

## MAST® CARBA PAcE Questions fréquentes

### A. Le produit

#### 1. Quelle utilisation du test MAST® CARBA PAcE ?

**MAST® CARBA PAcE** est un test colorimétrique rapide conçu pour identifier la production de carbapénémase sur les souches pures d'Entérobactéries, de *Pseudomonas* et d'*Acinetobacter*.

#### 2. Que détecte le test MAST® CARBA PAcE ?

Le test **MAST® CARBA PAcE** détecte la production d'enzymes carbapénémases dans les Entérobactéries, *Pseudomonas* et *Acinetobacter spp.* et contient un nouvel analogue chromogène de céphalosporine, qui est hydrolysé par les enzymes carbapénémases, produisant un changement de couleur du jaune à l'orange/rouge. Les organismes qui n'ont pas d'activité carbapénémase ne produiront pas de changement de couleur.

#### 3. Comment fonctionne le test MAST® CARBA PAcE ?

Chaque kit contient 4 flacons de culots lyophilisés (Flacon PEL) et 4 flacons de tampon de reconstitution (Flacon RB). Une fois mélangé, le tampon de reconstitution dissout rapidement le culot pour obtenir la solution active finale. Cette solution est aliquotée dans les tubes fournis dans le kit et les colonies bactériennes isolées sont ajoutées et agitées pour produire une suspension trouble. Après incubation à 35°C ± 1°C pendant 10 minutes, la couleur est observée. Un changement de couleur du jaune à l'orange ou au rouge indique la présence de carbapénémases.

#### 4. Quelles souches produisent des carbapénémases ?

Les souches d'Entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii* produisent des enzymes carbapénémases et peuvent être dépistées avec le test **MAST® CARBA PAcE**.

#### 5. Quelle taille/densité d'inoculum est nécessaire pour obtenir de bons résultats avec le test MAST® CARBA PAcE ?

Il est recommandé de prélever une anse de 1 à 5 µl (voir figure 1) d'une culture pure fraîche (≤24 heures) sur un milieu de culture solide non sélectif. L'inoculum bactérien doit être vortexé pendant au moins 20 secondes pour donner une suspension homogène et trouble équivalente à 3,0 à 3,5 McFarland (environ 10<sup>9</sup> UFC/mL). Le fait de ne pas utiliser une densité de l'inoculum suffisante ou de ne pas assurer une suspension homogène peut entraîner des résultats faussement négatifs.

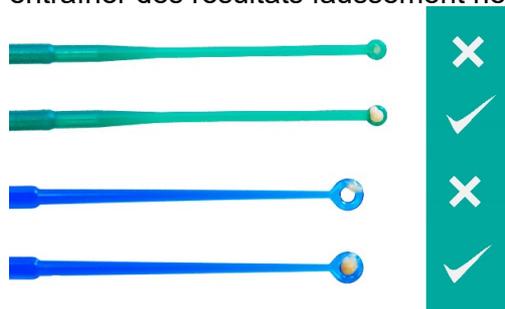


Figure 1 - Quantité prélevée recommandée - l'anse verte est une anse de 1 µL, et l'anse bleue est une anse de 5 µL.



Figure 2 – Représentation d'une suspension équivalente à 3,0 - 3,5 McFarland

## 6. Puis-je utiliser le test MAST<sup>®</sup> CARBA PAcE si la souche à tester produit des pigments colorés ?

Comme il s'agit d'un test colorimétrique, il n'est pas recommandé d'utiliser le test **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE avec des souches qui produisent des pigments fortement colorés tels que les souches du genre *Serratia*. Il est recommandé de vérifier la couleur de la solution immédiatement après inoculation ; si elle n'est pas jaune, le test doit être arrêté. Les souches *Pseudomonas* peuvent donner une couleur jaune/verte, ce qui est acceptable, et un résultat positif peut être clairement distingué. La figure 3 ci-dessous montre deux témoins négatifs *Acinetobacter Iwoffii* ATCC<sup>®</sup> 15309, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 25668 de gauche à droite. Conformément à la notice d'utilisation, il est conseillé d'effectuer des contrôles internes positifs et négatifs.

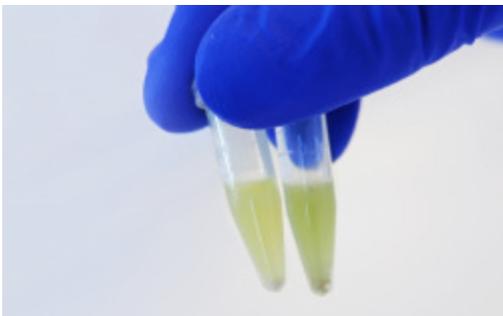


Figure 3 – Contrôles négatifs *Acinetobacter Iwoffii* ATCC<sup>®</sup> 15309 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC<sup>®</sup> 25668 (de gauche à droite)

## 7. Puis-je utiliser le test MAST<sup>®</sup> CARBA PAcE avec des colonies de milieux de culture sélectifs, différentiels ou chromogènes ?

Le test **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE est adapté aux tests utilisant des souches cultivées sur des géloses non sélectives et riches en éléments, y compris la gélose Columbia avec ou sans sang de cheval, et la gélose au chocolat. Les résultats d'études internes montrent que les souches prélevées sur un milieu gélosé contenant un indicateur de pH pour la différenciation de la couleur des colonies, par exemple la gélose MacConkey, ne sont pas compatibles et nécessitent une sub culture sur une gélose nutritive non sélective avant d'effectuer le test.

Six milieux chromogènes commerciaux ont été testés. Certains milieux ont donné un nombre élevé de résultats incorrects et seulement deux ont été jugés acceptables. Un autre test est actuellement en cours avec deux autres milieux chromogènes, dont les résultats seront mis à jour dans ce document. Le conseil actuel est d'utiliser des souches prélevées à partir de milieux non sélectifs. Il est déconseillé d'utiliser des géloses différentielles, sélectives ou chromogènes.

### 8. Peut-on lire les résultats obtenus avec le test **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE si les tests ont été laissés sur la paillasse pendant plus de 20 minutes après incubation ?

Il n'est pas recommandé de lire les résultats plus de 20 minutes après l'incubation car la couleur peut commencer à changer et entraîne un risque de résultats faussement positifs ou faussement négatifs.

### 9. Quels sont les limites du test **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE ?

Le test **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE est seulement destiné à identifier la production de carbapénémase et ne peut faire la différence entre les différents types de carbapénémases. S'il est nécessaire d'identifier la carbapénémase produite, il est recommandé d'effectuer un test complémentaire, tel que le test **MASTDISCS**<sup>®</sup> *Combi Carba Plus* (D73C) ou un test de biologie moléculaire.

Le test **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE ne peut pas être réalisé avec des colonies bactériennes prélevées sur gélose sélective, différentielle ou chromogène. Les souches produisant des pigments fortement colorés ne peuvent pas être testées avec **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE.

La production de certaines bêta-lactamases peut entraîner des résultats faussement positifs, comme par exemple la K1  $\beta$ -lactamase de *Klebsiella oxytoca*. Certaines carbapénémases de type GES peuvent être difficiles à détecter.

Les résultats obtenus avec cette trousse doivent être combinés à d'autres données cliniquement pertinentes lors du diagnostic d'une infection.

Ne pas mélanger des flacons de différents lots afin d'éviter des résultats potentiellement erronés.

### 10. Quelle est la présentation ?

Chaque kit de 48 tests contient 4 flacons PEL et 4 flacons RB.

### 11. Quelle est la durée de conservation et de stockage du kit **MAST**<sup>®</sup> CARBA PAcE ?

La durée de conservation est de 12 mois à une température de 2°C à 8°C. Une fois reconstituée, la solution test doit être conservée entre 2°C et 8°C et utilisée dans les quatre semaines. S'assurer que la solution reconstituée est clairement identifiée avec sa date d'expiration.

## B. Les mécanismes de résistance

### 1. Que sont les carbapénémases ?

Les carbapénémases sont un groupe diversifié d'enzymes ( $\beta$ -lactamases) dont la capacité à hydrolyser les carbapénèmes et autres  $\beta$ -lactames varie. Ils sont actifs contre les oxyimino-céphalosporines, les céphamycines et les carbapénèmes. Les enzymes carbapénémases peuvent être acquises par transmission ou chromosomiques. Les carbapénémases appartiennent à plusieurs classes Ambler - classes A, B et D.

Les enzymes de classe A inactivent le cycle  $\beta$ -lactame au moyen d'un résidu sérine catalytiquement actif dans le site actif enzymatique. Ils sont inhibés par le clavulanate (divers degrés d'inhibition), le tazobactam et les acides boroniques et hydrolysent habituellement les céphalosporines ou la pénicilline plus efficacement que les carbapénèmes. Cette classe d'enzymes comprend les KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapénémases), IMI, SME, NMC-A et GES. Elles sont couramment produites par des membres des Entérobactéries mais ont également été détectées chez *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les enzymes de classe B sont connues sous le nom de Metallo-lactamases (MBL) et peuvent hydrolyser efficacement les carbapénèmes mais pas l'aztréonam. Ils ont besoin de zinc comme cofacteur métallique pour leur activité catalytique et sont inhibés par des agents chélatants comme l'EDTA. Les MBL comprennent les familles IMP, VIM, NDM et SPM-1, et ont été détectées chez *P. aeruginosa*, les souches d'Entérobactéries et *A.baumannii*.

Les enzymes de classe D qui ont un résidu sérine actif hydrolysent faiblement les carbapénèmes et sont inhibés faiblement par le clavulanate. Les enzymes de classe D qui appartiennent à la famille des OXA et sont le plus souvent produites par *Acinetobacter spp.* mais ont également été identifiées chez *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*.

## 2. Quels sont les pays touchés par les carbapénémases ?

Les carbapénémases sont un problème mondial dont l'incidence est élevée dans plusieurs régions telles que l'Amérique du Sud, les États-Unis, l'Asie et l'Europe.

## 3. Quelle est l'incidence au Royaume-Uni ?

Un rapport publié par la Health Protection Agency en octobre 2016 a montré une augmentation du nombre de souches confirmées positives pour la carbapénémase au Royaume-Uni, passant de trois souches en 2003 à 1893 souches en 2015.

## 4. Qu'est-ce qu'une MBL ?

Les métallo-β-lactamases font partie des enzymes β-lactames de classe B ; malgré une grande diversité de séquences au niveau des acides aminés, elles partagent trois propriétés fonctionnelles distinctes. Elles sont capables d'hydrolyser les carbapénèmes inhibés par des agents chélatants comme l'EDTA. Elles sont incapables d'inactiver l'aztréonam, car les MBL B1 se lient aux monobactames ayant une très faible affinité et le positionnement du médicament dans le site actif de la MBL ne favorise pas son hydrolyse. Les MBL peuvent être à médiation chromosomique ou codées par des gènes transférables. En raison du séquençage moléculaire, on trouve de plus en plus de gènes à médiation chromosomique, mais ils ont tendance à être présents dans des bactéries non cliniques obscures.

## 5. Qu'est-ce qu'une KPC ?

Les carbapénémases des KPC ou de *Klebsiella pneumonia* appartiennent à la classe A Ambler. Un résidu de sérine sur site actif en position 70 (selon le système Ambler) est nécessaire pour l'hydrolyse. Elles se caractérisent par une sensibilité réduite à l'imipénème et sont inhibées par le clavulanate, le tazobactam et les acides boroniques. Les KPC sont capables d'hydrolyser une large gamme de β-lactames, notamment les pénicillines, l'aztréonam, les carbapénèmes et les céphalosporines. Les KPC peuvent être différenciées de l'autre membre du groupe des enzymes 2f (classe A Ambler) qui représente une proportion notable des carbapénémases utilisant la sérine sur le site actif, par deux caractéristiques. La séquence des enzymes KPC se trouve sur les plasmides transférables et peut hydrolyser les céphalosporines aminothiazoleoxime, par exemple le céfotaxime. En raison de leur localisation sur des plasmides transférables, les KPC ont le plus grand potentiel de propagation et *K.pneumoniae* est connu pour sa capacité à transférer et à accumuler les déterminants de résistance.

## 6. Qu'est-ce qu'une carbapénémase de type OXA-48 ?

Les carbapénémases de type OXA-48 appartiennent à la classe D Ambler et contiennent un site actif de sérine. Celles-ci ont un spectre plus large d'activité sur les substrats que les enzymes AmpC. Les enzymes de type OXA-48 hydrolysent les aminopénicillines, les uréidopénicillines et les carbapénèmes de bas niveaux de concentrations, mais n'hydrolysent pas significativement les céphalosporines à spectre large.

Les carbapénémases de type OXA-48 sont intrinsèquement difficiles à détecter en raison de leur faible résistance et de l'absence d'inhibiteurs spécifiques.

## **7. Pourquoi est-il important de détecter les carbapénémases ?**

Il est important de détecter les carbapénémases car la majorité des bactéries productrices de carbapénémases sont extrêmement résistantes aux médicaments et la détection précoce est importante pour prévenir la propagation. Les entérobactéries sont transportées dans la flore intestinale et sont donc hautement transmissibles lorsque les patients ont la diarrhée ou une forte dépendance vis-à-vis des professionnels de santé. Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) ont souvent des gènes qui confèrent une résistance à d'autres agents antimicrobiens, ce qui limite le choix thérapeutique. Des souches productrices de KPC résistantes ont été signalées dans le monde entier et certaines ERC ont été associées à des taux de mortalité élevés.

Les infections causées par ERC sont à déclaration obligatoire dans certaines régions du monde.

## **8. Pourquoi est-il important de dépister les carbapénémases ?**

Bien que les tests de sensibilité aux antimicrobiens puissent identifier les souches ayant une sensibilité réduite aux carbapénèmes, cette méthode manque de spécificité car certaines carbapénémases (comme les enzymes de type OXA-48) causent une faible résistance qui ne peut être détectée par ces tests. L'absence de dépistage des carbapénémases, peut entraîner l'échec du traitement. Le dépistage des carbapénémases est également important d'un point de vue épidémiologique car les enzymes carbapénémases sont souvent codées sur des éléments génétiques mobiles hautement transmissibles comme les plasmides. Une détection précoce peut permettre de mettre en œuvre les mesures appropriées de lutte contre les infections afin de limiter leur dissémination. Le dépistage permet de différencier les souches productrices de carbapénémase des souches résistantes aux carbapénèmes par un mécanisme alternatif (par exemple, la perte de porine en combinaison avec la régulation ascendante de la pompe à efflux), ces dernières ayant une importance épidémiologique moindre.