



# Détection rapide de carbapénémases produites par les Entérobactéries (Carba NP test)



<b>Objectif</b>	détection biochimique de l'hydrolyse du carbapénème à partir de colonies bactériennes d'Entérobactéries	
<b>Matériels</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- tampon de lyse B-PER II, Bacterial protein Extraction Reagent, ThermoScientific</li><li>- Imipénème 500 mg, poudre pour solution pour perfusion</li><li>- solution Rouge de phénol, Merck Millipore</li><li>- solution de sulfate de Zinc ZnSO<sub>4</sub>, 0.1 mol/L, Merck Millipore</li><li>- solution NaOH 1N, Sigma</li><li>- eau stérile</li><li>- souches témoins POS et NEG</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- vortex</li><li>- centrifugeuse</li><li>- pH-mètre</li><li>- étuve à 37°C</li><li>- tubes Ependorf 1.5 ml</li><li>- tube Falcon 15 mL</li><li>- pipettes</li></ul>
<b>Méthodologie</b>	<p><b>Préparation de la solution de rouge de phénol</b></p> <p>Dans un flacon, mélanger 2 mL de la solution pure de rouge de phénol avec 16.6 mL d'eau stérile. A l'aide du pH-mètre, ajuster le pH de la solution à 7.8 avec du NaOH 1N (ajouter 5microL par 5 microL). Recouvrir le flacon de papier ALU. La solution se conserve 1 mois à 4°C</p> <p><b>Préparation de la solution de travail (à préparer 24 h avant l'utilisation)</b></p> <p>Peser 15 mg d'imipénème dans un tube Ependorf. Dans un tube Falcon de 15 mL, ajouter</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- 5 mL de la solution de rouge de phénol préparée ci-dessus,</li><li>- 5 microL de la solution de sulfate de Zinc ZnSO<sub>4</sub></li><li>- les 15 mg d'imipénème</li></ul> <p>Mélanger en vortexant. Recouvrir le tube de papier ALU. La solution se conserve 15 jours à 4°C</p> <p><b>Préparation des suspensions bactériennes à tester</b></p> <p><u>Pour chaque série</u>, tester la souche test et les deux souches témoins POS et NEG Attention : les colonies à tester doivent être sur milieu TSH ou MH. Elles ne doivent pas être sur milieu chromogène et/ou sélectif (CLED, CPS,...) Pour chacune des souches à tester, les témoins POS et NEG</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- dans un tube Ependorf de 1.5 mL, pipetter 100 microL du tampon de lyse</li><li>- avec une öse de 10 microL, reprendre des colonies bactériennes (öse remplie au ¾).</li><li>- mélanger les colonies aux 100 microL du tampon de lyse</li><li>- vortexer pendant 1 minute</li><li>- incuber à température ambiante pendant 30 minutes</li><li>- centrifuger à 10 000g pendant 5 minutes à température ambiante</li></ul> <p><b>Mise en évidence de la carbapénémase</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- sortir la solution de travail du réfrigérateur au dernier moment</li><li>- disposer 100 microL de solution de travail dans des tubes Ependorf de 1.5 mL (1 tube par souches à tester + 2 tubes pour les témoins POS et NEG)</li><li>- ajouter 30 microL de surnageant bactérien. Aspirer et refouler 2-3 fois. Le liquide doit devenir rouge. Il ne doit pas coaguler.</li><li>- incuber 2 heures à 37°C (la positivité peut apparaître plus rapidement)</li></ul> <p><b>Lecture et interprétation</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- un virage au jaune indique que la souche produit très vraisemblablement une carbapénémase ;</li><li>- la coloration du liquide reste rouge après 2 heures d'incubation ; cela indique que la souche n'est vraisemblablement pas productrice de carbapénémase.</li><li>- le test est validé par les souches témoins POS (jaune) et NEG (rouge)</li><li>- une coagulation ne permet pas de conclure ; la souche doit faire l'objet d'une expertise complémentaire.</li><li>- toute souche positive doit être transmise immédiatement à la CRENO et/ou au CNR pour caractérisation moléculaire (la CRENO transmet toutes les souches au CNR)</li></ul> <p><b>Rappels sur la stratégie de détection des EPC</b></p> <p>Le Carba NP test permet de détecter les EPC en cas de suspicion d'EPC</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- en routine diagnostique (culture d'entérobactéries avec CMI Erta &gt;0.5 mg/L)</li><li>- ou dans le cadre du dépistage des sujets contacts d'un cas (culture d'entérobactéries sur milieu utilisé pour la détection des EPC)</li></ul> <p><b>Avantages</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- test simple, rapide</li><li>- permet de lever rapidement les suspicions d'EPC (excellente VPN)</li><li>- son excellente VPP permet de détecter les EPC diffusant <u>actuellement</u> en France.</li></ul> <p><b>Inconvénients</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- les souches à tester doivent être sur <u>milieu de culture simple</u></li><li>- un résultat non interprétable est obtenu pour certaines entérobactéries (coagulation du milieu)</li></ul>	
<b>Références</b>	Dortet et coll. J Clin Microbiol 2012 ; Nordmann et coll. Emerg Infect Dis 2012	

