|  |
| --- |
| **PROCÉDURE OPÉRATIONELLE NORMALISÉE Secteur** |
| **Dépistage des BGNPC à partir du protocole du CDC** |  |

1. **Objectif / but de l’analyse :**

Le but de cette procédure est de décrire le traitement des échantillons soumis au laboratoire de microbiologie pour la détection d’*Enterobacteriaceae* producteurs de carbapénémases (EPC) à l'aide du protocole du CDC.

1. **Principe de la méthode / contexte / domaine d’application :**

Les carbapénémases sont des β-lactamases capables d’hydrolyser les carbapénèmes. On retrouve plusieurs types de carbapénémases comme les KPC, les VIM, les NDM et les OXA. Ces enzymes sont souvent retrouvées chez plusieurs *Enterobacteriaceae*, mais les éclosions ont surtout été rapportées pour les *E. coli* et les *Klebsiella* spp. Ces souches sont souvent multirésistantes. Le système gastro-intestinal est un réservoir chez les patients colonisés par ces bactéries. La détection de l’état de porteur permet de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle des infections afin de limiter leur propagation dans le milieu hospitalier.

La méthode utilisée pour le dépistage repose sur l'utilisation d'un bouillon sélectif, puis d'une sous-culture sur gélose MacConkey. La présence d’un carbapénème dans le bouillon inhibe les souches sensibles à ces antibiotiques. L'utilisation d'un disque d'antibiotique sur la gélose MacConkey permet de diminuer le nombre de colonies travaillées.

À cause de la faible prévalence de ces souches au Québec, il n'y a pas eu d'évaluation locale des différentes méthodes de dépistage. Un article récemment publié dans le Clinical Microbiology Review présente les caractéristiques de performance des principales méthodes disponibles. Le tableau relatif au dépistage sur les échantillons rectaux est présenté à l'annexe 1. Le protocole du CDC offre une sensibilité légèrement inférieure aux méthodes utilisant les géloses chromogéniques et un délai de réalisation de l'analyse (turn-around time) un peu plus long. Cependant, il offre l'avantage que le matériel nécessaire à sa réalisation est facilement disponible dans tous les laboratoires. Dans un souci d'accélérer la réalisation de l'analyse, certains laboratoires ont décidé d'ensemencer directement l'échantillon sur la gélose MacConkey au lieu de passer par l'étape du bouillon sélectif. Les performances de sensibilité et de spécificité de cette méthode ne sont pas connues.

Dans le contexte de ce document, les termes BGNPC et EPC sont interchangeables.

1. **Définitions / abréviations / acronymes :**

BGN: Bâtonnet Gram négatif

BGNPC: Bâtonnet Gram négatif producteur de carbapénémase

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CQ : Contrôle de qualité

EPC: *Enterobacteriaceae* producteurs de carbapénémases

ERC: *Enterobacteriaceae* résistants aux carbapénèmes

ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine.

GS : Gélose sang

McC : Gélose MacConkey

TSB: Trypticase soy broth

1. **Responsabilités :**

Les technologistes sont responsables de générer des résultats de qualité conformes à cette procédure.

Les microbiologistes-infectiologues sont responsables de s'assurer qu'une procédure à jour existe ainsi que d’en valider les résultats

1. **Énoncé / système de fonctionnement :**
	1. **Spécimen :**
		1. **Prélèvement et transport:**
			1. L’écouvillonnage rectal est l’échantillon privilégié pour le dépistage des BGNPC.
			2. La recherche de BGNPC ne peut pas se faire sur le même écouvillon que celui prélevé pour la recherche d’ERV. Il faut donc soumettre un deuxième écouvillon.
			3. La recherche de BGNPC peut également se faire sur une selle transportée dans un contenant stérile sans milieu de transport.
			4. La recherche d’BGNPC peut se faire également sur la gorge, l’urine, les plaies, les pourtours de stomies ou de cathéters.
			5. Identifier l’écouvillon/l’échantillon et la requête selon la procédure en vigueur.
			6. Transporter l’échantillon en moins de 24 heures à la température de la pièce.
		2. **Réception du spécimen et critères de rejet :**
			1. Selon les procédures propres à chaque laboratoire.
			2. Il est recommandé de noter sur le rapport s'il y a une absence de selles visibles sur l'écouvillon rectal.
				1. On rejettera les écouvillons qui ne sont pas visiblement souillés de selles.
	2. **Matériel et réactifs :**
		1. Disques d'ertapénème 10 μg
		2. Disques de méropénème 10 μg
		3. Gélose MacConkey
		4. Matériel nécessaire à l'identification bactérienne et à la réalisation de l'antibiogramme.
		5. Pinces stériles
		6. Réactif d'oxydase
		7. Réactifs pour coloration de Gram
		8. Règle
		9. Tubes de 5 mL de bouillon TSB
	3. **Matériel et procédures de contrôle de la qualité :**

Voir la procédure sur le contrôle de qualité des milieux de culture propre à chaque laboratoire. Utiliser la souche contrôle *K. pneumoniae* ATCC BAA1705 comme contrôle positif et la souche de *K. pneumoniae* ATCC 700603 comme contrôle négatif.

* 1. **Étapes / procédure analytique :**
		1. **Examens directs :**
			1. Ne s'applique pas
		2. **Ensemencement :**
			1. Placer de façon stérile un disque de 10 μg d'ertapénème dans 5 mL de TSB.
			2. Inoculer immédiatement le bouillon avec l'écouvillon rectal ou l'échantillon.
			3. Incuber jusqu'au lendemain à 35±2oC à l'air ambiant.
			4. Le lendemain, vortexer le bouillon et transférer 100 μL du bouillon sur une gélose McC.
			5. Étaler le bouillon pour obtenir des colonies isolées.
			6. Placer un disque de méropénème entre le premier et le deuxième quadrant, ainsi qu'entre le deuxième et le troisième.
			7. Incuber jusqu'au lendemain à 35±2oC à l'air ambiant.
		3. **Identification :**
			1. Les colonies qui poussent à l’intérieur d’une zone de moins de 34 mm de diamètre («zone suspecte») autour d’au moins 1 des deux disques sont suspectes pour la production d’une carbapénémase (« colonies suspectes »).
			2. Repiquer chaque morphotype différent de ces colonies suspectes sur GS, sans égard au disque autour duquel elles poussent. Ceci signifie que des colonies identiques qui poussent à l’intérieur de la «zone suspecte» des deux disques doivent être repiquées une seule fois.
			3. Effectuer une oxydase à partir de la GS. Si elle est positive, on ne procèdera pas plus loin.
			4. Procéder à l’identification de tous les BGN oxydase négative selon la procédure en vigueur dans votre laboratoire.
		4. **Épreuves de sensibilité :**
			1. Les souches d'entérobactéries doivent être soumises à un antibiogramme selon la procédure en vigueur dans votre laboratoire. Cet antibiogramme devrait inclure le méropénème. L'utilisation de l'ertapénème est nécessaire dans certaines circonstances (voir l'annexe 2).
			2. Les souches d'entérobactéries qui répondent aux critères de l'algorithme du LSPQ présenté à l'annexe 2 doivent être envoyée au LSPQ pour confirmation à moins que le patient soit connu porteur d’un BGNPC de la même espèce. En cas d’une nouvelle espèce, procéder à l’antibiogramme et à l’envoi au LSPQ comme s’il s’agissait d’un nouveau cas.
			3. Il est également recommandé d'effectuer un TIC selon la procédure appropriée sur les souches envoyées au LSPQ.
			4. Toutes les souches envoyées au LSPQ pour confirmation doivent être conservées selon la procédure en vigueur.
	2. **Sources potentielles de variation des résultats :**
		+ Certaines souches d'EPC peuvent avoir des CMI au méropénème inférieures à 0.25 mg/L (faux négatifs possibles). Ces situations sont par contre rares.
		+ Certaines souches d’*Enterobacteriaceae* peuvent avoir des CMI ≥ 2 mg/L pour l’imipénème ou le méropénème sans être productrices de carbapénémases. Il s'agit habituellement d'hyperproducteurs d'ampC combinés à une perte de porine.
		+ Le délai entre l'acquisition d'une souche de BGNPC et son recouvrement dans les selles n'est pas bien connu. Un résultat peut être faussement négatif si l'échantillon est prélevé trop tôt après l'acquisition.
	3. **Interprétation et rapport:**
		+ **Résultat négatif final:**
			- Absence de colonie dans la zone suspecte des disques de méropénème.
			- Colonies d'entérobactéries qui ne répondent pas aux critères de dépistage du LSPQ.
			- Libellé du rapport: Recherche de bâtonnet Gram négatif producteur de carbapénémase (BGNPC) : négative.
		+ **Résultat préliminaire positif d’un patient non connu porteur:**
			- Une souche d’*Enterobacteriaceae* qui répond aux critères de dépistage du LSPQ et dont on attend le test de confirmation.
			- Libellé du rapport: Présence de [*Genre et espèce*] SANS antibiogramme. Ajouter le commentaire: «Sur la base de l'antibiogramme, cette souche pourrait être productrice d'une carbapénémase (BGNPC). Souche envoyée au LSPQ pour confirmation.»
			- À cette étape, si le TIC a donné un résultat positif, il est fortement recommandé d'aviser le service de contrôle et de prévention des infections si cela n'a pas été fait.
		+ **Résultat final pour une enterobactérie d’un patient non connu porteur:**
			- Si la souche est confirmée positive pour un gène codant pour une carbapénémase par le LSPQ, le libellé du rapport sera:
				* Présence de [*Genre et espèce*]
				* Ajouter le commentaire: «Cette souche produit une carbapénémase de type [gène du LSPQ]. Confirmation effectuée au LSPQ.»
				* La décision de rapporter ou non l'antibiogramme revient à chaque laboratoire
			- Si les résultats du LSPQ ne confirment pas la présence d'une carbapénémase, le libellé du rapport sera:
				* Présence de [*Genre et espèce*] SANS antibiogramme. Les analyses effectuées au LSPQ ne démontrent pas la présence d'une carbapénémase. ABSENCE de BGNPC.
		+ **Résultat final d’un patient connu porteur d’une souche productrice de carbapénémase**:
			- Une souche de la même espèce que celle rapportée positive antérieurement et qui répond aux critères de dépistage du LSPQ (même si l'ensemble de l'antibiogramme n'est pas identique au précédent).
			- Libellé du rapport: Recherche de bâtonnet Gram négatif producteur de carbapénémase (BGNPC) : POSITIVE. Cas connu.
	4. **Valeurs d’alertes ou critiques :**

La croissance d'une souche de BGNPC est une valeur épidémiologique urgente qui doit être rapportée immédiatement au microbiologiste de garde au laboratoire, au service de prévention et de contrôle des infections (SPCI) et à l'unité de soins concernée si le patient est hospitalisé.

* 1. **Validation par un microbiologiste-infectiologue:**

Tous les rapports positifs doivent être validés par le microbiologiste-infectiologue de garde au laboratoire.

* 1. **Acheminement du rapport:**
		+ Selon la procédure de votre laboratoire.
	2. **Précautions / mesures de sécurité :**

Les bonnes pratiques de laboratoire s'appliquent lors du traitement de ces échantillons.

1. **Politiques / procédures / formulaires / documents associés :**
* Selon les procédures de votre laboratoire.
1. **Références :**

Blackburn J., Tsimiklis C., Lavergne V., Pilotte J., Grenier S., Gilbert A., Lefebvre B., Domingo M.C., Tremblay C., Bourgault A.M. Carbapenem Disks on MacConkey Agar in Screening Methods for Detection of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Rods in Stools. JCM January 2013 pp 331-333

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Sixth edition. January 2016. Clinical And Laboratory Standards Institute document M100-S26.

Viau R et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. 2016;29:1.

1. **Diffusion :**

Selon les procédures de votre laboratoire.

1. **Version :**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Versions** | **Date** | **Auteurs** | **Modifications**  |
| 1.0  | 2016-07-01 | Christian Lavallée | Création |
|  |  |  |  |

ANNEXE 1: Caractéristiques de performance de différentes géloses pour le dépistage de BGNPC



Viau R et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. 2016;29:1.

**ANNEXE 2: Algorithme pour les laboratoires qui ne peuvent pas distinguer de routine les souches avec une CMI méropénème de 0,25 mg/L**

*N.B.: À l'exception des patients déjà connus porteurs d'une entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC), toutes les souches d'entérobactéries avec une CMI au méropénème ≥ 0,25 mg/L (ou une zone d'inhibition pour le méropénème de ≤ 24 mm) doivent être envoyées au LSPQ. L'algorithme suivant s'adresse aux laboratoires qui ne peuvent pas détecter de routine les souches avec une CMI de 0,25 mg/L*



Cet algorithme se base sur les seuils de résistance aux antibiotiques exposés dans le document suivant :

European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). Version 1.0. Décembre 2013. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Document disponible à l’adresse suivante : <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_>

detection\_of\_resistance\_mechanisms\_v1.0\_20131211.pdf