

ANNEXE 1

Lettre d'information du CA-SFM concernant la détection de la production de carbapénèmases chez les entérobactéries

Janvier 2012

Deux mécanismes peuvent causer la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes : (i) la production de carbapénèmases qui appartiennent à différentes classes de β -lactamases (classification d'Amblar) : classe A (KPC), classe B (métalloenzymes VIM, IMP, NDM) et classe D (OXA-48, OXA-23, OXA-181 et leurs variants) et (ii) un défaut d'accumulation de l'antibiotique associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE.

Il faut d'abord noter que les espèces de la tribu des *Proteae*, notamment *Proteus mirabilis* et *Morganella morganii*, sont intrinsèquement moins sensibles aux carbapénèmes (notamment à l'imipénème) que les autres espèces d'entérobactéries à cause de PLP naturellement peu affines pour ces molécules. Le respect de l'inoculum bactérien lors de la réalisation des tests de sensibilité *in vitro* est important pour ces espèces pour éviter de fausses résistances aux carbapénèmes, notamment avec les techniques d'antibiogramme automatisées en milieu liquide. Une résistance acquise à l'imipénème (et au mécilinam) par mutation des PLP a été décrite chez *P. mirabilis*.

Les carbapénèmases rapportées en France à ce jour sont le plus souvent de type OXA-48 et KPC. Les principales espèces bactériennes impliquées sont *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii*. Ce sont souvent, jusqu'à ce jour, des souches importées de zones d'endémie (pourtour méditerranéen, Inde, Asie, USA).

Certaines souches productrices de carbapénèmases sont, quelle que soit la méthode d'antibiogramme utilisée, catégorisées sensibles (S) aux carbapénèmes, notamment aux molécules autres que l'ertapénème (imipénème, méropénème). L'ertapénème est le carbapénème le plus sensible pour la détection des souches productrices de carbapénèmases. On doit suspecter la production d'une carbapénémase lorsque le diamètre d'inhibition autour du disque d'ertapénème est < 28 mm ou que la CMI est > 0,5 mg/L. En cas de suspicion, la production de carbapénémase doit être faite confirmée à l'aide de techniques phénotypiques et/ou génotypiques. En effet, la détection des carbapénèmases est indispensable pour mettre en oeuvre les mesures de prévention pour empêcher la dissémination épidémique des souches et/ou des gènes dans la population, et le risque d'impasse thérapeutique qui en découlerait (souches pan-résistantes).

On dispose à ce jour de plusieurs techniques phénotypiques pour détecter les carbapénèmases chez les entérobactéries. Ces techniques sont déjà utilisées dans de nombreux laboratoires. Cependant, parce que les performances exactes de ces techniques en termes de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives et rapports de vraisemblance n'ont pas encore été suffisamment évaluées, le CA-SFM ne peut encore recommander un algorithme unique de détection. Il était cependant indispensable de communiquer dès maintenant à la communauté des bactériologistes des laboratoires de biologie médicale la liste des techniques les plus efficaces, sous forme d'une lettre d'information. Dès que possible, le CA-SFM recommandera un algorithme qui sera probablement basé sur une combinaison ordonnée de plusieurs tests.

La **détection phénotypique** des carbapénèmases peut être entreprise selon deux approches, des **tests d'inhibition** (ex. Kit carbapénémase Rosco, E-test MBL BioMérieux ou disque MBL BioRad) et le **test de Hodge** modifié.

1. Les **tests d'inhibition** reposent sur l'augmentation du diamètre d'inhibition autour d'un disque combinant un carbapénème (méropénème ou imipénème) et un inhibiteur ou la diminution de la CMI de ces molécules en présence d'inhibiteurs spécifiques de β -lactamases :

* EDTA ou acide dipicolinique pour les enzymes de classe B

* acides boroniques (ex. : acide para-amino-phenyl boronique) pour les enzymes KPC de classe A.

En testant les carbapénèmes sur un milieu contenant de la cloxacilline (inhibiteur de céphalosporinase) et, comparativement sur un milieu sans cloxacilline, on peut détecter une résistance aux carbapénèmes non liée à la production d'une carbapénémase mais à l'association de céphalosporinase et de défaut d'accumulation des carbapénèmes, qui se traduit par une augmentation importante des diamètres d'inhibition sur le premier milieu.

Il faut signaler que certains des inhibiteurs ci-dessus cités manquent de spécificité : les acides boroniques peuvent inhiber des céphalosporinases et l'EDTA peut avoir une activité antibiotique intrinsèque sur certaines souches.

A ce jour, il n'existe pas de test d'inhibition spécifique des carbapénémases de classe D (ex. OXA-48). La production de ces enzymes est suspectée si tous les tests d'inhibition cités ci-dessus sont négatifs. Dans ce cas le test de Hodges est particulièrement utile (cf. ci-dessous).

2. Le **test de Hodges** modifié repose sur l'utilisation d'un disque d'ertapénème 10 µg (plus indiqué que imipénème, cf ci-dessus) et la souche de référence sensible *E. coli* ATCC 25922 ensemencée par écouvillonnage sur gélose Müller-Hinton à l'aide d'une suspension à 0,5 McFarland diluée au 1/10e. Les souches test suspectées de produire une carbapénémase et des souches témoins (ex. : témoin positif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 productrice de carbapénémase KP-2 et témoin négatif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 non productrice de carbapénémase) sont ensemencées en strie depuis le disque vers le bord de la gélose sur une longueur d'au moins 20 mm. Le test est interprétable en cas de déformation de la zone d'inhibition de la souche de référence le long de la strie de la souche témoin +. Si une déformation semblable est observée avec la souche test suspecte, celle-ci peut-être considérée comme productrice d'une carbapénémase. Le test ne permet pas de donner une orientation sur la classe à laquelle appartient la carbapénémase.

Le test de Hodge peut parfois être faussement négatif, notamment avec les souches productrices de carbapénémases de type NDM-1. L'ajout de ZnSO₄ (100 µg/ml) dans le milieu permet d'augmenter très notablement la sensibilité du test dans ce cas. Un test d'inhibition par des inhibiteurs spécifiques des β-lactamases de classe B (EDTA ou acide dipicolinique, cf. ci-dessus) est également utile dans ce cas.

Le test de Hodge peut parfois être faussement positif pour les souches ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE. La réalisation du test de Hodge modifié en ajoutant de la cloxacilline sur le disque d'ertapénème (déposer 10 µl d'une solution aqueuse à 75 mg/ml de cloxacilline sur le disque d'ertapénème) permet d'éliminer les faux positifs liés à la production de céphalosporinase.

La méthode référence pour la détection des carbapénémases est l'amplification du gène codant pour la carbapénémase.

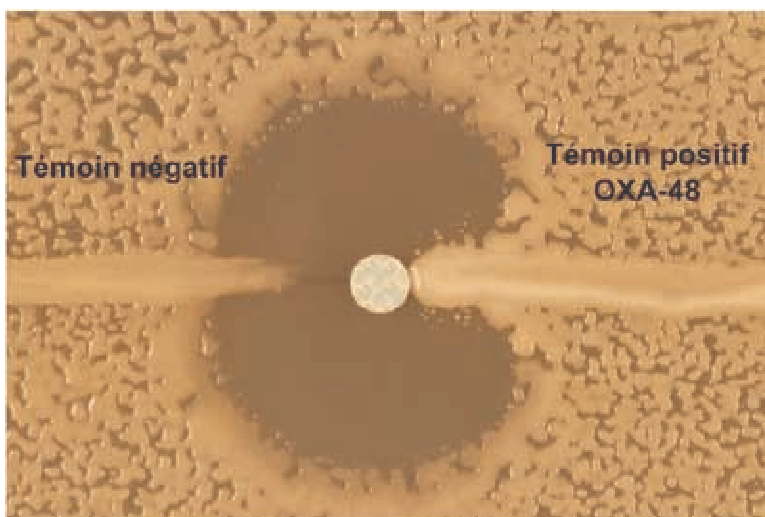


Figure. Test de Hodges modifié pour la détection des carbapénémases. La production de carbapénémase est objectivée par une déformation de la zone d'inhibition autour d'un disque d'ertapénème (ETP) de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 le long des stries correspondant au témoin positif (T+, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 produisant la carbapénémase KPC-2) et à la souche test (ici *K. pneumoniae* produisant OXA-48). La zone d'inhibition de la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 reste inchangée au contact de la strie correspondant un témoin négatif (T-, *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706).