



Méthode(s) (numéro et version) : Technique d'inactivation des carbapénèmes chez les entérobactéries

Section 1 – Type de méthode

- Méthode normalisée (joindre un résumé des preuves de la vérification)
- Méthode interne qualitative dite descriptive (joindre un résumé des preuves de la vérification)
- Méthode interne qualitative (poursuivre à la section 2)
- Méthode interne quantitative ou semi-quantitative (poursuivre à la section 2)

Titre : Technique d'inactivation des carbapénèmes (TIC) chez les entérobactéries selon les normes du CLSI M100-S27.

Description : La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries est en grande partie liée à la production d'une carbapénémase qui inactive les carbapénèmes ainsi que d'autres β -lactamines. Les carbapénémases se divisent en trois classes enzymatiques principales: i) La classe A des carbapénémases comportant une sérine dans leur site actif (exemple KPC, SME, IMI/NMC, GES...), ii) La classe B des métallo- β -lactamases comportant un ion zinc dans leur site actif et représentée par les enzymes IMP, VIM et NDM, et iii), la classe D des carbapénémases comportant une sérine dans leur site actif et représentée par les enzymes de type OXA-23, OXA-24, OXA-48 et OXA-58.

La technique d'inactivation des carbapénèmes est une méthode de détection phénotypique pour la recherche de carbapénémases recommandée par le CLSI (M100-S27). Cette technique repose sur une brève incubation de la souche d'entérobactérie à tester dans un tube contenant un disque de méropénème. En présence d'une carbapénémase (si la souche à tester en produit), le méropénème sera hydrolysé (détruit). À la sortie du disque du tube, il ne restera plus d'antibiotique sur le disque. Lorsque ce disque sera placé sur une géloseensemencée avec un *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible au méropénème), il y aura croissance de cette souche jusqu'au bord du disque puisque le disque ne contiendra plus d'antibiotique. Si la souche à tester ne produit pas de carbapénémase, il n'y aura pas de destruction du méropénème. Ainsi, lorsque le disque sera placé sur la géloseensemencée avec le *E. coli* ATCC 25922, il y aura une zone d'inhibition autour du disque puisque l'antibiotique sera présent et que cette souche contrôle est sensible.

Les carbapénémases de classe A (sérines carbapénémases), de classe B (métallo- β -lactamases) et de classe D (oxacillinases) sont détectées par la technique d'inactivation des carbapénémases (TIC).

Selon l'évaluation faite par le CLSI (voir p.124 du M100-S27), la spécificité du test > 99% et la sensibilité du test est > 99% pour les KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, SME et les OXA de type carbapénémases. La performance pour la détection des autres carbapénémases et des carbapénémases retrouvées chez les souches autre que les entérobactéries n'a pas été évaluée.

Ce document présente les données de validation de la technique d'inactivation des carbapénèmes chez les entérobactéries selon la méthode décrite dans le CLSI (M100-S27).

Section 2 – Sommaire de la validation

La validation de la technique d'inactivation des carbapénèmes a été effectuée en utilisant suivant les recommandations du CLSI (M100-S27). Le contrôle positif LSPQ 3998 (EPC [gène KPC]) et le contrôle négatif LSPQ 3999 (non EPC) ont été utilisés lors de la validation. Ces contrôles sont recommandés par le CLSI :

- LSPQ 3998 : ATCC BAA-1705
- LSPQ 3999 : ATCC BAA-1706

Le disque de méropénème a été contrôlé (Kirby-Bauer) en utilisant la souche *E. coli* ATCC 25922 (LSPQ 2129). Les résultats obtenus sont conformes aux valeurs attendues (28-35 mm).

CONCORDANCE, SENSIBILITÉ ET SPÉCIFICITÉ

Afin de définir la performance (concordance, sensibilité, spécificité) de la méthode, les résultats obtenus ont été comparés aux résultats obtenus par PCR. Les résultats attendus pour chaque souche testée ont été établis par les PCR conventionnelles et temps réel du LSPQ et/ou la PCR du LNM.

La liste de souches testées (n=56) ainsi que les résultats attendus et obtenus pour chaque cible sont présentés aux annexes 1, 2 et 3. La compilation des résultats pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité est présentée à l'annexe 4. La souche MA097332 (*P. mirabilis*) a dû être éliminée dans la compilation des résultats, car le «swarming» rendait le résultat non interprétable. La compilation des résultats porte donc sur 55 souches.

Concordance : Les résultats obtenus avec la TIC est identiques à ceux attendus pour les 54 des 55 souches testées, pour une concordance de 98,2%. La souche MA093091 possédant le gène GES n'a pas été trouvée positive à la TIC. Il est à noter que le gène GES est très rare au Québec (seulement 2 souches identifiées depuis 2010).

Sensibilité : Les souches pour lesquelles un résultat positif était attendu ont correctement été identifiées pour 34/35 des souches positives pour une sensibilité de 97,1%. Le gène GES n'a pas été détecté chez la souche MA093091.

Spécificité : Les souches pour lesquelles un résultat négatif était attendu ont correctement été identifiées pour 20/20 des souches non EPC pour une spécificité de 100%.

Valeur prédictive positive (VPP) :

La VPP de ce test est de 100%. Aucun faux positif n'a été obtenu.

Valeur prédictive négative (VPN) :

La VPN de ce test est de 95,2%. Un faux résultat négatif a été obtenu pour le gène GES (MA093091).

LIMITES DE L'ÉPREUVE

Certaines carbapénémases peuvent ne pas être détectées par la technique d'inactivation des carbapénémases. Certaines souches d'EPC peuvent ne pas produire assez de carbapénémases et donner un résultat faussement négatif. Un inoculum trop grand dans le tube contenant le disque de méropénème peut conduire à un résultat faussement positif. Un inoculum trop faible dans le tube contenant le disque de méropénème peut conduire à un résultat faussement négatif. L'utilisation d'un disque de méropénème expiré peut conduire à un résultat faussement positif. Certaines souches qui produisent une β -lactamase de type AmpC peuvent conduire à un faux résultat positif. Cette méthode a été validée seulement pour les entérobactéries.

CONCLUSION

Les résultats présentés démontrent que la technique d'inactivation des carbapénèmes (TIC) peut être utilisée au LSPQ pour la détection phénotypique de carbapénèmases chez les entérobactéries. La méthode sera détaillée dans la procédure PR-MA-044.

RÉFÉRENCE

CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. M100-S27.

Paramètre

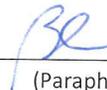
- Concordance
- Incertitude
- Justesse
- Limite de détection
- Limite de linéarité
- Limite de quantification
- Récupération
- Répétabilité
- Réplicabilité
- Sensibilité
- Seuil de détection
- Spécificité

Commentaire

Les données cumulées lors de la validation permettent de confirmer que la méthode est prête à l'emploi :

16 FEV. 2018

(Date - aaaa/mm/jj)


(Paraphe)

Vérifié par le responsable d'activité :

16 FEV. 2018

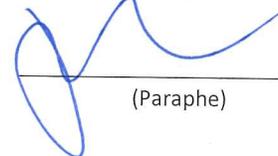
(Date - aaaa/mm/jj)


(Paraphe)

Approuvé par le cadre responsable :

2018. 2.22

(Date - aaaa/mm/jj)


(Paraphe)

Annexe 1. Évaluation de la technique d'inactivation des carbapénèmes (TIC) pour les entérobactéries selon le CLSI M100-S27

No. LSPQ	Identification	Hôpital	Gène	TIC des centres hospitaliers (selon méthode LSPQ)	TIC LSPQ *				TIC CLSI †		CMI MÉRO (mg/L) microdilutions LSPQ
					2 hrs		4 hrs		4 hrs		
					zone (mm)	Interprétation	zone (mm)	Interprétation	zone (mm)	Interprétation	
LSPQ-3998	K. pneumoniae	NA	KPC	NA	6	+	6	+	6	+	ND
LSPQ-3999	K. pneumoniae	NA	PCR –	NA	27,4	–	27,4	–	23,4	–	ND
MA104334	C. freundii	HMR	NDM	–	6	+	6	+	6	+	16 (R)
MA103301	C. freundii	Manicouagan	OXA-48	–	6	+	6	+	6	+	2 (I)
MA103302	C. freundii	Manicouagan	OXA-48	–	7	+	7	+	6	+	0,5 (S)
MA103303	C. freundii	Manicouagan	OXA-48	–	8	+	8	+	6	+	0,5 (S)
MA103347	C. freundii	Manicouagan	OXA-48	–	9	+	9	+	6	+	1 (S)
MA103644	C. freundii	Manicouagan	OXA-48	–	6	+	6	+	6	+	4 (R)
MA103710	C. freundii	Hotel Dieu-Qc	OXA-48	–	6	+	6	+	6	+	1 (S)
MA103711	C. freundii	Hotel Dieu-Qc	OXA-48	–	6	+	6	+	6	+	0,5 (S)
MA103980	E.coli	HMR	OXA-48	–	6	+	6	+	6	+	> 32 (R)
MA095140	K. pneumoniae	HGJ	KPC	ND	6	+	6	+	6	+	≤0,03 (S)
MA095215	K. pneumoniae	HGJ	KPC	ND	6	+	6	+	6	+	0,06 (S)
MA102755	Enterobacter sp.	Lakeshore	PCR –	ND	7	+	7	+	18,7	–	16 (R)

* Souche (loupe de 10 ul à partir de gélose sang incubée overnight) dans 400 ul eau, incubée avec disque de méropénème 10 ug pendant 2 et 4 hrs.

† Souche (loupe de 1 ul à partir de gélose sang incubée overnight) dans 2 ml TSB, incubée avec disque de méropénème 10 ug pendant 4 hrs.

LSPQ-3998 = BAA-1705 (contrôle positif)

LSPQ-3999 = BAA-1706 (contrôle négatif)

Essais réalisés par Simon Wong/Brigitte Lefebvre, LSPQ, 2017-01-17. Lectures effectuées le 2017-01-18 (MHA incubé 18-24 hrs 35°C).

Annexe 2. TIC pour les entérobactéries selon la méthode du CLSI (M100-S27)

Ensemencement: 2017-05-31 SW

Lecture: 2017-06-01 SW / FR

No. pour évaluation	No. LSPQ	Identification	Gène carbapénèmases	Lecture SW		Lecture FR	
				Zone (mm)	Résultat TIC	Zone (mm)	Résultat TIC
1	MA090108	E. coli	PCR négatif	24	-	24	-
2	MA090822	E. coli	PCR négatif	21	-	21,8	-
3	MA091263	E. aerogenes	PCR négatif	19	-	19,6	-
4	MA091832	E. coli	PCR négatif	24	-	24,5	-
5	MA092762	E. coli	KPC négatif **	22	-	22,5	-
6	MA092786	K. pneumoniae	KPC négatif **	21	-	21,3	-
8*	MA093091	K. pneumoniae	GES	21	-	20,6	-
10	MA093119	K. pneumoniae	KPC négatif **	23	-	23	-
12	MA095140	K. pneumoniae	KPC	6	+	6	+
13	MA095215	K. pneumoniae	KPC	6	+	6	+
14	MA095797	K. pneumoniae	VIM	6	+	6	+
15	MA095967	K. pneumoniae	VIM	6	+	6	+
16	MA096364	K. pneumoniae	PCR négatif	22	-	22,4	-
17*	MA097018	K. pneumoniae	PCR négatif	21	-	21,6	-
19	MA097079	E. cloacae	PCR négatif	22	-	21,3	-
20	MA097102	K. pneumoniae	PCR négatif	22	-	21,8	-
21	MA097205	E. cloacae	PCR négatif	22	-	22,3	-
22	MA097332	P. mirabilis	PCR négatif	Swarming	ND	Swarming	ND
23	MA097365	E. cloacae	PCR négatif	19	-	19,1	-
24	MA097460	E. cloacae	IMI	6	+	6	+
25	MA097461	E. cloacae	IMI	6	+	6	+
L-3998		Contrôle positif (KPC)		6	+	6	+
L-3999		Contrôle négatif		23	-	23,3	-
Méropénèmet†		E. coli ATCC 25922		35	NA	34,8	NA

Légende :

* f mucoide

** KPC testé seulement

† : kirby bauer effectué pour contrôle le disque. Valeur attendue entre 28 et 35 mm.

6-15 mm	TIC positif
16-18 mm avec colonies	TIC positif
16-18 mm sans colonies	TIC indéterminé
≥ 19 mm	TIC négatif

Annexe 3. TIC pour les entérobactéries selon la méthode du CLSI (M100-S27)

Ensemencement: 2017-06-07 SW

Lecture: 2017-06-08 SW / AK

No. pour évaluation	No. LSPQ	Identification	Gène carbapénèmases	Lecture SW		Lecture AK	
				Zone (mm)	Résultat TIC	Zone (mm)	Résultat TIC
26	MA097545	K. pneumoniae	PCR négatif	19	-	17	IND
27	MA097645	E. coli	PCR négatif	22	-	21	-
29	MA098153	E. aerogenes	PCR négatif	22	-	21	-
30	MA098347	E. cloacae	PCR négatif	22	-	20	-
31	MA098559	E. cloacae	IMP	6	+	6	+
32	MA098632	K. pneumoniae	PCR négatif	23	-	22	-
33	MA098934	E. cloacae	IMI	6	+	6	+
34*	MA099096	K. pneumoniae	PCR négatif	22	-	21	-
35	MA099522	E. cloacae	IMI/NMC	6	+	6	+
36	MA100316	E. cloacae	IMI/NMC	6	+	6	+
38	MA100744	C. freundii	KPC	6	+	6	+
39	MA100831	K. oxytoca	KPC	6	+	6	+
40	MA100896	S. marcescens	SME	6	+	6	+
41	MA101158	K. pneumoniae	NDM	6	+	6	+
42	MA101271	E. coli	NDM	6	+	6	+
43	MA101353	E. coli	KPC	6	+	6	+
44*	MA101354-1	K. pneumoniae	KPC	6	+	6	+
45	MA101433	S. marcescens	SME	6	+	6	+
46	MA101434	K. pneumoniae	OXA-48	12	+	6	+
47	MA101515	C. freundii	OXA-48	6	+	6	+
48	MA101531	K. pneumoniae	OXA-48	6	+	6	+
49	MA101532	E. coli	OXA-48	6	+	6	+
50	MA101610	E. gergoviae	KPC	15	+	14	+
L-3998		Contrôle positif (KPC)		6	+	6	+
L-3999		Contrôle négatif		23	-	23	-
Méropénème†		E. coli ATCC 25922		36	NA	36	NA

Légende :

* f mucoide

** KPC testé seulement

† : kirby bauer effectué pour contrôle le disque. Valeur attendue entre 28 et 35 mm.

6-15 mm	TIC positif
16-18 mm avec colonies	TIC positif
16-18 mm sans colonies	TIC indéterminé
≥ 19 mm	TIC négatif

Annexe 4. Compilation des résultats de l'évaluation de la TIC pour les entérobactéries selon le CLSI (M100-S27)

	Nb souches	Conforme	Non conforme
KPC	9	9	
NDM	3	3	
OXA-48 (famille)	12	12	
VIM	2	2	
SME	2	2	
GES	1		1
IMP	1	1	
IMI/NMC	5	5	
Négatif *	20	20	
TOTAL	55	54	1
	%	98,2	1,8

* Une souche éliminée dans la compilation des résultats, car le swarming rendait le résultat non interprétable.

Aucun faux positif obtenu. Le test est spécifique à 100%.

Un seul faux négatif obtenu avec le gène GES. Ce gène est très peu fréquent au Québec. Le test est sensible à 97,1 %.

Spécificité = nb test - / total des souches non EPC	20/20	100%
Sensibilité = nb test + / total des EPC	34/35	97,1%
VPP = nb vrai test + / total des tests +	35/35	100%
VPN = nb vrai test - / total des tests -	20/21	95,2%