



HAL
open science

Mise en place d'un algorithme décisionnel pour la détection des entérobactéries productrices de carbapénèmase (EPC) au laboratoire de bactériologie du CHU Amiens Picardie

Morgane Choquet

► To cite this version:

Morgane Choquet. Mise en place d'un algorithme décisionnel pour la détection des entérobactéries productrices de carbapénèmase (EPC) au laboratoire de bactériologie du CHU Amiens Picardie. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01496957

HAL Id: dumas-01496957

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01496957>

Submitted on 28 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2016

Thèse n°3159

Mise en place d'un algorithme décisionnel pour la
détection des entérobactéries productrices de
carbapénèmase (EPC) au laboratoire de bactériologie du
CHU Amiens-Picardie

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE TENANT LIEU DE THESE POUR LE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le **25 octobre 2016**

Par

Morgane CHOQUET

Président de jury :

Professeur Pascal SONNET

Juges :

Professeur Sandrine CASTELAIN

Docteur Patricia ZAWADZKI

Docteur Catherine MULLIE-DEMAILLY

Docteur Emilie PLUQUET

Directeur de thèse :

Docteur Véronique DECROIX

Remerciements

A Monsieur le Professeur Pascal SONNET,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame le Professeur Sandrine CASTELAIN,

Merci de m'avoir fait confiance avec ce sujet et de me donner les moyens de le porter jusqu'au bout. Merci de me faire confiance pour les années à venir. Soyez assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Patricia ZAWADZKI,

Merci de m'avoir enseigné et donné goût à la bactériologie. Merci de m'avoir encouragée à poursuivre dans cette voie. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Catherine MULLIE-DEMAILLY,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Soyez assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame le Docteur Emilie PLUQUET,

Merci de l'aide que tu m'apportes au quotidien, merci de m'avoir appris tant de choses, merci de croire en moi.

J'espère occuper ton bureau de longues années encore !

A Madame le Docteur Véronique DECROIX,

Merci de m'avoir si bien encadrée et de t'être autant impliquée tout au long de ce travail. Merci d'avoir enduré et su canaliser ma « logorrhée écrite » !!

En tout cas, si c'était à refaire, je signe tout de suite !

A Monsieur le Professeur Vincent CATTOIR,

Merci de nous avoir confié les souches qui nous ont permis d'approfondir ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance.

A Antoine,

Tu m'as supportée et soutenue au quotidien durant cette année difficile, nous avons surmonté plusieurs épreuves mais nous sommes toujours là !

Gardons le cap, ce n'est que le début !

A mon fils, Adrien,

Tu es ma raison de vivre depuis bientôt deux ans, c'est toi qui me donnes la force d'avancer et de me surpasser pour t'offrir une vie la plus heureuse possible.

A mes parents,

Vous qui m'avez soutenue et qui avez cru en moi depuis le début, merci d'avoir fait de moi ce que je suis ! Votre soutien sans faille depuis tant d'années a une part importante dans la réussite de mes études, merci ! J'espère que vous êtes fiers de moi...

A ma sœur Emeline,

Merci d'être toujours là pour moi, tu sais comme personne trouver les mots qui me donnent la force de me relever. Toi qui suis la même voie que moi, je tiendrai comme il se doit mon rôle de grande sœur, et serai là pour te conseiller et t'épauler chaque fois que tu en auras besoin.

A ma famille,

Merci à tous pour votre soutien au cours de ce long parcours semé d'embûches ! Merci d'être toujours près de moi dans les bons comme dans les mauvais moments, votre présence m'est indispensable !

A Delphine ainsi qu'aux techniciens de bactériologie,

Merci à tous pour le soutien que vous me témoignez au quotidien. Nous devons continuer à unir nos forces pour aller de l'avant !

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Abréviations | 6 |
| I- Introduction | 7 |
| a- Généralités sur la résistance aux β -lactamines des bacilles à Gram négatif | 7 |
| 1. β -lactamines et β -lactamases | 7 |
| 2. Support génétique des β -lactamases | 10 |
| b- Diversité des carbapénèmases | 12 |
| 1. Carbapénèmases de classe A | 13 |
| 2. Carbapénèmases de classe B | 14 |
| 3. Carbapénèmases de classe D | 15 |
| c- Epidémiologie mondiale des carbapénèmases | 17 |
| d- Epidémiologie nationale des carbapénèmases | 20 |
| e- Epidémiologie locale des carbapénèmases | 23 |
| f- Méthodes de détection des carbapénèmases | 25 |
| 1. Tests phénotypiques | 25 |
| 2. Tests génotypiques | 29 |
| 3. Tests basés sur l'hydrolyse d'un carbapénème | 29 |
| a) <i>Rapidec® CARBA NP</i> | 30 |
| b) <i>Spectrométrie de masse MALDI-ToF</i> | 30 |
| 4. Recommandations actuelles pour la détection des carbapénèmases | 32 |
| g- Objectifs de ce travail..... | 34 |
| II- Matériels et méthodes | 35 |
| a- Souches bactériennes..... | 35 |
| 1. Souchier rétrospectif | 35 |
| 2. Souchier prospectif..... | 35 |
| b- Identification bactérienne | 35 |
| c- Sensibilité aux antibiotiques..... | 36 |
| d- Tests complémentaires | 38 |
| 1. Spectrométrie de masse MALDI-ToF - Test d'hydrolyse de l'imipénème | 39 |
| a) <i>Analyse des souches</i> | 39 |
| b) <i>Analyse des spectres</i> | 40 |
| c) <i>Contrôle de la stabilité de la solution d'imipénème</i> | 40 |

| | | |
|-----------------------------|---|-----------|
| 2. | Rapidec [®] CARBA NP | 41 |
| 3. | Xpert [®] Carba-R..... | 42 |
| III- Résultats | | 43 |
| a- | Souchier rétrospectif | 43 |
| 1. | Identification bactérienne et sensibilité aux antibiotiques | 43 |
| 2. | Mise en place du test d'hydrolyse de l'imipénème | 45 |
| a) | <i>Spectre de l'imipénème</i> | 45 |
| b) | <i>Détermination des conditions expérimentales</i> | 45 |
| c) | <i>Analyse des souches</i> | 46 |
| d) | <i>Contrôle de la stabilité de la solution d'imipénème</i> | 48 |
| 3. | Algorithme décisionnel appliqué au souchier rétrospectif | 49 |
| b- | Souchier prospectif..... | 50 |
| 1. | Identification bactérienne et tests phénotypiques..... | 50 |
| 2. | Tests complémentaires | 51 |
| a) | <i>Tests d'hydrolyse de l'imipénème</i> | 51 |
| b) | <i>Test Xpert[®] Carba-R</i> | 52 |
| c- | Comparaison de méthodes | 53 |
| d- | Coûts et délai de rendu des résultats | 55 |
| IV- Discussion | | 57 |
| V- Conclusion..... | | 61 |
| Bibliographie..... | | 62 |
| Annexes | | 71 |

Abréviations

| | |
|-----------|---|
| Arlin | Antenne régionale de lutte contre les infections nosocomiales |
| ARS | Agence Régionale de Santé |
| CClin | Centre de Coordination de la lutte contre les infections nosocomiales |
| BHRe | Bactéries Hautement Résistantes émergentes |
| BLSE | β -Lactamase à Spectre Etendu (ou élargi) |
| BMR | Bactéries Multi Résistantes |
| CASFM | Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie |
| CMI | Concentration Minimale Inhibitrice |
| CNR | Centre National de Référence |
| EDTA | Ethylène Diamine Tétra-Acétique |
| EPC | Entérobactérie Productrice de Carbapénèmase |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| MALDI-ToF | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight |
| MBL | Métallo- β -lactamase |
| MH | Mueller-Hinton |

I- Introduction

a- Généralités sur la résistance aux β -lactamines des bacilles à Gram négatif

1. β -lactamines et β -lactamases

Les entérobactéries constituent une des familles bactériennes les plus importantes en pathologie humaine. Ce sont des bacilles à Gram négatif, pathogènes opportunistes. En effet, elles font partie de la flore digestive, mais peuvent être responsables d'infections sévères chez l'homme.

Escherichia coli est l'entérobactérie la plus isolée en bactériologie clinique. Il s'agit de l'espèce aérobie la plus importante de la flore digestive. *E. coli* est de loin le premier micro-organisme isolé dans les infections urinaires. Il est responsable également d'infections digestives, respiratoires, materno-fœtales, de suppurations profondes et de bactériémies.

Klebsiella pneumoniae fait partie de la flore intestinale; c'est également une bactérie environnementale. C'est l'une des entérobactéries les plus fréquemment isolées en bactériologie clinique, notamment dans les infections urinaires, respiratoires, et les septicémies; surtout en milieu hospitalier.

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, les entérobactéries possèdent une paroi complexe organisée en trois parties, comprenant de l'extérieur vers l'intérieur une membrane externe, une couche de peptidoglycane, et une membrane cytoplasmique. Le peptidoglycane est un polymère complexe rigide qui comporte des chaînes polysidiques constituées d'une alternance de molécules de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, et des chaînes latérales de tétrapeptides attachés aux molécules d'acide N-acétylmuramique établissant entre elles des ponts interpeptidiques. Les enzymes nécessaires à sa synthèse se trouvent sur le versant externe de la membrane cytoplasmique et sont dénommées PLP (protéines liant la pénicilline).

Le traitement des infections causées par les entérobactéries repose principalement sur les β -lactamines, qui sont des antibiotiques bactéricides et temps-dépendants. Ces molécules inhibent les PLP en mimant leur substrat naturel, et entraînent un arrêt de synthèse du peptidoglycane. Leur structure chimique comporte un cycle β -lactame associé à un noyau hétérocyclique dont la nature permet de distinguer quatre groupes: les pénicillines, qui comportent un noyau pénème, les céphalosporines, qui comportent un noyau céphème, les

monobactames, qui ne possèdent aucun noyau, et les carbapénèmes, qui comportent un noyau pénème (figure 1).

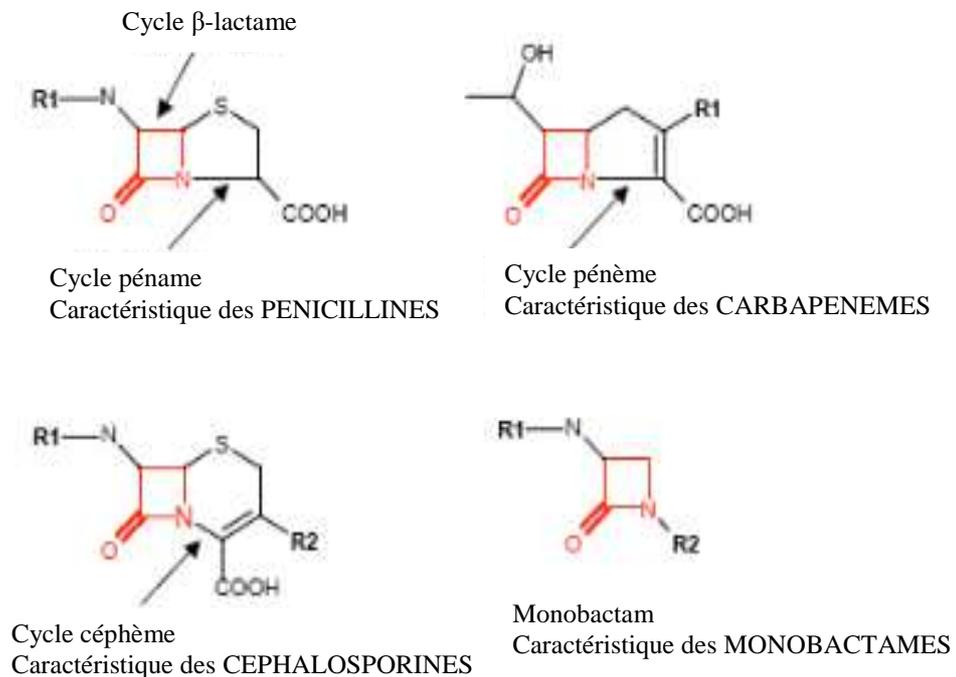


Figure 1: Structure simplifiée des β -lactamines

L'utilisation intensive des β -lactamines a conduit les bactéries à s'adapter progressivement pour leur survie en produisant des enzymes inactivatrices : les β -lactamases (pénicillinases, céphalosporinases, β -lactamases à spectre étendu (BLSE)). Ces enzymes, qui inactivent les antibiotiques en procédant à l'hydrolyse de leur cycle β -lactame, sont très diversifiées d'un point de vue structural et fonctionnel. La classification moléculaire d'Ambler, basée sur les homologies de séquence en acides aminés, rend compte des identités structurales et distingue d'une part les β -lactamases de classes A, C et D dites à sérine active et d'autre part, les β -lactamases de classe B, dites métallo- β -lactamases (MBL), qui requièrent un ion zinc dans leur site actif pour leur activité hydrolytique [1]. La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros, tient compte du spectre d'hydrolyse des β -lactamases et de leur sensibilité aux inhibiteurs [2].

L'émergence des souches d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération par production de BLSE et de céphalosporinase a accentué l'utilisation des seules β -lactamines restant actives sur ces souches: les carbapénèmes. Ces molécules présentent une

excellente activité antibactérienne liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi des bacilles Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises, y compris les céphalosporinases et les BLSE. En France, les cliniciens disposent de trois molécules : l'imipénème, l'ertapénème et le méropénème (figure 2).

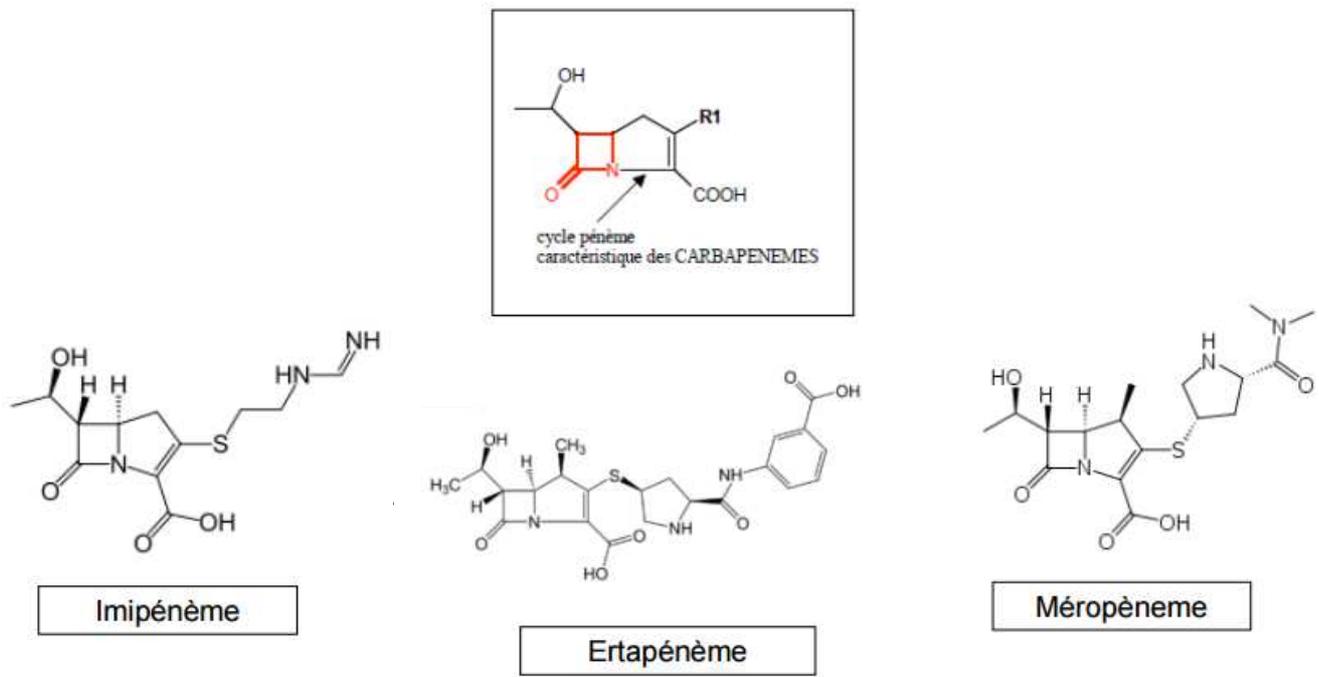


Figure 2: Structures chimiques des trois molécules de carbapénèmes commercialisées en France ; en haut, structure simplifiée de la molécule de carbapénème.

Le recours intensif à ces antibiotiques a conduit une nouvelle fois les bactéries à s'adapter. La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries résulte essentiellement de deux mécanismes impliquant tous deux des β -lactamases [3]. Le premier mécanisme associe la production d'une céphalosporinase chromosomique ou plasmidique ou d'une BLSE à une perte de perméabilité membranaire. Le second mécanisme de résistance implique la production de β -lactamases présentant une forte activité hydrolytique vis-à-vis des carbapénèmes : les carbapénémases.

Malgré la proportion encore faible d'entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC) en France, l'augmentation constante de la production de telles enzymes est très préoccupante en matière de santé publique. En effet, les EPC, bactéries potentiellement responsables d'infections graves, sont résistantes à la plupart des β -lactamines, et notamment aux carbapénèmes, qui sont une classe d'antibiotique largement utilisée dans le traitement des infections bactériennes sévères hospitalières. Les conséquences cliniques de la résistance aux

carbapénèmes sont dramatiques. En effet, seules quelques classes d'antibiotiques comme les polymyxines (colistine) ou éventuellement les glycylycyclines (tigécycline) restent actives sur ce type de souches, du fait des fréquentes résistances associées aux autres classes d'antibiotiques. Les infections qu'elles provoquent mènent donc à des impasses thérapeutiques.

2. Support génétique des β -lactamases

Certaines entérobactéries produisent naturellement une β -lactamase chromosomique, comme *K. pneumoniae* qui exprime une pénicillinase (SHV-1). Cependant les β -lactamases sont également impliquées dans la résistance acquise des entérobactéries. En effet, la pression de sélection induite par les antibiotiques entraîne la sélection et la dissémination de gènes de résistance, et ce d'autant plus facilement qu'ils sont portés par des éléments génétiques mobiles comme les plasmides.

Les plasmides sont des molécules d'ADN bicaténaire, circulaires et cytoplasmiques, de petite taille (5 à 4000 fois plus petit que le chromosome), se répliquant d'une manière autonome et non indispensables au métabolisme normal de la bactérie. Leur transmission horizontale d'une cellule bactérienne à une autre peut s'effectuer par conjugaison (transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de pili sexuels) ou transduction (transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire de bactériophages) [4]. Les gènes portés par les plasmides peuvent coder pour la synthèse de protéines qui confèrent des propriétés biologiques diverses (résistance aux antibiotiques, aux antiseptiques mercuriels, aux métaux lourds, aux bactériophages...) et qui assurent leur répllication autonome.

La virulence des bactéries peut être à médiation plasmidique; les plasmides leur permettent ainsi de s'adapter à un environnement hostile. Ils représentent un élément essentiel d'adaptation bactérienne et sont impliqués dans la dissémination sur un mode épidémique de gènes de résistance aux antibiotiques. Une fois la résistance acquise par une cellule, elle peut être transmise entre des bactéries d'espèces différentes et parfois même de genres différents, il y a donc un risque réel de transmission croisée [5,6].

Chez les entérobactéries, les carbapénémases sont portées par des plasmides dans l'immense majorité des cas, bien que de rares exceptions aient été décrites chez certaines souches de *Serratia fonticola* [7].

Les carbapénémases sont à l'origine d'impasses thérapeutiques en raison de la résistance à la quasi totalité des β -lactamines et des résistances associées aux autres familles d'antibiotiques co-transmises par les plasmides [6]. De plus, elles sont associées à un risque épidémique très important du fait du transfert horizontal de leurs gènes. Les EPC sont donc considérées comme des BHRe (Bactéries Hautement Résistantes émergentes).

Pour ces deux raisons, le Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé a publié, le 06 décembre 2010, une circulaire relative à la mise en œuvre de mesures de contrôle des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) [8]. Dans cette circulaire, il est stipulé « que toute diminution de la sensibilité aux carbapénèmes sur l'antibiogramme doit conduire à une analyse moléculaire de la résistance (Haut Conseil de Santé Publique), soit localement, soit en transférant la souche dans un Centre National de Référence ou dans un laboratoire expert. A cette fin, l'Agence Régionale de Santé informera les établissements de santé concernés de la liste des laboratoires de la région en capacité de réaliser les analyses nécessaires. A la lumière des évolutions récentes, des recommandations plus précises sont en cours d'élaboration par l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) et par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Les laboratoires de microbiologie adapteront les mesures ci-dessus en fonction des nouvelles recommandations de ces organismes ». La recherche active des EPC est donc une obligation réglementaire depuis 2010.

b- Diversité des carbapénèmases

Les carbapénèmases décrites chez les entérobactéries sont très diverses sur le plan structural. Elles appartiennent aux classes A, B et D de la classification de Ambler, basée sur les homologies de séquence des β -lactamases (tableau 1) [1], et aux classes 2df, 2f, 3a et 3b de la classification de Bush-Jacoby et Medeiros (figure 3) [9]. Les plus importantes cliniquement sont actuellement les β -lactamases de type KPC, NDM/IMP/VIM et OXA-48, appartenant respectivement aux classes A, B et D.

Tableau 1 : Caractéristiques structurales des carbapénèmases selon la classification de Ambler [1].

| | Classe A | Classe B | Classe D |
|-------------------------------------|---|---|---|
| Site actif de l'enzyme | Sérine | Zinc | Sérine |
| Enzymes le plus souvent rencontrées | KPC | VIM, IMP, NDM | OXA-48 |
| Espèces les plus touchées | Entérobactéries, <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> | Entérobactéries, <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> | Entérobactéries, <i>A. baumannii</i> |

| Bush-Jacoby group (2009) | Bush-Jacoby-Medeiros group (1995) | Molecular class (subclass) | Distinctive substrate(s) | Inhibited by | | Defining characteristic(s) | Representative enzyme(s) |
|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--|------------------------|------|--|--|
| | | | | CA or TZB ^a | EDTA | | |
| 1 | 1 | C | Cephalosporins | No | No | Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins | <i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 |
| 1e | NP ^b | C | Cephalosporins | No | No | Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxymino- β -lactams | GCI, CMY-37 |
| 2a | 2a | A | Penicillins | Yes | No | Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins | PC1 |
| 2b | 2b | A | Penicillins, early cephalosporins | Yes | No | Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins | TEM-1, TEM-2, SHV-1 |
| 2be | 2be | A | Extended-spectrum cephalosporins, monobactams | Yes | No | Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, ceftipime, aztreonam) | TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1 |
| 2br | 2br | A | Penicillins | No | No | Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam | TEM-30, SHV-10 |
| 2ber | NI | A | Extended-spectrum cephalosporins, monobactams | No | No | Increased hydrolysis of oxymino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam | TEM-50 |
| 2c | 2c | A | Carbenicillin | Yes | No | Increased hydrolysis of carbenicillin | PSE-1, CARB-3 |
| 2ce | NI | A | Carbenicillin, ceftipime | Yes | No | Increased hydrolysis of carbenicillin, ceftipime, and ceftiprome | RTG-4 |
| 2d | 2d | D | Cloxacillin | Variable | No | Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin | OXA-1, OXA-10 |
| 2de | NI | D | Extended-spectrum cephalosporins and oxymino- β -lactams | Variable | No | Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin | OXA-11, OXA-15 |
| 2df | NI | D | Carbapenems | Variable | No | Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin | OXA-23, OXA-48 |
| 2e | 2e | A | Extended-spectrum cephalosporins | Yes | No | Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam | CepA |
| 2f | 2f | A | Carbapenems | Variable | No | Increased hydrolysis of carbapenems, oxymino- β -lactams, cephamycins | KPC-2, IMI-1, SME-1 |
| 3a | 3 | B (B1) | Carbapenems | No | Yes | Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams | IMP-1, VIM-1, CerA, IND-1 |
| | | B (B3) | | | | | LI, CAU-1, GOB-1, FEZ-1 |
| 3b | 3 | B (B2) | Carbapenems | No | Yes | Preferential hydrolysis of carbapenems | CphA, Sfb-1 |

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

Figure 3: Les carbapénèmases au sein de la classification fonctionnelle des β -lactamases proposée par Bush et al [9].

1. Carbapénèmases de classe A

Les carbapénèmases de classe A (sous-groupe 2f de Bush) sont des enzymes plasmidiques [2] ou plus rarement chromosomiques comme SME, IMI et NmcA [2]. KPC, la carbapénémase plasmidique de classe A la plus fréquemment rencontrée, hydrolyse davantage les céphalosporines et les pénicillines que les carbapénèmes et l'aztréonam [6]. La figure 4 représente un antibiogramme typique de carbapénémase de type KPC.



Figure 4: Antibiogramme de *K. pneumoniae* produisant une carbapénèmase de type KPC.

Les enzymes de cette classe A sont inhibées à des degrés variables par l'acide boronique, l'acide clavulanique et le tazobactam [10] mais cependant davantage par ce dernier. L'EDTA n'a aucune action sur elles [9].

2. Carbapénèmases de classe B

Les métallo- β -lactamases (MBL) comme VIM, IMP, et NDM-1 correspondent à la classe B de la classification d'Ambler (groupe 3 de Bush). Les MBL diffèrent des sérines carbapénèmases par la présence d'ions zinc au niveau du site actif qui catalysent la réaction enzymatique. Elles comptent actuellement plus de 80 enzymes découvertes à travers le monde dans de nombreuses espèces, plus de 75 % de ces gènes étant portés par des plasmides [11]. Elles hydrolysent largement les carbapénèmes, les pénicillines et les céphalosporines. Elles épargnent l'aztréonam [9]. NDM-1 présente un spectre d'hydrolyse similaire à celui de VIM-2 et IMP-1 mais avec une cinétique d'hydrolyse des carbapénèmes plus lente [11].

Toutes les MBL sont inhibées par des agents chélateurs du zinc comme l'EDTA mais aussi par l'acide dipicolinique. En revanche, l'acide clavulanique, l'acide boronique ou le tazobactam n'exercent aucune activité inhibitrice sur ces enzymes [9].

La figure 5 représente un antibiogramme typique de métallo- β -lactamase de type NDM.

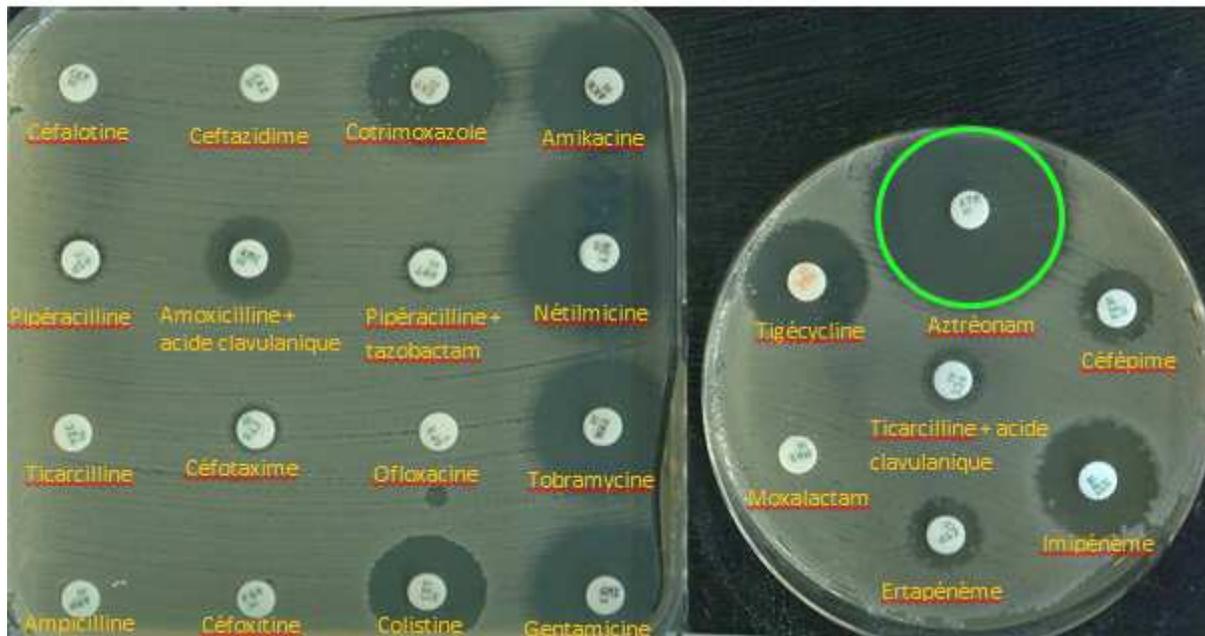


Figure 5: Antibiogramme de *K. pneumoniae* produisant une métallo- β -lactamase de type NDM.

3. Carbapénèmes de classe D

Les carbapénèmes de classe D correspondent aux enzymes de type oxacillines à activité carbapénémase (sous-groupe 2df de Bush) : OXA-48, OXA-163, OXA-181 essentiellement. Leur activité carbapénémase est cependant faible avec une vitesse d'hydrolyse du méropénème inférieure à celle de l'imipénème, mais 40 à 50 fois plus faible que celles retrouvées pour les pénicillines. Elles n'hydrolysent pas ou peu les céphalosporines de 3ème génération, ce qui rend leur détection délicate. En revanche, elles hydrolysent fortement la témocilline (ou 6- α -methoxy-ticarcilline) [12] et sont définies par leur activité hydrolytique vis-à-vis de la cloxacilline ou de l'oxacilline.

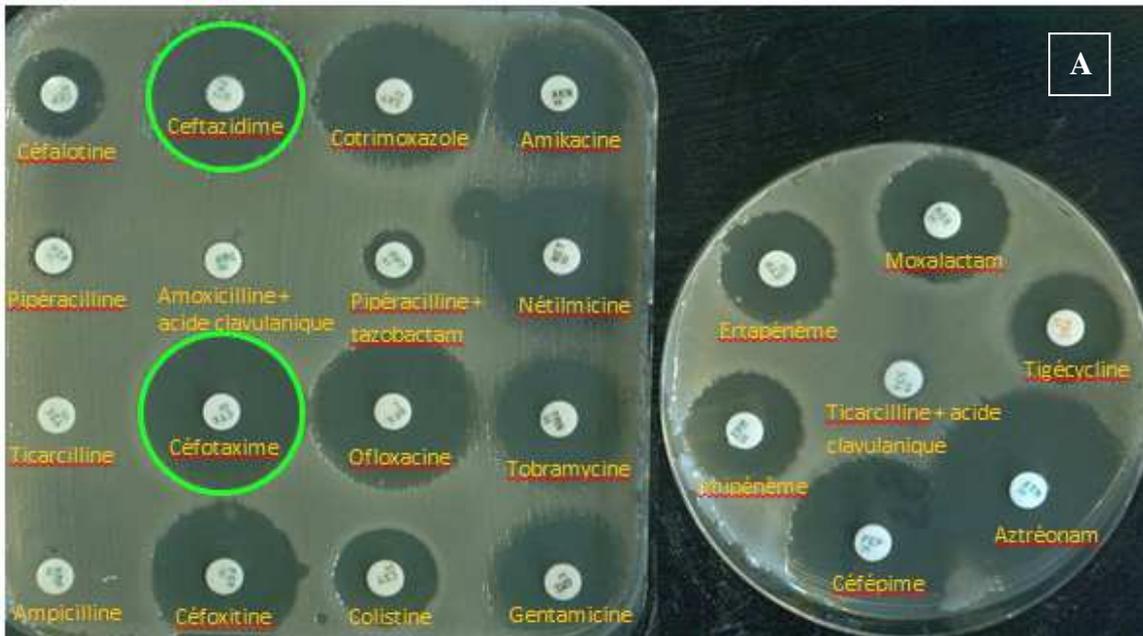


Figure 6:

A : Antibiogramme de *K. pneumoniae* produisant une oxacillinase de type OXA-48.

B : Même souche exprimant une résistance de haut niveau à la témocilline.

Elles sont résistantes aux inhibiteurs suicides de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam) et l'EDTA n'a aucune action [9]. Leur présence est souvent couplée à la présence d'une β -lactamase à spectre étendu (BLSE), ce qui conduit à une multirésistance des souches sécrétrices. Elles sont le plus fréquemment décrites chez *Acinetobacter baumannii* et les entérobactéries [9].

Chez les entérobactéries, la carbapénémase la plus répandue en France et en Europe est OXA-48.

La figure 6 représente un antibiogramme typique d'oxacillinase de type OXA-48.

c- Epidémiologie mondiale des carbapénèmases

Les carbapénèmases constituent une menace de santé publique à l'échelle mondiale du fait de leur dissémination rapide au sein d'une même espèce mais surtout d'une espèce à l'autre [4, 5, 6]. En effet, le support génétique plasmidique de ces enzymes explique le risque de transmission horizontale et la survenue d'épidémie. Les trois carbapénèmases les plus répandues appartiennent aux trois classes (A, B et D) de la classification d'Ambler : KPC, NDM et OXA-48. Les EPC produisant une enzyme de type KPC sont principalement responsables d'infections nosocomiales, alors que les EPC produisant une enzyme de type NDM ou OXA-48 sont responsables à la fois d'infections nosocomiales et communautaires [13].

Les carbapénèmases de classe A de type KPC (pour *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase) ont tout d'abord été décrites sur la côte est des États Unis en 1996 [14] avant d'être identifiées dans la plupart des états du pays, avec notamment une très forte prévalence dans l'état de New York. Ces souches ont également été décrites en Amérique Latine avec des zones endémiques, notamment en Colombie et en Argentine ; ainsi que quelques cas rapportés en Asie du Sud-Est et en Inde [13]. En Europe, les KPC ont été décrites en Grèce, en Israël et en Italie où elles sont à l'heure actuelle endémiques [13, 15]. Plusieurs variants ont été décrits à ce jour (KPC-1 à KPC- 19), le gène blaKPC-2 est actuellement le plus répandu sur la planète [13, 16].

Les MBL, bien que connues comme étant des enzymes chromosomiques de nombreuses bactéries environnementales, ont été identifiées au début des années 1990 comme des enzymes acquises chez les *Pseudomonas* et les *Enterobacteriaceae* [13]. Les enzymes de type VIM (Verona Integron encoded Metallo-bêta-lactamase) et IMP (Imipénémase) qui représentent la majorité des carbapénèmases de classe B ont été rejointes en 2008 par une nouvelle enzyme appelée NDM-1 (New Delhi métallobêta-lactamase 1) isolée chez un patient originaire d'Inde et qui ne cesse de s'étendre depuis [17].

La métallobêta-lactamase de type IMP a été décrite au Japon en 1993 dans une souche de *Serratia marcescens* [18] après sa détection en 1991 dans une souche de *P. aeruginosa* [19]. D'autres variants enzymatiques ont aussi été rapportés dont le plus fréquent est IMP-4 en Chine [11, 20] et en Australie [21] (IMP-3, IMP-6, IMP-8 et IMP-10 [21, 22]).

VIM-1 a été la deuxième MBL identifiée à Vérone en Italie dans une souche de *P. aeruginosa* [23]. Cette enzyme s'est ensuite répandue en Grèce où plusieurs épidémies ont été recensées entre 2001 et 2005 dans des souches d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* [21]. VIM-2, qui a été isolée pour la première fois en France en 1996 dans une souche de *P. aeruginosa* [24], est actuellement la MBL la plus répandue dans le monde [13]. Du fait de sa localisation plasmidique, l'enzyme s'est ensuite rapidement répandue dans le monde entier et est désormais endémique en Europe du Sud (Grèce, l'Italie, l'Espagne), en Asie du Sud-Est (Corée du Sud, Japon) [13]. Certaines épidémies ont également été rapportées en Afrique (Côte d'Ivoire [25], Afrique du Sud [26] et Tunisie [27]) ainsi qu'en Europe (Allemagne [28], Pays-Bas [29] et France [30, 31]).

Découverte en 2008 en Suède chez un patient d'origine indienne ayant auparavant été hospitalisé à New Delhi [17, 32], la métallo- β -lactamase NDM-1 avait été identifiée sur tous les continents en 2010. A l'heure actuelle, les entérobactéries productrices de NDM ont disséminé dans le monde entier; la prévalence du portage est estimée entre 5 et 15% de par le monde [33, 34]. Depuis la première description de NDM-1, huit autres variants ont été découverts (NDM-1 à NDM-8) ; ils sont presque tous originaires d'Asie [35, 36, 37]. NDM-2 a été décrite chez *A. baumannii*, épargné jusqu'alors par NDM-1. Ce variant a été décrit en Egypte et au Moyen Orient [38, 39]. NDM-4 a été détectée chez *E. coli* [40].

En ce qui concerne les carbapénémases de classe D, la plupart des enzymes ont été identifiées chez *Acinetobacter*, cependant, OXA-48 et ses variants ont été décrits chez les entérobactéries [41]. Elle est principalement retrouvée chez *K. pneumoniae* et *E. coli*, même si d'autres espèces d'entérobactéries peuvent produire ce type d'enzyme. La première souche de *K. pneumoniae* productrice d'OXA-48 a été isolée en Turquie en 2003 [42]. Depuis, les bactéries productrices de carbapénémases de classe D, notamment OXA-48, ont très largement émergé dans tous les pays du pourtour méditerranéen et en Afrique [41, 43]. En Europe, des épidémies hospitalières impliquant des entérobactéries productrices d'OXA-48 ont été rapportées en France, en Allemagne, en Suisse en Espagne, au Pays-Bas ainsi qu'au Royaume-Uni [44, 45, 46, 47, 48, 49]. Plus récemment, des souches produisant un nouveau variant, OXA-181, ont été isolées en Inde ou chez des patients d'origine indienne [50, 51]. Cette enzyme a également été isolée dans de nombreux pays (France, Royaume-Uni, Canada, Australie, Afrique du Sud, Norvège... [41, 52, 53]); un lien avec l'Inde a été systématiquement observé. D'autres variants d'OXA-48 ont été décrits, notamment OXA-204

en Algérie et Tunisie [54] et OXA-232 en France (patients transférés de l'île Maurice ou d'Inde) [55].

La figure 7 représente la répartition géographique des quatre carbapénèmases les plus répandues en Europe : KPC, OXA-48, NDM et VIM. Force est de constater que la prévalence de ces enzymes dans les pays limitrophes (Italie, Espagne, Belgique notamment) ainsi que dans les pays européens proches de la France (Grèce, Turquie, Royaume-Uni...) est préoccupante. En effet, selon l'InVs, sur les 2026 cas d'EPC signalés en France au 04 septembre 2015, un lien direct avec un pays étranger a pu être établi pour 978 cas, soit 48% des cas [56].

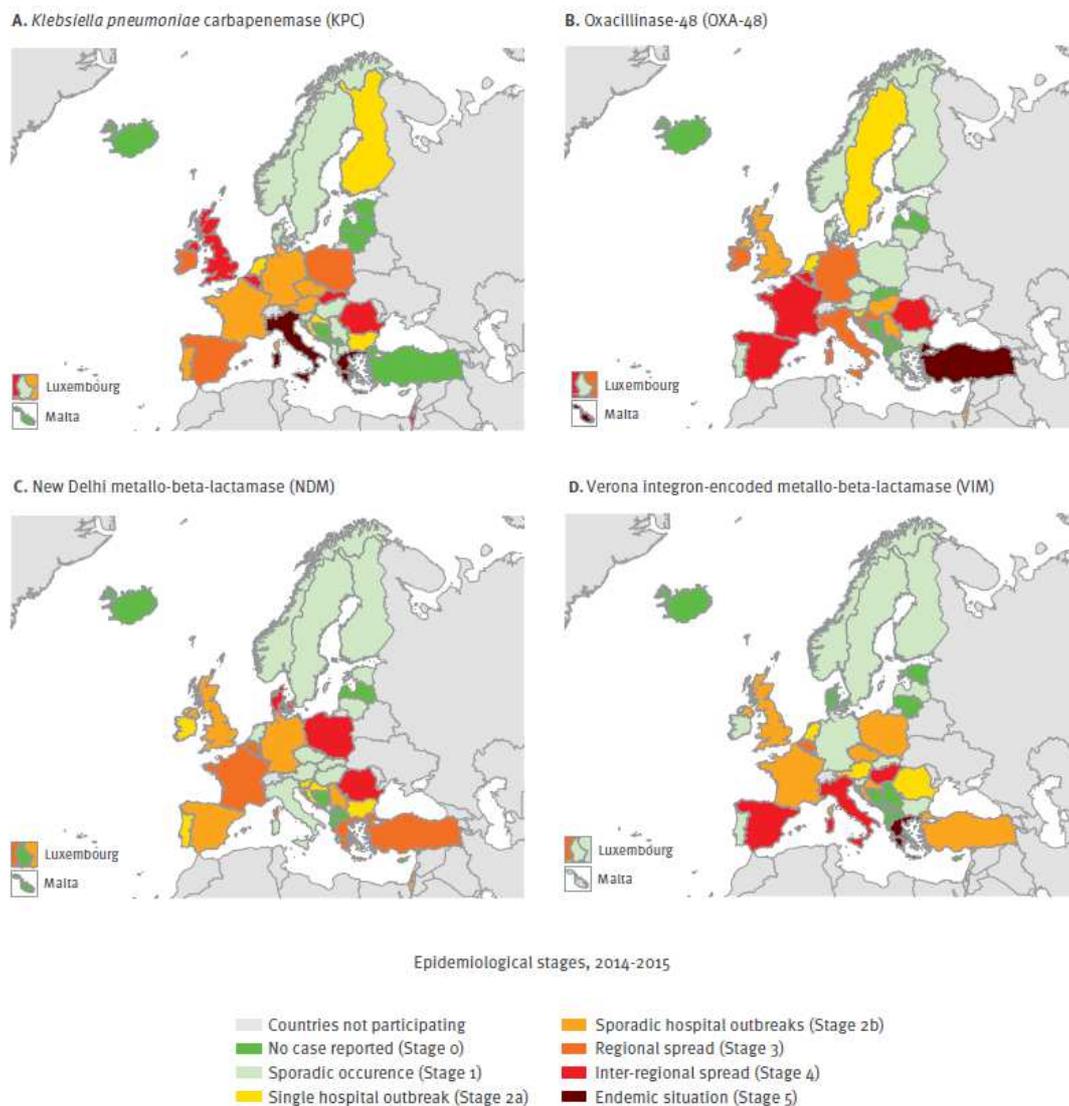


Figure 7 : Répartition géographique des EPC, par type d'enzyme, dans 38 pays européens en mai 2015 [57].

d- Epidémiologie nationale des carbapénèmases

Le premier épisode impliquant une entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC) en France a été signalé en 2004. Depuis, 2026 épisodes de ce type ont été signalés par les établissements de santé et/ou le CNR Résistance aux antibiotiques ou d'autres laboratoires experts (figure 8). Le nombre d'épisodes impliquant des EPC a connu une augmentation très nette entre 2009 et 2013. Une tendance à la stabilisation a été observée entre l'été 2013 et l'été 2014 ; cependant, depuis septembre 2014 et jusqu'à aujourd'hui, le nombre de signalements est reparti à la hausse, et notamment depuis la fin de l'été 2015. En effet, on observe une nette augmentation des signalements entre mars et septembre 2015 (466 épisodes contre 388 entre septembre 2014 et février 2015).

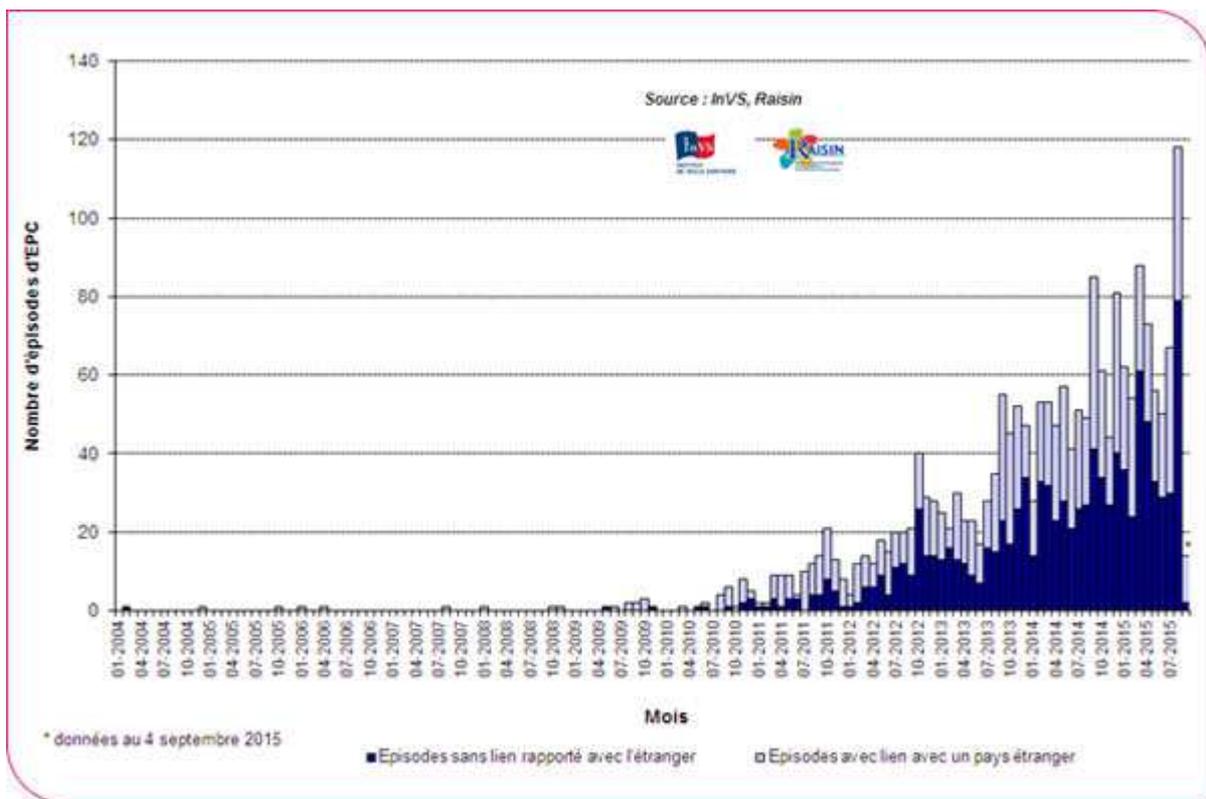


Figure 8: Nombre d'épisodes impliquant des EPC en France signalés à l'InVS entre janvier 2004 et le 04 septembre 2015 (n = 2026) [56].

Dans la majorité des épisodes (84%), seule une bactérie est impliquée. Les entérobactéries les plus fréquemment en cause sont, par ordre de fréquence, *K. pneumoniae*, *E. coli* et *E. cloacae*.

Dans la majorité des épisodes (97%), seul un type de mécanisme est impliqué. Pour 63 épisodes (3% des épisodes), il a été rapporté plus d'un mécanisme (carbapénèmase et BLSE ou céphalosporinase hyperproduite). Les enzymes OXA-48 et OXA-48 like sont les plus fréquents et sont retrouvés dans 78% des épisodes.

La figure 9 présente la répartition des épisodes en fonction de l'année de signalement et du mécanisme de résistance. On observe que la prévalence de l'enzyme OXA-48, détectée pour la première fois en France en 2009, est en constante augmentation depuis, tout comme celle des enzymes de type NDM depuis 2010 ; les prévalences des KPC et VIM semblent en revanche être plutôt stables.

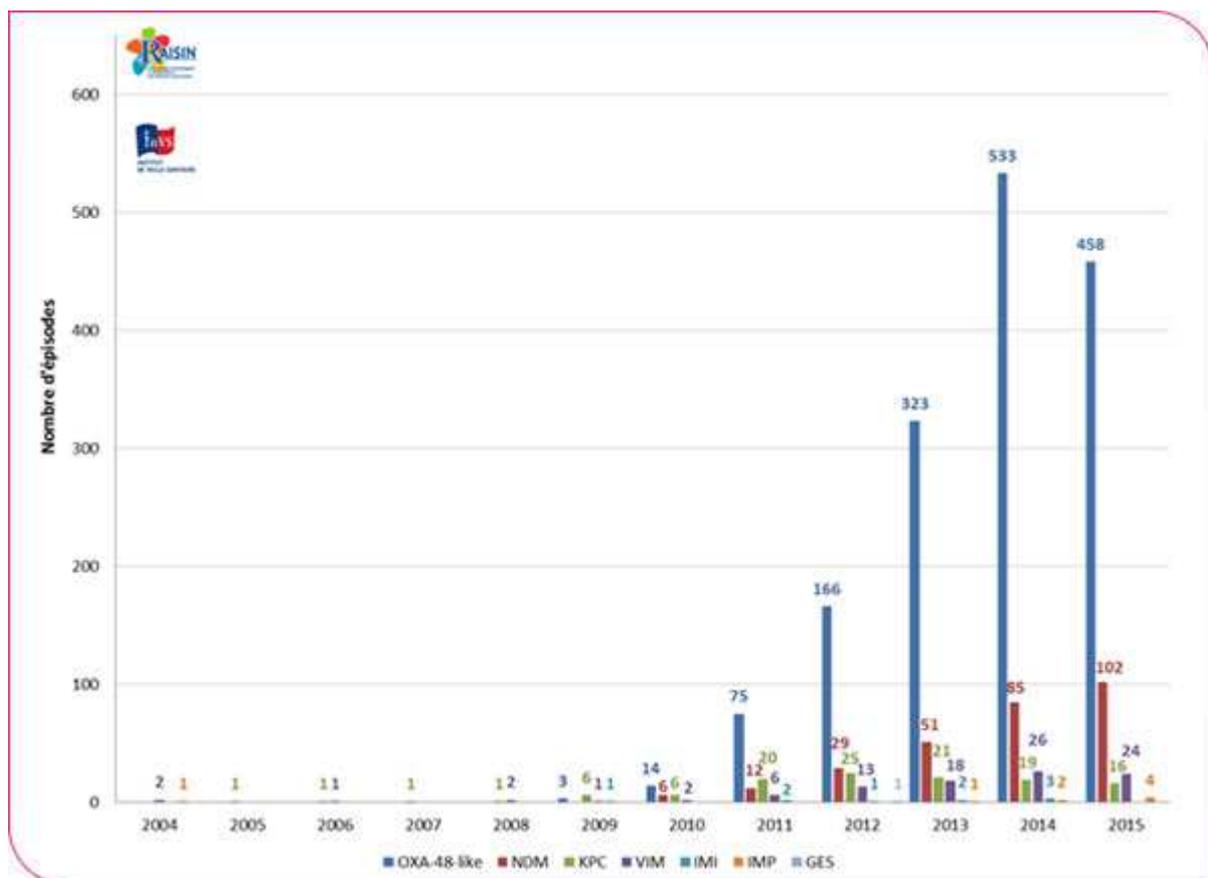


Figure 9: Répartition des épisodes impliquant des EPC en France signalés à l'InVS entre janvier 2004 et le 4 septembre 2015 (n = 2 026) [56].

La répartition des épisodes signalés ces dernières années (2012, 2013, 2014 et jusqu'au 4 septembre 2015) par département est décrite dans la figure 10.

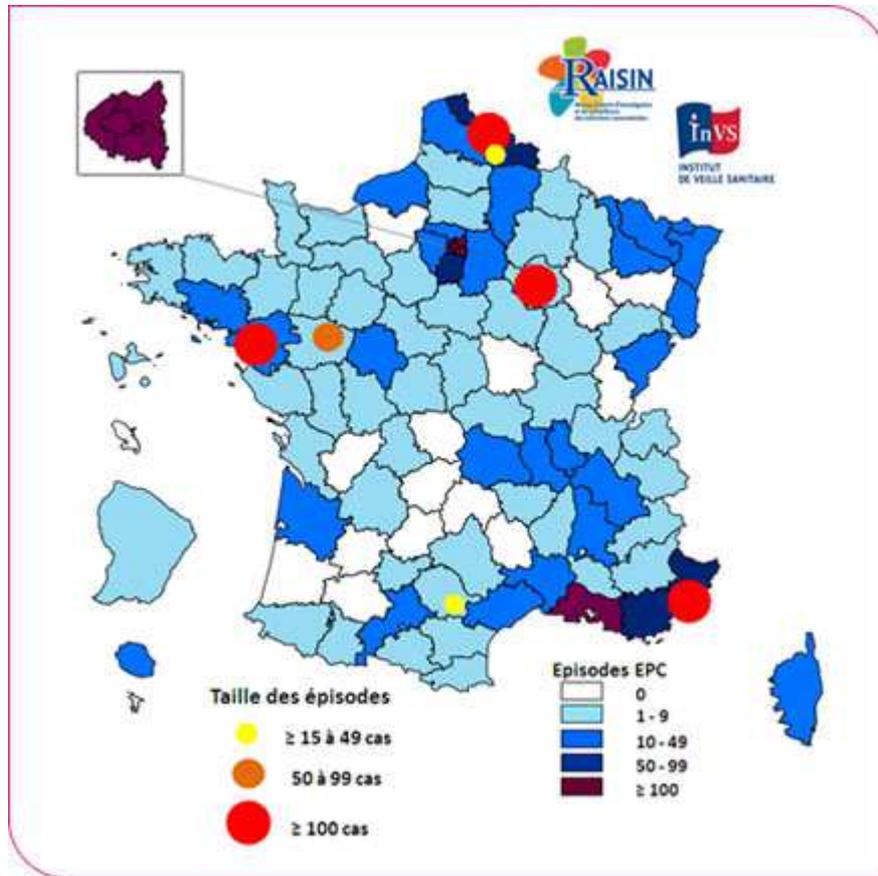


Figure 10 : Nombre d'épisodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases en France signalés à l'InVS entre janvier 2012 et le 4 septembre 2015, par départements (n=1866) et épisodes d'évolution récente les plus importants (n = 7) [56].

Un épisode situé en région Hauts-de-France implique depuis 2012 16 établissements de santé situés dans les départements du Nord (59), du Pas de Calais (62) et de l'Oise (02) en Picardie, avec des transmissions croisées rapportées dans une quinzaine d'établissements. On recense à ce jour un total de 114 cas d'EPC avec un mécanisme de résistance OXA-48, l'espèce concernée étant le plus souvent *K. pneumoniae*. Les investigations réalisées et la comparaison des souches par le CNR ont permis de relier plusieurs épisodes initialement considérés comme distincts. Elles ont aussi permis de mettre en évidence la circulation de la

souche épidémique au niveau interrégional (ex-Nord-Pas-de-Calais et ex-Picardie). Cet épisode est suivi étroitement par l'Arclin, l'ARS Nord-Pas-de-Calais-Picardie ainsi que le CClin Paris-Nord.

Néanmoins, en France, la production d'une carbapénèmase n'est pas le mécanisme de résistance aux carbapénèmes le plus fréquent chez les entérobactéries. D'après Robert J *et al.*, seules 13% des souches non sensibles aux carbapénèmes sont des EPC; les 87% restant ne produisent pas de carbapénèmase, le mécanisme de résistance est alors la production d'une BLSE associée ou non à une céphalosporinase hyperproduite combinée(s) à une imperméabilité membranaire aux β -lactamines [58].

Le défi du microbiologiste est donc de détecter les EPC parmi les entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes afin de répondre aux exigences de la circulaire de 2010 du Ministère de la Santé [8].

e- Epidémiologie locale des carbapénèmases

Parmi les 7510 entérobactéries isolées de prélèvements cliniques au CHU Amiens-Picardie en 2015 ou envoyées par des laboratoires extérieurs, 0.86% (n = 65) présentaient une résistance aux carbapénèmes, et seulement 0.05% (n = 4) produisaient une carbapénèmase. Ces chiffres sont comparables aux données épidémiologiques nationales (entérobactéries résistantes aux carbapénèmes en France 0.6% ; proportion EPC 0.08%) [58].

Le tableau 2 récapitule le nombre total de souches d'entérobactéries isolées au CHU ou provenant d'hôpitaux extérieurs sur l'année 2015 ainsi que le nombre d'entérobactéries non sensibles aux carbapénèmes et le nombre d'EPC.

Le tableau 3 illustre les mêmes données, mais selon les trois entérobactéries le plus souvent impliquées.

Tableau 2 : Sensibilité aux carbapénèmes chez les entérobactéries analysées au laboratoire entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre 2015.

| | CHU Amiens-Picardie (prélèvements cliniques) | Souches envoyées par d'autres laboratoires | Total (n=) |
|--|---|---|-----------------------|
| Entérobactéries (n=) | 7355 | 155 | 7510 |
| Entérobactéries non sensibles aux carbapénèmes | 56 | 9 | 65 |
| EPC | 2 | 2 | 4 |

Tableau 3 : Sensibilité aux carbapénèmes chez *E. cloacae*, *K. pneumoniae* et *E. coli* entre le 1^{er} janvier et le 31 décembre 2015.

| | CHU Amiens-Picardie (prélèvements cliniques) | | | Souches envoyées par d'autres laboratoires | | |
|----------------------|---|--------------------------------------|----------|---|--------------------------------------|----------|
| | n = | Non sensibles aux carbapénèmes | EPC | n = | Non sensibles aux carbapénèmes | EPC |
| <i>E. cloacae</i> | 479 | 32 | 0 | 27 | 4 | 0 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 795 | 10 | 0 | 29 | 3 | 1 |
| <i>E. coli</i> | 4033 | 5 | 2 | 77 | 2 | 1 |
| Total (n =) | 5307 | 47 | 2 | 133 | 9 | 2 |

Il est à noter que la seule carbapénémase isolée chez les entérobactéries au CHU en 2015 était OXA-48. Deux provenaient du CHU Amiens Picardie (deux *E. coli* OXA-48) ; les deux autres (une *K. pneumoniae* OXA-48 et un *E. coli* OXA-48) étaient des souches envoyées de laboratoires extérieurs pour suspicion de carbapénémase.

Les souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes sont donc un problème quotidien à gérer au laboratoire. Le nombre faible d'EPC, tant au niveau national que local, rend leur détection fastidieuse mais il existe une réelle nécessité à les déceler au vu des risques épidémiologique et d'impasse thérapeutique dont elles sont la source.

Le nombre important de souches d'entérobactéries (n = 155) envoyées par des laboratoires extérieurs met l'accent sur l'importance pour le CHU de se positionner comme centre de recours pour la détection des EPC au sein de la région Picardie.

f- Méthodes de détection des carbapénèmases

1. Tests phénotypiques

Les méthodes phénotypiques sont basées sur l'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques.

La réalisation d'un antibiogramme, en milieu liquide ou par diffusion sur milieu gélosé est la méthode de référence pour l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. Il permet de détecter des mécanismes de type pénicillinase, céphalosporinase ou BLSE (bétalactamase à spectre étendu). Cependant, l'accumulation des mécanismes de résistance rend parfois son interprétation difficile.

L'estimation des concentrations minimales inhibitrices (CMI) aux carbapénèmes est un moyen plus précis pour détecter la diminution de sensibilité d'une souche à ces antibiotiques. L'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC [59]. Ainsi toute souche possédant une diminution de sensibilité à l'ertapénème (CMI > 0,5 mg/L ou un diamètre d'inhibition < 28 mm (CASFM-2013 [60]) par test de diffusion en gélose est à considérer comme suspecte d'EPC ; ces seuils ont été définis de manière à détecter le maximum de souches productrices de carbapénémase. Cependant, pour les souches produisant des carbapénèmases hydrolysant faiblement les carbapénèmes comme OXA-48, les carbapénèmes peuvent être catégorisés sensibles.

Des tests phénotypiques mettant à profit les propriétés biochimiques des carbapénèmases vis-à-vis des inhibiteurs ont été développés. Ils permettent de mettre en évidence une restauration *in vitro* de la sensibilité aux carbapénèmes à l'aide des inhibiteurs de β -lactamases. Par exemple, la bandelette MBL E-test® mesure la CMI de l'imipénème avec et sans EDTA. Une diminution significative de la CMI en présence d'EDTA fait suspecter une carbapénémase de classe B (figure 11) [61]. Ces MBL E-test® sont cependant onéreuses, non accessibles à tous les laboratoires et ne permettent pas de mettre en évidence les carbapénèmases de classe D qui sont aujourd'hui la classe la plus répandue en France et en

Europe. De plus, elles posent un réel problème d'interprétation pour les EPC produisant une enzyme qui hydrolyse faiblement les carbapénèmes (CMI basses voire sensibles).

L'acide boronique est utilisé pour la détection des carbapénémases de classe A. Cependant, l'acide boronique inhibe aussi les céphalosporinases (classe C de Ambler) et manque donc de spécificité.

La technique des disques combinés (CD test, Combined Test) [62] ou le test de double synergie (DSST, Double Disc Synergy Test) [63] utilisent un substrat carbapénème sur lequel ou à côté duquel est déposé l'inhibiteur de carbapénémase afin d'observer une augmentation du diamètre autour du disque antibiotique ou une synergie entre les disques. Chaque test peut être appliqué à la recherche des carbapénémases de classes A ou B en fonction de l'inhibiteur utilisé (figure 12).

Malheureusement, aucun inhibiteur ne permet de mettre en évidence les carbapénémases de classe D de type OXA-48. Cependant, la témocilline (6- α -méthoxy-ticarcline) est connue pour être fortement hydrolysée [64] par les carbapénémases de type OXA-48. La résistance de haut niveau à cet antibiotique est un marqueur sensible de ces enzymes mais non spécifique, bien que la témocilline résiste à l'action de la plupart des β -lactamases [65].



Figure 11: Bandelette MBL E-test®, testant les CMI d'une souche donnée pour l'imipénème avec (IPI) et sans (IP) EDTA (inhibiteur des MBL); une diminution de 3 fois la CMI de l'imipénème en présence d'EDTA est considérée comme significative.

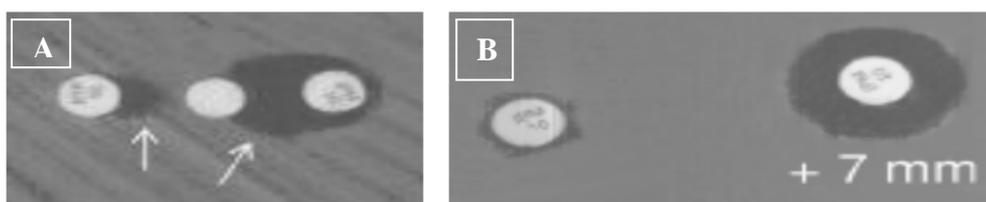


Figure 12: Résultats des tests de confirmation phénotypique en faveur de la détection d'une carbapénémase de classe A [66]:

A : DDST ; les flèches indiquent une synergie entre les disques d'ertapénème (à gauche) et d'imipénème (à droite) et le disque imprégné d'acide boronique (au centre).

B : CD test ; le chiffre indique l'augmentation de diamètre autour du disque d'imipénème après l'ajout d'acide boronique directement sur le disque.

Un autre test phénotypique anciennement recommandé par le CLSI est le Hodge test modifié [67] (figure 13) : il permet, de façon non spécifique, de détecter la production d'une carbapénémase épidémique sans préjuger de la classe d'Ambler. Malgré des avantages certains (peu coûteux, bonne détection des souches productrices de carbapénémases de type OXA-48 et KPC), ce test présente de nombreux inconvénients : faux négatifs avec des souches produisant une NDM ; nombreux faux positifs essentiellement pour *Enterobacter spp.* surexprimant leur céphalosporinase naturelle ; et délai de rendu long (24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme) incompatible avec une identification rapide des carbapénémases. Tous ces inconvénients ont conduit le CNR de la résistance aux antibiotiques à publier, en mars 2015, une note technique intitulée « Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase » dans laquelle il est fortement recommandé d'abandonner le test de Hodge modifié [68].

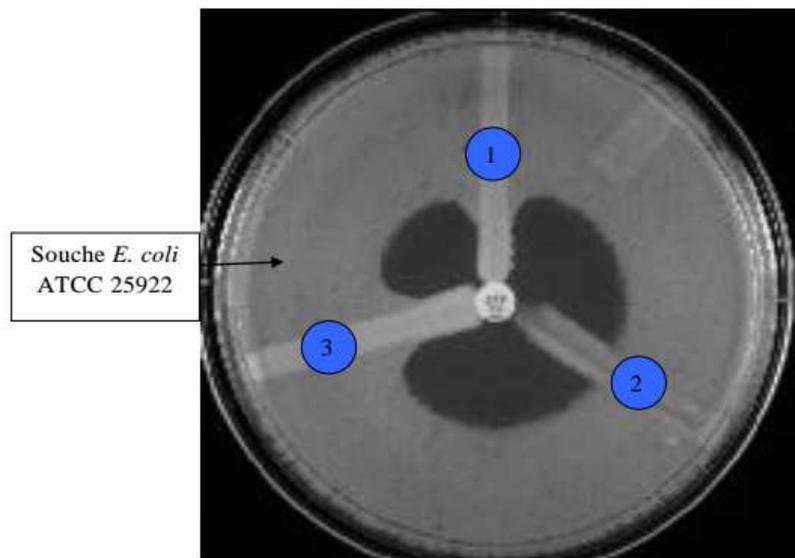


Figure 13: Test de Hodge modifié sur gélose MH ensemencée avec la souche sauvage *E. coli*, un disque d’ertapénème ou de méropénème est déposé au centre de la gélose à partir duquel les stries de chaque souche sont ensemencées. La présence d’une repousse d’*E. coli* au contact de la strie (1 et 3) signe la présence d’une carbapénémase.

1 : souche testée

2 : *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (témoin négatif)

3 : *K. pneumoniae* ATCC BAA 17-05 (témoin positif).

En ce qui concerne la résistance aux carbapénèmes, les tests phénotypiques ne sont pas suffisants pour identifier avec précision le mécanisme produit par la bactérie. Ce manque de sensibilité et de spécificité peut s'expliquer par le fait que les profils de résistance aux carbapénèmes sont multiples, qu'ils peuvent se surajouter. Les méthodes phénotypiques seules ne permettent donc pas de discriminer les mécanismes épidémiques, comme la production d'une carbapénémase, de ceux non épidémiques, comme l'imperméabilité membranaire due à une diminution de l'expression des protéines transmembranaires que sont les porines.

2. Tests génotypiques

Bien que de nombreuses méthodes génotypiques aient été mises au point, ce mode de détection est insuffisant du fait d'une grande diversité d'enzymes décrites. Un résultat négatif de biologie moléculaire ne permet pas d'exclure à 100% la probabilité d'être en présence d'une EPC (enzymes non encore décrites).

Les tests génotypiques sont cependant indispensables en deuxième intention afin d'identifier la carbapénèmase produite, à des fins épidémiologiques.

Le test Cepheid Xpert[®] Carba-R, réalisé sur les systèmes d'instrument GeneXpert[®], est un test qualitatif de diagnostic *in vitro* conçu pour détecter et différencier rapidement les séquences de gène *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOXA-48* et *blaIMP-1*. Il s'agit d'un test de PCR en temps réel incluant l'extraction, l'amplification et la détection des séquences cibles. La préparation de l'échantillon est rapide (environ 5 minutes), la durée de l'analyse est de 47 minutes. La cartouche réactive, qui contient l'ensemble des réactifs de PCR, est close ainsi qu'à usage unique, ce qui réduit au minimum la contamination croisée entre les prélèvements.

Les performances de ce test ont été étudiées à de multiples reprises [69, 70] et semblent satisfaisantes. Une étude internationale multicentrique [71] rapporte une sensibilité comprise entre 93.5% et 100% ainsi qu'une spécificité comprise entre 99.3 et 100% pour les différentes enzymes recherchées (KPC, NDM, VIM, OXA-48 et IMP-1).

3. Tests basés sur l'hydrolyse d'un carbapénème

L'émergence rapide des EPC ces dix dernières années a conduit la communauté scientifique à développer des méthodes de détection plus sensibles et plus spécifiques.

Les méthodes basées sur l'hydrolyse d'un carbapénème font depuis quelques années l'objet de nombreuses publications. L'avantage majeur de ces techniques de détection, contrairement aux méthodes génotypiques, est la mise en évidence de « l'activité carbapénèmase » et non de l'enzyme produite par la bactérie. Ceci nous permet donc de détecter tous les types de carbapénèmase, y compris les nouveaux variants.

Parmi ces techniques hydrolytiques, deux ont largement été décrites et évaluées dans la littérature: le Carba NP test [72] et la spectrométrie de masse de type MALDI-ToF [73, 74]. Ces deux méthodes sont très prometteuses car elles disposent de bonnes sensibilité et

spécificité. Cependant, un manque de sensibilité en ce qui concerne la détection des OXA-48 a été mis en évidence du fait de leur faible activité hydrolytique des carbapénèmes [41].

a) *Rapidec® CARBA NP*

Ce test consiste en une galerie prête à l'emploi permettant la détection rapide des souches productrices de carbapénémase chez les entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* à partir d'une culture bactérienne sur milieu gélosé. Le principe du test est dérivé du Carba NP test décrit par Nordmann, Poirel et Dortet [72, 75]. Le Rapidec® CARBA NP est basé sur la mise en évidence de l'hydrolyse d'un carbapénème par les bactéries productrices de carbapénémase. Cette hydrolyse se traduit par l'acidification du milieu réactionnel entraînant le virage d'un indicateur pH : le rouge de phénol. Les performances de ce test ont été déterminées par le fabricant à partir de 275 souches de collection ou de routine.

D'après le fournisseur, les performances de ce test sont une sensibilité ainsi qu'une spécificité de 97.8%. Certaines études rapportent des performances moindres telles qu'une sensibilité et une spécificité de 85% et 100% respectivement pour Chong *et al.* [76] ; de 88% et 100% respectivement pour Österblad *et al.* [77] ou encore de 72.5% et 100% respectivement pour Tijet *et al.* [78].

b) *Spectrométrie de masse MALDI-ToF*

La technologie de spectrométrie de masse de type MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry) couple une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol.

Le principe analytique est le suivant (figure 14): l'échantillon testé est déposé sur une cible en inox puis recouvert d'une matrice HCCA (acide α - cyano- 4- hydroxycinnamique). Cette matrice va, dans un premier temps, permettre la cristallisation de l'échantillon et, dans un second temps, transférer ses protons sur l'échantillon afin de charger positivement ce dernier sous l'action du rayon laser. L'échantillon chargé va, sous l'influence d'un champ électrique, parcourir le tube à temps de vol et atteindre le détecteur selon un temps proportionnel à sa masse. Le détecteur est relié à un système informatique qui intègre les données et établit un spectre de masse avec en ordonnée l'intensité relative du signal et en abscisse le rapport masse/charge (m/z).

La technologie MALDI-ToF est utilisée pour l'identification des bactéries, de nombreux laboratoires hospitaliers en sont aujourd'hui équipés.

Pour la détection des carbapénémases, il s'agit d'étudier le spectre d'un carbapénème après incubation avec une souche bactérienne. En présence d'une carbapénémase, on assiste à une disparition du pic du carbapénème étudié et l'apparition éventuelle de pics de métabolites.

Cette méthode, bien que souffrant d'un manque de standardisation [79], apparaît comme très performante. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté de très bonnes sensibilité et spécificité de la technique (100% pour Monteferrante *et al.* [80] ; 96.67% et 97.87% respectivement pour Hrabak *et al.* [73] ou encore 99% et 94% respectivement pour Chong *et al.* [76]).

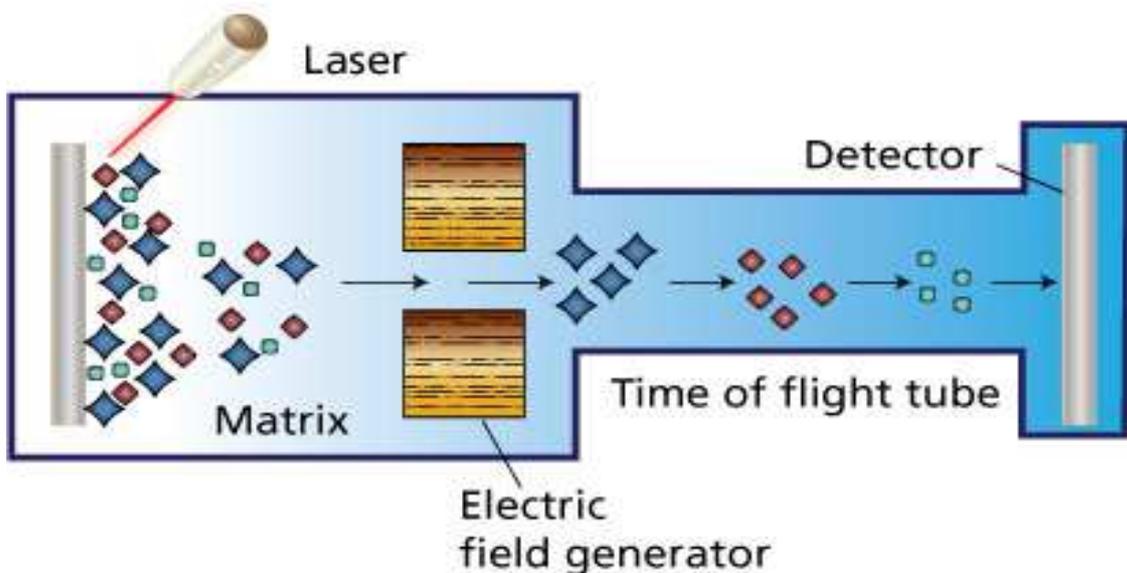


Figure 14: Schéma illustrant le principe analytique d'un spectromètre de masse de type MALDI-ToF.

4. Recommandations actuelles pour la détection des carbapénèmases

Au vu des risques épidémiques et d'impasse thérapeutique engendrés par les EPC, le CNR de la résistance aux antibiotiques [68] et le CASFM/EUCAST 2015 [80] recommandent une recherche systématique des EPC. Néanmoins, leur détection reste difficile, en particulier pour OXA-48 qui est la carbapénémase la plus répandue en France.

Le CNR de la résistance aux antibiotiques ainsi que le CASFM/EUCAST 2015 ont récemment proposé des algorithmes combinant les tests phénotypiques, génotypiques et d'hydrolyse afin de pouvoir détecter efficacement les EPC.

Ces deux algorithmes sont présentés sur les figures 15 et 16.

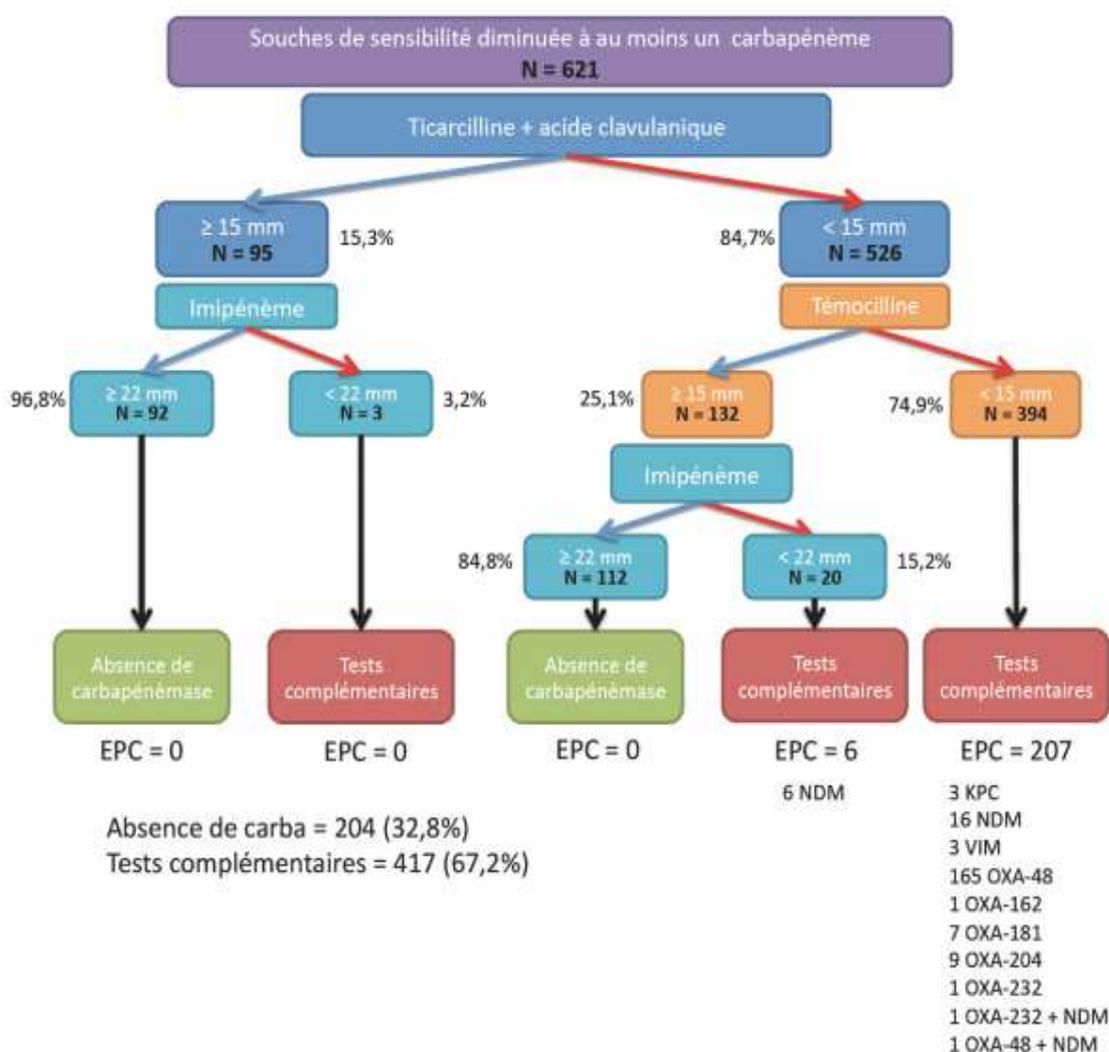


Figure 15: Algorithme décisionnel pour la détection des EPC proposé par le CNR de la résistance aux antibiotiques en avril 2015.

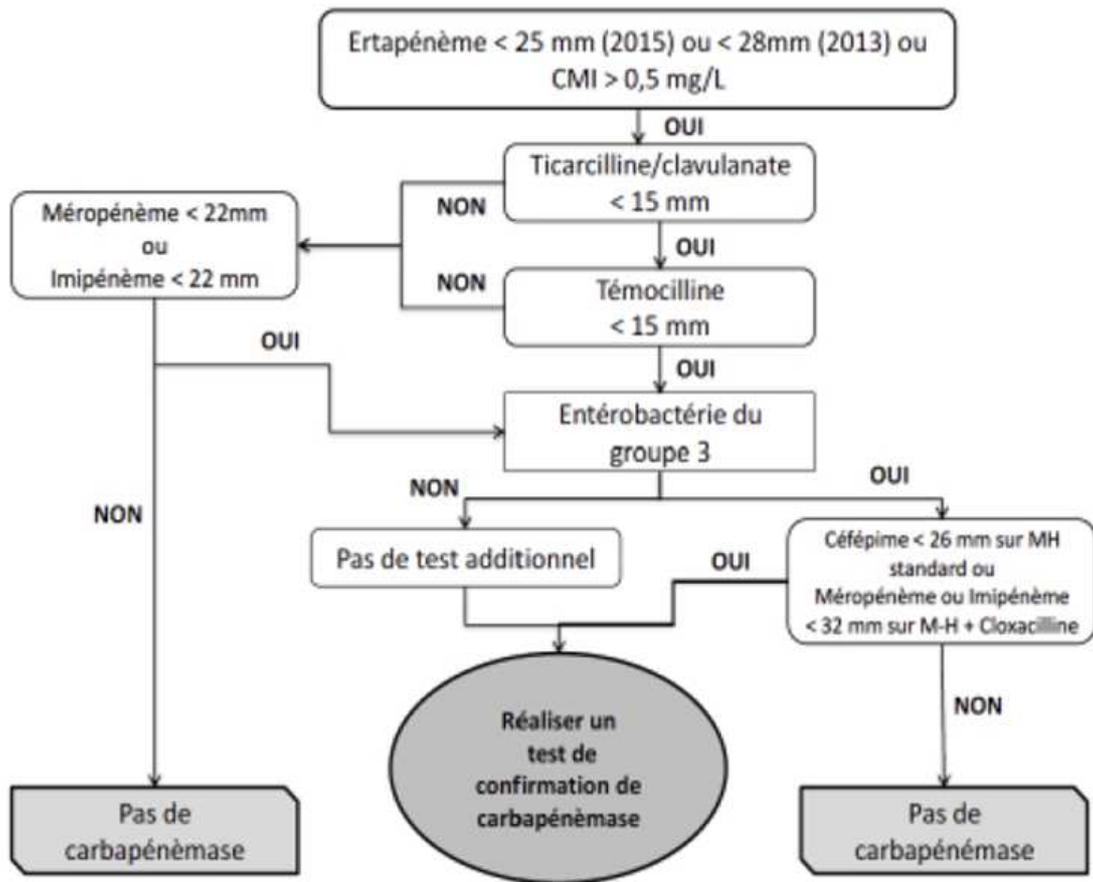


Figure 16: Algorithme décisionnel pour la détection EPC

proposé par le CASFM/EUCAST 2015.

g- Objectifs de ce travail

L'objectif principal de ce travail était de mettre en place un algorithme de détection des EPC en adaptant les recommandations des experts à nos pratiques quotidiennes au sein du laboratoire, et de l'évaluer de façon prospective pendant six mois.

En ce qui concerne les tests complémentaires pour la détection des EPC, de nouvelles techniques basées sur l'hydrolyse des carbapénèmes ont vu le jour ; le second objectif de cette étude a été de mettre en place l'une d'elles : l'hydrolyse de l'imipénème par spectrométrie de masse MALDI-ToF. Nous avons, dans un premier temps, mis au point la méthode à l'aide de souches préalablement caractérisées. Dans un second temps, la technique MALDI-TOF a été comparée aux galeries Rapidec[®] CARBA NP de façon prospective pendant 6 mois, dans le cadre de notre algorithme de détection des EPC.

Le but ultime de ce travail est l'utilisation en routine au laboratoire de bactériologie du CHU Amiens-Picardie, de l'algorithme décisionnel proposé afin de permettre une détection rapide, efficace et à moindre coût des EPC. Il offrirait une meilleure prise en charge des patients vis-à-vis des BHRé (adaptation rapide de l'antibiothérapie, application des mesures d'hygiène recommandées...) et permettrait également au CHU de se positionner comme centre de recours pour la détection des EPC au sein de la région Picardie.

II- Matériels et méthodes

a- Souches bactériennes

1. Souchier rétrospectif

Cinquante-quatre souches d'entérobactéries non sensibles aux carbapénèmes provenant de prélèvements cliniques et de dépistage isolées au laboratoire entre juin 2013 et décembre 2015 ont été incluses dans cette étude.

Onze souches d'entérobactéries productrices de carbapénémase provenant de prélèvements cliniques et de dépistage isolées entre juillet 2012 et janvier 2016 nous ont été envoyées par le CHU de Caen afin d'enrichir le nombre d'EPC étudiées au cours de ce travail.

Toutes ces souches sont conservées à -20°C dans des cryotubes à billes puis cultivées sur gélose au sang (BD Columbia Agar With 5% Horse Blood) et incubées 24 à 48h à $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en aérobiose.

2. Souchier prospectif

Les souches d'entérobactéries provenant de prélèvements cliniques ou envoyées de laboratoires extérieurs pour expertise et présentant un diamètre à l'ertapénème inférieur à 28 mm ou à l'imipénème inférieur à 24 mm ainsi qu'un diamètre à la ticarcilline-acide clavulanique inférieur à 15 mm ont été incluses lors d'un recueil prospectif entre le premier février et le 31 juillet 2016 (six mois).

Les souches nécessitant la réalisation de tests complémentaires ont été conservées en cryotubes comme décrit ci-dessus.

b- Identification bactérienne

L'identification de chaque isolat a été réalisée par le spectromètre de masse Microflex LT[®] Biotyper (Bruker[™] Daltonics, Wissembourg), le logiciel MALDI Biotyper IVD[®] version 2.2 et la base de données de spectres de référence mise à jour en 2015.

c- Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme des souches a été réalisé par la technique de diffusion en milieu gélosé conformément aux recommandations du CASFM 2013 [60] sur des géloses Mueller-Hinton Agar (BioradTM, Marne-la-Coquette, France). Les suspensions bactériennes servant d'inoculum sont standardisées à 0,5 Mc-Farland puis diluées au 1/10^{ème} dans l'eau stérile pour ensuite être appliquées par écouvillonnage en stries à la surface des géloses. Les disques imprégnés d'antibiotiques (BioradTM, Marne-la-Coquette, France) sont déposés à la surface de la gélose à l'aide d'un distributeur. Un disque imprégné de témocilline a été ajouté à la main sur chaque antibiogramme. L'interprétation est réalisée après 18-24h d'incubation à 35 ± 2°C en aérobiose.

La production d'une BLSE ou d'une céphalosporinase hyperproduite a été recherchée sur l'antibiogramme, et si nécessaire sur un antibiogramme supplémentaire sur gélose Mueller-Hinton additionnée de 250mg/L de cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases de classe C) (BioradTM, Marne-la-Coquette, France).

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour l'ertapénème et l'imipénème ont été déterminées en utilisant des bandelettes E-test[®] contenant un gradient de concentration d'antibiotique, conformément aux instructions du fabricant (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Elles ont été interprétées selon les recommandations du CASFM 2013 (annexe 1) [60]. Ces tests nous ont permis de confirmer ou d'infirmer la résistance aux carbapénèmes des bactéries présentant un diamètre diminué à l'ertapénème et/ou à l'imipénème sur l'antibiogramme initial.

Les souches issues des deux souchiers ont été soumises à l'algorithme présenté en figure 17 afin de déterminer la nécessité de réaliser des tests complémentaires à la recherche d'une carbapénémase. L'intérêt du souchier prospectif était de tester l'algorithme avec des souches qui sont le reflet de l'épidémiologie de notre laboratoire.

L'identification de la carbapénémase produite par les différentes souches a été réalisée par le test Xpert[®] Carba-R ou par le Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques.

L'ensemble des résultats de ces tests phénotypiques a été analysé selon l'algorithme décisionnel présenté en figure 17, permettant soit d'exclure une carbapénémase, soit de procéder à des tests complémentaires.

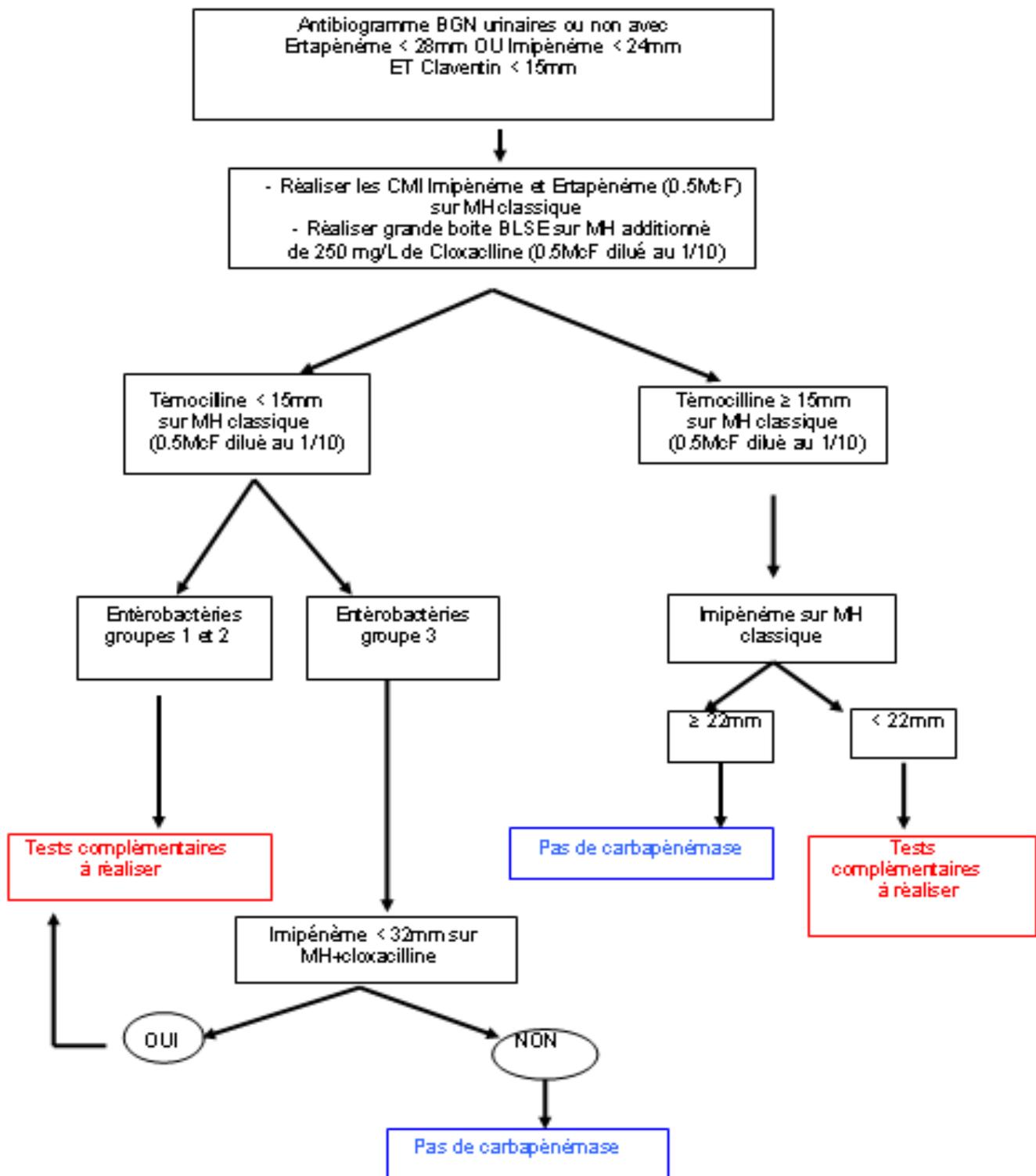


Figure 17: Algorithme décisionnel pour la détection des entérobactéries productrices de carbapénémase (EPC).

d- Tests complémentaires

Toutes les souches nécessitant la réalisation de tests complémentaires à la recherche d'une carbapénèmase ont été soumises à l'algorithme décisionnel présenté en figure 18.

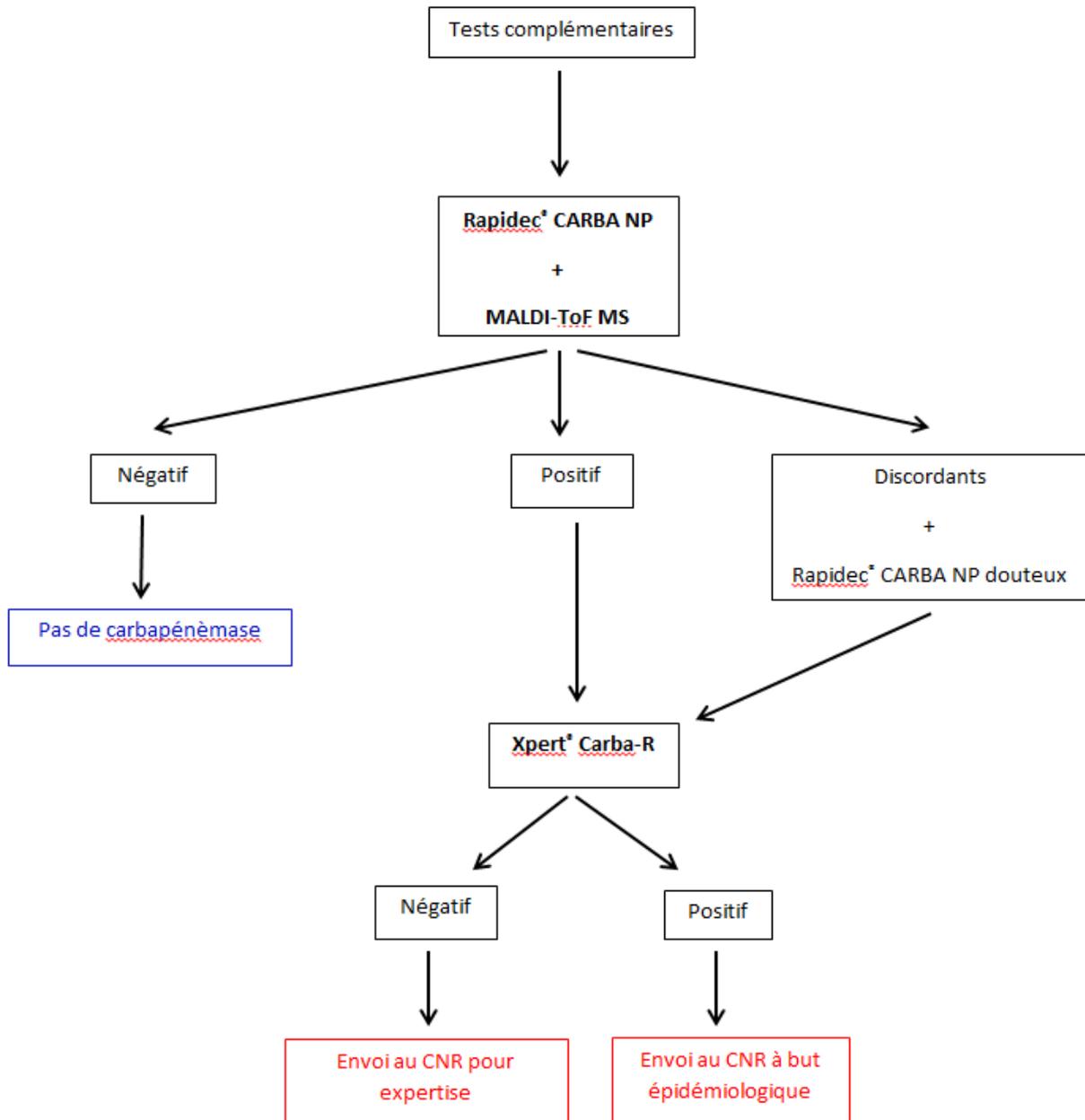


Figure 18: Algorithme décisionnel pour la réalisation des tests complémentaires pour la détection des EPC.

1. Spectrométrie de masse MALDI-ToF - Test d'hydrolyse de l'imipénème

a) *Analyse des souches*

La solution d'imipénème est préparée à partir d'un flacon de 500 mg de poudre d'imipénème-cilastatine (Panpharma, Luitre, France) dans lequel on injecte 10 mL de citrate d'ammonium 10 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) [81]. La solution est ensuite diluée au 1/100^{ème} avec du citrate d'ammonium 10 mM afin d'obtenir une concentration finale en imipénème de 0.5 mg/mL [81]. Des aliquots de 1 mL sont conservés à - 80°C.

Le protocole décrit dans la publication de Lasserre *et al* [74] est celui qui permet un délai de rendu de résultats le plus court (30 minutes). Nous avons donc décidé de nous inspirer de ce protocole afin de nous approprier la technique. Nous avons ensuite adapté ce protocole en faisant varier les conditions expérimentales.

Les souches bactériennes ont été isolées sur gélose au sang (BD Columbia Agar With 5% Horse Blood) et incubées une nuit en aérobiose à 37°C. Un inoculum bactérien a été remis en suspension dans une solution d'imipénème, l'ensemble est incubé à 37°C. Différents inocula et volumes réactionnels ont été testés (une oese de 1 µL de bactéries dans 20 µL, une oese de 10 µL de bactéries dans 0.3 mL, 0.5 mL ou 0.7 mL) ainsi que différentes concentrations de la solution d'imipénème (0.25 mg/mL et 0.5 mg/mL) et différentes durées d'incubation (30 minutes et 1 heure) afin de définir quelles conditions expérimentales permettent d'observer une hydrolyse optimale de l'imipénème.

La suspension a ensuite été centrifugée 2 minutes à 13 000 tours/minutes. Un microlitre de surnageant a été déposé sur une cible en inox MSP Target 96 puits (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Après séchage à température ambiante, les dépôts ont été recouverts avec 1 µL de matrice HCCA (acide α -cyano- 4- hydroxycinnamique ; Bruker Daltonics).

Pour la détermination des conditions expérimentales, 2 EPC et 2 non EPC (A4, A5, A1 et C1 ; voir annexe 2) ont été analysées en triple ; les autres souches ont été analysées en double.

Les spectres de masse ont été acquis à l'aide du spectromètre de masse Microflex et du logiciel flexControl v3.3 (Bruker Daltonics) avec une plage de lecture de 100 à 1200 Da. Les paramètres de l'appareil étaient réglés de la manière suivante : ion source 1, 19 kV ; ion source 2, 17.15 kV ; lens, 6 kV ; pulsed ion extraction, 0 ns ; detector gain, 1X ; electronic gain, enhanced ; mode, low range ; mass range selection, 0 à 1200 Da ; laser frequency, 60

Hz ; digitizer trigger level, 1000 mV ; laser attenuator, 47% et laser range, 20%. Un total de 240 tirs a été effectué par position pour un spectre.

Une calibration interne du spectromètre a été réalisée au début de chaque série sur deux pics de matrice HCCA : 190 et 379 Da.

b) Analyse des spectres

Les spectres ont été analysés à l'aide du logiciel FlexAnalysis v3.3 (Bruker Daltonics) après avoir été lissés et avoir soustrait la ligne de base. Les pics de l'imipénème ($C_{12}H_{17}N_3O_4S$) (300 ± 0.2 Da) et de son métabolite connu ($C_{11}H_{17}N_3O_2S$) (254 ± 0.2 Da) ont été repérés et leurs intensités et aires sous la courbe (AUC) ont été notées. Un ratio d'intensité [métabolite/ (métabolite + imipénème)] a été calculé pour chacune des souches.

Les différents ratios d'intensité calculés nous ont permis de définir une valeur seuil en deçà de laquelle la production de carbapénèmase peut être écartée. L'objectif était de détecter l'ensemble des carbapénèmases ; il était donc nécessaire d'établir un seuil permettant d'obtenir une sensibilité de 100% pour les EPC tout en étant le plus discriminant possible.

Les ratios d'intensité ont été représentés sous forme de box plot grâce au logiciel de statistiques XLSTAT[®] pour Microsoft Excel[®].

c) Contrôle de la stabilité de la solution d'imipénème

Pour chaque expérience, une solution d'imipénème pur 0.5 mg/L a été testée afin de vérifier la qualité de la solution. Ce passage nous permet également de savoir si les spectres obtenus pour les solutions imipénème + bactérie seront exploitables et interprétables.

L'imipénème étant une molécule fragile, qui se dégrade rapidement, la solution d'imipénème a été testée à J1, J2, J3, J7 et J9 de la reconstitution afin d'estimer une durée de conservation et d'exploitation maximale.

2. Rapidec[®] CARBA NP

Les 65 souches du soucier rétrospectif ainsi que les souches du soucier prospectif nécessitant la réalisation de tests complémentaires pour la recherche de carbapénèmase selon l'algorithme décisionnel présenté en figure 17 ont été testées avec les galeries biochimiques Rapidec[®] CARBA NP commercialisées par la société bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France. Le test a été réalisé et interprété conformément aux instructions du fournisseur.

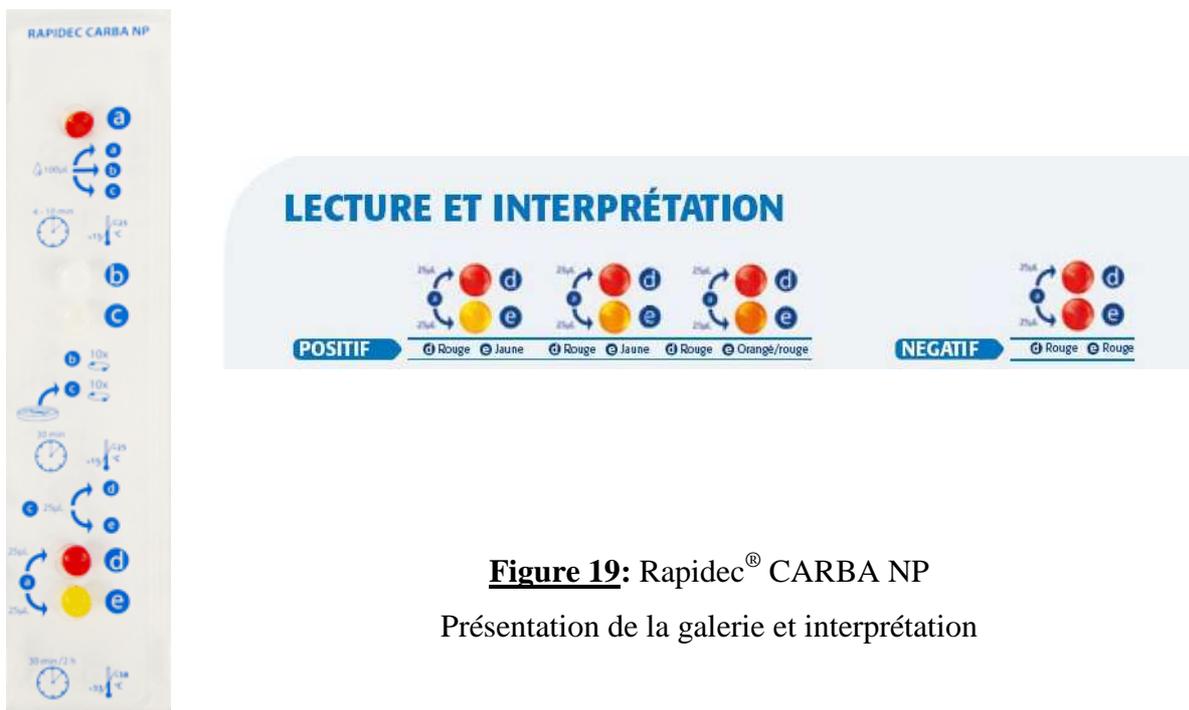


Figure 19: Rapidec[®] CARBA NP
Présentation de la galerie et interprétation

La lecture de la galerie se fait par comparaison des couleurs du puits d (puits contrôle) et du puits e (contenant de l'imipénème lyophilisé). En présence d'une carbapénèmase, l'imipénème est hydrolysé, ce qui entraîne une acidification du milieu conduisant à un virage de l'indicateur coloré du rouge au jaune. Un test est positif lorsqu'une variation significative de couleur entre ces deux puits est observée. Le tableau 4 détaille les règles d'interprétation des galeries Rapidec[®] CARBA NP.

Dans certains cas, en cas de difficulté d'interprétation (virage coloré très léger dans le puits e) un résultat douteux a été rendu.

Tableau 4: Règles d'interprétation des galeries Rapidec® CARBA NP

| Puits témoin d | Puits test e | Interprétation |
|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| rouge | rouge | Négatif |
| orange | orange | |
| rouge | rouge-orangé, orange à jaune | Positif |
| orange | jaune | |
| couleur autre que rouge ou orange | non applicable | Non interprétable |
| orange | rouge | |

3. Xpert® Carba-R

Le test Xpert® Carba-R (Cepheid) est un test de PCR en temps réel permettant l'extraction de l'ADN bactérien puis la détection des gènes *blaKPC*, *blaNDM*, *blaVIM*, *blaOXA-48* et *blaIMP-1*. Le test comporte un contrôle interne dénommé contrôle de traitement de l'échantillon (CTE). Un contrôle interne supplémentaire, le contrôle de vérification de la sonde (CVS) vérifie la réhydratation des réactifs, le remplissage des tubes de PCR dans la cartouche, l'intégrité de la sonde et la stabilité du fluorochrome.

La réalisation du test se fait de la manière suivante : une suspension bactérienne à 0.5 McFarland est réalisée puis diluée au 1/10 ème. 10 µL de cette solution sont ensuite analysés conformément aux recommandations du fabricant. Le résultat est disponible après 50 minutes environ.

III- Résultats

a- Souchier rétrospectif

1. Identification bactérienne et sensibilité aux antibiotiques

Pour chaque souche, l'identification, les mécanismes de résistance, le diamètre d'inhibition de la témocilline ainsi que les CMI de l'ertapénème et de l'imipénème sont colligés dans l'annexe 3. Le tableau 5 résume les principaux mécanismes de résistance exprimés par les 65 souches du souchier rétrospectif.

L'identification par spectrométrie de masse s'est révélée, pour les 65 souches bactériennes, corrélée avec l'identification initiale réalisée lors de l'isolement de la bactérie au sein du prélèvement clinique ou de dépistage (souches de collection).

La réalisation des antibiogrammes a permis la mise en évidence des différents mécanismes de résistance exprimés par les 65 souches du souchier rétrospectif. Ainsi, parmi les 33 non EPC, 15 souches produisaient une céphalosporinase hyperproduite associée à une imperméabilité membranaire ; 16 souches produisaient une BLSE associée à une imperméabilité membranaire et 2 souches exprimaient les trois mécanismes combinés (céphalosporinase hyperproduite + BLSE + imperméabilité). Parmi les 32 souches EPC, 2 souches produisaient une céphalosporinase hyperproduite et 12 produisaient une BLSE ; les 18 souches restantes exprimaient uniquement une (ou 2) carbapénèmase(s).

Le disque de témocilline déposé sur l'antibiogramme nous a en outre permis de confirmer ou d'infirmer la résistance de chaque souche à cette molécule. 46 souches présentaient un diamètre d'inhibition autour de la témocilline inférieur à 15 mm (dont les 32 EPC et 14 non EPC) et étaient donc suspectes de produire une carbapénèmase selon les recommandations du CASFM/EUCAST 2015 [80].

Tableau 5 : Mécanismes de résistance produits par les 65 souches d'entérobactéries composant le soucier rétrospectif.

| | Mécanisme de résistance | Espèces | Nombre de souches (n=) | Nombre de souches (n=) | Nombre de souches (n=) | |
|---|--|-------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---|
| Non EPC | Céphalosporinase hyperproduite +Imperméabilité | <i>K. pneumoniae</i> | 5 | 15 | 33 | |
| | | <i>E. cloacae</i> | 6 | | | |
| | | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 3 | | | |
| | | <i>S. marcescens</i> | 1 | | | |
| | BLSE +Imperméabilité | <i>K. pneumoniae</i> | 4 | 16 | | |
| | | <i>E. cloacae</i> | 12 | | | |
| | Céphalosporinase hyperproduite +BLSE +Imperméabilité | <i>K. pneumoniae</i> | 1 | 2 | | |
| | | <i>E. cloacae</i> | 1 | | | |
| | EPC | BLSE +OXA-48 | <i>K. pneumoniae</i> | 5 | | 9 |
| | | | <i>E. coli</i> | 2 | | |
| <i>E. cloacae</i> | | | 2 | | | |
| BLSE + NDM | | <i>K. pneumoniae</i> | 2 | 2 | | |
| BLSE + VIM | | <i>K. pneumoniae</i> | 1 | 1 | | |
| Céphalosporinase hyperproduite + OXA-48 | | <i>K. pneumoniae</i> | 1 | 2 | 32 | |
| | | <i>E. coli</i> | 1 | | | |
| KPC | | <i>K.pneumoniae</i> | 1 | 1 | | |
| OXA-48 | | <i>K. pneumoniae</i> | 10 | 13 | | |
| | | <i>E. coli</i> | 3 | | | |
| KPC +NDM | <i>K. pneumoniae</i> | 1 | 1 | | | |
| NDM | <i>K. pneumoniae</i> | 1 | 3 | | | |
| | <i>E. coli</i> | 2 | | | | |

2. Mise en place du test d'hydrolyse de l'imipénème

La mise en place de cette méthode a été réalisée grâce aux 65 souches du soucier rétrospectif.

a) *Spectre de l'imipénème*

Pour chaque expérience, la solution d'imipénème pur à 0.5 mg/mL est testée afin de vérifier la présence du pic d'imipénème à 300 Da.

L'analyse du spectre de l'imipénème pur a révélé un seul pic d'intérêt (300 Da), correspondant à la molécule mère. Nous n'observons pas de pic à 254 Da.

Le spectre de masse de l'imipénème seul est représenté sur la figure 20.

b) *Détermination des conditions expérimentales*

Nos premiers tests, avec un volume réactionnel de 20 µL (proche du protocole proposé par Lasserre *et al* [74]) ne nous ont pas permis d'obtenir des données exploitables. En effet, le spectromètre ne parvenait pas à acquérir un spectre de masse correct, probablement parce que la quantité de bactéries présente dans l'échantillon était trop importante et que les protéines bactériennes interféraient avec l'imipénème pour l'acquisition du spectre de masse. Nous avons donc décidé d'augmenter le volume réactionnel afin d'obtenir un surnageant plus important et limiter au maximum la contamination bactérienne. Plusieurs volumes réactionnels ont ainsi été testés : 0.3 mL, 0.5 mL et 0.7 mL. Avec ces différents volumes, les spectres de toutes les souches testées étaient exploitables.

Afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales pour la mise en évidence de l'hydrolyse de l'imipénème, différentes concentrations de la solution d'antibiotique (0.25 mg/mL et 0.5 mg/mL) et différentes durées d'incubation (30 minutes et 1 heure) ont été testées avec 4 souches bactériennes : *E. coli* OXA-48 (A4), *K. pneumoniae* NDM (A5), *E. cloacae* BLSE + imperméabilité (A1) et *K. pneumoniae* céphalosporinase hyperproduite et imperméabilité (C1). Les données récoltées sont colligées dans le tableau de l'annexe 2.

Au vu de ces résultats, nous avons pu conclure que les meilleures conditions expérimentales pour l'hydrolyse de l'imipénème étaient : imipénème concentré à 0.5 mg/mL, 30 minutes d'incubation et volume réactionnel 0.3 mL. En effet, ces paramètres sont ceux qui montraient une franche diminution voire une disparition totale du pic à 300 Da pour les EPC

et une diminution moindre pour les non EPC. De plus, les ratios d'intensité calculés étaient plus discriminants.

c) Analyse des souches

En reprenant les conditions expérimentales déterminées précédemment, nous avons testé en double les 65 souches bactériennes incluses dans le soucier rétrospectif et calculé pour chacune d'elle le ratio d'intensité [métabolite/(métabolite + imipénème)].

Les résultats obtenus sont présentés dans l'annexe 4 et la figure 20.

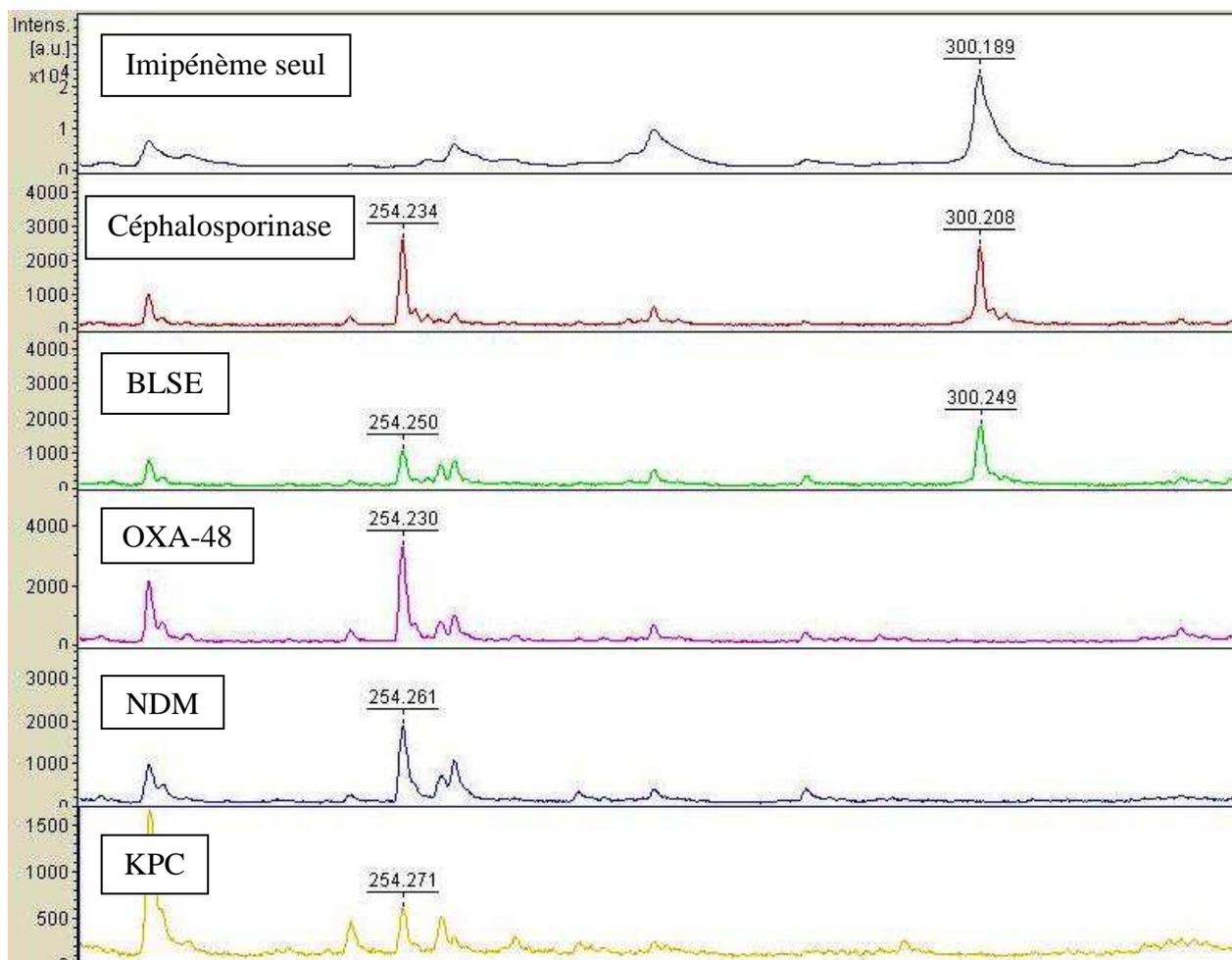


Figure 20: Spectres MALDI-ToF de l'hydrolyse de l'imipénème après 30 minutes d'incubation à 37°C.

Les pics d'intérêt sont repérés sur les spectres : 300 Da et 254 Da.

Les unités sur l'axe des ordonnées représentent l'intensité relative.

La figure 20 représente les spectres de masse de l'imipénème pur et de solutions d'imipénème incubée avec des bactéries exprimant différents mécanismes de résistance. Sur le spectre de l'imipénème pur, nous avons observé un pic correspondant à la molécule mère à 300 Da, aucun pic n'est présent à 254 Da. Quand l'imipénème est incubé avec une entérobactérie non sensible aux carbapénèmes mais non productrice de carbapénèmase, le spectre de masse obtenu met en évidence un pic à 300 Da ; un pic à 254 Da peut néanmoins être observé de façon inconstante. Cependant, dès lors que l'imipénème est incubé avec une entérobactérie productrice de carbapénèmase, quelle que soit la classe de l'enzyme produite, on remarque une disparition du pic à 300 Da et l'apparition d'un pic à 254 Da correspondant au métabolite de la molécule mère, qui a été hydrolysée par l'enzyme.

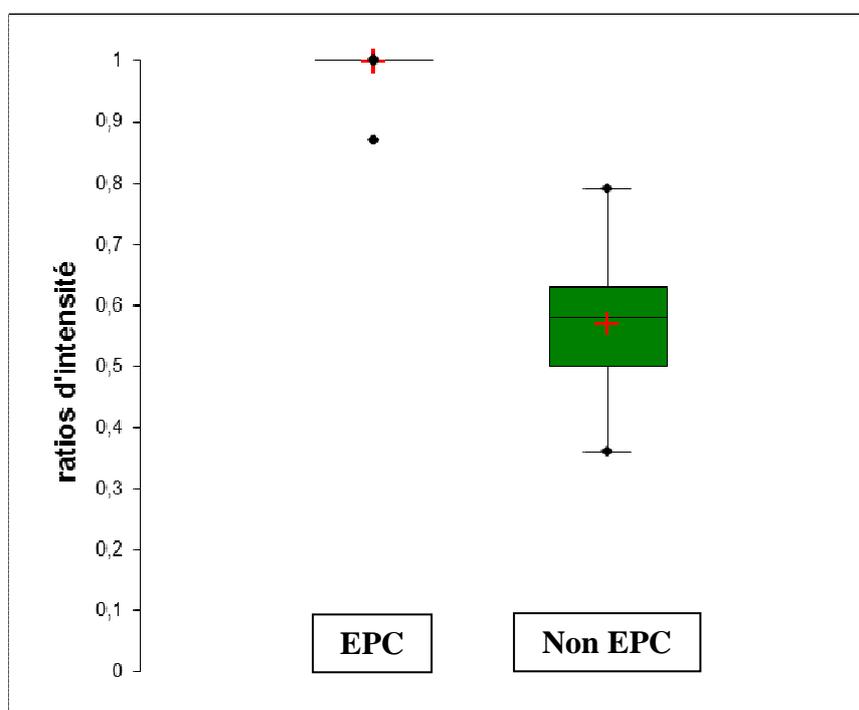


Figure 21: Distribution des ratios d'intensité des deux populations testées : EPC et non EPC

La figure 21 nous a permis de définir un ratio qui permet une discrimination efficace des EPC et des non EPC. En effet, la valeur de ratio la plus faible pour les EPC est de 0.87 et celle la plus forte des non EPC est de 0.79. Il n'y a donc aucun chevauchement entre les deux populations.

Nous avons fixé comme ratio seuil pour la détection des EPC la valeur de 0.83. Cette valeur correspond à la moyenne entre la valeur de ratio la plus faible pour les EPC (0.87) et celle la plus forte des non EPC (0.79).

Un ratio inférieur ou égal à 0.83 correspond à une non EPC ; un ratio strictement supérieur à 0.83 correspond à une EPC.

d) Contrôle de la stabilité de la solution d'imipénème

La solution d'imipénème pur à 0.5 mg/mL est testée à J1, J2, J3, J7 et J9 de la reconstitution afin d'estimer une durée de conservation et d'exploitation maximale. Les intensités du pic à 300 Da mesurées à J1, J2 et J3 sont tout à fait satisfaisantes. Cependant, à J7, on note une diminution significative de l'intensité du pic d'imipénème et à J9, une disparition du pic, la solution n'est donc plus utilisable. Les résultats concernant le contrôle de la stabilité de la solution d'imipénème sont résumés dans le tableau 5.

Aucune donnée n'a pu être acquise à J5.

Tableau 5 : Contrôle de la stabilité de la solution d'imipénème.

| | Intensité pic 300 Da | AUC pic 300 Da | Intensité pic 254 Da | AUC pic 254 Da |
|-----------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| J1 | 22208 | 48276 | 0 | 0 |
| J2 | 13594 | 33185 | 0 | 0 |
| J3 | 14772 | 31623 | 0 | 0 |
| J7 | 3914 | 2577 | 0 | 0 |
| J9 | Pas de pic détecté | Pas de pic détecté | 0 | 0 |

3. Algorithme décisionnel appliqué au soucier rétrospectif

Afin de tester l'algorithme décisionnel proposé dans cette étude, nous l'avons appliqué aux 65 souches du soucier rétrospectif. Ainsi, 19 souches suspectes de produire une carbapénémase ont pu être écartées dès les tests phénotypiques ; 46 tests complémentaires (Rapidec® CARBA NP + MALDI-ToF) ont été réalisés permettant de détecter les 32 souches d'EPC incluses dans le soucier.

Les résultats sont présentés sur la figure 22.

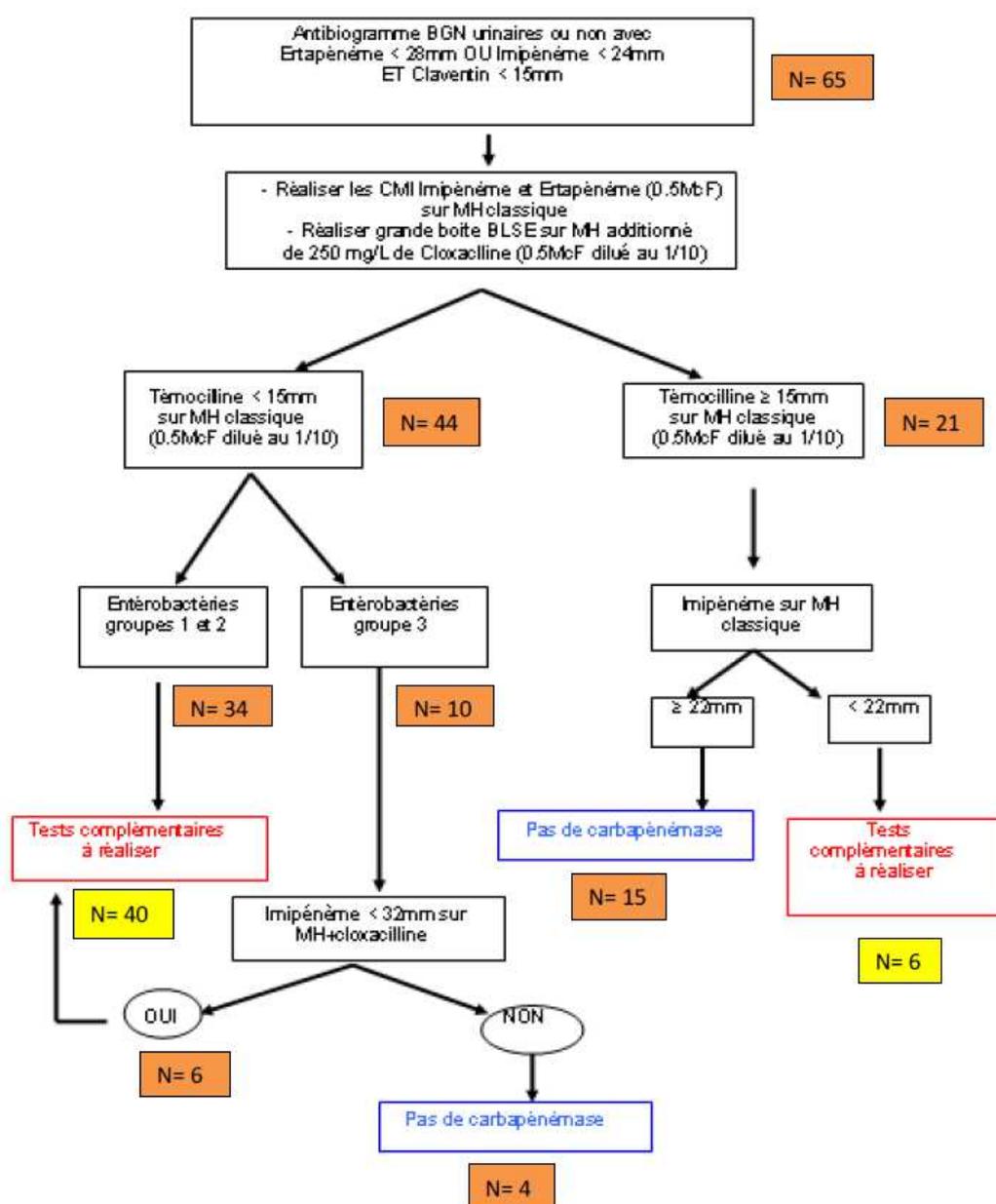


Figure 22: Algorithme décisionnel appliqué aux 65 souches d'entérobactéries composant le soucier rétrospectif.

b- Souchier prospectif

1. Identification bactérienne et tests phénotypiques

Le recueil prospectif réalisé entre le 1^{er} février et le 31 juillet 2016 a permis d'inclure 74 souches supplémentaires dans cette étude.

Pour chaque souche, l'identification, les mécanismes de résistance, le diamètre d'inhibition de la témocilline ainsi que les CMI de l'ertapénème et de l'imipénème sont colligés dans l'annexe 5.

L'identification réalisée par spectrométrie de masse a permis d'identifier, parmi les 74 souches que contient le souchier prospectif, 48 *E. cloacae*, 17 *K. pneumoniae*, 7 *E. aerogenes* et 2 *E. coli*.

L'algorithme décisionnel proposé dans cette étude a été appliqué aux 74 souches du souchier prospectif. Ainsi, 54 souches suspectes de produire une carbapénémase ont pu être écartées dès les tests phénotypiques et 20 souches ont nécessité la réalisation de tests complémentaires (Rapidec[®] CARBA NP + MALDI-ToF).

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 23.

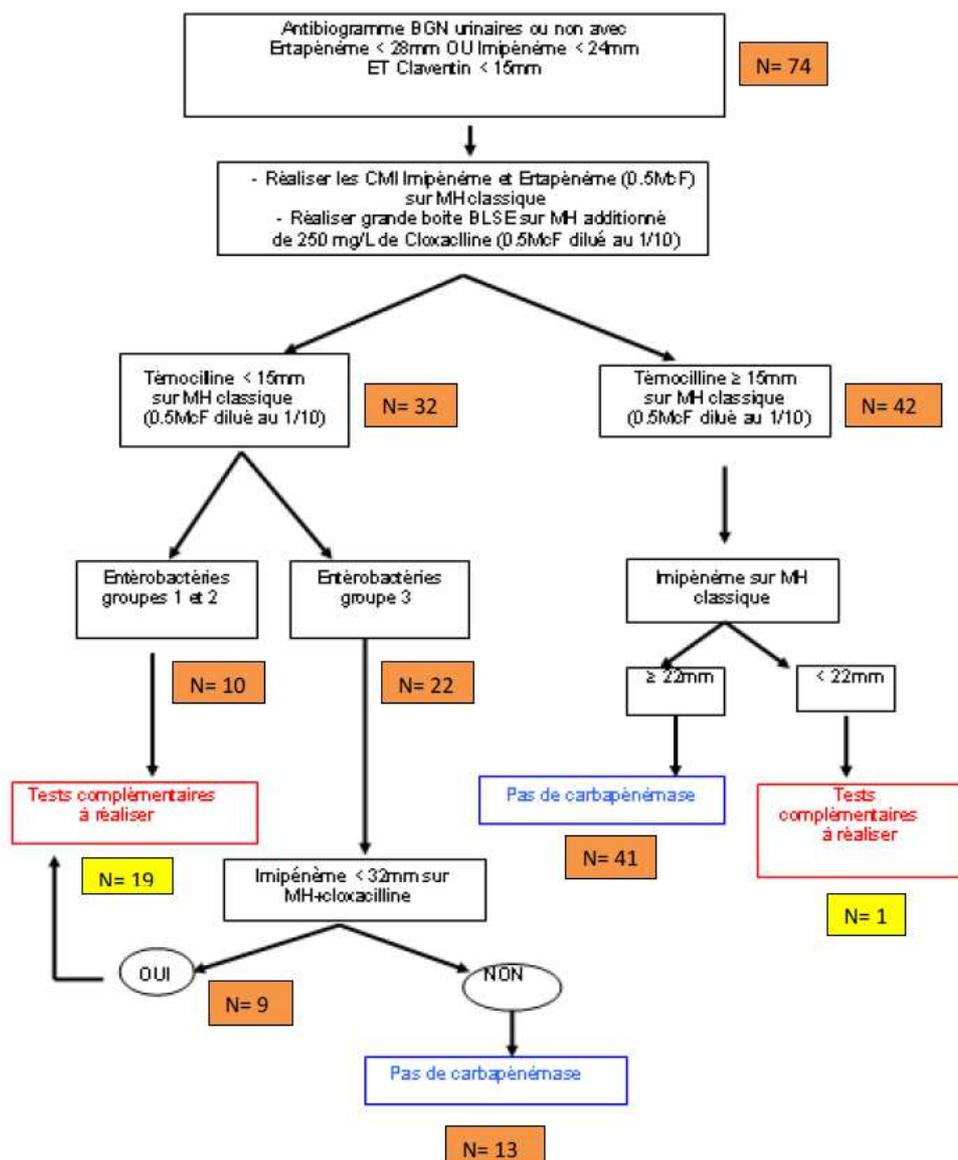


Figure 23: Algorithme décisionnel appliqué aux 74 souches d'entérobactéries composant le souche prospectif.

2. Tests complémentaires

a) Tests d'hydrolyse de l'imipénème

Les deux tests d'hydrolyse (Rapidec[®] CARBA NP + MALDI-ToF) ont été effectués sur les 20 souches du souche prospectif nécessitant la réalisation de tests complémentaires. 13 souches étaient négatives et 4 étaient positives avec les deux techniques ; 3 étaient discordantes (négatives en Rapidec[®] CARBA NP et positives en MALDI-ToF).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

b) Test Xpert[®] Carba-R

Le test Xpert[®] Carba-R a été réalisé sur les 7 souches positives lors des tests d'hydrolyse. Pour les 4 souches positives avec les deux tests d'hydrolyse, il nous a permis de caractériser les carbapénèmases produites par les bactéries : 3 OXA-48 et une NDM. Pour les 3 souches discordantes, le test Xpert[®] Carba-R était négatif. Ces 3 souches ont été envoyées au CNR qui a conclu à l'absence de carbapénèmase.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats des tests d'hydrolyse et du test Xpert[®] Carba-R pour les 20 souches du soucier prospectif.

| Espèce | Souche n° | MALDI-ToF | Rapidec [®] CARBA NP | Xpert [®] Carba-R | Mécanisme de résistance |
|----------------------|-----------|-----------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> | 2C7 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2C8 | Négatif | Négatif | NA* | HCase** + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2D1 | Négatif | Négatif | NA* | HCase** + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2D2 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2D3 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2D4 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2D5 | Négatif | Négatif | NA* | HCase** + imperméabilité |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2D6 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2D8 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2E2 | Négatif | Négatif | NA* | HCase** + imperméabilité |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2E3 | Positif | Positif | NDM | NDM |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2E4 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2E6 | Positif | Positif | OXA-48 | OXA-48 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2E7 | Positif | Positif | OXA-48 | OXA-48 |
| <i>E. cloacae</i> | 2E8 | Négatif | Négatif | NA* | BLSE + imperméabilité |
| <i>E. cloacae</i> | 2A3 | Négatif | Négatif | NA* | HCase** + imperméabilité |
| <i>E. aerogenes</i> | 2G4 | Positif | Négatif | Négatif | HCase** + imperméabilité |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2G5 | Positif | Positif | OXA-48 | OXA-48 |
| <i>E. cloacae</i> | 2G6 | Positif | Négatif | Négatif | HCase** + imperméabilité |
| <i>E. coli</i> | 2G7 | Positif | Négatif | Négatif | Oxacillinase + imperméabilité |

* : Non applicable ** : Céphalosporinase produite à haut niveau

L'algorithme décisionnel proposé dans cette étude a permis la mise en évidence des différents mécanismes de résistance exprimés par ces 74 souches. Ainsi, parmi les 70 non EPC, 44 souches produisaient une céphalosporinase hyperproduite associée à une imperméabilité membranaire, 25 souches produisaient une BLSE associée à une imperméabilité membranaire et une souche produisait une oxacillinase associée à une imperméabilité membranaire. Parmi les 4 souches EPC, 3 souches produisaient une OXA-48 et la quatrième produisait une NDM.

Notre algorithme décisionnel limite donc le recours aux tests d'hydrolyse, à la biologie moléculaire ainsi que les envois de souches au CNR pour expertise. En effet, sur les 74 souches du souchier prospectif, 20 souches ont bénéficié de tests complémentaires, 7 Xpert® Carba-R ont été réalisés et seulement 3 souches ont été envoyées au CNR. Nous pouvons donc dire que cet algorithme est adapté à notre épidémiologie.

c- Comparaison de méthodes

Au cours de ce travail, nous avons comparé la méthode MALDI-ToF développée au laboratoire aux galeries Rapidec® CARBA NP pour la détection de l'activité carbapénémase de 85 souches d'entérobactéries isolées à partir de prélèvements cliniques ou de dépistage (65 souches du souchier rétrospectif, et 20 souches du souchier prospectif).

Les tableaux 7 et 8 récapitulent les résultats colligés dans l'annexe 6.

Tableau 7 : Comparaison de la méthode MALDI-ToF développée au laboratoire aux galeries Rapidec® CARBA NP (n=85)

| | | MALDI-ToF | | |
|------------------------------|-----------------|-----------|----|-------|
| | | + | - | Total |
| Rapidec® CARBA NP | + | 33 | 0 | 33 |
| | Douteux | 3 | 3 | 6 |
| | Ininterprétable | 0 | 1 | 1 |
| | - | 3 | 42 | 45 |
| | Total | 39 | 46 | 85 |

En comparant les deux méthodes, nous avons pu observer que 88% des résultats sont concordants (75/85). Ils sont pour n= 33 des résultats positifs et n= 42 des résultats négatifs et ce, avec les deux méthodes.

De plus, seuls 12% des résultats sont discordants (10/85).

L'analyse des cas discordants (10/85, soit 12%) met en évidence six Rapidec[®] CARBA NP douteux, qui ont tous été contrôlés sur une autre galerie. Trois sont positifs en MALDI-ToF et correspondent à des souches produisant une carbapénèmase de type OXA-48. Trois autres sont négatifs en MALDI-ToF et correspondent à des non EPC (résultat confirmé par le CNR). Un test Rapidec[®] CARBA NP est ininterprétable selon les règles d'interprétation proposées par le fournisseur (les deux puits d et e étant jaunes) ; cette souche est négative en MALDI-ToF, l'absence de carbapénèmase a également été confirmée par le CNR.

Les trois dernières souches discordantes (2G4, 2G6 et 2G7, voir annexe 6) sont positives en MALDI-ToF et négatives en Rapidec[®] CARBA NP ainsi qu'en Xpert[®] Carba-R. Pour la souche d'*E. aerogenes* 2G4, les CMI à l'ertapénème et à l'imipénème étaient de 32 et 12 mg/L respectivement ; l'antibiogramme mettait en évidence une céphalosporinase hyperproduite associée à une imperméabilité membranaire, avec une récupération significative de la sensibilité à l'imipénème avec cloxacilline. Pour la souche d'*E. cloacae* 2G6, les CMI à l'ertapénème et à l'imipénème étaient de 3 et 1 mg/L respectivement ; l'antibiogramme mettait également en évidence une céphalosporinase hyperproduite associée à une imperméabilité membranaire, avec une récupération non significative de la sensibilité à l'imipénème avec cloxacilline. Enfin, pour la souche d'*E. coli* 2G7, les CMI à l'ertapénème et à l'imipénème étaient de 3 et 3 mg/L respectivement ; l'antibiogramme mettait en évidence une oxacillinase associée à une imperméabilité membranaire.

Devant ces discordances, les trois souches ont été envoyées au CNR de la résistance aux antibiotiques pour expertise (conformément à l'algorithme décisionnel pour la réalisation des tests complémentaires, figure 18), qui conclut à l'absence de carbapénèmase.

Tableau 8: Tableau récapitulatif des résultats obtenus par spectrométrie de masse MALDI-ToF et galeries Rapidec[®] CARBA NP sur les 85 souches testées.

| | | EPC (n=36) | Non EPC (n=49) |
|-------------------------------------|---------|-------------------|-----------------------|
| Rapidec[®] CARBA NP | + | 33 | 0 |
| | Douteux | 3 | 4 |
| | - | 0 | 45 |
| MALDI-ToF | + | 36 | 3 |
| | - | 0 | 46 |

Les sensibilités du Rapidec[®] CARBA NP et du MALDI-ToF MS sont respectivement de 92% (33/36) et de 100% (36/36).

En ce qui concerne les souches non EPC, les spécificités du Rapidec[®] CARBA NP et du MALDI-ToF MS sont respectivement de 92% (45/49) et de 94% (46/49).

Le MALDI-ToF semble donc plus discriminant que les galeries Rapidec[®] CARBA NP quant à la détection des EPC, en effet, la plupart des cas discordants étaient liés à des galeries douteuses.

d- Coûts et délai de rendu des résultats

Le délai de réalisation ainsi que le prix de revient (estimé en termes de coût de réactifs) des différentes méthodes utilisées dans cette étude ont également été comparés.

L'antibiogramme et les tests phénotypiques de l'algorithme décisionnel pour la détection des EPC ont été estimés à 14.27 euros par souche testée ; son application permet un rendu de résultat le lendemain de l'obtention de l'antibiogramme.

La détection des EPC par MALDI-ToF par hydrolyse d'un carbapénème est, parmi les différentes méthodes proposées pour le screening des EPC, celle qui permet de rendre un résultat dans les meilleurs délais. La méthode MALDI-ToF développée au laboratoire nécessite un temps d'incubation de trente minutes ainsi qu'une quinzaine de minutes pour la préparation de l'échantillon et l'acquisition des spectres de masse. Son coût est estimé à seulement quelques centimes d'euros par spot MALDI-ToF.

La lecture des galeries Rapidec[®] CARBA NP s'effectue après deux heures d'incubation, mais environ une heure de préparation de l'échantillon est nécessaire avant l'incubation, soit une durée approximative de trois heures pour la réalisation de cette technique. Chaque galerie Rapidec[®] CARBA NP coûte 8.55 euros au laboratoire.

Enfin, en ce qui concerne le test Xpert[®] Carba-R, le résultat peut être rendu en 55 minutes (5 minutes de préparation de l'échantillon et 50 minutes de PCR), mais cette technique est onéreuse : 42 euros par test.

IV- Discussion

Ce travail a permis d'étudier la sensibilité aux carbapénèmes de 139 souches réparties en deux souchiers : rétrospectif (n = 65) et prospectif (n = 74).

Le souchier prospectif reflète notre épidémiologie locale ; sur les 3516 entérobactéries isolées au laboratoire pendant la période de recueil, 74 présentaient une sensibilité diminuée aux carbapénèmes (soit 2.1 %) et 4 étaient des EPC (soit 0.11 %). Ces chiffres sont légèrement supérieurs aux données épidémiologiques nationales (entérobactéries résistantes aux carbapénèmes en France 0.6% ; proportion EPC 0.08%) [58]. De plus, le nombre conséquent de souches de sensibilité diminuée aux carbapénèmes isolées sur une période de six mois montre bien que la détection des EPC est un problème quotidien à gérer au laboratoire.

La faible prévalence des EPC, dans notre région comme dans le reste de la France, affecte directement la valeur prédictive positive ainsi que la valeur prédictive négative des tests de détection disponibles. Il est donc indispensable de disposer d'un algorithme de détection des EPC adapté à notre épidémiologie.

La détection des EPC par spectrométrie de masse MALDI-ToF a été décrite et évaluée dans la littérature en utilisant différents carbapénèmes, notamment l'imipénème [82, 83] et le méropénème [84, 85]. Nous avons choisi l'imipénème plutôt que le méropénème comme molécule de détection ; ce choix est basé sur deux arguments. Premièrement, l'imipénème ne dispose que de deux pics d'intérêt (300 Da pour la molécule mère et 254 Da pour le métabolite) contrairement au méropénème qui en compte quatre (384 et 406 Da pour la molécule mère et 358 et 380 Da pour les métabolites), ce qui facilite l'interprétation du spectre de masse obtenu. Deuxièmement, la matrice HCCA (acide α - cyano- 4-hydroxycinnamique), utilisée pour cristalliser l'échantillon, comporte un pic à 379 Da, très proche de deux des quatre pics du méropénème ; ce qui expose à des erreurs de lecture des spectres [74].

Comme l'imipénème est une molécule réputée pour être instable dans le sérum [86], nous avons donc souhaité vérifier cette instabilité dans notre solution de citrate d'ammonium. Nous avons pu remarquer que la fraîcheur de la solution d'imipénème ainsi que ses conditions de conservation (aliquots non décongelés à -80°C) étaient des points critiques de la méthode. La solution d'imipénème à 0.5 mg/mL doit être refaite toutes les trois jours afin de garantir de

bonnes performances de détection des EPC par MALDI-ToF. Cependant, il serait intéressant d'obtenir des données à J4 et J5 et de déterminer la date limite à partir de laquelle les résultats sont affectés.

Nous nous sommes inspirés du protocole proposé par Lasserre *et al* [74] que nous avons modifié ; en effet, leurs conditions expérimentales ne nous permettaient pas d'obtenir des données exploitables. Nous avons obtenu de meilleurs résultats en utilisant des volumes réactionnels plus importants. Les ratios d'intensités [métabolite/(métabolite + imipénème)], calculés à partir des intensités relatives du pic d'imipénème (300 Da) et de son métabolite (254 Da), nous ont permis de définir une valeur seuil de 0.83. En cas de ratio strictement supérieur à 0.83, une PCR multiplexe (Xpert[®] Carba-R) recherchant les principales carbapénèmases décrites doit être réalisée, et la souche doit être envoyée au CNR pour expertise en cas de négativité de la PCR (recherche d'une enzyme non détectée par la PCR).

Les résultats obtenus lors de la mise en place du test d'hydrolyse de l'imipénème par spectrométrie de masse MALDI-ToF montrent que le protocole que nous décrivons dans cette étude permet de discriminer efficacement les entérobactéries productrices de carbapénèmase, y compris les OXA-48, des non EPC dans notre soucier rétrospectif.

Notre comparaison du Rapidec[®] CARBA NP et de la méthode MALDI-ToF développée au laboratoire montre une bonne concordance des résultats pour 88% des souches testées. L'étude de Chong *et al* [76] a comparé ces deux techniques: le MALDI-ToF présente une meilleure sensibilité (99%) et une spécificité légèrement moindre (94%) que le Rapidec[®] CARBA NP (sensibilité 85%, spécificité 100%). Dans notre étude, les sensibilités et spécificités du Rapidec[®] CARBA NP et du MALDI-ToF MS sont respectivement de 92% et 100% et de 92% et 94% ; nos résultats sont donc comparables à la littérature.

Trois souches productrices d'OXA-48 étaient positives en MALDI-ToF mais douteuses avec le Rapidec[®] CARBA NP. Plusieurs auteurs ont déjà mis en évidence un manque de sensibilité du Rapidec[®] CARBA NP vis-à-vis d'enzymes hydrolysant faiblement les carbapénèmes, notamment OXA-48 et GES-5 [76, 78, 87], lorsque l'inoculum bactérien est trop faible ou lorsque la souche testée est hypermuqueuse [78].

Pour quatre souches non productrices de carbapénèmase, nous avons obtenu trois résultats douteux et un résultat ininterprétable avec le Rapidec[®] CARBA NP. L'interprétation des galeries Rapidec[®] CARBA NP se fait à partir d'une lecture à l'œil nu du virage de l'indicateur coloré, paramètre très subjectif. Le virage de l'indicateur coloré n'est parfois pas assez marqué pour pouvoir être catégorisé grâce à la notice d'utilisation des galeries. Dans ce

genre de situation, nous avons conclu à un résultat douteux en Rapidec[®] CARBA NP. Plusieurs facteurs décrits dans la littérature peuvent influencer le virage de l'indicateur coloré comme, par exemple, un inoculum bactérien trop faible, un âge des cultures bactériennes supérieur à 24 heures, une durée d'incubation de la galerie trop longue (supérieure à 2 heures) ou encore l'utilisation de souches hyper-muqueuses [78].

Les six souches rendues douteuses par le Rapidec[®] CARBA NP ont été correctement assignées par le MALDI-ToF. Cette technique, basée sur la mesure objective d'un ratio d'intensité, nous a posé moins de problèmes d'interprétation que la galerie Rapidec[®] CARBA NP.

Pour trois souches positives en MALDI-ToF, la production d'une carbapénémase a été exclue par le Rapidec[®] CARBA NP et par le CNR de la résistance aux antibiotiques. Pour deux de ces souches, le phénotype évoque une céphalosporinase hyperproduite combinée à une imperméabilité membranaire. En revanche, pour la souche d'*E. coli*, le phénotype évoque la production d'une oxacillinase. A notre connaissance, la résistance aux carbapénèmes par association d'une oxacillinase à spectre étroit et d'une imperméabilité membranaire n'est pas rapportée dans la littérature. Il serait souhaitable de caractériser le mécanisme de résistance de cette souche, qui pour nous n'est pas élucidé.

Au total, le MALDI-ToF nous a permis de détecter toutes les EPC de notre série, et d'exclure la production de carbapénémase avec une excellente valeur prédictive négative. La présence de quelques faux positifs nécessitant l'expertise du CNR n'est pas un élément rédhibitoire pour l'utilisation en routine de cette méthode. De plus, la technique MALDI-ToF développée au laboratoire est moins coûteuse et plus rapide que le Rapidec[®] CARBA NP. Cependant, les techniques MALDI-ToF décrites dans la littérature souffrent d'un manque de standardisation [79] ; il apparaît donc nécessaire de réaliser quelques vérifications supplémentaires avant de pouvoir utiliser notre méthode en routine. Tout d'abord, une étude de répétabilité (une même souche testée plusieurs fois lors d'une même série) ainsi qu'une étude de reproductibilité (une même souche testée lors de différentes séries par un opérateur différent) devront être menées afin de déterminer la concordance des résultats obtenus avec les différentes conditions expérimentales. De plus, nous devons déterminer si le type de milieu de culture ainsi que la durée d'incubation des milieux sont des points critiques de la méthode, comme c'est le cas pour les galeries Rapidec[®] CARBA NP.

Nous avons également mis au point un algorithme décisionnel pour la détection des EPC. Cet algorithme permet d'exclure avec une VPN de 100 % la production d'une carbapénèmase pour 73% des souches testées, dès le résultat des tests phénotypiques. Cet algorithme limite le recours aux tests complémentaires et à la biologie moléculaire, permettant ainsi de réduire les coûts. Etant donné la faible prévalence des EPC dans notre région, cet algorithme semble adapté à notre épidémiologie locale.

Un algorithme similaire, ne prenant pas en compte le diamètre de l'imipénème sur Mueller-Hinton additionné de cloxacilline, a été évalué par le CNR [88] ; il permet l'exclusion de production d'une carbapénèmase dès le résultat de l'antibiogramme pour environ un tiers des souches. Cependant, cette évaluation porte sur des souches envoyées au CNR pour expertise, qui ne reflètent pas l'épidémiologie nationale.

Notre algorithme permet un rendu de résultats en 24 heures à partir de l'obtention de l'antibiogramme, il ne retarde donc pas la mise en place des mesures d'isolement requises en présence d'une EPC.

L'adjonction du MALDI-ToF à cet algorithme nous permettra de gagner en efficacité et de nous positionner, au niveau régional, comme centre de recours pour l'expertise des souches suspectes de produire une carbapénèmase.

V- Conclusion

Les entérobactéries productrices de carbapénémase constituent à l'heure actuelle un véritable enjeu de santé publique : leur dissémination plasmidique expose à un risque épidémique grave ainsi qu'à des impasses thérapeutiques. Malgré une prévalence encore faible en France, leur détection est nécessaire par tout laboratoire de bactériologie.

Notre algorithme de détection des EPC incluant des tests phénotypiques, des tests d'hydrolyse puis un test génotypique est adapté à notre épidémiologie ainsi qu'aux besoins du laboratoire. Il permet d'éliminer une carbapénémase chez la plupart des souches d'entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes avec une excellente valeur prédictive négative, et de limiter le recours aux tests complémentaires, ainsi que le coût en réactifs et en temps technique qui leurs sont associés.

Notre test basé sur l'hydrolyse de l'imipénème par spectrométrie de masse MALDI-ToF a montré de bonnes performances, compatibles avec une mise en place en routine. L'interprétation de ce test pose moins de problèmes que celle du Rapidec[®] CARBA NP, et son coût est moindre.

D'autres perspectives de développement de la spectrométrie de masse MALDI-ToF sont envisageables, comme la détection des mécanismes de résistance enzymatique aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Bibliographie

1. **Ambler, RP.** The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980; 289: 321-31.
2. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33.
3. **Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al.** Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
4. **Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000; 405: 299-304.
5. **Poirel L, Nordmann P.** Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol* 2002; 3: 117-27.
6. **Thomson KS.** Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1019-25.
7. **Henriques I, Moura A, Alves A, et al.** Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2321-4.
8. **Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé,** Circulaire N°DGS/RI/DGOS/PF/2010/413 du 6 décembre 2010 relative à la mise en œuvre de mesure de contrôles des cas importés d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC).
9. **Bush K, Jacoby GA.** Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
10. **Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al.** Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1631-9.
11. **Bush K,** Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13: 558-64.
12. **Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, et al.** Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 95-104.

13. **Nordmann P, Poirel L.** The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821-30.
14. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al.** Novel carbapenem hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-61.
15. **Nordmann P, Cuzon G, Naas T.** The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228-36.
16. **Boutet-Dubois A, Pantel A, Sotto A, et al.** Les entérobactéries productrices de carbapénèmases. Lettre d'information du CCLin Sud-Est 2012 n°2.
17. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al.** Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-54.
18. **Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S et al.** Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*IMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824-9.
19. **Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, et al.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 147-51.
20. **Liu Y, Zhang B, Cao Q, et al.** Two clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* carrying plasmid-borne *bla*IMP-4, *bla*SHV-12, and *armA* isolated at a pediatric center in Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 1642-4.
21. **Queenan AM, Bush K.** Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.
22. **Hu Z, Zhao WH.** Identification of plasmid and integron borne *bla*IMP-1 and *bla*IMP-10 in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* 2009; 58: 217-21.
23. **Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol MA, et al.** Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584-90.
24. **Poirel L, Naas T, Nicolas D et al.** Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891-7.

25. **Jeannot K, Guessens N, Fournier D, et al.** Outbreak of metallo- β -lactamase VIM-2-positive strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the Ivory Coast. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2952-4.
26. **Jacobson RK, Minenza N, Nicol M, et al.** VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1797-8.
27. **Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ghazzi R, et al.** Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol* 2011; 6: 106.
28. **Elias J, Schoen C, Heinze G et al.** Nosocomial outbreak of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with retrograde urography. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1494-1500.
29. **Van der Bij AK, Van Mansfeld R, Peirano G et al.** First outbreak of VIM-2 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37: 513-8.
30. **Corvec S, Poirel L, Espaze E, et al.** Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect* 2008; 68:73-82.
31. **Kassis-Chikhani N, Decre D, Gautier V et al.** First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*VIM-1 and *bla*SHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 142-5.
32. **Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, et al.** The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011; 19: 588-95.
33. **Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA et al.** Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2288-94.
34. **Day KD, Salman M, Kazi B et al.** Prevalence of NDM-1 carbapenemase in patients with diarrhoea in Pakistan and evaluation of two chromogenic culture media. *J Appl Microbiol* 2013; 114: 1810-6.
35. **Dortet L, Poirel L, Nordmann P.** Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 249856.

36. **Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT et al.** Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 529-33.
37. **Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Dahal RK et al.** NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2394-6.
38. **Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA et al.** NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1260-2.
39. **Ghazawi A, Sonnevend A, Bonnin RA, et al.** NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: E34-6.
40. **Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L.** NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2184-6.
41. **Poirel L, Potron A, Nordmann P.** OXA-48 like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1597-606.
42. **Poirel L, Héritier C, Tolün V, et al.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15-22.
43. **Cuzon G, Naas T, Lesenne A, et al.** Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 91-3.
44. **Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E et al.** Emergence of OXA-48- type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2125-8.
45. **Potron A, Kalpoe J, Poirel L, et al.** European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: E24-6.
46. **Dautzenberg MJ, Ossewaarde JM, de Kraker ME et al.** Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing *Enterobacteriaceae* in the Netherlands, 2009 to 2011. *Euro Surveill* 2014; 19: Pii 20723.
47. **Thomas CP, Moore LS, Elamin N et al.** Early (2008–2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42: 531-6.

48. **Dimou V, Dhanji H, Pike R, et al.** Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1660-5.
49. **Potron A, Schrenzel J, Poirel L, et al.** Emergence of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 563-4.
50. **Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D et al.** Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1274-8.
51. **Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, et al.** Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4896-9.
52. **Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C et al.** Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and evidence of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 369-72.
53. **Samuelson O, Naseer U, Karah N et al.** Identification of *Enterobacteriaceae* isolates with OXA-48 and coproduction of OXA-181 and NDM-1 in Norway. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1682-5.
54. **Potron A, Nordmann P, Poirel L.** Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 633-6.
55. **Potron A, Rondinaud E, Poirel L et al.** Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41: 325-9.
56. **Institut de Veille sanitaire- InVS.** Episodes impliquant des entérobactéries productrices de carbapénèmases en France. Situation épidémiologique du 4 septembre 2015. Publié le 15/12/2015. Disponible sur : <http://www.invs.sante.fr/fr../Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Enterobacteries-productrices-de-carbapenemases-EPC/Episodes-impliquant-des-enterobacteries-productrices-de-carbapenemases-en-France.-Situation-epidemiologique-du-4-septembre-2015>.

57. **Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, et al.** Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *Euro Surveill* 2015; 20.
58. **Robert J, Pantel A, Merens A, et al.** Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011-12. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2706-12.
59. **Nordmann P, Poirel L, Carrère A, et al.** How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 718-21.
60. **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).** Recommandations 2013. Disponible sur <http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2013vjuin.pdf>.
61. **Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA, Dutch working party on the detection of highly resistant microorganisms.** Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 205-10.
62. **Yong D, Lee K, Yum JH et al.** Imipenem–EDTA disc method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3798-801.
63. **Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.** Convenient test for screening metallo- β -lactamase producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40-3.
64. **Woodford N, Pike R, Meunier D, et al.** In vitro activity of temocillin 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; 69: 564-7.
65. **Fuchs PC, Barry AL, Jones RN, et al.** Temocillin: in vitro activity against 734 selected clinical isolates, including β -lactamase-producing strains. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1984; 2: 55-63.
66. **Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, et al.** Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1323-32.

67. **Lee K, Chong Y, Shin HB, et al.** Modified Hodge and EDTA-disc synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 88-91.
68. **CNR Résistance aux antibiotiques, Dr. Laurent DORTET, Dr. Gaëlle Cuzon.** Note technique : Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase. Publiée en mars 2015. Disponible sur : http://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/ressources/pages/Note_technique_v4_03_15.pdf
69. **Smith M, Diederer B, Scahrtinga J, et al.** Rapid and accurate detection of carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae* with the Cepheid Xpert Carba-R Assay. J Med Microbiol 2016. doi: 10.1099/jmm.0.000310.
70. **Uwamino Y, Sugita K, Hasegawa N, et al.** Rapid detection and typing of carbapenemase-producing genes from carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in a Japanese hospital using the Xpert™ Carba-R assay. Jpn J Infect Dis 2016.
71. **Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, et al.** Multisite evaluation of Cepheid Xpert Carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. J Clin Microbiol 2016; 54: 1814-9.
72. **Nordmann P, Poirel L, Dortet L.** Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2012; 18: 1503-7.
73. **Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al.** Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2011 ; 49: 3222-7.
74. **Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, et al.** Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. J Clin Microbiol 2015; 53: 2163-71.
75. **Dortet L, Poirel L, Nordmann P.** Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by using a biochemical test. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 6437-40.

76. **Chong PM, McCorrister SJ, Unger MS, et al.** MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 2015; 111: 21-3.
77. **Österblad M, Hakanen AJ, Jalava J.** Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 7553-6.
78. **Tijet N, Boyd D, Patel SN, et al.** Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4578-80.
79. **Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S,** Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 2225-34.
80. **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).** Recommandations 2015. Disponible sur http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf.
81. **Sparbier K, Schubert S, Weller U, et al.** 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* 2012; 50: 927-37.
82. **Sauget M, Cabrolier N, Manzoni M, et al.** Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2014; 105: 88-91.
83. **Kempf M, Bakour S, Flaudrops C et al.** Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012; 7: E31676.
84. **Hrabák J, Chudácková E, Walková R.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 103-14.
85. **Wang L, Han C, Sui W, et al.** MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. *Anal Bioanal Chem* 2013; 405: 5259-66.

86. **Swanson DJ, DeAngelis C, Smith IL, et al.** Degradation kinetics of imipenem in normal saline and in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 29: 936-7.
87. **Dortet L, Poirel L, Nordmann P.** Rapid detection of carbapenemase producing *Pseudomonas spp.* *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3773-6.
88. **Dortet L, Cuzon G, Plésiat P, et al.** Prospective evaluation of an algorithm for the phenotypic screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71 :135-40.

Annexes

Annexe 1 : Seuils pour l'interprétation des CMI des carbapénèmes selon le CASFM 2013.

4.1.2. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative (Tableau VII)

| Antibiotiques | Charge du disque | Concentrations critiques (mg/L) | | Diamètres critiques (mm) | | Remarques |
|-------------------------------|------------------|---------------------------------|--------|--------------------------|------|--|
| | | S | R | S | R | |
| Ampicilline | 10 µg | ≤ 4 | > 8 | ≥ 19 | < 16 | Interprétation valable pour bacampicilline, pivampicilline. Cf. règle (1) Cf. règle (1) |
| Amoxicilline | 25 µg | ≤ 4 | > 8 | ≥ 21 | < 16 | |
| Ampicilline/subactam | 10/10 µg | ≤ 4/8 | > 8/8 | ≥ 19 | < 16 | Cf. règle (3). Interprétation valable pour un traitement intraveineux. Cf. règles (1) et (2). |
| Amoxicilline/ac. clavulanique | 20/10 µg | ≤ 4/2 | > 8/2 | ≥ 21 | < 16 | |
| Ticarcliline | 75 µg | ≤ 8 | 16 | ≥ 24 | < 22 | |
| Ticarcliline/ac. clavulanique | 75/10 µg | ≤ 8/2 | > 16/2 | ≥ 24 | < 22 | Interprétation valable pour un traitement intraveineux. Cf. règles (1) et (2). |
| Pipéracilline | 75 µg | ≤ 8 | > 16 | ≥ 20 | < 16 | |
| Pipéracilline/tazobactam | 75/10 µg | ≤ 8/4 | > 16/4 | ≥ 21 | < 17 | Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines. Voir note en annexe 1 : lettre d'information (p.56) Déterminer la CMI en cas de résistance par diffusion à l'entapénème avec sensibilité à l'imipénème. |
| Méclillinam | 10 µg | ≤ 8 | > 8 | ≥ 18 | < 18 | |
| Imipénème | 10 µg | ≤ 2 | > 8 | ≥ 24 | < 17 | |
| Méropénème | 10 µg | ≤ 2 | > 8 | ≥ 22 | < 15 | |
| Ertapénème | 10 µg | ≤ 0,5 | > 1 | ≥ 28 | < 26 | |
| Doripénème | 10 µg | ≤ 1 | > 4 | ≥ 24 | < 19 | Cf. règle (3). |
| Aztréonam | 30 µg | ≤ 1 | > 8 | ≥ 27 | < 21 | |

Annexe 2 : Détermination des meilleures conditions expérimentales pour la mise en évidence de l'hydrolyse de l'imipénème par MALDI-ToF.

| | | Imipénème 0,5 mg/mL | | | | | | Imipénème 0,25 mg/mL | | | | | | |
|--------|----|---------------------|-------|-------|-------------|-------|-------|----------------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------------|
| | | 30 minutes | | | 1 heure | | | 30 minutes | | | 1 heure | | | |
| | | I 300 | I 254 | RATIO | I 300 | I 254 | RATIO | I 300 | I 254 | RATIO | I 300 | I 254 | RATIO | |
| 0,3 mL | A4 | 1 | 137 | 1821 | 0,93 | 98 | 1520 | 0,94 | 0 | 650 | 1 | 0 | 3223 | 1 |
| | | 2 | 85 | 650 | 0,88 | 0 | 5418 | 1 | 0 | 1033 | 1 | 0 | 749 | 1 |
| | | 3 | 117 | 685 | 0,85 | 0 | 3936 | 1 | 0 | 4166 | 1 | 0 | 4120 | 1 |
| | | 1 | 85 | 837 | 0,91 | 97 | 249 | 0,72 | 0 | 611 | 1 | 0 | 993 | 1 |
| | | 2 | 0 | 3109 | 1 | 295 | 2240 | 0,88 | 0 | 562 | 1 | 0 | 1419 | 1 |
| | | 3 | 89 | 874 | 0,91 | 331 | 139 | 0,29 | 0 | 2102 | 1 | 0 | 862 | 1 |
| | | 1 | 96 | 228 | 0,7 | 836 | 706 | 0,46 | 42 | 45 | 0,52 | 39 | 57 | 0,59 |
| | | 2 | 249 | 690 | 0,73 | 1196 | 1113 | 0,48 | 38 | 94 | 0,71 | PS | PS | NC |
| | | 3 | 354 | 676 | 0,66 | 695 | 600 | 0,46 | PS | PS | NC | 39 | 43 | 0,52 |
| 0,5 mL | C1 | 1 | 1198 | 1748 | 0,59 | 1067 | 1152 | 0,52 | 245 | 697 | 0,74 | 1385 | 2523 | 0,65 |
| | | 2 | 543 | 934 | 0,63 | 234 | 312 | 0,57 | 157 | 602 | 0,79 | 69 | 224 | 0,76 |
| | | 3 | 847 | 1554 | 0,65 | 213 | 353 | 0,62 | 495 | 1537 | 0,76 | 542 | 1837 | 0,77 |
| | | 1 | 714 | 1355 | 0,65 | 937 | 5575 | 0,86 | 4803 | 3228 | 0,4 | 0 | 1180 | 1 |
| | | 2 | 362 | 1327 | 0,78 | 270 | 834 | 0,75 | 0 | 5190 | 1 | 0 | 3241 | 1 |
| | | 3 | 308 | 1454 | 0,83 | 299 | 729 | 0,71 | 0 | 4128 | 1 | 0 | 3112 | 1 |
| | | 1 | 1056 | 3586 | 0,77 | 1922 | 2476 | 0,56 | 152 | 970 | 0,86 | 0 | 1467 | 1 |
| | | 2 | 219 | 1385 | 0,86 | 1289 | 3602 | 0,74 | 0 | 2041 | 1 | 0 | 2658 | 1 |
| | | 3 | 410 | 960 | 0,7 | 1932 | 1357 | 0,41 | 0 | 1391 | 1 | 0 | 5134 | 1 |
| 0,7 mL | A1 | 1 | 94 | 180 | 0,66 | 475 | 503 | 0,51 | PS | 49 | NC | 0 | 50 | 1 |
| | | 2 | 420 | 854 | 0,67 | 731 | 654 | 0,47 | 40 | PS | NC | 40 | 76 | 0,65 |
| | | 3 | 146 | 323 | 0,69 | 339 | 289 | 0,46 | 41 | 47 | 0,53 | PS | PS | NC |
| | | 1 | 323 | 391 | 0,55 | 1557 | 1889 | 0,55 | 1011 | 1710 | 0,63 | 1032 | 1919 | 0,65 |
| | | 2 | 584 | 832 | 0,59 | 404 | 329 | 0,45 | 429 | 564 | 0,57 | 880 | 1279 | 0,59 |
| | | 3 | 295 | 253 | 0,46 | 1011 | 818 | 0,45 | 481 | 1106 | 0,7 | 531 | 937 | 0,64 |
| | | 1 | 792 | 3144 | 0,8 | 271 | 1230 | 0,82 | 1615 | 3899 | 0,71 | 509 | 658 | 0,56 |
| | | 2 | 226 | 968 | 0,81 | 670 | 3220 | 0,83 | 2941 | 3504 | 0,54 | 2609 | 2854 | 0,52 |
| | | 3 | 168 | 458 | 0,73 | 873 | 4336 | 0,83 | 3439 | 4043 | 0,54 | 3069 | 2928 | 0,49 |
| 0,7 mL | A5 | 1 | 1092 | 1240 | 0,53 | 4295 | 2672 | 0,38 | 1837 | 2771 | 0,6 | 1322 | 1958 | 0,6 |
| | | 2 | 1138 | 1445 | 0,56 | 2668 | 2408 | 0,47 | 2161 | 3400 | 0,61 | 1669 | 2987 | 0,64 |
| | | 3 | 2235 | 1466 | 0,4 | 2979 | 3325 | 0,53 | 573 | 1558 | 0,73 | 1433 | 3020 | 0,68 |
| | | 1 | 74 | 141 | 0,66 | 1580 | 1283 | 0,45 | 76 | 171 | 0,69 | 0 | 43 | 1 |
| | | 2 | 157 | 279 | 0,64 | 197 | 242 | 0,55 | 209 | 438 | 0,68 | 369 | 676 | 0,65 |
| | | 3 | 1383 | 1280 | 0,48 | 947 | 918 | 0,49 | 47 | 70 | 0,6 | 203 | 484 | 0,7 |
| | | 1 | 2646 | 1501 | 0,36 | 978 | 820 | 0,46 | 1503 | 2429 | 0,62 | 2690 | 2258 | 0,46 |
| | | 2 | 7106 | 1263 | 0,15 | 738 | 387 | 0,34 | 1880 | 2658 | 0,58 | 420 | 251 | 0,37 |
| | | 3 | 8875 | 2641 | 0,23 | 743 | 736 | 0,5 | 167 | 540 | 0,76 | 609 | 302 | 0,33 |

PS : Pas de spectre NC : Non calculable

Annexe 3 : Identification, mécanismes de résistance, diamètre d'inhibition de la témocilline et CMI de l'ertapénème et de l'imipénème des 65 souches du souchier rétrospectif.

| Espèce | Souche n° | Mécanisme de Résistance | Témocilline (diamètre mm) | CMI ertapénème (mg/L) | CMI imipénème (mg/L) |
|---------------------|-----------|--|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>E.cloacae</i> | A1 | BLSE + imperméabilité | 16 | 8 | 8 |
| <i>E.aerogenes</i> | A2 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 6 | 8 | 8 |
| <i>E.coli</i> | A4 | OXA-48 | 6 | 0,19 | 0,38 |
| <i>K.pneumoniae</i> | A5 | NDM | 6 | 24 | 8 |
| <i>K.pneumoniae</i> | A7 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 18 | 0,75 | 0,19 |
| <i>E.cloacae</i> | B2 | BLSE + imperméabilité | 15 | 0,19 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | B3 | OXA-48 | 6 | 0,75 | 0,75 |
| <i>K.pneumoniae</i> | B4 | BLSE + OXA-48 | 6 | 0,75 | 0,75 |
| <i>E.cloacae</i> | B7 | BLSE + imperméabilité | 6 | 1 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | B8 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 18 | 0,75 | 0,19 |
| <i>K.pneumoniae</i> | C1 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 6 | >32 | >32 |
| <i>E.cloacae</i> | C3 | BLSE + imperméabilité | 12 | >32 | 4 |
| <i>E.cloacae</i> | C4 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 10 | 1 | 0,25 |
| <i>S.marcescens</i> | C5 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 6 | 1 | 2 |
| <i>K.pneumoniae</i> | C6 | BLSE + NDM-1 | 8 | 24 | 12 |
| <i>E.cloacae</i> | C7 | BLSE + imperméabilité | 18 | 32 | 12 |
| <i>E.kobei</i> | C8 | BLSE + imperméabilité | 19 | 2 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | D3 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 17 | 0,75 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | D6 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 17 | 12 | 2 |
| <i>E.aerogenes</i> | D7 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 17 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | E3 | BLSE + imperméabilité | 19 | 0,5 | 0,75 |
| <i>E.cloacae</i> | E4 | BLSE + imperméabilité | 20 | >32 | 6 |
| <i>E.cloacae</i> | E6 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 20 | 1 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | E7 | BLSE + imperméabilité | 18 | >32 | 32 |
| <i>E.cloacae</i> | E8 | BLSE + imperméabilité | 20 | 0,38 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | F2 | BLSE + imperméabilité | 16 | 32 | 6 |
| <i>E.cloacae</i> | F3 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 21 | 1,5 | 0,19 |
| <i>K.pneumoniae</i> | F7 | KPC | 14 | 6 | 4 |
| <i>E.coli</i> | F8 | NDM | 10 | 4 | 16 |
| <i>K.pneumoniae</i> | G1 | OXA 48 + BLSE | 6 | 4 | 1,5 |
| <i>E.cloacae</i> | G2 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 14 | 1 | 0,38 |
| <i>E.coli</i> | G3 | OXA 48 | 6 | 16 | 4 |

| | | | | | |
|---------------------|-----|---|----|-------|-------|
| <i>K.pneumoniae</i> | G4 | BLSE + Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 6 | 16 | 3 |
| <i>K.pneumoniae</i> | G5 | BLSE + impermeabilité | 10 | 1 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | G6 | BLSE + Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 8 | >32 | 4 |
| <i>K.pneumoniae</i> | H1 | Céphalosporinase hyperproduite + OXA 48 | 6 | 32 | 32 |
| <i>K.pneumoniae</i> | H3 | BLSE + impermeabilité | 6 | 32 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | H4 | BLSE + impermeabilité | 10 | 2 | 0,38 |
| <i>E.coli</i> | H5 | OXA 48 + BLSE | 6 | >32 | 0,75 |
| <i>K.pneumoniae</i> | H6 | BLSE + impermeabilité | 18 | 0,125 | 1,5 |
| <i>E.coli</i> | H7 | OXA 48 | 6 | 0,5 | 0,5 |
| <i>E.aerogenes</i> | H8 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 18 | >32 | 12 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2A1 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 22 | 0,75 | 0,19 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B3 | OXA 48 | 6 | 32 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B4 | BLSE + impermeabilité | 13 | 1 | 0,125 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B5 | BLSE + NDM | 6 | 2 | 1 |
| <i>E.coli</i> | 2B6 | Céphalosporinase hyperproduite + OXA 48 | 6 | 0,75 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B7 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 14 | 16 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B8 | OXA 48 | 6 | >32 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C1 | BLSE + OXA 48 | 6 | >32 | 1,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C2 | BLSE + OXA 48 | 6 | >32 | 4 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C3 | OXA 48 | 6 | 2 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C4 | BLSE + OXA 48 | 6 | 6 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C5 | KPC + NDM | 10 | >32 | 32 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F1 | OXA-48 | 6 | >32 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | 2F2 | BLSE + OXA-48 | 6 | >32 | 0,75 |
| <i>E.cloacae</i> | 2F3 | BLSE + OXA-48 | 6 | >32 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F4 | OXA-48 | 6 | >32 | 4 |
| <i>E.coli</i> | 2F5 | BLSE + OXA-48 | 6 | 16 | 1,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F6 | BLSE + VIM-1 | 6 | 6 | 12 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F7 | OXA-48 | 6 | >32 | 32 |
| <i>E.coli</i> | 2F8 | NDM-5 | 6 | >32 | 32 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G1 | OXA-48 | 6 | 12 | 1,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G2 | OXA-48 | 6 | >32 | 6 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G3 | OXA-48 | 6 | >32 | 0,75 |

Annexe 4 : Résultats MALDI-ToF et ratios d'intensités des 65 souches incluses dans le soucier rétrospectif.

| Espèce | Souche n° | Mécanisme de Résistance | Intensité pic 300 | Intensité pic 254 | Ratio |
|---------------------|-----------|---|-------------------|-------------------|-------|
| <i>E.cloacae</i> | A1 | BLSE + imperméabilité | 96 | 356 | 0,79 |
| | | | 55 | 205 | 0,79 |
| <i>E.aerogenes</i> | A2 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 616 | 919 | 0,6 |
| | | | 447 | 676 | 0,6 |
| <i>E.coli</i> | A4 | OXA 48 | 0 | 3256 | 1 |
| | | | 0 | 2633 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | A5 | NDM | 0 | 1817 | 1 |
| | | | 0 | 773 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | A7 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 938 | 1959 | 0,68 |
| | | | 2056 | 3498 | 0,63 |
| <i>E.cloacae</i> | B2 | BLSE + imperméabilité | 338 | 524 | 0,61 |
| | | | 381 | 581 | 0,6 |
| <i>K.pneumoniae</i> | B3 | OXA 48 | 0 | 692 | 1 |
| | | | 0 | 212 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | B4 | BLSE + OXA 48 | 0 | 350 | 1 |
| | | | 0 | 3342 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | B7 | BLSE + imperméabilité | 1740 | 1029 | 0,37 |
| | | | 449 | 574 | 0,56 |
| <i>K.pneumoniae</i> | B8 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 1208 | 1248 | 0,51 |
| | | | 276 | 434 | 0,61 |
| <i>K.pneumoniae</i> | C1 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 907 | 1438 | 0,61 |
| | | | 1316 | 1647 | 0,56 |
| <i>E.cloacae</i> | C3 | BLSE + imperméabilité | 188 | 177 | 0,48 |
| | | | 309 | 570 | 0,65 |
| <i>E.cloacae</i> | C4 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 522 | 728 | 0,58 |
| | | | 323 | 743 | 0,7 |
| <i>S.marcescens</i> | C5 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 903 | 1639 | 0,64 |
| | | | 2027 | 2686 | 0,57 |
| <i>K.pneumoniae</i> | C6 | BLSE + NDM-1 | 0 | 1844 | 1 |
| | | | 0 | 1087 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | C7 | BLSE + imperméabilité | 593 | 666 | 0,53 |
| | | | 538 | 630 | 0,54 |
| <i>E.cloacae</i> | C8 | BLSE + imperméabilité | 1452 | 2103 | 0,59 |
| | | | 424 | 404 | 0,49 |
| <i>E.cloacae</i> | D3 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 514 | 725 | 0,59 |
| | | | 353 | 654 | 0,65 |
| <i>E.cloacae</i> | D6 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 440 | 367 | 0,45 |
| | | | 547 | 385 | 0,41 |

| | | | | | |
|---------------------|----|--|----------------|----------------|----------------|
| <i>E.aerogenes</i> | D7 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 2354 | 2548 | 0,52 |
| | | | 190 | 268 | 0,59 |
| <i>E.cloacae</i> | E3 | BLSE + imperméabilité | 1262 | 908 | 0,42 |
| | | | 133 | 137 | 0,51 |
| <i>E.cloacae</i> | E4 | BLSE + imperméabilité | 1024 | 865 | 0,46 |
| | | | 381 | 501 | 0,57 |
| <i>E.cloacae</i> | E6 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 366 | 907 | 0,71 |
| | | | 626 | 2143 | 0,77 |
| <i>E.cloacae</i> | E7 | BLSE + imperméabilité | 295 | 250 | 0,46 |
| | | | 176 | 232 | 0,57 |
| <i>E.cloacae</i> | E8 | BLSE + imperméabilité | 116 | 140 | 0,55 |
| | | | 121 | 110 | 0,48 |
| <i>E.cloacae</i> | F2 | BLSE + imperméabilité | 788 | 492 | 0,38 |
| | | | 3569 | 2343 | 0,4 |
| <i>E.cloacae</i> | F3 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 1353 | 786 | 0,37 |
| | | | 1649 | 1324 | 0,45 |
| <i>K.pneumoniae</i> | F7 | KPC | 0 | 589 | 1 |
| | | | 0 | 337 | 1 |
| <i>E.coli</i> | F8 | NDM | 0 | 2290 | 1 |
| | | | 0 | 315 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | G1 | BLSE + OXA 48 | 0 | 579 | 1 |
| | | | 0 | 194 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | G2 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 1186 | 1562 | 0,57 |
| | | | 312 | 225 | 0,42 |
| <i>E.coli</i> | G3 | OXA 48 | 0 | 952 | 1 |
| | | | 0 | 883 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | G4 | BLSE + Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | Pas de spectre | Pas de spectre | Non calculable |
| | | | 1368 | 987 | 0,42 |
| <i>K.pneumoniae</i> | G5 | BLSE + imperméabilité | 266 | 328 | 0,55 |
| | | | 122 | 206 | 0,63 |
| <i>E.cloacae</i> | G6 | BLSE + Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 564 | 905 | 0,62 |
| | | | 1219 | 677 | 0,36 |
| <i>K.pneumoniae</i> | H1 | Céphalosporinase hyperproduite + OXA 48 | 0 | 599 | 1 |
| | | | 0 | 1195 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | H3 | BLSE + imperméabilité | 520 | 916 | 0,64 |
| | | | 288 | 409 | 0,59 |
| <i>E.cloacae</i> | H4 | BLSE + imperméabilité | 681 | 693 | 0,5 |
| | | | 303 | 385 | 0,56 |
| <i>E.coli</i> | H5 | BLSE + OXA 48 | 0 | 410 | 1 |
| | | | 0 | 204 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | H6 | BLSE + imperméabilité | 244 | 496 | 0,67 |
| | | | 221 | 363 | 0,62 |

| | | | | | |
|---------------------|-----|---|-----|------|------|
| <i>E.coli</i> | H7 | OXA 48 | 0 | 3159 | 1 |
| | | | 0 | 338 | 1 |
| <i>E.aerogenes</i> | H8 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 346 | 537 | 0,61 |
| | | | 318 | 450 | 0,59 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2A1 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 333 | 795 | 0,7 |
| | | | 171 | 587 | 0,77 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B3 | OXA 48 | 0 | 1439 | 0,77 |
| | | | 0 | 1397 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B4 | BLSE + imperméabilité | 951 | 1218 | 0,56 |
| | | | 546 | 979 | 0,64 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B5 | BLSE + NDM | 0 | 778 | 1 |
| | | | 0 | 773 | 1 |
| <i>E.coli</i> | 2B6 | Céphalosporinase hyperproduite + OXA 48 | 0 | 1025 | 1 |
| | | | 0 | 869 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B7 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 178 | 399 | 0,69 |
| | | | 138 | 288 | 0,68 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B8 | OXA 48 | 93 | 651 | 0,87 |
| | | | 0 | 271 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C1 | BLSE + OXA 48 | 0 | 626 | 1 |
| | | | 0 | 834 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C2 | BLSE + OXA 48 | 0 | 753 | 1 |
| | | | 0 | 572 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C3 | OXA 48 | 0 | 998 | 1 |
| | | | 0 | 930 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C4 | BLSE + OXA 48 | 0 | 357 | 1 |
| | | | 0 | 560 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C5 | KPC + NDM | 0 | 152 | 1 |
| | | | 0 | 467 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F1 | OXA-48 | 0 | 325 | 1 |
| | | | 0 | 548 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | 2F2 | BLSE + OXA-48 | 0 | 155 | 1 |
| | | | 0 | 239 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | 2F3 | BLSE + OXA-48 | 0 | 135 | 1 |
| | | | 0 | 105 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F4 | OXA-48 | 0 | 97 | 1 |
| | | | 0 | 106 | 1 |
| <i>E.coli</i> | 2F5 | BLSE + OXA-48 | 0 | 332 | 1 |
| | | | 0 | 139 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F6 | BLSE + VIM-1 | 0 | 96 | 1 |
| | | | 0 | 98 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F7 | OXA-48 | 0 | 244 | 1 |
| | | | 0 | 104 | 1 |
| <i>E.coli</i> | 2F8 | NDM-5 | 0 | 288 | 1 |
| | | | 0 | 144 | 1 |

| | | | | | |
|---------------------|-----|---------------|---|-----|---|
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G1 | OXA-48 | 0 | 103 | 1 |
| | | | 0 | 84 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G2 | OXA-48 | 0 | 227 | 1 |
| | | | 0 | 344 | 1 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G3 | OXA-48 | 0 | 310 | 1 |
| | | | 0 | 162 | 1 |

Annexe 5 : Identification, mécanismes de résistance, diamètre d'inhibition de la témocilline et CMI de l'ertapénème et de l'imipénème des 74 souches du soucier prospectif.

| Espèce | Souche n° | Mécanisme de Résistance | Témocilline (diamètre mm) | CMI ertapénème (mg/L) | CMI imipénème (mg/L) |
|---------------------|-----------|--|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C7 | BLSE + imperméabilité | 13 | 0,125 | 0,19 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + imperméabilité | 25 | 12 | 3 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 16 | 0,38 | 0,75 |
| <i>E.aerogenes</i> | NC | BLSE + imperméabilité | 22 | 0,19 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 10 | 1,5 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 18 | 0,25 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 16 | 0,25 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 24 | 0,19 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C8 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 14 | 0,5 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | 2D1 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 12 | 0,25 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | 2D2 | BLSE + imperméabilité | 6 | 0,25 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2D3 | BLSE + imperméabilité | 13 | 4 | 1 |
| <i>E.cloacae</i> | 2D4 | BLSE + imperméabilité | 11 | 0,5 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | 2D5 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 14 | 1,5 | 0,38 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2D6 | BLSE + imperméabilité | 12 | 0,25 | 0,125 |
| <i>E.aerogenes</i> | 2D7 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 20 | 0,25 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | 2D8 | BLSE + imperméabilité | 14 | 1 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E1 | BLSE + imperméabilité | 17 | 8 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | 2E2 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 13 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 25 | 0,19 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 17 | 0,25 | 0,38 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 25 | 0,38 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E3 | NDM | 9 | 8 | 2 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E4 | BLSE + imperméabilité | 13 | 0,38 | 0,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 23 | 0,012 | 0,19 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 20 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 17 | 0,25 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | 2E5 | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 12 | 0,38 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E6 | OXA-48 | 6 | 3 | 4 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 14 | 0,75 | 0,75 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E7 | OXA-48 | 6 | >32 | 8 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + imperméabilité | 16 | 0,19 | 0,38 |

| | | | | | |
|---------------------|-----|--|----|-------|-------|
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 13 | 0,25 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 16 | 0,25 | 0,19 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 11 | 0,38 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 20 | 0,5 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 18 | 0,25 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 13 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 14 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 13 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 18 | 0,25 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 19 | 0,19 | 0,125 |
| <i>E.cloacae</i> | 2E8 | BLSE + impermeabilité | 12 | 0,75 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | 2A3 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 18 | 0,5 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 15 | 0,25 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 15 | 0,38 | 0,25 |
| <i>E.aerogenes</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 17 | 0,38 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 10 | 1 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 22 | 0,064 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 20 | 0,19 | 0,125 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 15 | 0,25 | 0,38 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 11 | 0,5 | 0,25 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 19 | 0,38 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 16 | 0,19 | 0,19 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 20 | 0,19 | 0,38 |
| <i>E.coli</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 19 | 0,75 | 0,19 |
| <i>E.aerogenes</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 19 | 0,25 | 0,5 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 15 | 0,047 | 0,19 |
| <i>E.aerogenes</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 14 | 1,5 | 1 |
| <i>E.aerogenes</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 12 | 0,38 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 20 | 0,032 | 1,5 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 19 | 0,5 | 0,38 |
| <i>E.aerogenes</i> | 2G4 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 14 | 32 | 12 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 24 | 0,19 | 0,75 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 10 | 0,5 | 0,25 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G5 | OXA-48 | 6 | 24 | 12 |
| <i>E.cloacae</i> | 2G6 | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 10 | 3 | 1 |
| <i>E.coli</i> | 2G7 | Oxacillinase + impermeabilité | 6 | 3 | 3 |

| | | | | | |
|---------------------|----|--|----|-------|------|
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 19 | 0,19 | 1,5 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 16 | 0,25 | 2 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 21 | 12 | 1,5 |
| <i>K.pneumoniae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 17 | 0,125 | 19 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | BLSE + impermeabilité | 19 | 0,38 | 0,19 |
| <i>E.cloacae</i> | NC | Céphalosporinase hyperproduite + impermeabilité | 16 | 0,25 | 0,19 |

NC : Non conservée.

Les souches ne nécessitant pas la réalisation de tests complémentaires n'ont pas été conservées dans des cryotubes à -20°C.

Annexe 6: Comparaison de la détection des EPC par MALDI-ToF et galeries Rapidec® CARBA NP sur les 65 souches du soucier rétrospectif et les 20 souches du soucier prospectif ayant nécessité la réalisation de tests complémentaires.

| Espèce | Souche n° | Carbapénèmase | Rapidec | MALDI-ToF |
|---------------------|-----------|--|------------------------|----------------|
| <i>E.cloacae</i> | A1 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.aerogenes</i> | A2 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.coli</i> | A4 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | A5 | NDM | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | A7 | Négatif | Douteux | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | B2 | Négatif | Douteux | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | B3 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | B4 | BLSE + OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | B7 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | B8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | C1 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | C3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | C4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>S.marcescens</i> | C5 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | C6 | BLSE + NDM-1 | Positif | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | C7 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.kobei</i> | C8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | D3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | D6 | Négatif | Douteux | Négatif |
| <i>E.aerogenes</i> | D7 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | E3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | E4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | E6 | Négatif | Ininterprétable | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | E7 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | E8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | F2 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | F3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | F7 | KPC | Positif | Positif |
| <i>E.coli</i> | F8 | NDM | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | G1 | OXA 48 + BLSE | Positif | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | G2 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.coli</i> | G3 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | G4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | G5 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | G6 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | H1 | Céphalosporinase hyperproduite + OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | H3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | H4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.coli</i> | H5 | OXA 48 + BLSE | Positif | Positif |

| | | | | |
|---------------------|-----|--|----------------|----------------|
| <i>K.pneumoniae</i> | H6 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.coli</i> | H7 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>E.aerogenes</i> | H8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2A1 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B3 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B5 | BLSE + NDM | Positif | Positif |
| <i>E.coli</i> | 2B6 | Céphalosporinase hyperproduite + OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B7 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2B8 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C1 | BLSE + OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C2 | BLSE + OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C3 | OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C4 | BLSE + OXA 48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C5 | KPC + NDM | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F1 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | 2F2 | BLSE + OXA-48 | Douteux | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | 2F3 | BLSE + OXA-48 | Douteux | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F4 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>E.coli</i> | 2F5 | BLSE + OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F6 | BLSE + VIM-1 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2F7 | OXA-48 | Douteux | Positif |
| <i>E.coli</i> | 2F8 | NDM-5 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G1 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G2 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G3 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C7 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2C8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2D1 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2D2 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2D3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2D4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2D5 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2D6 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2D8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2E2 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E3 | NDM | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E4 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E6 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2E7 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | 2E8 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.cloacae</i> | 2A3 | Négatif | Négatif | Négatif |
| <i>E.aerogenes</i> | 2G4 | Négatif | Négatif | Positif |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2G5 | OXA-48 | Positif | Positif |
| <i>E.cloacae</i> | 2G6 | Négatif | Négatif | Positif |
| <i>E.coli</i> | 2G7 | Négatif | Négatif | Positif |

TITRE : Mise en place d'un algorithme décisionnel pour la détection des entérobactéries productrices de carbapénèmase (EPC) au laboratoire de bactériologie du CHU Amiens-Picardie.

MOTS CLES : Entérobactéries productrice de carbapénèmase, résistance, carbapénèmes, hydrolyse, MALDI-ToF.

RESUME

Introduction : Les entérobactéries productrices de carbapénèmase (EPC) constituent un problème de santé publique en France, mais leur détection reste difficile. Le but de ce travail était de mettre en place un algorithme de détection des EPC incluant un test d'hydrolyse par MALDI-ToF.

Matériel et méthodes : Nous avons mis en place un test basé sur l'hydrolyse de l'imipénème par MALDI-ToF, à l'aide de 65 souches produisant ou non une carbapénèmase, et comparé ses performances au test Rapidec® CARBA NP. Notre algorithme de détection, basé sur des tests phénotypiques (dépistage) puis sur un test d'hydrolyse de l'imipénème (confirmation), a été évalué à l'aide d'un recueil prospectif pendant 6 mois.

Résultats : Le test d'hydrolyse de l'imipénème MALDI-ToF discrimine efficacement les EPC des autres souches non sensibles aux carbapénèmes. Le test a montré des performances supérieures au Rapidec® CARBA NP (sensibilités 100% et 92%, spécificités 94% et 92% respectivement). Lors du recueil prospectif, 74 souches ont été soumises à l'algorithme de détection. 54 « non EPC » ont été testées négatives, et 20 souches, dont 100% des EPC, ont été soumises au test de confirmation. Lors de ce test, 7 souches étaient positives, justifiant le recours à la biologie moléculaire et à un centre de référence. 3 d'entre elles étaient en fait des faux positifs.

Discussion : La supériorité du test d'hydrolyse par MALDI-ToF peut s'expliquer par les problèmes d'interprétation du test Rapidec® CARBA NP (test colorimétrique). L'algorithme de détection s'est montré adapté à notre épidémiologie locale qui montre une très faible prévalence des carbapénèmases (0.05% en 2015, données du laboratoire). Il permet de rendre un résultat dans la journée, et de limiter le recours aux tests de biologie moléculaire onéreux.

Conclusion : L'algorithme de détection incluant le test d'hydrolyse de l'imipénème par MALDI-ToF peut être mis en place en routine au laboratoire sur des souches cliniques. L'utilisation de la technologie MALDI-ToF pourra être étendue aux souches de dépistage, puis à l'étude d'autres mécanismes de résistance épidémiques.

ABSTRACT

Introduction: Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) have become a serious public health issue. However, their detection remains difficult. The aim of this study was to build a CPE detection algorithm including a hydrolysis test by MALDI-ToF.

Methods: We designed a test based on imipenem hydrolysis by MALDI-ToF, using 65 strains producing or not a carbapenemase, and compared its performances to those of the Rapidec® CARBA NP test. Our detection algorithm, based on phenotypic tests (screening test) followed by an imipenem hydrolysis test (confirmation test), was assessed using a prospective collection for 6 months.

Results: The imipenem hydrolysis test effectively discriminates CPE from other carbapenem non-sensitive strains. The test showed higher performances than Rapidec® CARBA NP (sensitivity 100% and 92%, specificity 94% and 92% respectively). During the prospective collection, 74 strains were subjected to the detection algorithm. 54 « non CPE » turned out to be negatives, and 20 strains, including 100% of CPE, were subjected to the confirmation test. During this test, 7 were positives, requiring the use of molecular biology and of a reference center. 3 of them were actually false positives.

Discussion : The superiority of the hydrolysis test by MALDI-ToF can be explained by interpretation difficulties of Rapidec® CARBA NP (color test). The detection algorithm proved to be suited to our local epidemiology which shows a low prevalence of CPE (0.05% in 2015, laboratory data). It allows us to give a result within the day, and to limit the use of expensive molecular biology tests.

Conclusion: The CPE detection algorithm including a hydrolysis test by MALDI-ToF can be conducted as a routine test at the laboratory on clinical strains. The use of MALDI-ToF technology can be extended to screening strains, and then, to the study of other epidemic resistance mechanisms.

JURY

Président : Professeur Pascal SONNET

Asseseurs : Professeur Sandrine CASTELAIN, Docteur Patricia ZAWADZKI, Docteur Catherine MULLIE-DEMAILLY, Docteur Emilie PLUQUET, Docteur Véronique DECROIX.