

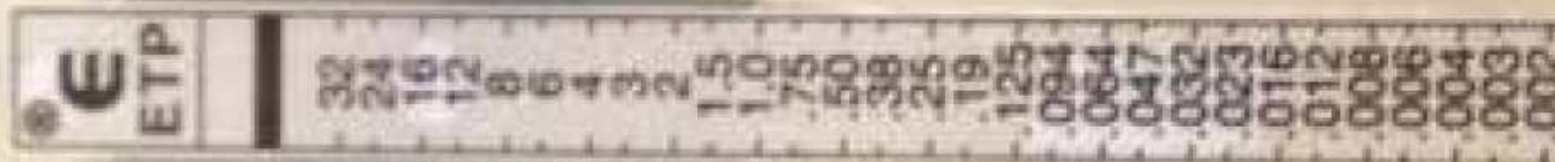


# Détection des carbapénémases

Méthodes de première ligne

- carbaNP test
- test de Hodge modifié
- tests d'inhibition

**Rechercher une carbapénémase**  
quand CMI ERTA ou IMIP I ou R



**Test de Hodge  
modifié  
Tests  
d'inhibition**



**Réponse  
en 24 h**

**Carba NP test**



**Réponse  
en 2 h**

**Envoi à la  
CRENO ou  
au CNR**



**Réponse  
en 48-72 h**

# **Test de Hodge modifié**

# Matériels



- Souches témoin
  - Témoin négatif : *E. coli* multisensible ATCC25922
  - Témoin positif :
    - KPN KPC CRENO 591120
    - KPN OXA-48 CRENO 569400
- Solution de **cloxacilline** à 75 mg/mL
  - 1g de cloxa. + 13.3 mL d'H<sub>2</sub>O
  - Aliquots de 10 microL conservés à -20°C
- gélose Mueller Hinton carrée
- disque ERTA

# Mode opératoire

- faire une suspension à 0.5 McFarland dans une ampoule NaCl 0.85 %  
Medium de la souche Témoin négatif (*E. coli* sensible)
- diluer cette suspension au 1/10 (1mL dans 9 mL d'eau osmosée stérile)
- ensemercer une gélose Mueller Hinton carrée par écouvillonnage (dans les 4 directions)
- laisser sécher sous hotte 15 minutes
- déposer un disque d'ERTA au centre de la boîte
- imbiber le disque avec 10 microL de cloxacilline
- avec une anse de 1 microL ensemercer la gélose MH en strie fine depuis le disque vers le bord de la gélose, sur une longueur d'au moins 20 mm avec
  - La souche à tester
  - La souche Témoin négatif
  - La souche Témoin positif
- incuber 18-24 h à 37°C

# Interprétation

- Vérification
  - Témoin négatif
  - Témoin positif
- Lecture pour souches test
  - 591260 positif
  - 514242 négatif
- **Résultat en 24h**



# Carba NP test



# Matériels

- Souches témoin
  - Témoin négatif : *E. coli* multisensible ATCC25922
  - Témoin positif :
    - KPN KPC CRENO 591120
    - KPN OXA-48 CRENO 569400
- Tampon de lyse B-PER II, ThermoScientific
- Imipénème 500 mg, poudre pour solution pour perfusion
- Solution rouge de phénol, Merck Millipore
- Solution de sulfate de Zinc 0.1 mol/L, Merck Millipore
- Solution NaOH 1N, Sigma
- Centrifugeuse
- pH-mètre
- Tube Eppendorf 0.5 mL

# Préparation de la solution de rouge de phénol

- dans un flacon mélanger 2 mL de la solution pure de rouge de phénol avec 16.6 mL d'eau osmosée
- avec le pH-mètre ajuster le pH à 7.8 avec du NaOH 1N (ajouter 5microL par 5 microL)
- protéger le flacon de la lumière avec du papier aluminium
- conserver la solution 20 jours à +4°C



# Préparation de la solution de travail

- peser 15 mg d'imipénème dans un tube eppendorf
- dans un tube Falcon de 15 mL, ajouter
  - 5 mL de la solution de rouge de phénol à pH7.8
  - 5 microL de la solution de sulfate de Zinc
  - Les 15 mg d'imipénème
- mélanger en vortexant
- conserver la solution 20 jours à +4°C



# Mode opératoire-1

- **Préparation des suspensions bactériennes**
  - Dans chaque série, tester les souches Témoin positive et négative
  - Préparer pour chaque souche à tester
    - Déposer 100 microL de tampon de lyse dans 1 tube eppendorf 1.5 mL
    - À l'aide d'une öse de 10 microL, récupérer plusieurs colonies (öse remplie au  $\frac{3}{4}$ )
    - Mélanger les colonies aux 100 microL de tampon de lyse



# Mode opératoire-2

- Préparation des suspensions bactériennes (suite)
  - Vortexer pendant 1 minute
  - Incuber à température ambiante pendant 30 minutes
  - Centrifuger à 10 000g pendant 5 minutes à température ambiante



# Mode opératoire-3

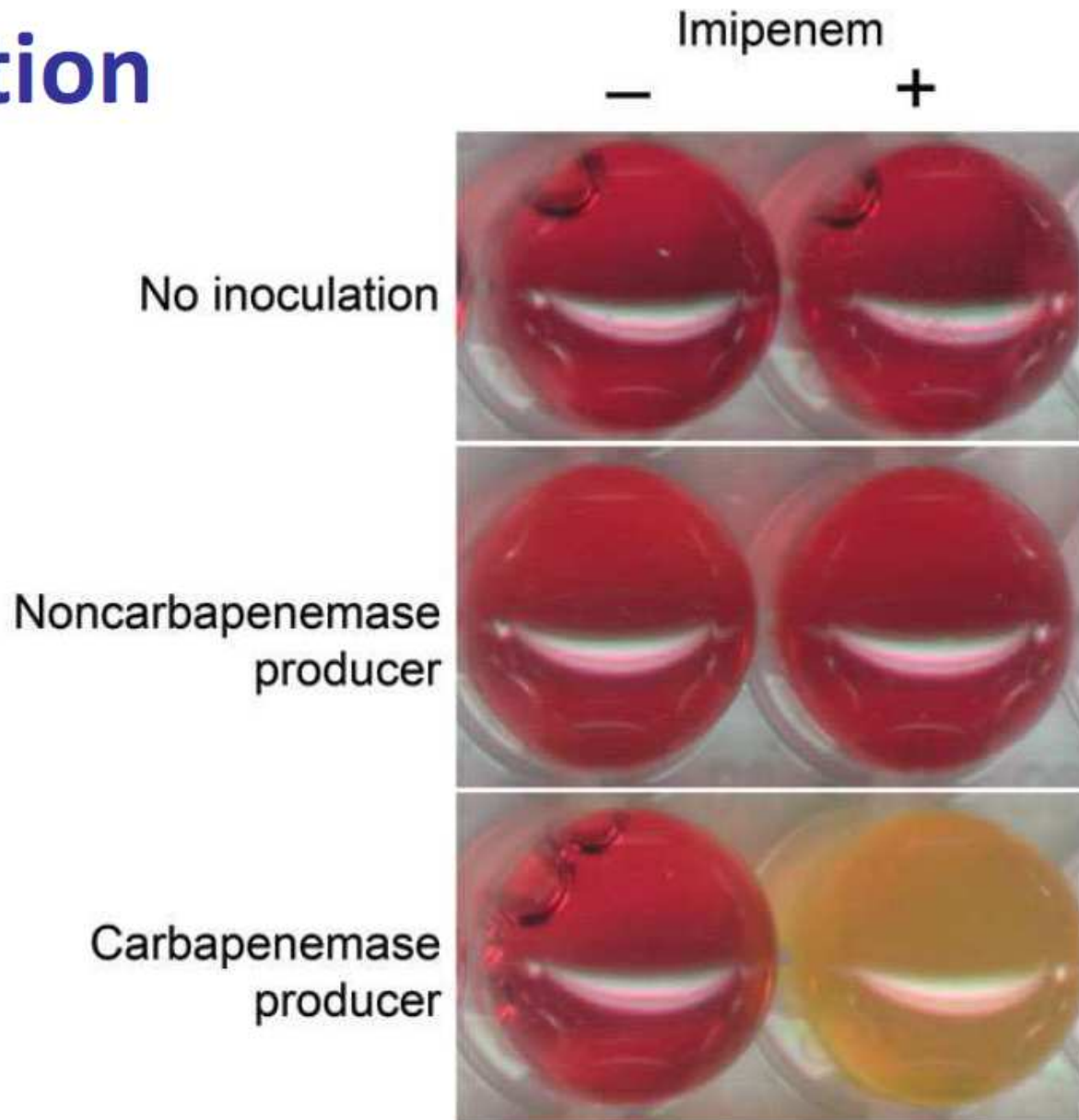
- **Rechercher la carbapénémase**
  - Préparer pour chaque souche à tester
    - Déposer 100 microL de solution de travail dans un tube eppendorf 1.5 mL
    - Ajouter 30 microL de surnageant bactérien
    - Incuber 2 heures à 37°C

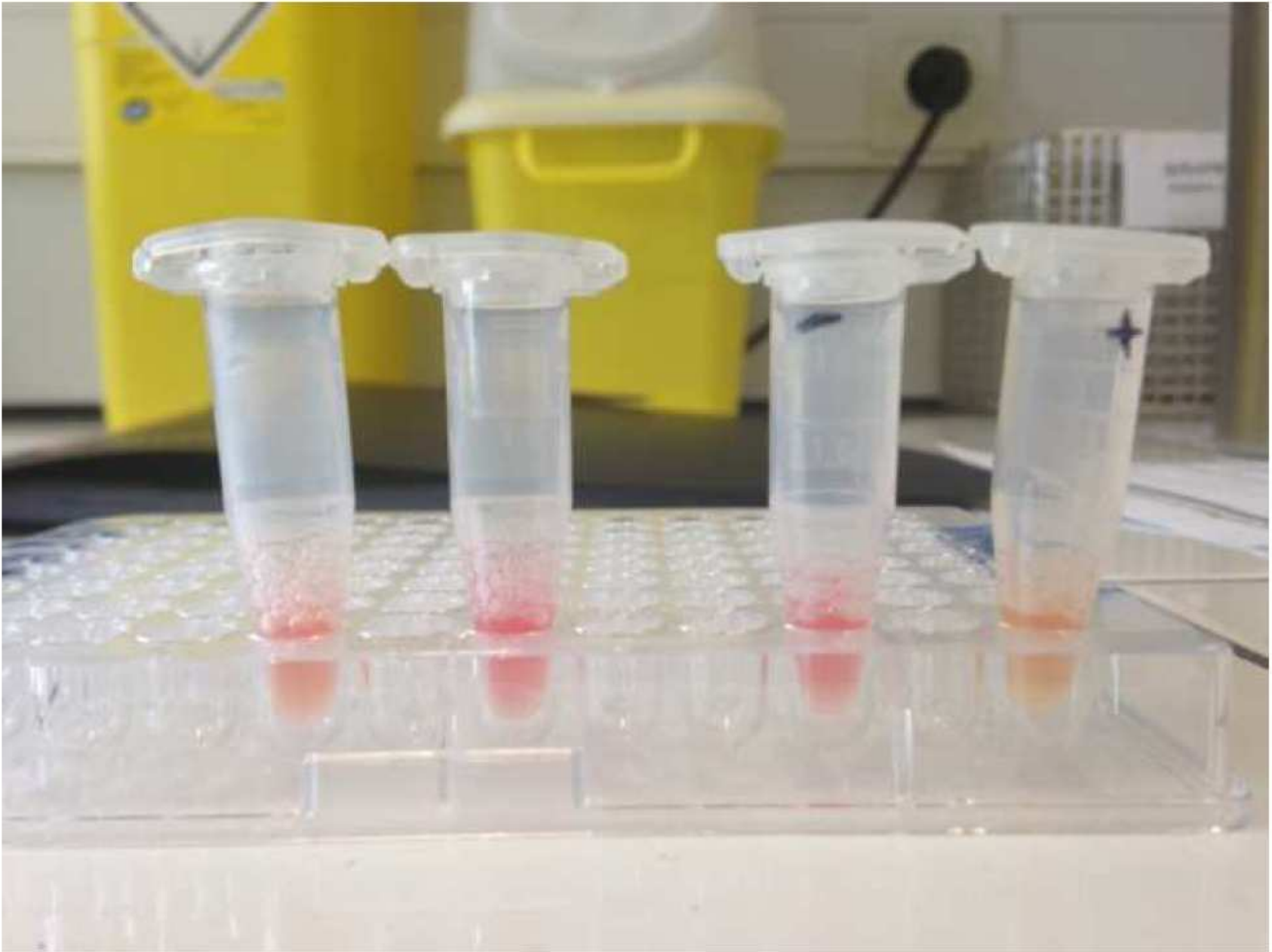
Img\_1670.mov



# Interprétation

- Un virage au jaune indique que la souche produit une carbapénémase
- Une coloration qui reste rouge indique que la souche ne produit pas de carbapénémase







# Tests d'inhibition

détermination de la nature de la  
carbapénémase

# Matériels



- Souches Témoin positif :
  - KPN KPC CRENO 591120
  - KPN OXA-48 CRENO 569400
  - PYO MBL CRENO 592241
- gélose Mueller Hinton carrée
- Disques
  - Meropenem 10 microg (code MRP10)
  - Meropenem 10 microg + acide boronique (code MR+BO)
  - Meropenem 10 microg + cloxacilline (code MR+CL)
  - Meropenem 10 microg + acide dipicolinique (code MR+DP)

# Mode opératoire

- faire une suspension à 0.5 McFarland dans une ampoule NaCl 0.85 % Medium de la souche à tester
- inonder une gélose Mueller Hinton carrée avec la suspension; éliminer l'excès de liquide à l'aide d'une pipette par aspiration
- laisser sécher sous hotte 15 minutes
- déposer les 4 disques MRP10, MR+BO, MR+CL et MR+DP en laissant un espace suffisant (> 4 cm) entre chaque disque
- incuber 18-24 h à 37°C

# Interprétation

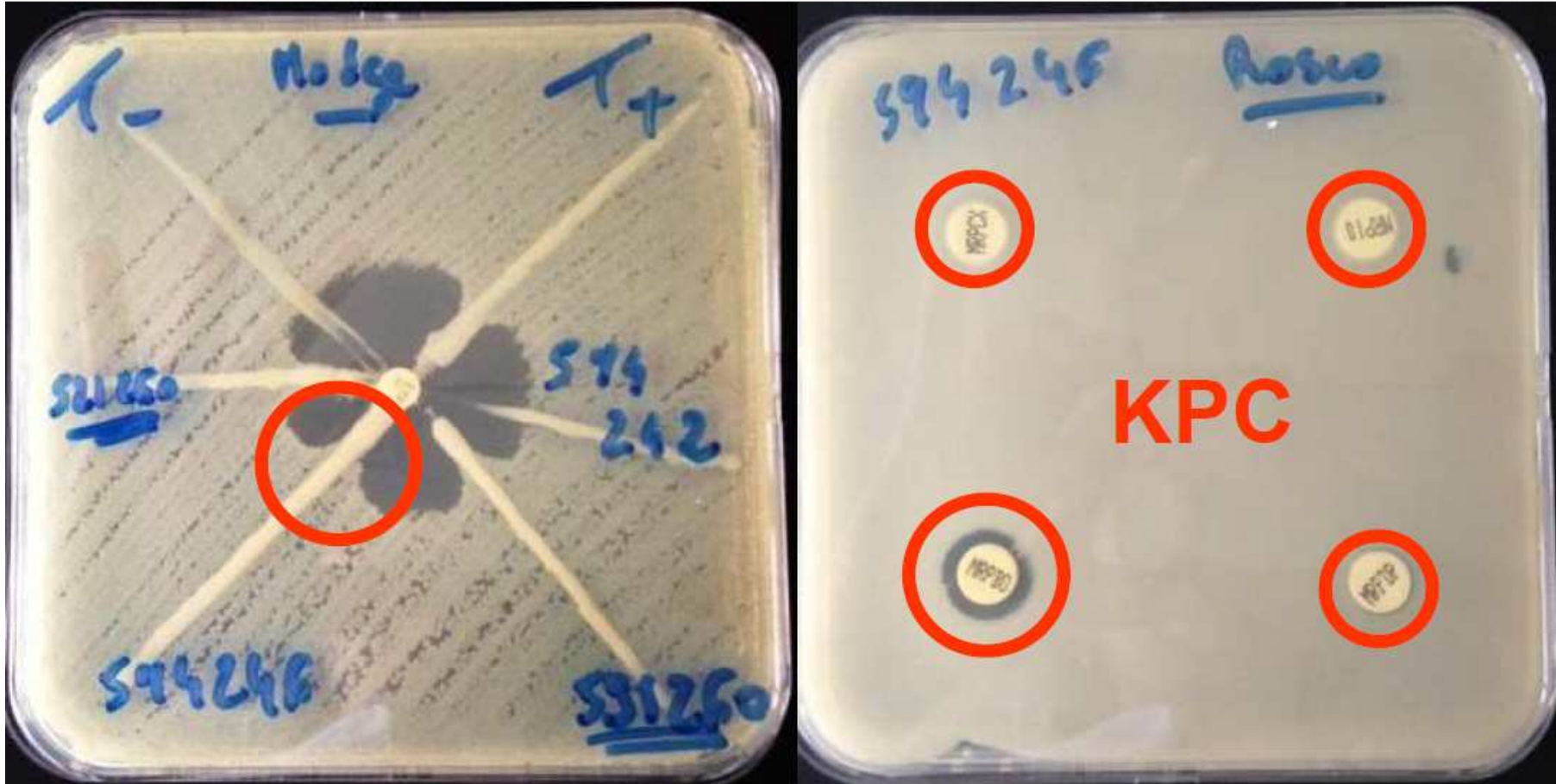
- Lecture des diamètres d'inhibition autour des 4 disques
  - MRP10
  - MR+BO
  - MR+CL
  - MR+DP

## INTERPRETATION DES RESULTATS

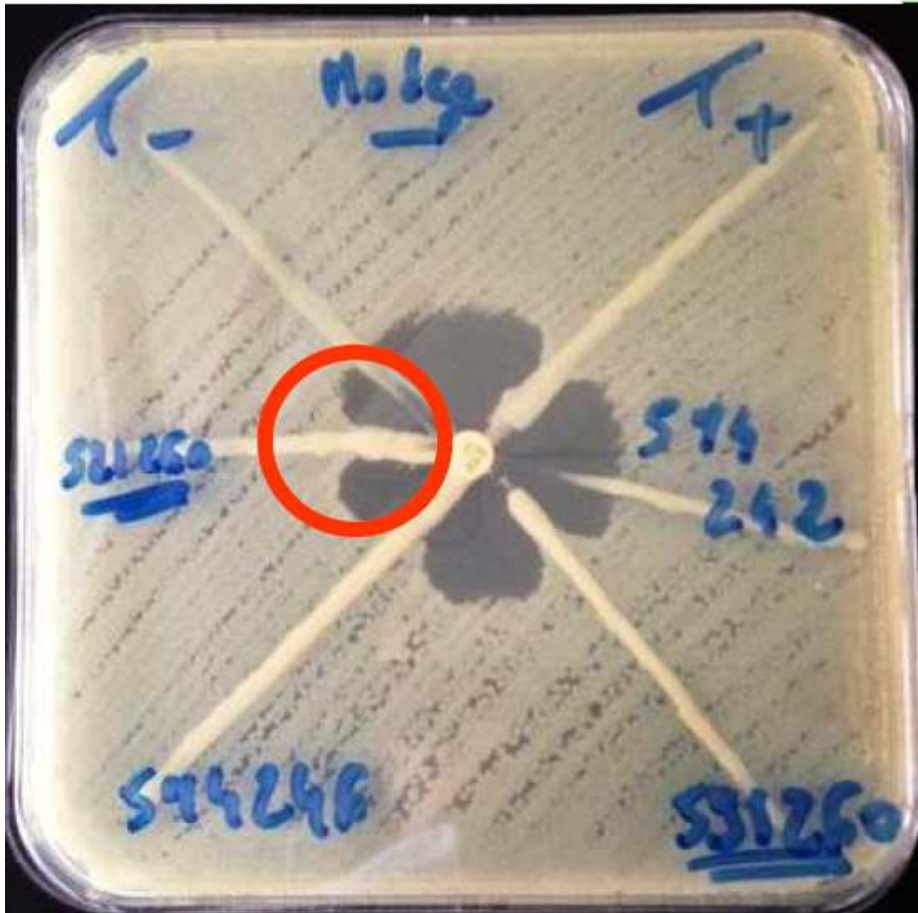
- $\geq 5$  mm entre EDTA (ou AC. DIP.) et EDTA (ou AC. DIP.) + MERO. ▶ ▶ ▶ **probable EPC MBL**
- $\geq 5$  mm **SEULEMENT** entre AC. BORO. et AC. BORO. + MERO. ▶ ▶ ▶ **probable EPC KPC**
- en absence de différence entre les diamètres ▶ ▶ ▶ **possible EPC OXA**
- $\geq 5$  mm entre AC. BORO. et AC. BORO. + MERO. **ET**  $\geq 5$  mm entre CLOXA et CLOXA + MERO. ▶ ▶ ▶ **AmpC et altération porine**

Diminution de la sensibilité aux Carbapénems par	Test à l'EDTA (ou AC. DIP.)	Test à l'acide BORONIQUE	Test à la CLOXACILLINE
<b>probable</b> Carbapénémase MBL	+	-	-
<b>probable</b> Carbapénémase KPC	-	+	-
<b>possible</b> Carbapénémase OXA	-	-	-
AmpC et altération porine	-	+	+

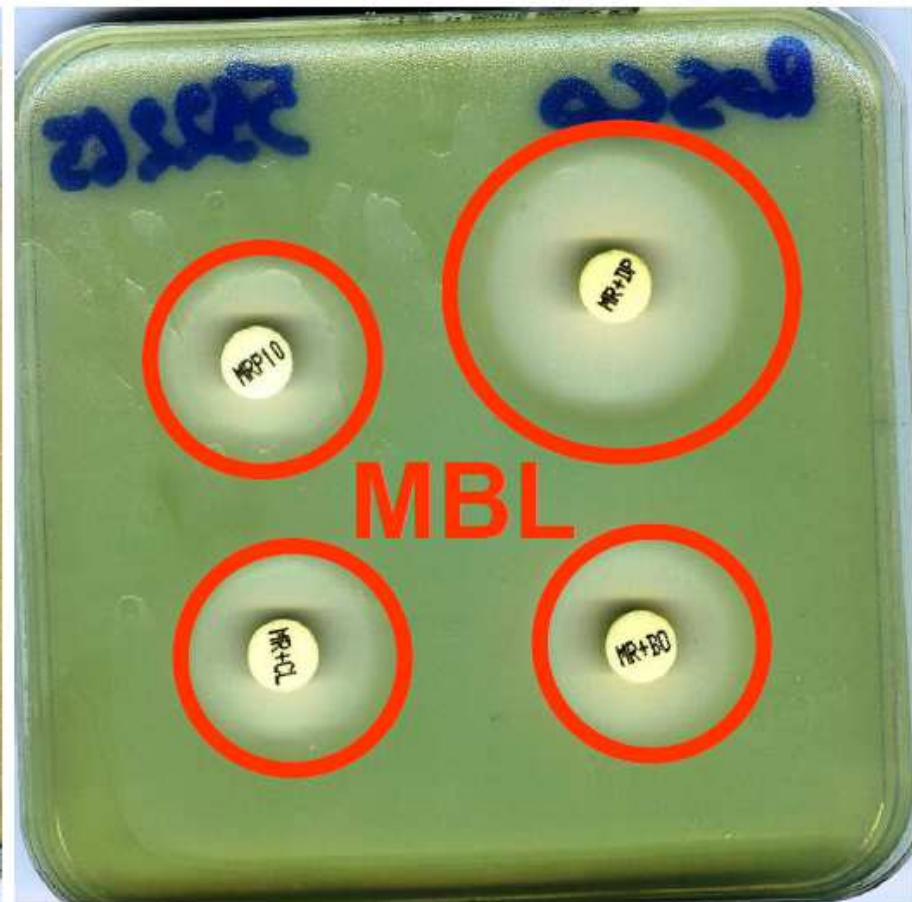
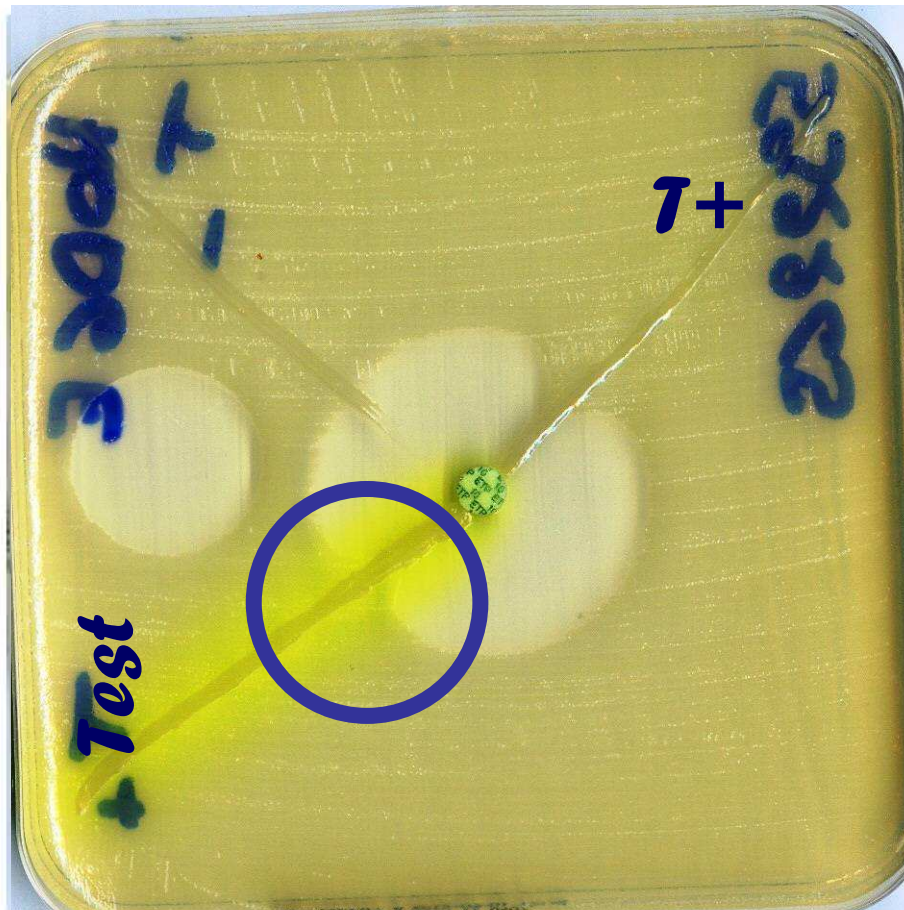
# Hodge POS + inhibition BO => KPC



**Hodge POS + no inhibition => OXA-48**



Hodge<sup>POS</sup><sub>ou NEG</sub> + inhibition DP => MBL



# Hodge NEG + inhibition CL => CP





**Tests d'inhibition +  
Test de Hodge modifié +  
et/ou carba NP test +**

**Résultat positif = ALERTE**

=> prévenir

immédiatement EOHH (étab. de santé)

immédiatement RHC si plusieurs étab. de santé ou  
ville

=> envoyer la souche à la CRENO ou au CNR

# Test de Hodge modifié **douteux** et/ou carba NP test **douteux**

## Résultat douteux

=> envoyer la souche à la CRENO ou au CNR

=> en fonction du contexte, +/- prévenir

immédiatement EOHH (étab. de santé)

immédiatement RHC si plusieurs étab. de santé ou  
ville