases au sein des souches non-sensibles aux carbapénèmes (2015) : recommandations (2017) du CASFM/EUCAST. (16)

II TRAVAIL EXPERIMENTAL

II.A CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Notre travail expérimental avait pour objectif d'évaluer les performances de plusieurs méthodes de détection des carbapénèmases chez les entérobactéries. Trois méthodes phénotypiques ont été évaluées : la méthode des disques combinés ROSCO Neo-Sensitabs™ (Rosco Diagnostica), actuellement utilisée au laboratoire de Bactériologie-Hygiène du CHU de Toulouse, les disques combinés avec inhibiteur MAST DISCS® (Mast Diagnostic, Amiens, France) et le test CIM (Carbapenem Inactivation Method) – (45). Ces tests ont été comparés aux méthodes de biologie moléculaire. L'objectif de cette comparaison est d'établir un nouvel algorithme du laboratoire pour le dépistage des EPC.

Les disques ROSCO et MAST permettent de dépister les carbapénèmases de classe A et B ainsi que les céphalosporinases de type AmpC. Le kit MAST, développé ultérieurement, contient un disque CAT-ID comportant du faropénème, qui est censé augmenter la sensibilité de détection des enzymes de type OXA-48, en association avec un disque de témocilline, selon les recommandations du CASFM-EUCAST. Ces 2 méthodes permettraient la détection en 24 heures des trois différentes classes de carbapénèmases, sans recourir à la biologie moléculaire.

Nous avons également évalué 2 milieux chromogènes utilisés pour le dépistage des EPC, comme test complémentaire pour confirmation du mécanisme de résistance enzymatique de type carbapénèmase, à partir d'une colonie suspecte. Ces géloses sélectives chromogènes sont ChromID® CARBA (bioMérieux) et ChromID® OXA-48 (bioMérieux). En effet, il a été démontré que le milieu OXA-48 était particulièrement sensible et spécifique pour la détection des enzymes de type OXA-48. Ces tests ont été réalisés à partir de 58 souches d'entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes, productrices ou non de carbapénèmases, isolées et disponibles au laboratoire de Bactériologie du CHU de Toulouse.

II.B MATERIEL ET METHODES

II.B.1 Isolats bactériens

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé 58 souches d'entérobactéries, dont 34 EPC et 24 non productrices de carbapénèmases. Un contrôle de qualité (souche de rérérence *E.coli* ATCC 29522 – phénotype sauvage) a également été utilisé pour valider les tests. Les souches disponibles au laboratoire ont été sélectionnées de façon rétrospective (souches isolées entre janvier 2013 et avril 2016). Le mécanisme de résistance des souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes a été déterminé de 2 façons différentes :

- pour les EPC : confirmation par CNR associé de la résistance aux antibiotiques, « Entérobactéries productrices de carbapénèmases » au CHRU de Bicêtre (Le Kremlin-Bicêtre) par test Carba NP ou par PCR, ou bien au laboratoire du CHU de Toulouse par PCR Carba-R® sur système GeneXpert® (Cepheid) - (extraction à partir du système informatique du laboratoire) ;
- pour les non-EPC : caractérisation au CNR par test Carba NP et/ou PCR

Parmi les 34 EPC, notre collection comprenait 21 *K.pneumoniae,* 6 *E.coli*, 3 *M.morganii*, 2 *C.freundii* et 1 *E.cloacae* ; et parmi les enzymes identifiées : 1 VIM, 2 VIM + BLSE, 4 NDM, 6 NDM + BLSE, 11 OXA-48, 8 OXA-48 + BLSE, 1 OXA-181 + BLSE et 1 OXA-48 + hyperAmpC. Parmi les 24 souches non productrices de carbapénèmase, nous retrouvions 7 *E.coli,* 5 *K.pneumoniae*, 4 *E.cloacae,* 4 *K.oxytoca,* 3 *C.freundii,* 1 *E.aerogenes* et 1 *H.alvei ;* et concernant les mécanismes de résistance : 11 BLSE + imperméabilité, 4 HyperAmpC + imperméabilité, 4 HyperAmpC + BLSE + imperméabilité, 1 oxacillinase + imperméabilité et 4 hyperOxy + imperméabilité. La répartition des mécanismes de résistance ainsi que des enzymes de notre collection est présentée dans la Figure 29.

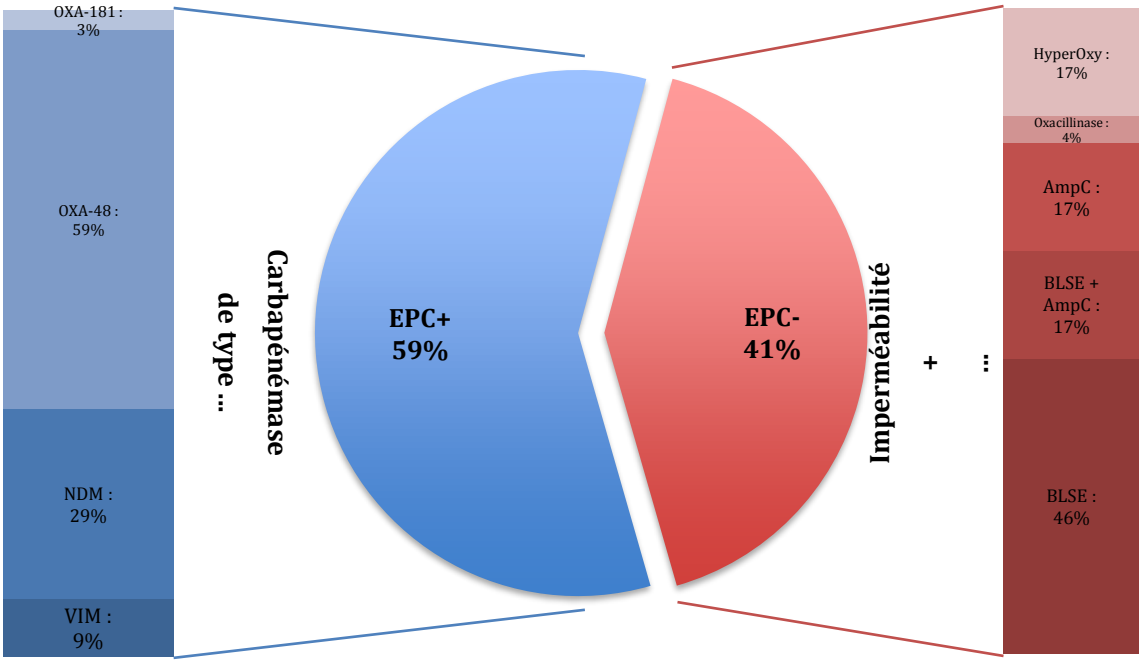


Figure 29. Répartition des mécanismes de résistance ainsi que des β-lactamases de notre collection

Parmi les espèces d'entérobactéries productrices de carbapénèmases, *K.pneumoniae* était de loin la plus fréquente, mais notre collection comptait également 6 *E.coli,* 3 *M.morganii, 2 E.cloacae* et 2 *C.freundii* (Figure 30).

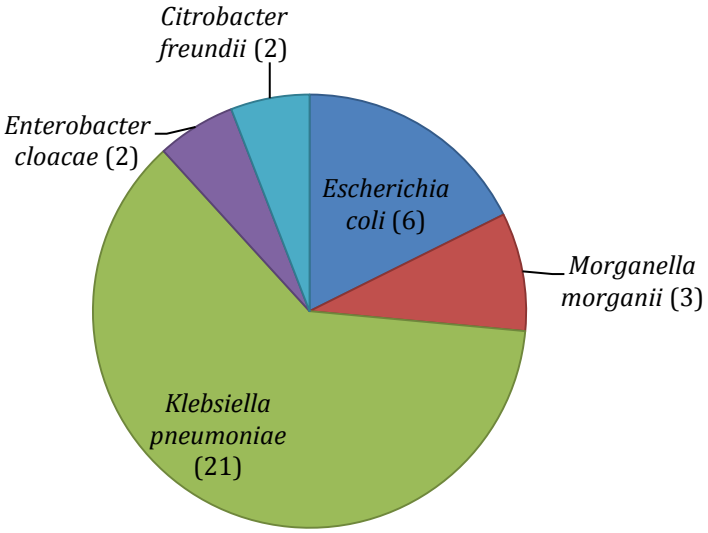


Figure 30. Répartition des espèces d'EPC isolées au CHU de Toulouse de janvier 2013 à avril 2016

Parmi les souches non productrices de carbapénèmases, seules les souches envoyées au CNR pour expertise ont été inclues, le recueil des non-EPC n'est donc pas exhaustif. Aucune souche productrice de KPC n'est présente dans l'étude, en effet notre

collection est composée de souches disponibles au laboratoire du CHU de Toulouse. 2 bactéries, non-EPC, n'ont plus poussé après repiquage à partir de la souche congelée et ont donc été retirées de l'analyse.

Toutes les souches ont été identifiées au laboratoire par l'automate Vitek® 2 (bioMérieux) et/ou par le spectromètre de masse MALDI-Biotyper® (Bruker).

Les antibiogrammes des différentes souches ont été réalisés :

- soit en milieu liquide, à l'aide du système automatisé Vitek® 2 en utilisant les cartes antibiogramme de base des entérobactéries, éventuellement associées à la carte complémentaire (dite « étendue ») pour les entérobactéries ;
- soit en milieu solide par diffusion sur gélose Müeller-Hinton (bioMérieux).

En cas de profil suspect de BLSE, et selon les recommandations du CA-SFM en vigueur au moment de l'isolement de la souche :

- la recherche de BLSE a été effectuée par un test de synergie sur gélose Müeller-Hinton (MH) entre un disque d'amoxicilline + acide clavulanique et trois disques de C3G (céfotaxime, ceftriaxone, céfépime) et d'aztréonam. La recherche de céphalosporinase de haut niveau a été également réalisé sur gélose Müeller-Hinton additionnée de cloxacilline (Sigma) - (MH-CLOXA), inhibiteur des céphalosporinases AmpC (classe C), à une concentration de 250 mg/L :
  - en présence d'une synergie d'un des disques de C3G ou de l'aztréonam avec l'acide clavulanique (image en « bouchon de champagne ») sur MH – (Figure 31) et absence d'augmentation des diamètres sur MH-CLOXA : nous avons conclu à la présence de BLSE ;
  - en présence d'une récupération des diamètres sur MH-CLOXA sans synergie avec l'acide clavulanique : nous avons conclu à la présence d'une céphalosporinase AmpC de haut niveau ;

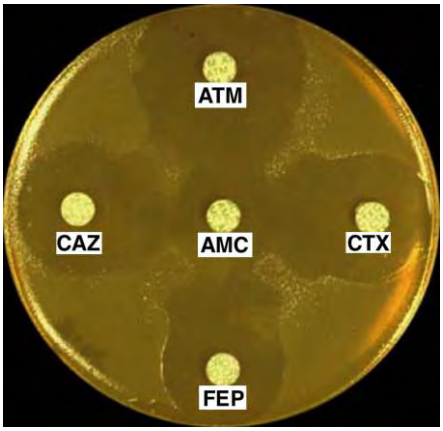


Figure 31. Exemple de recherche de BLSE (image de synergie)

- la combinaison des 2 mécanismes (BLSE + AmpC) est possible et a été objectivée par l'association d'images de synergie et la récupération des diamètres sur gélose MH additionnée de cloxacilline ;

- des CMI aux carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème) ont pu être déterminées par epsilomètre en fonction du germe, du profil global de sensibilité aux antibtiotiques et de l'algorithme décisionnel appliqué au laboratoire.

Les souches inclues n'étaient pas sensibles (c'est-à-dire intermédiaires ou résistantes) à au moins un carbapénème, correspondant à une CMI > 0,5 µg/mL pour l'ertapénème et > 1 µg/mL pour le méropénème et l'imipénème (CMI Vitek® 2 et/ou E-test).
Les souches d'entérobactéries inclues sont décrites dans le Tableau 16.

Tableau 16. Espèces et méthodes de détermination du mécanisme de résistance des 58 souches d'entérobactéries inclues dans l'étude.

Nombre de souches	Mécanisme de résistance	Germe	Méthodes de détermination du mécanisme de résistance		
			GeneXpert CHU	Carba NP CNR	PCR CNR
1	VIM	*C. freundii*	VIM	NR	NR
1	VIM + BLSE	*K. pneumoniae*	NR	Positif	VIM-1
1	VIM + BLSE	*E. cloacae*	VIM	NR	NR
1	NDM	*E. coli*	NDM	NR	NR
2	NDM	*M. morganii*	NDM	NR	NR
1	NDM	*K. pneumoniae*	NDM	Positif	NDM-1
3	NDM + BLSE	*K. pneumoniae*	NDM	Positif	NDM
2	NDM + BLSE	*E. coli*	NDM	NR	NR
1	NDM + BLSE	*M. morganii*	NDM	NR	NR

Nombre de souches	Mécanisme de résistance	Germe	Méthodes de détermination du mécanisme de résistance		
			GeneXpert CHU	Carba NP CNR	PCR CNR
3	OXA-48	*K. pneumoniae*	OXA-48	Positif	OXA-48
3	OXA-48	*K. pneumoniae*	OXA-48	NR	NR
1	OXA-48	*K. pneumoniae*	OXA-48	Positif	OXA-48
2	OXA-48	*E. coli*	OXA-48	NR	NR
1	OXA-48	*C. freundii*	OXA-48	NR	NR
1	OXA-48	*K. pneumoniae*	OXA-48	NR	NR
6	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	OXA-48	NR	NR
2	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	OXA-48	Positif	OXA-48
1	OXA-181 + BLSE	*E. coli*	NR	Positif	OXA-181

Nombre de souches	Mécanisme de résistance	Germe	Méthodes de détermination du mécanisme de résistance		
			GeneXpert CHU	Carba NP CNR	PCR CNR
1	OXA-48 + hyperAmpC	*E. cloacae*	OXA-48	NR	NR
2	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	Négatif	Négatif	Négatif
2	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	Négatif	Négatif	Négatif
1	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	NR	Négatif	NR
3	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	NR	Négatif	Négatif
1	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	NR	Négatif	NR
1	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	Négatif	Négatif	NR
1	BLSE + imperméabilité	*H. alvei*	NR	Négatif	Négatif
1	HyperAmpC + imperméabilité	*E. coli*	OXA-48 ?	Négatif	Négatif

Nombre de souches	Mécanisme de résistance	Germe	Méthodes de détermination du mécanisme de résistance		
			GeneXpert CHU	Carba NP CNR	PCR CNR
1	HyperAmpC + imperméabilité	*E. cloacae*	NR	Négatif	NR
1	HyperAmpC + imperméabilité	*C. freundii*	Négatif	Négatif	NR
1	HyperAmpC + imperméabilité	*C. freundii*	NR	Négatif	NR
1	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*E. cloacae*	Négatif	NR	Négatif
1	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*E. cloacae*	OXA-48 ?	Négatif	Négatif
1	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*E. aerogenes*	Négatif	Négatif	NR
1	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*C. freundii*	NR	Négatif	NR
1	Oxacillinase naturelle + imperméabilité	*E. coli*	Négatif	Négatif	Négatif
2	HyperOxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	NR	Négatif	NR

Nombre de souches	Mécanisme de résistance	Germe	Méthodes de détermination du mécanisme de résistance		
			GeneXpert CHU	Carba NP CNR	PCR CNR
1	HyperOxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	Négatif	Négatif	NR
1	HyperOxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	NR	Négatif	NR

C.freundii : Citrobacter freundii, K. pneumoniae : Klebsiella pneumoniae, E.cloacae : Enterobacter cloacae, E.coli : Escherichia coli, M. morganii : Morganella morganii, H.alvei : Hafnia alvei, E.aerogenes : Enterobacter aerogenes, K.oxytoca : Klebsiella oxytoca

HyperAmpC : hyperproduction de céphalosporinase, NR : non réalisé

Cultures bactériennes

Les souches utilisées proviennent de la souchothèque du laboratoire et étaient donc congelées à -20°C. Elles ont été ensemencées sur différents milieux pour la réalisation de l'étude :

- gélose sélective chromogène ChromID® CARBA (bioMérieux) pour les EPC de type NDM ou VIM ;
- gélose sélective chromogène ChromID® OXA-48 (bioMérieux) pour les EPC de type OXA-48 ou OXA-181 ;
- gélose Müeller-Hinton avec un disque d'ertapénème pour les souches résistantes aux carbapénèmes, mais ne produisant pas de carbapénèmase.

En effet, ces différentes géloses ont été utilisées pour confirmer la conservation du mécanisme de résistance après décongélation en appliquant une pression de sélection par antibiotique. Les différentes géloses ont ensuite été incubées pendant 18 à 24h à 37°C.

II.B.2 Tests phénotypiques

Les différents tests ont été réalisés selon les recommandations du fournisseur.
Les 3 tests à évaluer sont le test ROSCO Neo-sensitabs™ avec addition de témocilline, le test MAST DISCS® avec addition de témocilline et de CAT-ID ainsi que le test CIM.

II.B.2.1 Tests en milieu gélosé par disques additionnés d'inhibiteurs

II.B.2.1.1 Principe du test ROSCO Neo-Sensitabs™ avec addition de témocilline

Les résultats du test Rosco ne correspondent pas à des tests de routine, en raison de données manquantes pour certaines souches ; de plus, afin d'effectuer une comparaison avec les tests MAST et CIM dans les mêmes conditions, ce test a été refait en parallèle.

Ce test comprend 4 comprimés (diamètre : 9mm) de Méropénème contenant ou non un inhibiteur de β-lactamase :

- un comprimé **MR** contenant du méropénème ;
- un comprimé **MR+BO** contenant du méropénème + acide phénylboronique (inhibiteur de KPC et AmpC) ;
- un comprimé **MR+CX** contenant du méropénème + cloxacilline (inhibiteur de AmpC) ;
- un comprimé **MR+DP**contenant du méropénème + acide dipicolinique (inhibiteur de MBL).

Un disque de témocilline (30µg) de 6mm de diamètre a également été ajouté pour la détection des enzymes de type OXA-48. Ce test a été réalisé sur milieu Müeller-Hinton, à partir d'une suspension à 0,5 Mc Farland de la souche à tester, selon les recommandations du fournisseur. La lecture des diamètres d'inhibition et leur interprétation ont ensuite été

réalisées après 18 à 24h d'incubation à 37°C. Un diamètre d'inhibition < 15 mm autour de la témocilline est en faveur d'un test positif (selon le CASFM).

Lecture et interprétation du test (Tableau 17) :

- par défaut, les comprimés sans zone d'inhibition ont un diamètre de 9 mm ;
- comparaison du diamètre d'inhibition du comprimé de méropénème seul à ceux des comprimés de méropénème + inhibiteur

Tableau 17. Règles d'interprétation du test ROSCO Neo-Sensitabs™

Mécanisme	MR+BO - MR	MR+DP - MR	MR+CX - MR	Remarque
MBL +	≤ 3mm	≥ 5mm	≤ 3mm	Quelques FP observés si CAZ S
KPC +	≥ 4mm	≤ 3mm	≤ 3mm	Également si MR+BO – MR+CX ≥ 4mm
AmpC + perte de porines	≥ 4mm	≤ 3mm	≥ 5mm	

FP : faux-positifs ; CAZ : ceftazidime ; S : sensible

- si toutes les différences de diamètres sont <3 mm, il n'y a pas de KPC ou MBL ;
- sachant que les enzymes AmpC et KPC sont toutes 2 inhibées par l'acide phénylboronique, la cloxacilline, inhibant uniquement les AmpC, est utilisée pour les distinguer ;
- l'acide dipicolinique, utilisé pour inhiber les MBL, ne présente pas, à l'inverse de l'EDTA, d'activité antibactérienne intrinsèque : le test est donc plus facile à interpréter ;
- lorsque tous les tests de synergie sont négatifs et qu'un diamètre d'inhibition < 15mm est observé autour de la témocilline, une oxacillinase (OXA-48 ou similaire) est alors suspectée dans 80% des cas. Il faut toutefois noter que si, à la fois le méropénème et les combinaisons n'ont pas de diamètre d'inhibition, le test à la témocilline est ininterprétable.

NB : quelques VIM-1 ou apparentés peuvent apparaître comme faux-négatifs si la CMI du méropénème est ≤ 0,25µg/mL.

II.B.2.1.2 Principe du test MAST DISCS® avec addition de témocilline et de CAT-ID

Le test MAST DISCS® permet la confirmation phénotypique d'une activité carbapénèmase grâce à l'utilisation de 4 disques (diamètre : 6mm) :

- disque **A** contenant le méropénème (10µg) ;
- disque **B** contenant du méropénème 10µg avec un inhibiteur de MBL (classe B);
- disque **C** contenant du méropénème 10µg avec un inhibiteur de KPC (classe A) ;
- disque **D** contenant du méropénème 10µg avec un inhibiteur de céphalosporinase (Classe C/AmpC) ;

La nature spécifique des inhibiteurs n'est pas communiquée dans la notice du fournisseur.

Le disque CAT-ID™ (pour Carbapenemase Activity Test), qui peut être associé au test MAST DISCS®, permet la confirmation rapide des carbapénèmases, sans mesure de diamètre. Ce test permet également la confirmation des EPC de type OXA-48. Il utilise les propriétés phénotypiques du faropénème pour le dépistage simple de l'activité carbapénèmase.

Lecture et interprétation du disque CAT-ID™ (Figure 32):

- les souches produisant KPC et MBL sont totalement résistantes au faropénème : absence de zone d'inhibition autour du disque ;
- les souches produisant OXA-48 se différencient par la présence d'une « double zone » autour du disque : présence d'une zone claire contenant des micro-colonies.

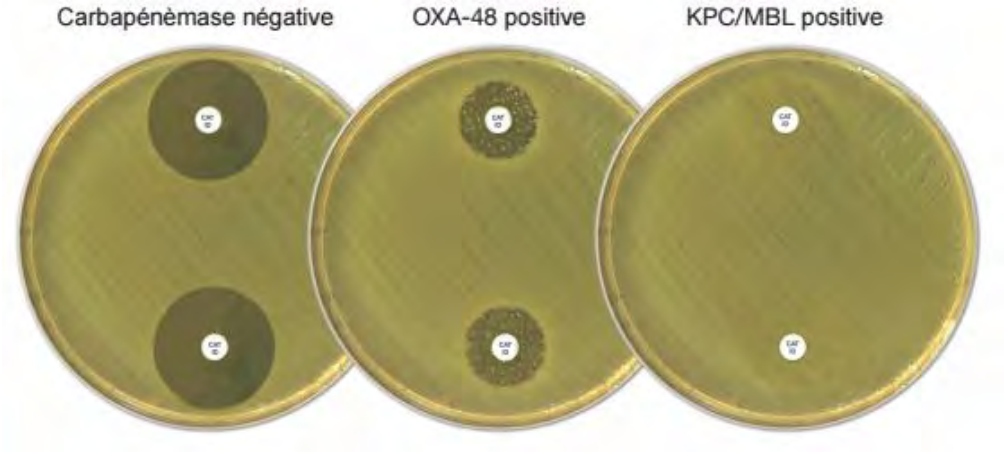


Figure 32. Interprétation du test MAST DISCS® CAT-ID™ - (Mast Diagnostics)

Un disque de témocilline (30µg) de 6mm de diamètre, proposé par le même fournisseur, a également été ajouté pour améliorer la détection des enzymes de type OXA-48. Ce test est réalisé sur gélose Müeller-Hinton gélosé (bioMérieux), à partir d'une suspension à 0,5 Mc Farland de la souche à tester, selon les recommandations du

fournisseur. La lecture des diamètres d'inhibition et leur interprétation sont ensuite réalisées après 18 à 24h d'incubation à 37°C. Un diamètre d'inhibition < 15mm autour de la témocilline est en faveur d'un test positif (selon le CASFM).

Lecture des disques et interprétation du test (Tableau 18) :

- par défaut, les disques sans zone d'inhibition ont un diamètre de 6 mm ;
- comparaison du diamètre d'inhibition du disque de carbapénème seul (**A**) à ceux des disques de carbapénème + inhibiteur (**B, C, D**).

Tableau 18. Règles d'interprétation du test MAST DISCS®

Mécanisme	B-A	C-A	D-A	Remarque
MBL +	≥ 5mm	< 4mm	< 4mm	Uniquement B > A
KPC +	< 3mm	≥ 4mm	< 3mm	Uniquement C > A
AmpC + et perte de porines (imperméabilité)	< 3mm	≥ 4mm	≥ 5mm	Il faut C et D > A*

* du fait d'une inhibition des AmpC par l'acide boronique (78)

II.B.2.2 Test CIM (Carbapenem Inactivation Method)

Ce test phénotypique décrit par Zwaluw *et al*. (45) permet la détection de l'activité carbapénèmase des bactéries à gram négatif - (Figure 33). Ce test est basé sur l'inactivation *in vitro* du méropénème contenu dans un disque chargé à 10µg par les souches productrices de carbapénèmases.

Pour réaliser ce test :

- une suspension bactérienne de la souche à tester est préparée à partir d'une öese de 10µL de bactéries cultivées sur gélose de repiquage, re-suspendues dans 400µL d'eau selon la publication originale. Afin de tenter d'améliorer la sensibilité de détection des carbapénèmases, nous avons également réalisé en parallèle ce test à partir d'une suspension en solution saline ;
- un disque contenant 10µg de méropénème est ensuite ajouté dans la suspension bactérienne qui est incubée pendant au moins 2h à 35°C;
- après incubation, une gélose Müeller-Hinton est ensemencée à l'aide d'une suspension à 0,5 McF d'*E.coli* sauvage (ATCC 29522), servant d'indicateur. Le disque de méropénème est ensuite déposé sur la gélose qui est incubée 12 à 18h à

35°C. En pratique, les géloses ont été incubées pendant une nuit au total, c'est-à-dire au moins 18h.

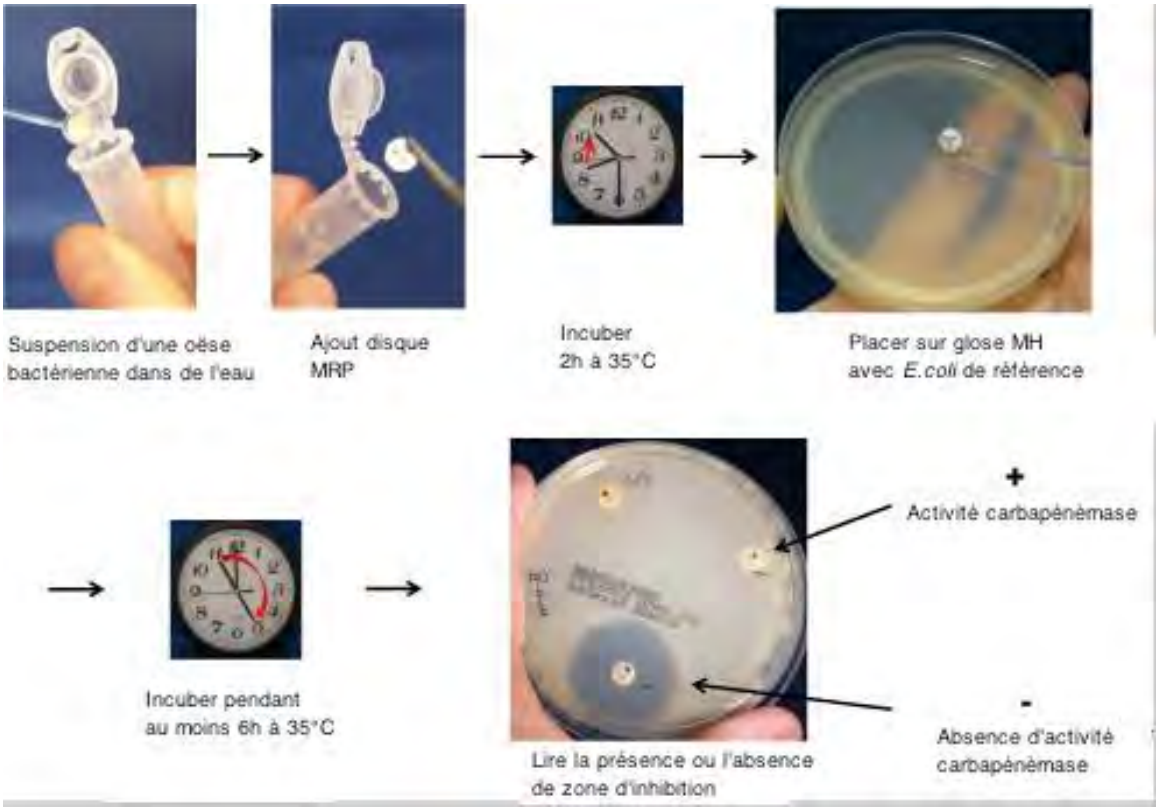


Figure 33. Présentation schématique du test CIM (45)

Lecture et interprétation du test:

- si la souche bactérienne produit une carbapénèmase, le méropénème contenu dans le disque va être inactivé, permettant la pousse de la souche indicatrice autour du disque ;
- si la souche bactérienne ne produit pas de carbapénèmase, le méropénème n'est pas dégradé et une zone d'inhibition franche est visible autour du disque. La publication ne décrit pas de valeur seuil de zone d'inhibition autour du disque de méropénème : soit une zone d'inhibition est présente, soit la pousse bactérienne est au contact du disque de méropénème.

Nous avons réalisé ce test, d'une part selon les modalités de cette publication, en solution aqueuse, et d'autre part, en réalisant la suspension bactérienne dans une solution saline (Solution NaCl 0,45% Vitek® – bioMérieux). En effet, la faible sensibilité du test en solution aqueuse nous a amenés à préparer ce test en solution NaCl 0,45%, habituellement utilisée pour la réalisation des tests de sensibilité.

D’après l’étude de Zwaluw *et al*. (45), les diamètres peuvent être lus après 6 heures d’incubation si les résultats sont requis dans la journée, mais il est préférable de les lire après 18 à 24h d’incubation. Dans la pratiqe, la lecture a été réalisée au bout de 6h (si la pousse bactérienne était suffisante), ainsi qu’après 18 à 24h d’incubation, selon les recommandations de la publication.

II.B.2.3 Repiquage des souches sur milieux chromogènes ChromID®

Les souches à tester ont également été repiquées, à partir d’une suspension à 0,5McF (utilisée pour les autres tests), à la fois sur géloses ChromID® CARBA et ChromID® OXA-48 (bioMérieux), afin d’évaluer les performances de ces milieux. Le milieu ChromID® Carba contient un carbapénème et des substrats chromogènes pour permettre l’identification de l’espèce bactérienne. Ce milieu a été développé et est vendu pour dépister, directement à partir des prélèvements cliniques les souches productrices de KPC ou de MBL principalement (dans une moindre mesure d’OXA-48). La gélose ChromID® OXA-48 est spécifiquement destinée au dépistage des souches productrices de carbapénèmases de type OXA-48, à partir de prélèvements cliniques, afin de compenser le manque de sensibilité du milieu ChromID® CARBA vis-à-vis des EPC de type OXA-48, la composition n’a cependant pas été dévoilée par le fournisseur.

II.C RESULTATS ET DISCUSSION

II.C.1 Synthèse des résultats de l'étude

Concernant la répartition des carbapénèmases de notre collection (Figure 34), c'est l'oxacillinase OXA-48 (59% des souches) qui est la plus fréquemment isolée au CHU de Toulouse, suivie des carbapénèmases de type NDM (29%), puis des type VIM (9%), et enfin OXA-181 (3%). Il faut cependant noter que certains souches ont pu être identifiées à partir d'un prélèvement reçu d'un laboratoire extérieur. De plus, aucun dédoublonnage n'a été réalisé.

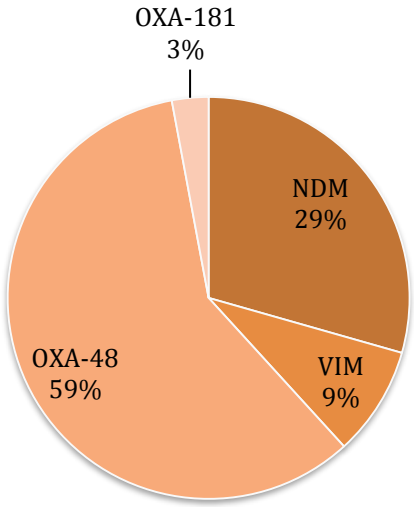


Figure 34. Répartition des carbapénèmases isolées d'entérobactéries entre 2013 et avril 2016 au CHU de Toulouse

Le Tableau 19 synthétise les résultats des différents tests réalisés pour chaque entérobactérie. Dans les paragraphes suivants, chaque test sera analysé indépendemment, les tests seront ensuite comparés entre eux et enfin, différentes combinaisons seront analysées.

Tableau 19. Résultats des tests réalisés pour les différentes souches

N° souche	Mécanisme de résistance	Espèce	Témo Biorad	ROSCO	CAT ID	Témo MAST	MAST	ChromID OXA-48	ChromID CARBA
1	VIM	*C. freundii*	15	Absence de MBL	6	11	Absence de MBL	-	+
2	VIM + BLSE	*K. pneumoniae*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
3	VIM + BLSE	*E. cloacae*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
4	NDM	*E. coli*	19	MBL	6	19	MBL	-	+
5	NDM	*M. morganii*	8	MBL	6	6	MBL	-	+
6	NDM	*M. morganii*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
7	NDM	*K. pneumoniae*	9	MBL	6	9	MBL	-	+
8	NDM + BLSE	*K. pneumoniae*	6	MBL	6	10	MBL	-	+
9	NDM + BLSE	*K. pneumoniae*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
10	NDM + BLSE	*K. pneumoniae*	9	MBL	6	8	MBL	-	+
11	NDM + BLSE	*E. coli*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
12	NDM + BLSE	*E. coli*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
13	NDM + BLSE	*M. morganii*	6	MBL	6	6	MBL	-	+
14	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	17 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
15	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	15 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+

	Mécanisme de résistance	Espèce	Témo Biorad	ROSCO	CAT ID	Témo MAST	MAST	ChromID OXA-48	ChromID CARBA
16	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	8 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	-	+
17	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	8 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
18	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	17 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
19	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	11 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
20	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	14 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
21	OXA-48	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	14 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
22	OXA-48	*E. coli*	6	Absence de KPC/MBL	15 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
23	OXA-48	*E. coli*	6	Absence de KPC/MBL	15 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
24	OXA-48	*C. freundii*	6	Absence de KPC/MBL	13 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	-
25	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	14 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
26	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	16 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
27	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	16 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
28	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	13 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
29	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	16 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
30	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	9 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+
31	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	6	Absence de KPC/MBL	19 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	+

	Mécanisme de résistance	Espèce	Témo Biorad	ROSCO	CAT ID	Témo MAST	MAST	ChromID OXA-48	ChromID CARBA
32	OXA-48 + BLSE	*K. pneumoniae*	21	Absence de KPC/MBL	23	22	Absence de KPC/MBL	-	-
33	OXA-48 + hyperAmpC	*E. cloacae*	6	Absence de KPC/MBL	9 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	-	+
34	OXA-181 + BLSE	*E. coli*	6	Absence de KPC/MBL	7 (DZ/µcolonies)	6	Absence de KPC/MBL	+	-
35	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	14	Absence de KPC/MBL	15	12	Absence de KPC/MBL	-	-
36	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	17	Absence de KPC/MBL	22	16	Absence de KPC/MBL	-	+
37	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	6	Absence de KPC/MBL	12	6	Absence de KPC/MBL	-	+
38	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	17	Absence de KPC/MBL	**7**	15	Absence de KPC/MBL	-	-
39	BLSE + imperméabilité	*E. coli*	12	Absence de KPC/MBL	9	11	Absence de KPC/MBL	-	+
40	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	15	Absence de KPC/MBL	9	13	Absence de KPC/MBL	-	+
41	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	12	Absence de KPC/MBL	15	10	Absence de KPC/MBL	-	+
42	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	21	Absence de KPC/MBL	8 (DZ/µcolonies)	20	Absence de KPC/MBL	-	+
43	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	15	MBL	11	13	Absence de KPC/MBL	-	-
44	BLSE + imperméabilité	*K. pneumoniae*	21	Absence de KPC/MBL	15	19	Absence de KPC/MBL	-	+
45	BLSE + imperméabilité	*H. alvei*	15	Absence de KPC/MBL	6	12	Absence de KPC/MBL	-	-
46	HyperAmpC + imperméabilité	*E. coli*	15	Absence de KPC/MBL	24	17	Absence de KPC/MBL	+	-
47	HyperAmpC + imperméabilité	*E. cloacae*	21	Céphalosporinase	9	15	Céphalosporinase	-	-

	Mécanisme de résistance	Espèce	Témo Biorad	ROSCO	CAT ID	Témo MAST	MAST	ChromID OXA-48	ChromID CARBA
48	HyperAmpC + imperméabilité	*C. freundii*	17	Absence de KPC/MBL	7	16	Absence de KPC/MBL	-	-
49	HyperAmpC + imperméabilité	*C. freundii*	16	Absence de KPC/MBL	9 (DZ/µcolonies)	15	Absence de KPC/MBL	-	-
50	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*E. cloacae*	21	Absence de KPC/MBL	8	20	Absence de KPC/MBL	-	+
51	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*E. cloacae*	11	Céphalosporinase	10	9	Absence de KPC/MBL	-	-
52	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*E. aerogenes*	9	Céphalosporinase	7	6	Céphalosporinase	-	-
53	HyperAmpC + imperméabilité + BLSE	*C. freundii*	23	Absence de KPC/MBL	9 (DZ/µcolonies)	15	Absence de KPC/MBL	-	+
54	Oxacillinase naturelle + imperméabilité	*E. coli*	20	Absence de KPC/MBL	11	18	Absence de KPC/MBL	-	+
55	Hyperoxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	22	KPC	15	19	Absence de KPC/MBL	-	+
56	Hyperoxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	20	Absence de KPC/MBL	17	18	Absence de KPC/MBL	-	+
57	Hyperoxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	17	KPC	13	16	Absence de KPC/MBL	-	-
58	Hyperoxy + imperméabilité	*K. oxytoca*	23	Absence de KPC/MBL	22	22	Absence de KPC/MBL	-	+

Rouge : résultats discordants
DZ/µcolonies : double zone/micro-colonies dans la zone d'inhibition ; Témo : témocilline
ChromID OXA-48/CARBA : + → présence d'une pousse / - → absence de pousse
Diamètres des témocillines et CAT ID en mm, 6 mm = absence de zone d'inhibition autour du disque
L'interprétation ROSCO comprend les disques MR, MR+BO, MR+CX, MR+DP.
L'interprétation MAST comprend les disques A, B, C, D.

II.C.2 Résultats et comparaison des tests ROSCO Neo-Sensitabs™ et MAST DISCS®

Pour certaines souches, des colonies ont poussé dans la zone d'inhibition. Ces colonies ont été prises en compte ; les diamètres retenus correspondent donc à des zones claires d'inhibition. Cette observation ne concerne pas le disque CAT-ID pour lequel la présence de micro-colonies dans la zone d'inhibition est caractéristique des souches productrices d'OXA-48 (Annexe).

Les tests ROSCO et MAST ont été comparés entre eux quant à leur performance de détection des EPC. Afin d'améliorer la sensibilité de détection, un disque de témocilline a été ajouté à ces 2 tests. Le test CAT-ID est également un test additionnel, proposé avec le test MAST. Différentes combinaisons associant ces 2 tests ont été comparés pour la détection des EPC :

- test CAT-ID seul ;
- test ROSCO *vs* test MAST ;
- témocilline (Bio-Rad) *vs* témocilline (Mast) ;
- test ROSCO + témocilline *vs* test MAST + témocilline ;
- test ROSCO + CAT-ID *vs* test MAST + CAT-ID ;
- test ROSCO + témocilline + CAT-ID *vs* test MAST + témocilline + CAT-ID ;

Les interprétations des tests ROSCO et MAST ainsi que les diamètres des témocillines et du CAT-ID sont renseignés dans le Tableau 19.

II.C.2.1 Performances du test CAT-ID pour la détection des EPC

Les performances du CAT-ID seul ont été évaluées pour la détection des EPC.

Parmi les 34 EPC, 33 souches ont présenté un diamètre d'inhibition autour du disque inférieur ou égal à 6mm, ou une double zone d'inhibition avec des micro-colonies dans le cas des souches productrices d'OXA-48. Une seule souche productrice d'OXA-48 a présenté un diamètre d'inhibition à 23mm, il s'agit de la souche n° 32 : *K.pneumoniae* productrice d'OXA-48 en association à une BLSE, pour laquelle une perte de plasmide est suspectée. En effet, un antibiogramme a été refait et ne montrait plus de résistance aux carbapénèmes. Parmi les 24 souches non productrices de carbapénèmases, 4 souches ont présenté un résultat discordant : 3 souches ont un double diamètre d'inhibition avec des micro-colonies et une souche a un diamètre d'inhibition de 6mm.

Le test CAT-ID permet de détecter les EPC avec une sensibilité et une spécificité respectives de 97% et 83% (Tableau 20). En éliminant la souche de *K.pneumoniae* pour laquelle une perte de plasmide est suspectée, la sensibilité du test CAT-ID atteint 100%.

Tableau 20. Performances du disque CAT-ID

		CARBA + (n = 34)	CARBA - (n = 24)
CAT-ID seul	Test +	33 (97%)	4 (17%)
	Test -	1 (3%)	20 (83%)

Concernant le test CAT-ID (faropénème) utilisé pour la détection des EPC, nos résultats sont concordants avec les autres études. En effet, Day *et al.* ont réalisé une étude au Royaume-Uni (18) afin d'évaluer l'intérêt de tester la sensibilité du faropénème (disque de 10µg) pour prédire l'activité carbapénèmase : 166 EPC (dont 115 NDM, 14 IMP, 15 KPC, 13 OXA-48 et 9 VIM) et 82 souches productrices d'autres β-lactamases ont été inclues. Les objectifs de cette étude étaient :

- de comparer le faropénème aux autres carbapénèmes pour la détection des EPC : les données de performances sont regroupées dans le Tableau 21 ;

Tableau 21. Comparaison des performances de détection du faropénème par rapport aux autres carbapénèmes d'après Day *et al.* (18)

Carbapénème	Sensibilité	Spécificité
Ertapénème	99%	69%
Imipénème	98%	88%
Méropénème	99%	79%
Faropénème	99%	94%

- d'évaluer l'intérêt du faropénème pour le dépistage des EPC : ils ont ainsi démontré qu'un diamètre ≤ 6mm (absence de zone d'inhibition) autour du disque de faropénème permet de détecter une carbapénèmase avec une sensibilité de 99% et une spécificité de 94%. Cette étude est comparée à une autre étude réalisée au centre de référence du Royaume-Uni réalisée à partir de 205 souches : 86 EPC et 119 souches non-productrices de carbapénèmases. D'après cette deuxième étude, une EPC est détectée grâce à un diamètre d'inhibition autour du faropénème ≤ 6mm avec une sensibilité et une spécificité de 98% et 87%, respectivement. Cette spécificité plus faible pourrait être liée à un recrutement de souches plus atypiques au centre de référence.

Hu *et al.* (79) ont évalué dans une autre étude, l'intérêt d'utiliser un disque de faropénème pour la détection des enzymes de type KPC, carbapénèmase très fréquente dans certains pays. Les auteurs ont démontré qu'un disque de faropénème à 5µg permettait de détecter les carbapénèmases avec une sensibilité et une spécificité de 100%. Cette étude

a été réalisée à partir de 62 souches productrices de KPC et 73 souches non-productrices (hyperproduction d'AmpC ou BLSE).

Le disque de faropénème est donc un test simple, facile et ayant une forte valeur prédictive positive de détection des EPC.

II.C.2.2 Comparaison des tests ROSCO et MAST

Parmi les 13 souches productrices de MBL, une seule souche a présenté un résultat discordant avec les tests ROSCO et MAST, le kit ROSCO n'ayant pas détecté une MBL. Il s'agit d'un *C.freundii* producteur d'une carbapénèmase de type VIM ayant une sensibilité conservée pour le méropénème (CMI = 1µg/mL). Comme précisé dans la notice du kit ROSCO Neo-Sensitabs™, des faux-négatifs sont fréquemment observés en cas de sensibilité au méropénème.

En ce qui concerne les souches productrices de carbapénèmases de type OXA-48, les tests ROSCO et MAST seuls ne permettent pas de les détecter : la seule conclusion possible pour ces 2 tests est « Absence de KPC/MBL ». Ces 2 tests sont donc concordants pour l'ensemble des 21 souches productrices d'OXA-48-like.

Les 24 souches non-EPC sont concordantes avec le test MAST seul quant à la détection de carbapénèmase : aucun faux positif n'a été observé. 3 faux-positifs ont été observés avec le test ROSCO parmi les souches non-EPC : une en faveur d'un MBL et 2 en faveur de KPC. Pour autant, parmi les 8 souches hyperproduisant une céphalosporinase, seules 3 ont été identifiées avec le test ROSCO et 2 avec le test MAST.

Les sensibilités et spécificités de détection des carbapénèmases des tests ROSCO et MAST seuls sont donc respectivement de 35% et 88% (ROSCO) et 35% et 100% (MAST) – (Tableau 22). En effet, seules les carbapénèmases de type MBL ont été détectées. La spécificité est meilleure pour le test MAST, pour autant, seulement 3 souches non-EPC sur 24 ont rendu un résultat faussement positif avec le kit ROSCO. Cependant, aucune KPC n'a été inclue dans cette étude car aucune souche n'était présente dans la collection disponible au laboratoire.

Tableau 22. Test ROSCO *versus* test MAST

		CARBA + (n = 34)	CARBA – (n = 24)
ROSCO	Test +	12 (35%)	3 (12%)
	Test -	22 (65%)	21 (88%)
MAST	Test +	12 (35%)	0 (0%)
	Test -	22 (65%)	24 (100%)

CARBA + : souche productrice de carbapénèmase
CARBA - : souche non-productrice de carbapénèmase
Test + : identification du type de carbapénèmase en cause grâce au tests ROSCO ou MAST seuls
Test - : absence de détection de la carbapénèmase grâce à ces 2 tests

II.C.2.3 Comparaison des disques de témocilline (Bio-Rad/Mast)

La témocilline est théoriquement utilisée pour permettre la détection des carbapénèmases de type OXA-48. Nous avons donc comparé les 2 disques de témocilline pour la détection des enzymes de type OXA-48 uniquement (Tableau 23).

La témocilline des 2 fournisseurs est sensible (95%) et la témocilline Bio-Rad présente une meilleure spécificité (84%) que la témocilline Mast (76%).

Tableau 23. Témocilline Bio-Rad *versus* témocilline MAST pour la détection des OXA-48

		OXA-48 + (n=21)	OXA-48 – (n=37)
Témocilline Bio-Rad	Test +	20 (95%)	6 (16%)
	Test -	1 (5%)	31 (84%)
Témocilline Mast	Test +	20 (95%)	9 (24%)
	Test -	1 (5%)	28 (76%)

OXA-48 + : souche productrice d'OXA-48 like
OXA-48 - : souche non-productrice d'OXA-48 like
Test + : correspond à une suspicion d'OXA-48 like grâce aux disques de témocilline (Bio-Rad ou Mast) : zone d'inhibition < 15 mm autour du disque de témocilline
Test - : correspond à une absence de suspicion d'OXA-48 like grâce aux disques de témocilline : zone d'inhibition ≥ 15 mm autour du disque de témocilline

Koroska *et al*. (80) ont évalué les performances de la témocilline pour la détection des carbapénèmases de type OXA-48. Ils ont réalisé une étude à partir de 166 entérobactéries, dont 84 productrices d'OXA-48-like, 41 productrices d'autres carbapénèmases et 41 non-EPC. Un seuil de 11mm de diamètre d'inhibition a été utilisé dans cette étude pour la discrimination des OXA-48. La sensibilité et la spécificité de la témocilline pour la détection des OXA-48 étaient respectivement de 100% et 43,9%. De

même que dans notre étude, le disque de témocilline ne peut pas être utilisé seul pour la détection des OXA-48 en raison de la faible spécificité. Pour autant le seuil de diamètre d'inhibition (11 mm) est différent de celui utilisé dans notre étude, les données ne sont donc pas comparables.

Robert et al. (81) ont également démontré qu'un disque de témocilline, avec un seuil de diamètre d'inhibition à 15mm permettait d'améliorer la détection des EPC dans l'algorithme de détection proposé par le CASFM.

Woodford *et al.* (82) ont comparé la détection des EPC grâce à une résistance de haut niveau à la témocilline (CMI > 128mg/L) seule ou en association avec une absence de synergie à l'EDTA. Dans leur étude réalisée à partir de 2280 entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes (dont 1029 EPC), ils ont montré que la résistance à la témocilline seule permettait de détecter les OXA-48 avec une sensibilité de 90,7% et une spécificité de 88,2%. En associant cette résistance à la témocilline avec une absence de synergie à l'EDTA, ils ont obtenu une sensibilité équivalente (90,7%) et une meilleure spécificité (96,3%) de détection des OXA-48. Cette étude illustre l'intérêt d'associer un disque de témocilline au test MAST afin d'améliorer la spécificité de détection des OXA-48 (grâce à l'absence de synergie avec le disque B, contenant un inhibiteur de MBL). En effet nos résultats tiennent compte de l'association au test Mast ou Rosco : une OXA-48 n'a pas été suspectée devant une témocilline < 15mm si une synergie était observée avec le disque contenant un inhibiteur de MBL.

II.C.2.4 Comparaison des tests ROSCO et MAST avec addition de témocilline

Nous avons analysé les tests ROSCO et MAST associés aux disques de témocilline Bio-Rad et Mast respectivement afin d'évaluer leur intérêt par rapport aux tests ROSCO et MAST seuls. En ajoutant un disque de témocilline aux tests ROSCO et MAST seuls, un gain de sensibilité (94%) pour les 2 tests est observé, du fait de la détection des carbapénèmases de type OXA-48. Les tests ROSCO et MAST présentent la même spécificité de détection des EPC (62%). Cette spécificité est faible du fait de la faible spécificité de la témocilline pour la détection des EPC (Tableau 24). Ces 2 associations ont donc été analysés en ajoutant le disque CAT-ID afin de voir si un gain de spécificité est observé.

Tableau 24. Test ROSCO + témocilline Bio-Rad *versus* test MAST + témocilline Mast

		CARBA + (n = 34)	CARBA – (n = 24)
ROSCO + témocilline Bio-Rad	Test +	32 (94%)	9 (38%)
	Test -	2 (6%)	15 (62%)
MAST + témocilline Mast	Test +	32 (94%)	9 (38%)
	Test -	2 (83%)	15 (62%)

CARBA + : souche productrice de carbapénèmase
CARBA - : souche non-productrice de carbapénèmase
Test + : identification du type de carbapénèmase en cause grâce à ROSCO + témocilline Biorad ou MAST + témocilline Mast
Test - : correspond à une absence de détection de la carbapénèmase grâce à ces 2 associations

II.C.2.5 Comparaison des tests ROSCO et MAST avec addition de CAT-ID

Nous avons également comparé les tests ROSCO et MAST additionnés du test CAT-ID. Cette évaluation est « théorique », en effet le test CAT-ID est classiquement vendu avec le kit MAST. Le but de ces associations est d'évaluer l'intérêt d'associer le test CAT-ID aux kits ROSCO et MAST à la place (ou en plus) des disques de témocilline. L'association au test CAT-ID a permis de détecter la souche de *C.freundii* productrice de VIM mais non détectée par les tests ROSCO et MAST seuls, du fait d'une sensibilité conservée au méropénème. En effet, cette souche présentait un test CAT-ID positif. Les associations MAST + CAT-ID et ROSCO + CAT-ID détectent les EPC avec la même sensibilité (97%). Cependant, l'association avec le kit MAST est plus spécifique (83%) que celle avec le kit ROSCO (71%) - (Tableau 25). La sensibilité de détection des EPC est légèrement meilleure en utilisant le disque CAT-ID plutôt que la témocilline avec les tests ROSCO ou MAST (sensibilité de 97% et 94% respectivement pour les 2 tests). Par contre, du fait de l'absence d'utilisation de la témocilline, la spécificité des combinaisons utilisant le CAT-ID est bien meilleure (56% pour ROSCO ou MAST avec témocilline).

Tableau 25. Test ROSCO + CAT-ID *versus* test MAST + CAT-ID

		CARBA + (n=34)	CARBA - (n=24)
ROSCO + CAT-ID	Test +	33 (97%)	7 (29%)
	Test -	1 (3%)	17 (71%)
MAST + CAT-ID	Test +	33 (97%)	4 (17%)
	Test -	1 (3%)	20 (83%)

CARBA + : souche productrice de carbapénèmase
CARBA - : souche non-productrice de carbapénèmase
Test + : correspond à une identification du type de carbapénèmase en cause grâce à l'association kit ROSCO + CAT-ID ou Kit MAST + CAT-ID
Test - : correspond à une absence de détection de la carbapénèmase grâce à ces 2 associations

II.C.2.6 Comparaison des tests ROSCO et MAST avec témocilline et CAT-ID

Étant donné que les combinaisons utilisant le disque CAT-ID présentent des performances supérieures à celles utilisant la témocilline, sans toutefois atteindre 100% de sensibilité et spécificité, nous avons donc comparé les combinaisons utilisant à la fois la témocilline et le disque CAT-ID. Le but était de voir si cette triple association augmentait la sensibilité et ne diminuait pas trop la spécificité (Tableau 26). L'ajout d'un disque de témocilline aux combinaisons ROSCO + CAT-ID ou MAST + CAT-ID n'améliore pas la sensibilité (absence d'EPC supplémentaire détectée), mais diminue la spécificité. En effet, de nombreux faux-positifs sont observés avec la témocilline : 6 non-EPC pour le test ROSCO et 9 non-EPC pour le test MAST ont présenté un diamètre d'inhibition de la témocilline < 15 mm.

Tableau 26. ROSCO + témocilline Bio-Rad + CAT-ID *versus* MAST + témocilline Mast + CAT-ID

		CARBA + (n=34)	CARBA - (n=24)
ROSCO + Témocilline + CAT-ID	Test +	33 (97%)	13 (54%)
	Test -	1 (3%)	11 (46%)
MAST + Témocilline + CAT-ID	Test +	33 (97%)	12 (50%)
	Test -	1 (3%)	12 (50%)

CARBA + : souche productrice de carbapénèmase
CARBA - : souche non-productrice de carbapénèmase
Test + : correspond à une identification du type de carbapénèmase en cause grâce à l'association kit ROSCO + témocilline Biorad ou Kit MAST + témocilline MAST + CAT-ID
Test - : correspond à une absence de détection de la carbapénèmase grâce à ces 2 associations

II.C.2.7 Synthèse des performances des différentes combinaisons utilisant les tests ROSCO et MAST ainsi que la témocilline et le disque CAT-ID

Nous avons démontré que les associations utilisant le test MAST présentent de meilleures performances de détection des EPC que celles associant le test ROSCO. Nous avons donc synthétisé les résultats de ces différentes associations (avec le test MAST) dans le Tableau 27. Pour autant, notre étude est limitée par la taille de la collection. En France, une forte prévalence des carbapénèmases de type OXA-48 est observée, la combinaison à privilégier devra donc détecter ces carbapénèmases avec une bonne sensibilité, comme c'est le cas pour la témocilline, qui détecte les OXA-48 avec 95% de sensibilité et 46% de spécificité. D'après Koroska *et a*l. (80) qui ont réalisé une étude sur un plus grand nombre de souches, les performances de détection des EPC (et notamment des OXA-48) sont meilleures en associant la témocilline au faropénème (disque CAT-ID). En effet, ils ont montré que la sensibilité et spécificité du faropénème utilisé seul pour la détection des producteurs d'OXA-48 étaient respectivement de 57,1% et 98,8%. L'association de la témocilline au faropénème permettait de détecter les producteurs d'OXA-48 avec une sensibilité de 57,1% et une spécificité de 100%. En effet, leur algorithme utilisait des étapes successives avec réalisation d'un disque de faropénème uniquement si la témocilline est résistante. La réalisation d'un test immunochromatographique de détection des OXA-48 en cas de témocilline < 11mm et de test au faropénème négatif leur a permis de détecter les OXA-48 avec 100% de sensibilité et spécificité. Cette étude illustre l'intérêt d'utiliser à la fois la témocilline (très sensible : 100%) et le faropénème (très spécifique : 98,8%) pour la détection des OXA-48 et de réaliser une PCR (ou un autre test de confirmation) lorsque le test au faropénème est négatif mais que la témocilline présente un diamètre d'inhibition <15mm. Ces données sont toutefois différentes de notre étude, la sensibilité au faropénème est inférieure et le seuil utilisé pour la témocilline (11mm) est également différent.

Tableau 27. Performances des différents tests et combinaisons pour la détection des EPC

Paramètre	CAT-ID	Témocilline (**OXA-48 uniquement**)	MAST seul	MAST + témocilline	MAST + CAT-ID	MAST + CAT-ID + témocilline
Sensibilité	97%	95%	35%	94%	97%	97%
Spécificité	83%	76%	100%	62%	83%	50%
VPP	89%	69%	100%	78%	89%	73%
VPN	95%	97%	52%	88%	95%	92%

VPP : valeur prédictive positive ; VPN : valeur prédictive négative

Le test CAT-ID seul présente les meilleures performances de détection des EPC (sensibilité de 97% et spécificité de 83%). L'association au test MAST présente les mêmes performances de détection des EPC. L'utilisation du test CAT-ID seul nécessite cependant une évaluation complémentaire. En effet, d'après Koroska *et al.*, la sensibilité de détection des EPC en utilisant le faropénème seul est uniquement de 57,1%. La lecture de micro-colonies dans la zone d'inhibition a été relativement aisée pendant notre étude. Cependant, le mécanisme de résistance était connu avant la réalisation des tests. Une étude en aveugle serait donc nécessaire pour confirmer les résultats. Il peut s'avérer plus prudent de conserver le test MAST ainsi que la témocilline pour la détection des EPC. Cependant, la VPP de la témocilline est de 69% pour la détection des OXA-48. L'association du test MAST avec le disque de CAT-ID et la témocilline diminue fortement la spécificité (50%) par rapport au test CAT-ID seul (83%) d'après notre étude, mais sans autre étude permettant de confirmer nos résultats. Même si l'association CAT-ID + témocilline sans test d'inhibition (MAST) présente une meilleure sensibilité, aucun argument bibliographique ne justifie cette combinaison. Nous avons donc choisi d'utiliser le test d'inhibition MAST dans l'algorithme afin d'assurer la sensibilité de détection des EPC. De plus, le test MAST permet de caractériser les souches dans un laboratoire n'utilisant pas de PCR.

Dans un laboratoire réalisant une PCR en 2ème intention, cette association peut être utilisée du fait de la grande spécificité de la PCR. Après évaluation prospective du test CAT-ID seul ou de l'association MAST + CAT-ID, ceux-ci pourraient être utilisés dans un laboratoire dans lequel aucune méthode de PCR n'est disponible en raison d'une meilleure spécificité (83%). En attendant, les laboratoires ne disposant pas de PCR devraient envoyer les souches suspectes d'EPC au CNR pour confirmation et typage de la souche.

II.C.3 Performances des milieux chromogènes

L'utilisation des géloses chromogènes dans cette étude vise à évaluer leur intérêt dans l'algorithme de détection des carbapénèmases, en présence d'une souche de sensibilité aux carbapénèmes sur l'antibiogramme. En effet, le milieu CARBA permet une bonne détection des EPC non-OXA mais ne présente pas une bonne sensibilité pour la détection des oxacillinases, alors que le milieu OXA-48 détecte les OXA-48 avec une bonne sensibilité mais ne permet pas la détection des EPC non-OXA. Le milieu ChromID OXA-48 est donc évalué quant à l'augmentation de sensibilité et spécificité de détection des entérobactéries productrices d'OXA-48 par rapport à l'association du test MAST avec les disques de témocilline et de CAT-ID.

Parmi les EPC, 31 souches sur 34 ont poussé sur milieu CARBA. La croissance était nette et franche pour toutes les souches productrices de carbapénèmases. Parmi les 24 souches non EPC, 13 ont également poussé sur milieu CARBA, avec une pousse faible pour

3 d'entre elles. Le milieu CARBA présente une excellente sensibilité (100%) de détection des carbapénèmases de classe B (aucune entérobactérie productrice de carbapénèmase de classe A n'ayant été incluse dans l'étude). Cependant, de nombreuses souches résistantes aux carbapénèmes mais non productrices de carbapénèmase présentent une pousse positive sur milieu CARBA. Ce milieu est donc très peu spécifique (54%) pour la détection des carbapénèmases. Face à l'émergence des souches BLSE/AmpC associées à une altération des porines, ce milieu peu spécifique engendre la réalisation de nombreux examens complémentaires sur des souches non-EPC. La gélose ChromID CARBA est donc à réserver pour le dépistage des porteurs, comme test de première intention.

Parmi les 21 souches productrices d'OXA-48, une croissance sur gélose OXA-48 a pu être observée chez 18 d'entre elles (Annexe). Les 3 souches productrices d'OXA-48 mais n'ayant pas poussé sur milieu ChromID OXA-48 ont donc été repiquées après décongélation sur milieu MH additionné d'un disque d'ertapénème, dans un second temps. La souche de *K.pneumoniae* productrice d'OXA-48 pour laquelle une perte de plasmide est suspectée n'a pas poussé sur milieu OXA-48, ce qui peut confirmer l'hypothèse de perte de résistance pour cette souche. Aucune souche d'EPC non-OXA-48 n'a poussé sur ce milieu. Cependant, une souche non-EPC, un *E.coli* résistant aux carbapénèmes par hyperproduction de céphalosporinase associée à une imperméabilité, a poussé sur la gélose OXA-48. La gélose ChromID OXA-48 présente une sensibilité et une spécificité de détection des carbapénèmases de type OXA-48 de 86% et 97% respectivement (Tableau 28). En excluant la souche pour laquelle une perte de plasmide est suspectée, la sensibilité de la gélose ChromID OXA-48 pour la détection des enzymes de classe D passe de 86 à 90%.

Tableau 28. Évaluation des milieux chromogènes pour les différentes types de souches

Types de souches	Nombre de souches	Nombre de souches poussant sur ChromID OXA-48	Nombre de souches poussant sur ChromID CARBA
EPC OXA-48	21	18 (86%)	18 (86%)
EPC non-OXA-48	13	0 (0%)	13 (100%)
Entérobactéries non EPC	24	1 (4%)	13 (54%)

Les données de notre étude concernant la gélose ChromID OXA-48 sont comparables à celles de la littérature. En effet, une étude réalisée à partir de 37 souches d'entérobactéries productrices d'OXA-48 (ou OXA-48-like) - (83), a montré des performances relativement similaires : toutes les souches productrices d'OXA-48 ont poussé sur ce milieu

et seulement 2 souches non-OXA-48 ont poussé (Tableau 29). En effet, dans cette étude la sensibilité de ce milieu pour le dépistage des OXA-48 est de 100% et la spécificité est de 99%.

Tableau 29. Nombre de souches ayant poussé sur les différents milieux (83)

		chromID® OXA-48		chromID® CARBA		Colorex KPC		Brilliance CRE	
Nb of strains		18 h	24h	18 h	24h	18 h	24h	18 h	24h
37	OXA-48 / OXA-181	37	37	15	15	18	20	20	20
35	Other carbapenemase	1	1	34	34	32	34	24	24
36	HL Case, ESBL	-	-	-	2	1	1	9	9
14	resistant by impermeability	-	-	6	9	12	12	10	10
10	Other oxacillinase (OXA-23)	-	-	-	-	-	-	-	-
56	wild type	-	-	-	3	1	1	1	2
14	VRE	1	1	5	7	-	-	-	-
202	Total								

La combinaison utilisant les deux milieux chromogènes ChromID OXA-48 et ChromID CARBA permet de détecter les EPC avec une sensibilité de 97%, cette association présente donc un intérêt pour les tests de dépistage des porteurs.

Comme décrit précédemment, le test CAT-ID seul et l'association du test MAST avec les disques de témocilline et CAT-ID présentent les meilleures performances de détection des EPC. Nous avons donc évalué l'intérêt d'ajouter une gélose ChromID OXA-48 à ces 2 tests. Parmi les 3 souches productrices n'ayant pas poussé sur gélose OXA-48, 2 ont été détectées grâce au disque CAT-ID et au disque de témocilline, la 3ème souche étant celle pour laquelle une perte de plasmide est suspectée. L'association CAT-ID + ChromID OXA-48 n'augmente donc pas la sensibilité (sensibilité de 97% dans les 2 cas) et diminue la spécificité (83% et 79% pour CAT-ID seul et CAT-ID + gélose OXA-48 respectivement) de détection des EPC par rapport au CAT-ID seul. Il en est de même pour l'association MAST + témocilline + CAT-ID + ChromID-OXA-48 (sensibilité et spécificité respectives de 97% et 75%) par rapport à MAST + témocilline + CAT-ID (sensibilité et spécificité respectives de 97% et 83%) – (Tableau 30).

Tableau 30. CAT-ID + ChromID OXA-48 *versus* MAST + témocilline + CAT-ID + ChromID OXA-48

		CARBA + (n=34)	CARBA - (n=24)
CAT-ID + ChromID OXA-48	Test +	33 (97%)	5 (21%)
	Test -	1 (3%)	19 (79%)
MAST + témo + CAT-ID + ChromID OXA-48	Test +	33 (97%)	6 (25%)
	Test -	1 (3%)	18 (75%)

Ainsi, l'ajout d'une gélose ChromID OXA-48 au test CAT-ID seul ou à l'association MAST + témocilline + CAT-ID ne présente pas d'intérêt.

II.C.4 Résultats et performances du test CIM

Les suspensions bactériennes ont été réalisées en parallèle dans 400µL d'eau et de solution saline afin de comparer les résultats. La lecture a été faite après 6h, ainsi qu'après une nuit d'incubation, selon la publication originale. Le test a été rendu positif lorsque la pousse était au contact du disque de méropénème, et négatif dès lors qu'une zone d'inhibition était visible autour du disque.

Après 6h d'incubation, 5 EPC sur 34 incubés dans l'eau et 14 sur 34 incubés dans la solution saline ont donné un résultat positif. Alors qu'après une nuit d'incubation, 9 EPC sur 34 dans l'eau et 27 sur 34 en solution saline ont donné un résultat positif (Annexe). Aucune souche d'entérobactérie non productrice de carbapénèmase n'a donné un résultat positif, que ce soit en solution aqueuse ou saline. Toutes les souches d'EPC ayant un test CIM négatif, présentaient une zone d'inhibition ≥ 14mm (Tableau 31). Cependant Gauthier *et al.* ont réalisé le test selon les recommandations de la publication originale mais ont modifié le seuil d'interprétation du test CIM, avec un test indéterminé lorsque le diamètre d'inhibition est compris entre 6 et 20mm. Ces seuils pourraient permettre une meilleure interprétation de ce test.

Tableau 31. Résultats du test CIM réalisé à la fois en solution aqueuse et en solution saline

	Test CIM +			
	Eau 6h	**Eau 20h**	**NaCl 6h**	**NaCl 20h**
CARBA + (*n=34*)	**5 (15%)**	**9 (26%)**	**14 (41%)**	**27 (79%)**
dont MBL (*n=13)*	4 (31%)	6 (46%)	8 (62%)	11 (85%)
dont OXA (*n=21)*	1 (5%)	3 (14%)	6 (29%)	16 (76%)
CARBA – (*n=24*)	**0 (0%)**	**0 (0%)**	**0 (0%)**	**0 (0%)**

CIM + : test CIM positif (absence de zone d'inhibition autour du disque de méropénème)
CIM - : test CIM négatif (présence d'une zone claire d'inhibition autour du disque de méropénème)
CARBA + : EPC ; CARBA - : non-EPC ; Après 6h d'incubation, sont classés en CIM- les résultats négatifs et ceux dont la pousse n'était pas suffisante pour permettre la lecture.

Nos tests ont été réalisés à la fois en solution aqueuse et saline car les premiers tests dans l'eau ne montraient pas des résultats performants, et les tests de sensibilité sont de plus habituellement réalisés en solution NaCl. D'après nos résultats, les performances du test CIM réalisé en solution saline sont supérieures à celles réalisées en solution aqueuse, et rapportées dans la publication originale. Parmi les différentes carbapénèmases, les MBL présentent une sensibilité de détection supérieure à celle des autres OXA-48-like. La spécificité de cette étude est excellente (100%). En effet, aucune souche non productrice de carbapénèmase n'a montré un test CIM positif.

La publication originale précise que le résultat peut être rendu en 6 heures, en cas de nécessité d'avoir un résultat dans la journée. Pour autant, les résultats de Zwaluw *et al.* correspondent à des lectures après une nuit d'incubation. En effet, d'après nos tests, la sensibilité de détection après 6h d'incubation est très faible et la pousse trop faible empêchait la lecture de la zone d'inhibition. Toutefois, les résultats observés dans notre étude montrent des performances nettement inférieures à celles décrites par Zwaluw *et al.* (Tableau 32). Dans cette étude, 283 souches ont été testées. Parmi les entérobactéries, ils ont testés 70 EPC et 213 non-EPC. Les EPC étaient réparties de la façon suivante : 5 KPC, 2 IMP, 16 NDM, 5 VIM et 42 OXA-48. Le mécanisme de résistance des non-EPC n'est pas détaillé. Au total, il y avait 88 *K.pneumoniae,* 43 *E.coli*, 72 *E.cloacae* et 80 autres entérobactéries. Tous ces tests ont été réalisés en suspension dans de l'eau (le type d'eau n'est pas précisé dans la publication).

Tableau 32. Performances du test CIM selon Zwaluw *et al.* (45)

	CARBA + (*n=70*)			CARBA – (*n=213*)
	KPC (*n=5*)	MBL (*n=23*)	OXA-48 (*n=42*)	
CIM +	5 (100%)	22 (95.7%)	40 (95.2%)	3 (1.4%)
CIM -	0 (0%)	1 (4.3%)	2 (4.8%)	210 (98.6%)

CIM + : test CIM positif (absence de zone d'inhibition autour du disque de méropénème)
CIM - : test CIM négatif (présence d'une zone claire d'inhibition autour du disque de méropénème)
CARBA + : EPC ; CARBA - : non-EPC

La sensibilité et la spécificité globales du test CIM selon Zwaluw *et al.* sont respectivement de 95.7% et 98.6%. Les sensibilités de détection de chaque classe sont de 100% pour les KPC (classe A), 95.7% pour les MBL (classe B) et 95.2% pour les OXA-48 (classe D).

Plusieurs publications rapportent l'utilisation d'un test CIM original et modifié (Tableau 33), qui présenterait de meilleures performances que le test CIM de Zwaluw *et al*. Pierce *et al*. (84) ont réalisé une étude inter-laboratoires (9 laboratoires) pour valider le test CIM

modifié et ont montré de meilleures performances (mais variables) en comparaison avec la méthode originale (93% de sensibilité et 100% de spécificité). Du TSB (bouillon trypticase soja), milieu nutritif utilisé dans de nombreuses procédures de microbiologie et notamment pour la préparation de la suspension d'antibiogramme aux États-Unis a été utilisé en remplacement de l'eau distillée et le temps d'incubation de la suspension bactérienne a été allongé à 3-4h. D'après Pierce *et al.* ayant comparé le test CIM et le test CIM modifié, aucun souche ne présentait un diamètre d'inhibition indéterminé pour le test CIM modifié, le test CIM non modifié ayant été interprété selon les recommndations de Zwaluw *et al.*

Tableau 33. Comparaison des conditions du test CIM selon différentes études

Études	Nb de souches (dont EPC)	Sensibilité / Spécificité	Méthode de référence	Solution pour suspension	Temps / température d'incubation	Marque du disque de méropénème	Seuil de décision
Zwaluw *et al.* (2015) - (45)	283 EB (70 EPC)	95,7% / 98,6%	PCR / séquençage	400µL d'eau distillée	35°C / 2h	Oxoid	≤ 6mm : test +
Gauthier *et al*. (2017) - (85)	92 EB (63 EPC)	92,1% / 100%	PCR / séquençage	400µL d'eau distillée	35°C / 2h	Oxoid	≤ 6mm : test + ≥ 20mm : test -
Saito *et al.* (2017) - (86)	284 EB (233 EPC)	100% / 96,1%	Séquençage	400µL d'eau distillée	35°C / 2h	Eiken	≤ 10mm : test +
Yamada *et al.* (2017) - (87)	57 EB (34 EPC)	100% / 100%	PCR / séquençage	2mL TSB (BD)	35°C / 4h	BD	< 15mm
Tamma *et al.* (2017) - (57)	191 EB (122 EPC)	98% / 99%	Séquençage	2mL TSB	35°C / 4h	?	6-15mm : test + 16-18mm : ind. ≥19mm : test -
Pierce *et al.* (2017) - (84)	61 EB (27 EPC)	93% /1 00%	PCR / séquençage	2mL TSB	35°C / 4h	BD	6-15mm : test + 16-18mm : ind. ≥19mm : test -

EB : entérobactéries ; ind. : indéterminé

Dans notre étude, malgré une relativement bonne sensibilité de détection des carbapénèmases de type MBL (85%), les carbapénèmes de type OXA présente une sensibilité de détection de 76%. De plus, la sensibilité globale (79%) de détection des EPC ne concorde pas avec l'ensemble des études. Ce test apparaît donc peu robuste dans l'eau. Une des hypothèses pourrait être une charge insuffisante de méropénème contenue dans le disque, selon les fournisseurs ou les lots. En effet, les disques présentent une grande variabilité de charges entre fournisseurs, comme le montre actuellement l'EUCAST. De plus, le centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique (CTCB) semble présenter des difficultés pour l'analyse des contrôles de qualité internes externalisés, du fait d'une grande variabilité des résultats à cause des charges de disques différents entre les fournisseurs. Cependant, le test CIM, d'après la publication originale, n'est pas affecté par l'utilisation de disque de méropénème provenant de fournisseurs différents. Une autre hypothèse pourrait être l'utilisation de géloses sélectives chromogènes pour les EPC (les non-EPC étaient repiquées sur géloses MH avec un disque d'ertapénème) pour le repiquage des souches. En effet, dans les autres études, les souches sont sélectionnées à partir de gélose Müeller-Hinton.

D'après notre expérience, nous pouvons donc conclure que ce test est peu sensible et peu robuste selon les conditions de la publication originale. Parmi les avantages, ce test est très facile à réaliser, il ne nécessite que des réactifs accessibles dans n'importe quel laboratoire de microbiologie médicale (gélose MH, disque de méropénème à 10µg, eau ou solution saline), 4 tests en plus des contrôles négatif et positif peuvent être réalisés sur la même gélose MH (test économique, pour autant nous ne réalisons généralement pas autant de recherches simultanées au laboratoire) et l'interprétation est sans équivoque (lorsque le test est positif, la croissance est vraiment au contact du disque et lorsqu'il est négatif, la zone d'inhibition est bien claire).

Au moment de la réalisation des tests de cette étude, seule la publication originale était disponible. Cependant, les tests réalisés dans le NaCl semblent comparables à ceux dans le TSB. Ce test reste donc à évaluer en prolongeant l'incubation à 4h, en utilisant du TSB et en prenant les seuils d'interprétation de Pierce *et al*. car ils sont validés à partir d'une étude inter-laboratoires.

Cependant, d'après nos résultats, nous ne pouvons pas utiliser le test CIM dans notre algorithme de détection des EPC au laboratoire sans évaluation complémentaire, du fait de la faible sensibilité de détection des carbapénèmases, et notamment celles de type OXA-48. En effet, la détection des carbapénèmases de type OXA est phénotypiquement difficile en raison d'une faible activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes (85), et ce sont les carbapénèmases les plus fréquentes en France.

II.D CONCLUSION DE L'ETUDE

L'objectif de cette étude était d'évaluer les performances de 3 méthodes phénotypiques de détection des carbapénèmases chez les entérobactéries afin de déterminer leur intérêt en routine dans un laboratoire de biologie médicale et d'établir un algorithme pour la caractérisation des souches non sensibles aux carbapénèmes au laboratoire du CHU de Toulouse.

Entre janvier 2013 et avril 2016, 58 souches d'entérobactéries (dont 34 EPC et 24 non-EPC) ont été collectées et testées pour les différentes méthodes. Les tests MAST et ROSCO (additionnés ou non de témocilline et du disque CAT-ID), ainsi que le test CIM ont été réalisés sur les différentes souches. Les milieux chromogènes sélectifs ont également été testés afin d'évaluer leur intérêt et leurs performances dans cette situation. Les souches utilisées présentaient toutes une CMI intermédiaire ou résistante à au moins un carbapénème et provenaient à la fois de prélèvements cliniques ou de dépistage.

Comme cité précédemment, les carbapénèmases les plus fréquentes en France sont les oxacillinases de type OXA-48 (78%), suivie des NDM (14%), des KPC (5%) et des VIM (5%). Cette collection comportant 20 OXA-48 (59%), 10 NDM (29%), 3 VIM (9%) et 1 OXA-181 (3%) peut donc refléter l'épidémiologie française, une extrapolation est donc possible à l'échelle nationale. Cependant, cette collection comporte un biais car aucune entérobactérie productrice de KPC n'a été inclue. De plus, cette étude présente une limite du fait de la faible taille de la série.

Afin de choisir le test à mettre en place pour la détection des EPC dans un laboratoire de microbiologie médicale, la priorité est de trouver un test ayant une haute sensibilité en gardant une bonne spécificité. En effet, un faux-négatif peut engendrer un risque de transmission non maîtrisée de la résistance. A l'inverse, un faux-positif est à l'origine de la mise en place de précautions complémentaires (dont le coût est important) inutiles. Les autres paramètres à prendre en compte sont : le coût du test, la simplicité d'utilisation et/ou de réalisation, l'équipement nécessaire, la durée de réalisation du test ainsi que la durée nécessaire pour obtenir un résultat. Le test à choisir doit également prendre en compte l'épidémiologie locale. Par exemple, dans une région de forte endémie d'OXA-48, le test utilisé devra avoir une bonne sensibilité de détection des carbapénèmases de type OXA-48 (57). De plus, la fréquence de réalisation de cette recherche impacte le choix du test. En effet, si cette recherche d'EPC est rarement réalisée, il est préférable de choisir un test unitaire rapide, plutôt qu'une méthode manuelle telle que le CarbaNP test nécessitant la préparation extemporanée de solution antibiotique pour chaque utilisation, avec un risque de gaspillage.

D'après nos résultats, il est donc utile d'inclure un disque CAT-ID dans l'algorithme de détection des carbapénèmes, en tant qu'indicateur précoce, avant les tests génotypiques de confirmation. De plus, les micro-colonies présentes dans la zone d'inhibition permettent de conforter la suspicion de production d'enzyme de type OXA-48. En raison du faible recul sur l'utilisation de ce test, nous avons choisi de conserver un disque de témocilline ainsi que le test MAST dans l'algorithme de détection des EPC. Un disque de céfépime sur milieu MH (disponible dans tout laboratoire de microbiologie médicale) pour les entérobactéries du groupe 3 est également intégré, selon les recommandations du CASFM/EUCAST afin de détecter les souches résistantes aux carbapénèmes par hyperproduction de céphalosporinase. La suspicion de carbapénèmase pourra ensuite être confirmée, au laboratoire du CHU de Toulouse, grâce à la PCR Xpert® Carba-R qui présente une très grande spécificité, et permet également de déterminer le type de carbapénèmase, dans la plupart des cas. En pratique, le disque CAT-ID et le céfépime pourront être ajoutés sur la gélose MH lors de la réalisation des boîtes pour la recherche de BLSE. En fonction de l'antibiogramme, une carte étendue ainsi que des CMI complémentaires (méthode E-test) pourront être ajoutées afin de rechercher une sensibilité à des molécules utilisées en traitement alternatif. Après mise en place de ce nouvel algorithme, il peut s'avérer utile de réaliser une étude prospective, sur un plus grand nombre de souches, en utilisant le test CAT-ID seul afin de voir si une simplification des tests de dépistage est possible. L'algorithme de détection des EPC est donc présenté sur la Figure 35. Cet algorithme tient compte essentiellement du faible coût (en réactif et en temps opérateur) au laboratoire, mais il ne prend pas en compte le coût global de la prise en charge d'un patient porteur d'une souche de sensibilité diminuée aux carbapénèmes au niveau de l'institution, à savoir :

- coûts de mise en place inutile des PCC avant infirmation d'une EPC ;
- coûts de maîtrise d'une possible épidémie (dépistage de patients « contact », réalisation de cohortes) si absence de mise en place des PCC en cas de suspicion d'EPC, confirmée un jour plus tard ;

En prenant en compte ces éléments, et après réalisation d'une étude économique, il pourrait être également envisagé de réaliser une PCR en 1ère intention, dont le résultat est disponible en quelques heures, couplée à un disque de CAT-ID et éventuellement à la témocilline, afin de détecter les EPC dont les gènes de carbapénèmases ne seraient pas inclus dans le kit de PCR. Les entérobactéries du groupe 3, en particulier, sont fréquemment résistantes aux carbapénèmes par une association de mécanisme ; cette stratégie pourrait éviter la mise en place inutile de précautions complémentaires en attendant le résultat.

En ce qui concerne le test CIM, bien que ce test soit facile à réaliser et ne nécessite que du matériel disponible dans tout laboratoire, il serait intéressant de poursuivre cette

évaluation en réalisant une incubation prolongée, comme le préconisent Pierce *et a*l, et de comparer les résultats dans le NaCl à ceux obtenus dans le TSB.

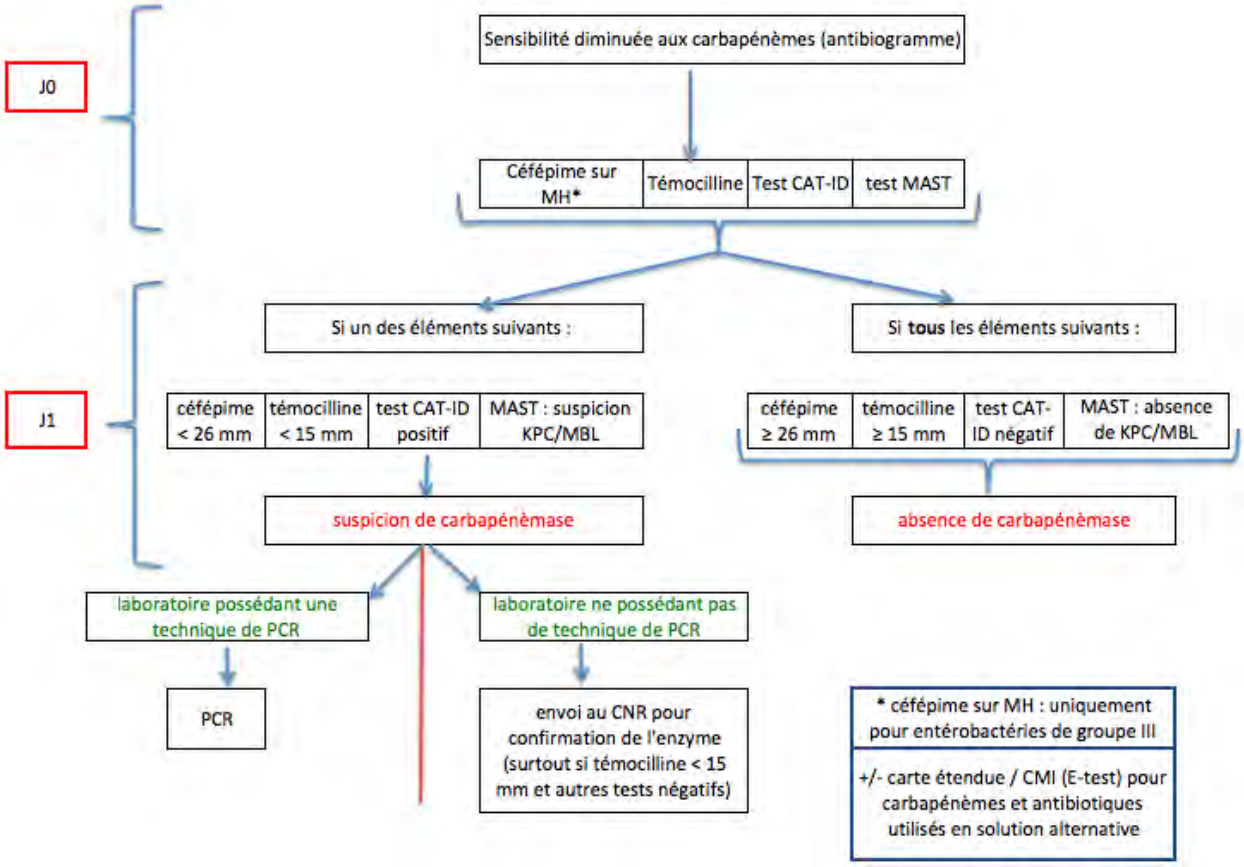


Figure 35. Algorithme de détection des EPC

III CONCLUSION

L'émergence des BMR permet de rappeler qu'il est évidemment nécessaire d'être attentif aux différents types de souches qui circulent dans les hôpitaux. La gestion du risque infectieux que représente la diffusion de souches multi-résistantes exige une collaboration étroite entre les différents acteurs de santé concernés (cliniciens, infectiologues, bactériologistes, hygiénistes, personnels soignants...). Des mesures d'hygiène strictes restent indispensables au sein des services, pour limiter la diffusion de ces souches multi-résistantes. Elles demeurent indissociables d'une politique d'antibiothérapie raisonnée, basée sur la surveillance de la sensibilité des souches et sur la meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la résistance.

Les laboratoires de microbiologie doivent pouvoir identifier rapidement EPC parmi les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes afin de permettre un signalement et la mise en place de précautions complémentaires le plus précocement possible, même si le choix et l'efficacité d'un traitement par carbapénème d'une infection due à une Entérobactérie de sensibilité diminuée aux carbapénèmes repose essentiellement sur la détermination de CMI *in vitro*, dont la durée d'obtention ne peut être raccourcie. Ainsi, des techniques phénotypiques et génotypiques sont constamment développées afin de déterminer plus rapidement la résistance par production de carbapénèmase chez les Entérobactéries. Certains tests phénotypiques permettent d'obtenir un résultat en quelques heures (J0) tels que la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF mais cette technique est peu praticable, sans l'acquisition d'un logiciel d'interprétation très coûteux ou encore les tests colorimétriques de type Carba NP test, d'interprétation souvent difficile. Les tests phénotypiques que nous avons testés permettent d'obtenir un résultat à J1, ils ont l'avantage d'être peu couteux mais le délai d'obtention du résultat est plus long.

Notre étude consistait à comparer 3 tests phénotypiques afin d'établir un algorithme de détection des EPC : le test CIM (carbapenem inactivation method) ainsi que 2 tests d'inhibition utilisant des disques combinés : le test ROSCO Neo-Sensitabs™ (Rosco Diagnostica) et le test MAST DISCS® (Mast Diagnostic, Amiens, France) associés ou non aux disques de témocilline et CAT-ID. Ces tests ont été évalués à partir de 58 entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes : 34 EPC (13 MBL et 20 OXA-48-like) et 24 non-EPC. Ces 3 tests ont montré une bonne praticabilité technique. Les disques combinés ont présenté de bonnes performances, alors que celles du test CIM étaient moins bonnes d'après notre travail, probablement dues à un problème de robustesse ou à une nécessité d'optimisation du test en tenant compte des dernières publications modifiant les conditions techniques et d'interprétation.

Les méthodes moléculaires, telles que la PCR, adaptées à la détection rapide des EPC, ont un coût élevé. Ce coût est néanmoins à mettre en balance avec le coût global pour l'institution et la collectivité. La PCR pourrait donc être utilisée en première intention pour un résultat à J0, éventuellement en association avec un test phénotypique comme le CAT-ID, dont le résultat, obtenu à J1, permettrait de pas manquer d'EPC non détectable par biologie moléculaire. D'autres techniques de biologie moléculaire telles que le séquencçage vont prendre de plus en plus d'ampleur, dans les années à venir, pour la détermination de la résistance.

Annexe 1 : Comparaison des tests ROSCO et MAST pour différentes souches

Klebsiella pneumoniae productrice d'OXA-48 (*Figure 36*)

ROSCO	MAST
(MR+BO) – MR = 0	C-A = 2
(MR+CX) – MR = -1	D-A = 2
(MR+DP) – MR= 0	B-A = 0
TEMOCILLINE = contact	TEMOCILLINE = contact
	CAT-ID = micro-colonies dans la zone d'inhibition

➔ Suspicion de carbapénèmase de type OXA-48

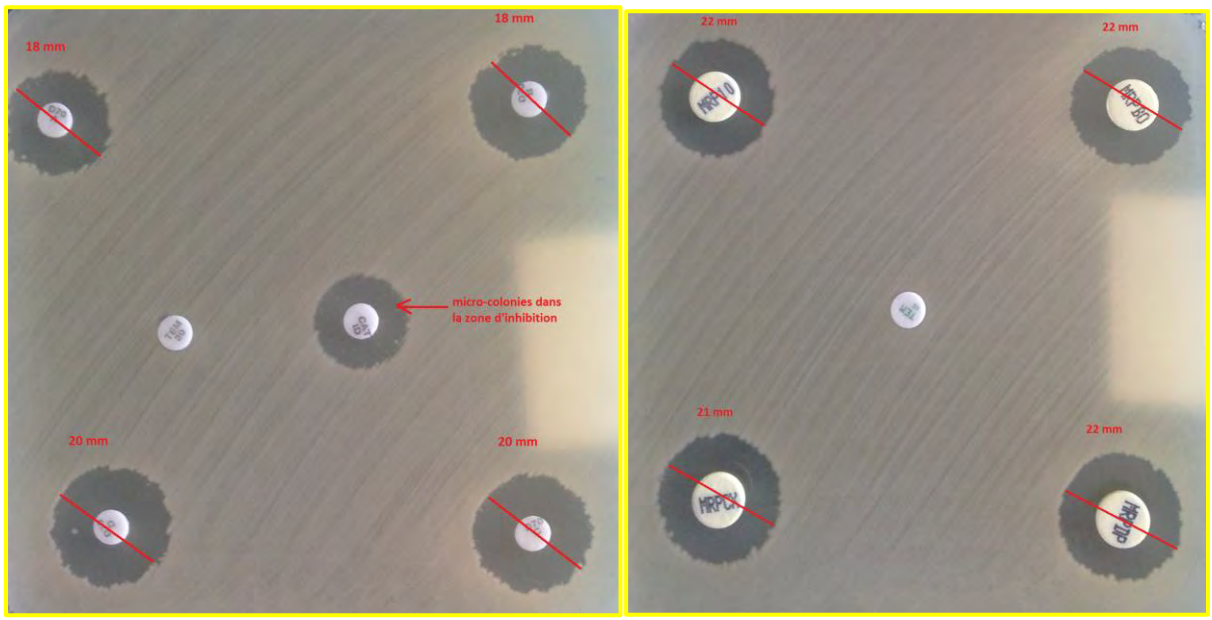


Figure 36. Résultats des disques MAST et ROSCO pour _K.pneumoniae productrice d'_OXA-48

(Disques MAST à gauche et ROSCO à droite)

***Morganella morganii* productrice de NDM (*Figure 37*)**

ROSCO		MAST	
(MR+BO) – MR = 3	**≤ 3 mm**	C-A = 0	**< 4 mm**
(MR+CX) – MR = 1	**≤ 3 mm**	D-A = 2	**< 4 mm**
(MR+DP) – MR = 8	**≥ 5 mm**	B-A = 7	**≥ 5 mm**
TEMOCILLINE = contact		TEMOCILLINE = contact	
		CAT-ID = contact	

➔ Suspicion de carbapénèmase de type MBL

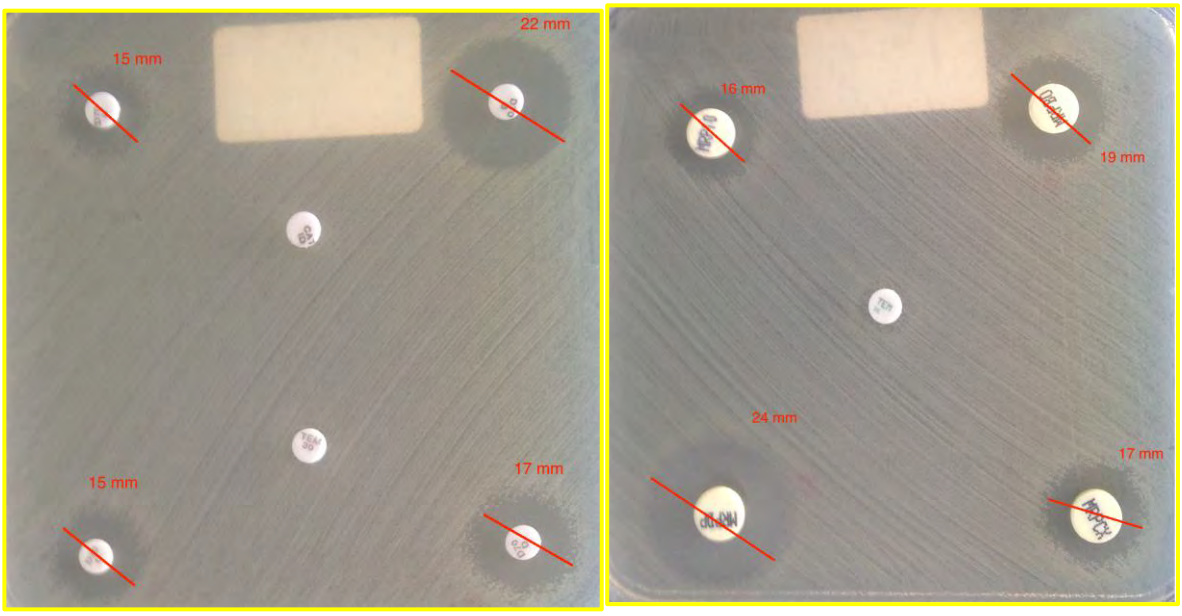


Figure 37. Résultats des disques MAST et ROSCO pour *M.morganii* productrice de NDM

(Disques MAST à gauche et ROSCO à droite)

***Citrobacter freundii* producteur de VIM (*Figure 38*)**

ROSCO		MAST	
(MR+BO) – MR = 0	**≤ 3 mm**	C-A = 2	**< 4 mm**
(MR+CX) – MR = 0	**≤ 3 mm**	D-A = 1	**< 4 mm**
(MR+DP) – MR = -1	**< 5 mm**	B-A = 0	**< 5 mm**
TEMOCILLINE = 15 mm		TEMOCILLINE = contact	
		CAT-ID = 11 mm	

➔ Absence de détection de la carbapénèmase de type MBL

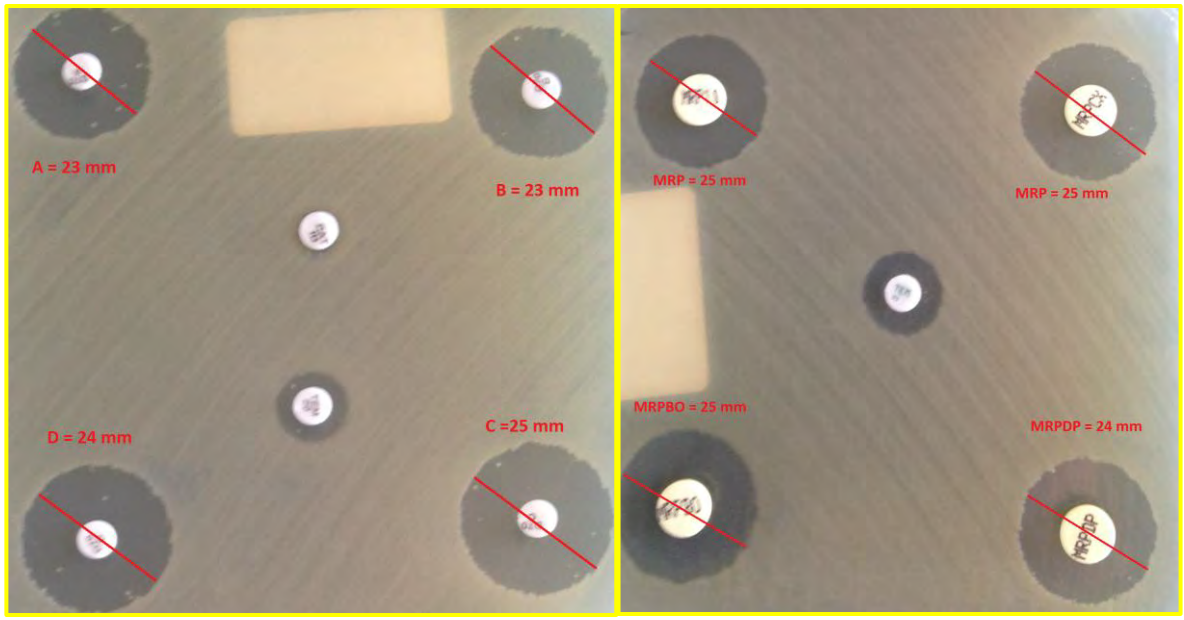


Figure 38. Résultats des disques MAST et ROSCO pour *Citrobacter freundii productruce de* VIM

(Disques MAST à gauche et ROSCO à droite)

Annexe 3 : EPC sur milieux chromogènes (Figure 39et Figure 40)

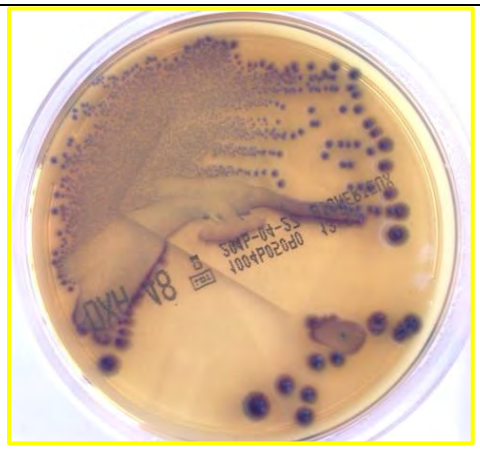


Figure 39. Gélose sélective ChromID® OXA-48 : *K.pneumoniae* productrice d' OXA-48

Figure 40. Gélose sélective ChromID® CARBA : *E.coli* producteur de NDM

Annexe 4 : Comparaison des tests ROSCO et MAST pour différentes souches

La Figure 41 compare les tests CIM réalisés à la fois en solution aqueuse ou saline après 18 à 24h d'incubation, pour différentes souches productrices ou non de carbapénèmases.

2 souches productrices d'OXA-48 (➡) présentent un test CIM positif en solution saline mais négatif en solution aqueuse. La même discordance est observée pour une souche d'*E.cloacae* productrice d'une enzyme de type VIM : test CIM positif en solution saline et négatif en solution aqueuse. (➡)

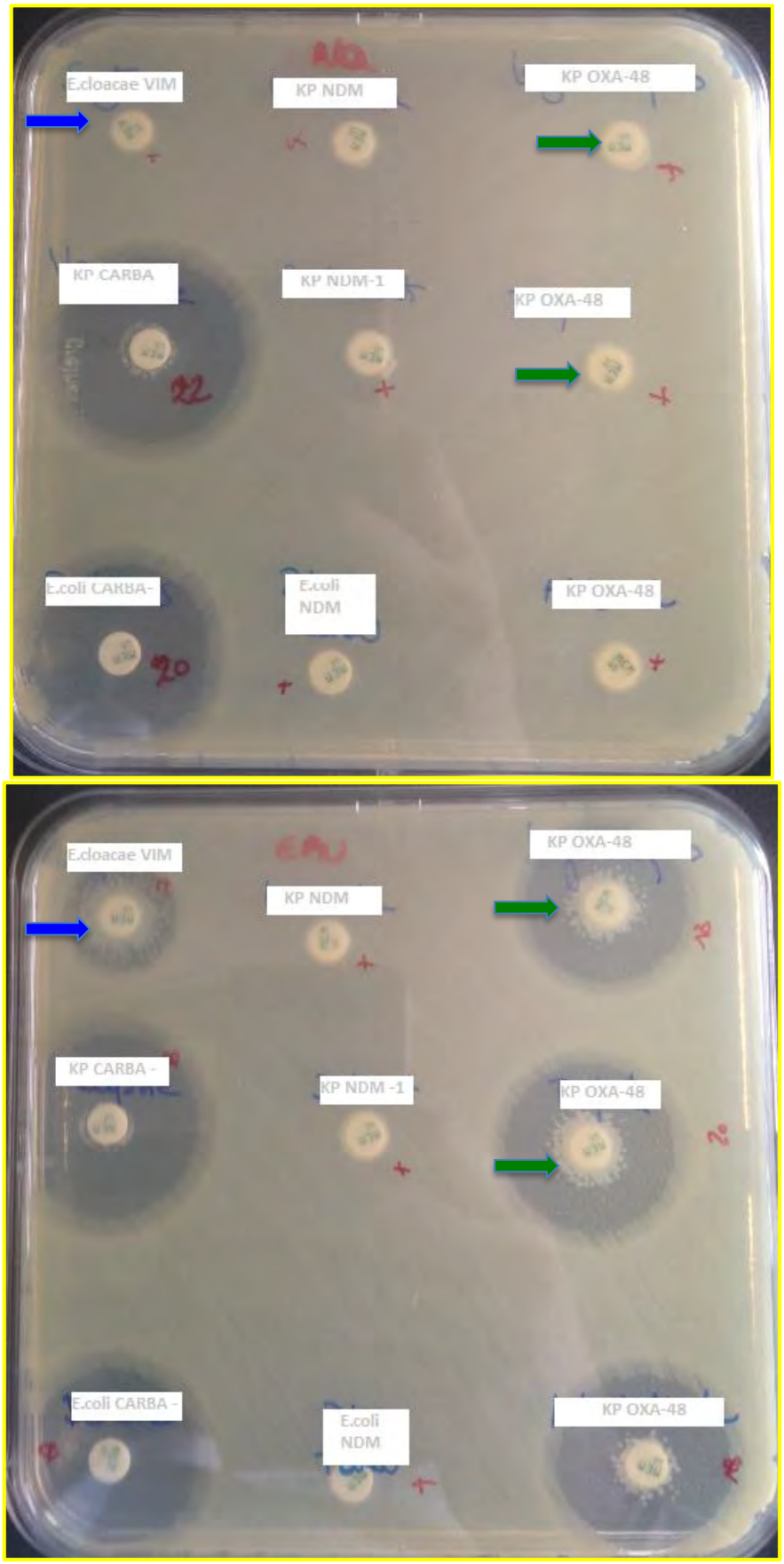


Figure 41. Comparaison test CIM en solutions NaCl (en haut) et aqueuse (en bas)

BIBLIOGRAPHIE

1. Lepelletier D, Batard E, Berthelot P, Zahar J-R, Lucet J-C, Fournier S, et al. Maîtrise de la diffusion des entérobactéries productrices de carbapénémases : épidémiologie, stratégies de prévention et enjeux. juin 2015;

2. Grall N, Muller-Serieys C. Carbapénèmes. EMC - Mal Infect. févr 2013 ; 10(1)

3. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Epidémiologie, détection et identification des entérobacteries productrices de carbapénèmases. Feuill Biol. 2013;312.

4. Institut de Veille Sanitaire. La résistance aux antibiotiques, synthèse des données Françaises. Disponible sur: http://www.invs.sante.fr/ratb

5. Grall N, Andremont A, Armand-Lefèvre L. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? J Anti-Infect. juin 2011;13(2):87‑102.

6. Decousser J-W, Poirel L, Nordmann P. Recent advances in biochemical and molecular diagnostics for the rapid detection of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae : a focus on ß-lactam resistance. Expert Rev Mol Diagn. 3 avr 2017;17(4):327‑50.

7. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. nov 2015;70(11):3014‑22.

8. G.Arlet. Quel avenir pour les carbapénèmases? Le point sur les méthodes de détection. 13ème journée Maurice Rapin; 2012 nov.

9. Philippon A, Arlet G. β-Lactamases de bacilles à Gram négatif : le mouvement perpétuel ! Ann Biol Clin (Paris). 1 janv 2006;64(1):37‑51.

10. Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Manuel de bactériologie clinique. Vol. 2. Amsterdam, France;

11. Philippon A. Résistance bactérienne : définitions, mécanismes, évolution. EMC - Mal Infect. janv 2008;5(3):1‑13.

12. Philippon A, Arlet G. Les bêta-lactamases chez les bacilles à Gram-négatif : que de nouveautés en 15 ans ! Antibiotiques. janv 2005;7.

13. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 16 mai 1980;289(1036):321‑31.

14. Courvalin P, Leclercq R. Antibiogramme. 3ème édition. ESKA; 2011.

15. Philippon A, Arlet G. Entérobactéries et bêta-lactamines : phénotypes de résistance naturelle. 3 avr 2012;

16. Société française de microbiologie (SFM. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie - European Committee on antimicrobial susceptibility testing (CASFM/EUCAST) - Recommandations 2017 - V1.0 Mars.

17. Gauzit R, Gutmann L, Brun-Buisson C, Jarlier V, Fantin B. Recommandations de bon usage des carbapénèmes. Antibiotiques. déc 2010;12(4):183‑9.

18. Day KM, Pike R, Winstanley TG, Lanyon C, Cummings SP, Raza MW, et al. Use of Faropenem as an Indicator of Carbapenemase Activity in the Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 1 juin 2013;51(6):1881‑6.

19. Wolff M, Joly-Guillou M-L, Pajot O. Le point sur les carbapénèmes. avr 2008;

20. R.Gauzit et al. Utilisation des carbapénèmes dans les établissements de santé en 2011 - Journées Nationales d'Infectiologie - Tours. SPILF, ONERBA; 2012.

21. Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing Klebsiella pneumoniae. J Med Microbiol. oct 2009;58(Pt 10):1303‑8.

22. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β-lactamases. J Antimicrob Chemother. avr 2015;70(4):1059‑63.

23. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis. avr 2009;9(4):228‑36.

24. Diene SM, Rolain J-M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. sept 2014;20(9):831‑8.

25. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. sept 2014;20(9):821‑30.

26. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. oct 2011;17(10):1791‑8.

27. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. ECDC; 2015.

28. Mathlouthi N, Al-Bayssari C, Bakour S, Rolain JM, Chouchani C. Prevalence and emergence of carbapenemases-producing Gram-negative bacteria in Mediterranean basin. Crit Rev Microbiol. févr 2017;43(1):43‑61.

29. Dortet L, et al. Investigation of NDM-1 producing Morganella morganii outbreak using Whole Genome Sequencing. 26th ECCMID; 2016 avr; Amsterdam, France.

30. Naas T. Rapport d'activité 2012-2015 - Centre national de référence de la résistance aux antibiotiques. CHU de Bicêtre; 2012 2015.

31. T. Naas. Epidémiologie et prévention des entérobactéries productrices de carbapénèmases. Hôpital de Bicêtre - CNR associé résistance aux carbapénèmes; 2016.

32. R.Gauzit, et al. « Alternative aux carbapénèmes » - 11e journée des référents en antibiothérapie. SPILF; 2016.

33. Cattoir V. Traitement des infections dues à entérobactéries productrices de carbapénèmases. J Anti-Infect. sept 2014;16(3):99‑105.

34. T.Ferry, et al. Traitement systémique des infections à bacilles gram négatif producteurs de carbapénèmases. La Lettre de l'infectiologue. août 2013;

35. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing Klebsiella pneumoniae: superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob Agents Chemother. avr 2012;56(4):2108‑13.

36. Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Karaiskos I. Effectiveness of a Double-Carbapenem Regimen for Infections in Humans Due to Carbapenemase-Producing Pandrug-Resistant Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. mai 2013;57(5):2388‑90.

37. Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. Efficacy of Humanized Carbapenem and Ceftazidime Regimens against Enterobacteriaceae Producing OXA-48 Carbapenemase in a Murine Infection Model. Antimicrob Agents Chemother. mars 2014;58(3):1678‑83.

38. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. Int J Antimicrob Agents. 1 mai 2011;37(5):415‑9.

39. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1 mai 2005;40(9):1333‑41.

40. Haut conseil de la santé publique (HCSP). Prévention de la transmission croisée des Bactéries Hautement Résistantes aux antibiotiques émergentes (BHRe). 2013 juill.

41. Nordmann P, Carrer A. Les carbapénèmases des entérobactéries. Arch Pédiatrie. 2010;17:S154–S162.

42. Pailhoriès H, Lemarié C, Kempf M, Mahaza C, Joly-Guillou M-L, Eveillard M. Retrospective detection of the hidden spread of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in a French teaching hospital. J Infect. 1 sept 2015;71(3):407‑9.

43. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. août 2010;48(8):2999‑3002.

44. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of Methods To Identify the Klebsiella pneumoniae Carbapenemase in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 8 janv 2007;45(8):2723‑5.

45. 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. Rohde H, éditeur. PLOS ONE. 23 mars 2015;10(3):e0123690.

46. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. févr 2012;50(2):477‑9.

47. AISSA N. Bactéries hautement résistantes émergentes « BHRe » - Comment les dépister ? 23èmes journées régionales d'hygiène et de lutte contre les infections nosomiales; 2015.

48. Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E, Bergerová T. Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry ▿. J Clin Microbiol. sept 2011;49(9):3222‑7.

49. Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S, Charrier J-P, van Belkum A, Welker M, et al. Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. nov 2015;34(11):2225‑34.

50. Burckhardt I, Zimmermann S. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. J Clin Microbiol. sept 2011;49(9):3321‑4.

51. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel J-M, Drissi M, et al. Rapid Detection of Carbapenem Resistance in Acinetobacter baumannii Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. PLOS ONE. 16 févr 2012;7(2):e31676.

52. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β-lactam antibiotics. J Clin Microbiol. mars 2012;50(3):927‑37.

53. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 1 juill 2012;50(7):2441‑3.

54. Lee W, Chung H-S, Lee Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, et al. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing Acinetobacter spp., Pseudomonas aeruginosa, and Klebsiella pneumoniae. Diagn Microbiol Infect Dis. nov 2013;77(3):227‑30.

55. Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, et al. Detection of SPM-1-Producing Pseudomonas aeruginosa and Class D β-Lactamase-Producing Acinetobacter baumannii Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 1 janv 2013;51(1):287‑90.

56. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martín MD, Liebana-Martos C, Navarro-Marí JM. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo-β-lactamases in Enterobacteriaceae and Pseudomonas spp. Lett Appl Microbiol. avr 2014;58(4):325‑9.

57. Tamma PD, Opene BNA, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 4 janv 2017;55(4):1046‑55.

58. Nordmann P, Poirel L. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif: épidémiologie, aspects théoriques et détection. Mal Infect. 2014;427(16):902–907.

59. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. sept 2012;18(9):1503‑7.

60. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP Test for Rapid Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. sept 2013;57(9):4578‑80.

61. Pires J, Tinguely R, Thomas B, Luzzaro F, Endimiani A. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. mars 2016;122:33‑7.

62. Vasoo S, Cunningham SA, Kohner PC, Simner PJ, Mandrekar JN, Lolans K, et al. Comparison of a Novel, Rapid Chromogenic Biochemical Assay, the Carba NP Test, with the Modified Hodge Test for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol. sept 2013;51(9):3097‑101.

63. Pires J, Novais Â, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. J Clin Microbiol. déc 2013;51(12):4281‑3.

64. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, Decré D, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β Carba Test. J Clin Microbiol. déc 2016;54(12):3065‑8.

65. Noël A, Huang T-D, Berhin C, Hoebeke M, Bouchahrouf W, Yunus S, et al. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Tests for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. J Clin Microbiol. 2 janv 2017;55(2):510‑8.

66. Bogaerts P, Yunus S, Massart M, Huang T-D, Glupczynski Y. Evaluation of the BYG Carba Test, a New Electrochemical Assay for Rapid Laboratory Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. févr 2016;54(2):349‑58.

67. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T-D, Leclipteux T, et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. J Antimicrob Chemother. mai 2016;71(5):1217‑22.

68. Wareham DW, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MHFA. Evaluation of an Immunochromatographic Lateral Flow Assay (OXA-48 K-SeT) for Rapid Detection of OXA-48-Like Carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. févr 2016;54(2):471‑3.

69. Meunier D, Vickers A, Pike R, Hill RL, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the K-SeT R.E.S.I.S.T. immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC and OXA-48-like carbapenemases. J Antimicrob Chemother. août 2016;71(8):2357‑9.

70. Huang T-D, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. J Antimicrob Chemother. 1 févr 2014;69(2):445‑50.

71. Eigner U., et al. Comparison of the Check-Direct CPE real-time PCR kit to selective agar media for the detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae. ECCMID; 2015.

72. Decousser J-W, Poirel L, Desroches M, Jayol A, Denamur E, Nordmann P. Failure to detect carbapenem-resistant Escherichia coli producing OXA-48-like using the Xpert Carba-R assay®. Clin Microbiol Infect. 1 févr 2015;21(2):e9‑10.

73. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). J Antimicrob Chemother. août 2012;67(8):1865‑9.

74. Riethmuller J. La résistance des entérobactéries aux carbapénèmes. Etude prospective aux Hôpitaux Civils de Colmar du dépistage avec un milieu sélectif et intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour le criblage [Mémoire du DES de biologie médicale]. Université de Strasbourg; 2013.

75. Dévigne L., et al. First evaluation of chromID® OXA-48 agar, a new chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing OXA-48 carbapenemase. ECCMID Berlin, Allemagne; 2013.

76. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of Carbapenemase Producers in Enterobacteriaceae by Use of a Novel Screening Medium. J Clin Microbiol. 8 janv 2012;50(8):2761‑6.

77. G. Gautier, et al. Evaluation d'une méthode phénotypique rapide de détection des différentes classes de carbapénémases : étude sur 101 souches d'entérobactéries, Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter baumannii génotypiquement identifiées. 35ème réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse; 2015.

78. Beesley T, Gascoyne N, Knott-Hunziker V, Petursson S, Waley SG, Jaurin B, et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. Biochem J. 1 janv 1983;209(1):229‑33.

79. Hu F, Ahn C, O'Hara JA, Doi Y. Faropenem Disks for Screening of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: TABLE 1. Bourbeau P, éditeur. J Clin Microbiol. sept 2014;52(9):3501‑2.

80. Koroska F, Göttig S, Kaase M, Steinmann J, Gatermann S, Sommer J, et al. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. J Clin Microbiol. 3 janv 2017;55(3):877‑83.

81. Robert J, Pantel A, Merens A, Meiller E, Lavigne J-P, Nicolas-Chanoine M-H. Development of an algorithm for phenotypic screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the routine laboratory. BMC Infect Dis. 17 janv 2017

82. Woodford N, et al. In vitro activity of témocillin against multidrug-resistant clinical isolates of Escherichia coli, Klebsiella spp., and Enterobacter spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. J antimicrob chemother. 2014;

83. Dévigne. First evaluation of chromID® OXA-48 agar - a new chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae-producing OXA-48 carbapenemase. Poster présenté à RICAI 2012.

84. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. The Modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 5 avr 2017;JCM.00193-17.

85. Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. PLoS ONE. 3 févr 2017;12(2).

86. Saito K, Nakano R, Suzuki Y, Nakano A, Ogawa Y, Yonekawa S, et al. Suitability of Carbapenem Inactivation Method (CIM) for Detection of IMP Metallo-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. avr 2017;55(4):1220‑2.

87. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method and sodium mercaptoacetate-combination method for the detection of metallo-β-lactamase production by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Microbiol Methods. janv 2017;132:112‑5.

88. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. Laboratory Detection of Enterobacteriaceae That Produce Carbapenemases. J Clin Microbiol. 1 déc 2012;50(12):3877‑80.

RAPID DETECTION OF CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE

Litterature review and evaluation of phenotypic tests

RESUME : The carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) have become globally distributed in the past decade, resulting in concern over control of hospital infections and antimicrobial therapies. Carbapenemase-producing CRE (CPE) must be detected rapidly and reliably to avoid horizontal transmission in healthcare facilities by implementing contact isolation.

We have performed litterature review on the various phenotypic and genotypic methods for detection of EPC from ERC colonies, associated with their own benefits and drawbacks. We evaluated and compared three of these phenotypic methods: (i) the Rosco NEO-SENSITABS KPC/MBL® inhibition confirm kit (Rosco Diagnostica), associated or not with a temocillin disk (Bio-Rad), and currently used in the university hospital laboratory of Toulouse, (ii) the MAST DISCS® inhibition test (Mast groups) associated or not with a temocillin disk (Mast) and the newly marketed CAT-ID disk (Carbapenemase Activity Test, Mast), and (iii) the Carbapenem Inactivation Method (CIM) test recently reported in the literature.

The evaluation of the tests was performed with 58 Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems (34 CPE strains and 24 non-CPE strains) available in the university hospital laboratory of Toulouse. The reference methods for determining the resistance mechanism were PCR and/or the Carba NP test carried out by the National Reference Center. EPC strains included, 3 VIM, 10 NDM, 19 OXA-48, and 1 OXA-181.

All combinations with the Rosco and Mast inhibition tests had a sensitivity ≥ 94% and a specificity ≥ 50%. Combinations associated with temocillin exhibited the poorest specificities. The CAT-ID test alone had the best performance (sensitivity of 97% and specificity of 83%) and could be used alone as an EPC screening test from colonies due to simplicity and low cost. The CIM test did not demonstrate sufficient performance for EPC detection contrary to its original description, but it deserves to be evaluated in its recently described modified form.

KEY WORDS : Enterobacteriaceae, carbapenemase, phenotypic tests, faropenem, carbapenem inactivation method

RESUME :

Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) ont vu leur distribution devenir mondiale au cours de la dernière décennie, ce qui suscite des inquiétudes quant au contrôle des infections hospitalières et des traitements antibiotiques. Les ERC par production de carbapénèmases (EPC) doivent être détectées de manière rapide et fiable afin de prévenir leur transmission horizontale dans les établissements de soins par mise en place des mesures d'hygiène complémentaires de type contact.

Nous avons réalisé une revue bibliographique des différentes méthodes phénotypiques et génotypiques de mise en évidence des EPC à partir de colonies d'ERC, en présentant les avantages et les limites de chacune. Nous avons par ailleurs évalué trois de ces méthodes phénotypiques: (i) le test d'inhibition Rosco NEO-SENSITABS KPC/MBL® confirm kit (Rosco Diagnostica) associé ou non à un disque de témocilline (Bio-Rad) actuellement utilisé au laboratoire du CHU de Toulouse, (ii) le test d'inhibition MAST DISCS® (Mast groups) en association ou non avec un disque de témocilline (Mast) et au disque CAT-ID (Carbapenemase Activity Test, Mast) nouvellement commercialisé, et (iii) le test CIM (Carbapenem Inactivation Method) récemment rapporté dans la littérature.

L'évaluation de ces tests a été réalisée avec 58 entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes (34 souches EPC et 24 souches non-EPC) disponibles au laboratoire du CHU de Toulouse, la méthode de référence pour la détermination du mécanisme de résistance était la PCR et/ou le test Carba NP réalisé par le Centre National de Référence. Les souches d'EPC incluaient, 3 VIM, 10 NDM, 19 OXA-48 et 1 OXA-181. Toutes les combinaisons associant les tests d'inhibition Rosco et Mast présentaient une sensibilité ≥ 94% et une spécificité ≥ 50%. Les combinaisons associant la témocilline présentaient les moins bonnes spécificités. Le test CAT-ID utilisé seul présentait les meilleures performances (sensibilité de 97% et spécificité de 83%) et pourrait être utilisé seul comme test de dépistage des EPC à partir de colonies du fait de sa simplicité de réalisation et de son faible coût. Le test CIM n'a pas montré de performances suffisantes pour la détection des EPC contrairement à sa description originale, mais il mérite d'être évalué dans sa forme modifiée récemment décrite.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

---

DISCIPLINE administrative : PHARMACIE – BIOLOGIE MEDICALE

MOTS-CLES : Entérobactéries, carbapénèmases, tests phénotypiques, faropénème, carbapenem inactivation method

---

INTITULE et ADRESSE du LABORATOIRE

Laboratoire de Bactériologie, Virologie et Hygiène
CHU TOULOUSE - Hôpital Purpan - Place du Docteur Baylac
TSA 40031 - 31059 Toulouse Cedex 9

Co-Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Christophe GARCIE
Co-Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Damien DUBOIS