



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2013/07/29
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2014/01/30
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2021/06/08
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2014/12/29
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2013/051819
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2014/016534
(30) Priorité/Priority: 2012/07/27 (FR1257324)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/04* (2006.01),
C12Q 1/10 (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
DEVIGNE, LAURENCE, FR;
GHIRARDI, SANDRINE, FR;
ZAMBARDI, GILLES, FR
(73) Propriétaire/Owner:
BIOMERIEUX, FR
(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE BACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES DE TYPE OXA-48
(54) Title: METHOD OF DETECTING OXA-048 CARBAPENEMASE PRODUCING BACTERIA

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention porte sur un procédé de détection et/ou d'identification spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à: a)mettre en contact l'échantillon biologique susceptible de contenir lesdites bactéries avec un milieu réactionnel comprenant au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique, et de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, de préférence comprise entre 200 et 500 mg/L, b)incuber l'ensemble de façon à permettre la croissance des bactéries, et c)détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48. L'invention porte également sur un milieu de culture tel que mis en oeuvre à l'étape a).

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
30 janvier 2014 (30.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/016534 A1(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/10 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2013/051819(22) Date de dépôt international :
29 juillet 2013 (29.07.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1257324 27 juillet 2012 (27.07.2012) FR(71) Déposant : BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy
L'etoile (FR).(72) Inventeurs : DEVIGNE, Laurence; 45 place de l'Eglise,
F-01150 Vaux en Bugey (FR). GHIRARDI, Sandrine; 16
rue du château d'eau, F-69290 Saint Genis les Ollières
(FR). ZAMBARDI, Gilles; 10 Impasse Pré Guillaud, F-
38300 Chezeuville (FR).(74) Mandataire : BLOND, Jean-Luc; BioMérieux, Dpt Pro-
priété Industrielle, chemin de l'Orme, F-69280 Marcy
L'etoile (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : METHOD OF DETECTING OXA-048 CARBAPENEMASE PRODUCING BACTERIA

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE BACTERIES PRODUCTRICES DE CARBAPENEMASES DE TYPE OXA-048

(57) Abstract : The present invention relates to a method of detecting and/or specific identification of bacteria producing OXA-048-type carbapenemase in a biological sample, comprising the steps consisting of: a) placing the biological sample likely to contain said bacteria in contact with a reaction medium comprising at least one chromogenic substrate to detect an enzymatic activity, and temocillin at a concentration equal to or greater than 150 mg/L, preferably between 200 and 500 mg/L, b) incubating said sample in the medium to allow the bacteria to grow, and c) detecting the strains corresponding to the OXA-48 carbapenemase producing bacteria. The invention also relates to a culture medium as implemented in step a).

(57) Abrégé : La présente invention porte sur un procédé de détection et/ou d'identification spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à: a) mettre en contact l'échantillon biologique susceptible de contenir lesdites bactéries avec un milieu réactionnel comprenant au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique, et de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, de préférence comprise entre 200 et 500 mg/L, b) incubier l'ensemble de façon à permettre la croissance des bactéries, et c) détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48. L'invention porte également sur un milieu de culture tel que mis en œuvre à l'étape a).



WO 2014/016534 A1

Procédé de détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48

La présente invention se rapporte au domaine de l'analyse microbiologique. Plus
5 spécifiquement, elle porte sur un procédé de détection et/ou d'identification de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48.

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques de type beta-lactamines, tels les
pénicillines et les céphalosporines, rend complexe le traitement des infections causées par
10 des souches de bactéries Gram négatives. Ces antibiotiques sont alors remplacés par d'autres antimicrobiens à large spectre. Parmi ces antimicrobiens à large spectre, les carbapénèmes ont pris une place importante, en particulier pour traiter des patients hospitalisés. Les carbapénèmes sont actifs contre la majorité des bactéries aérobies Gram positives et Gram négatives ainsi que contre certaines bactéries anaérobies.

15 Cependant, de plus en plus de souches résistantes aux carbapénèmes apparaissent chez des patients hospitalisés. Et il est primordial de détecter rapidement les souches présentant une activité carbapénémase pour instaurer le cas échéant une antibiothérapie permettant de traiter une infection de façon appropriée, et pour identifier les patients porteurs afin de
20 diminuer le risque de propagation de ces souches dans les centres de soins..

La nomenclature des bêta-lactamases, enzymes bactériennes de résistance aux beta-lactamines, n'est pas complètement standardisée. Elles sont soit classées en quatre classes moléculaires (A à D) sur la base de leur structure primaire (classification d'Ambler), soit en
25 groupes fonctionnels sur la base des substrats ciblés et de leur résistance aux inhibiteurs (pour une revue, voir Bush and Jacoby, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010 ; 54 (3) : 969-976).

Les bactéries concernées par la résistance aux carbapénèmes sont, de façon non
30 exhaustive, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, *Comamonas sp.*, *Aeromonas sp.*, *Morganella morganii*, *Enterococcus sp.*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella senftenberg*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* etc.

35 Ces bactéries peuvent produire différents types de beta-lactamases capables d'hydrolyser les carbapénèmes, ou carbapénémases. Les carbapénémases sont des beta-lactamases à

très large spectre, capables d'inactiver presque la totalité des beta-lactamines. elles sont schématiquement réparties en trois classes selon la classification d'Ambler :

- la classe A, également appelée sérine-carbapénémase, se caractérise par une inhibition variable par l'acide clavulanique et les dérivés d'acide boronique. Le principal représentant est l'enzyme KPC ;
- la classe B, également appelée métallo-carbapénémase, se caractérise par une inhibition par des agents chélateurs de cations tels que l'EDTA. Les principaux représentants sont les enzymes NDM, VIM et IMP ;
- la classe D, qui correspond aux beta-lactamases de type OXA, parmi lesquelles figure le variant OXA-48 qui a la particularité de posséder une activité carbapénémase. D'autres variants dérivés par mutation ponctuelle d'OXA-48 existent, bien que moins fréquents, et conservent cette activité carbapénémase. On citera OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204 et OXA-232.

Les metallo-beta-lactamases (dont l'abréviation anglo-saxonne est MBLs) et les *Klebsiella pneumoniae* carbapénémase (KPC) sont prévalentes chez les entérobactéries plus particulièrement en Amérique du Nord, Amérique du Sud, Israël, Italie, Grèce, Inde, Chine et Pakistan. L'oxacillinase-48 (OXA-48) a été récemment isolée en Turquie, dans le bassin méditerranéen et en Europe de l'Ouest.

Les gènes de carbapénémases sont susceptibles d'être présents dans les chromosomes et/ou dans des plasmides. Du fait de cette présence sous forme de plasmides, ces résistances de type enzymatiques sont susceptibles de disséminer de façon très importante et présentent, en conséquence, un risque majeur en terme d'épidémiologie.

Pour détecter et/ou identifier des souches résistantes aux carbapénèmes, il est possible d'utiliser des techniques de biologie moléculaire qui sont très sensibles et présentent l'avantage de permettre une identification rapide des souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases. Cependant, ces méthodes sont coûteuses, complexes, et ne sont pas disponibles en routine dans la plupart des laboratoires.

Pour cribler, détecter et/ou identifier des entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC), des méthodes basées sur la culture sont bien connues de l'homme de l'art. Elles reposent séquentiellement sur un isolement sur un milieu conventionnel de type Mac-Conkey agar ou en bouillon trypticase soja rendu sélectif par l'ajout d'un carbapénème ou après la réalisation d'un antibiogramme montrant une non sensibilité à un carbapénème. Le cas échéant, des disques imprégnés d'un carbapénème ou des bandelettes de type Etest®

(bioMérieux) peuvent être utilisés. La confirmation de la présence de carbapénémase par des tests complémentaires est nécessaire, tests parmi lesquels on citera : le test de Hodge modifié (CLSI M100-S22: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. January 2012. Supplemental Table 2A-S2), des tests de synergie par diffusion (ou disques combinés) en gélose, employant des inhibiteurs combinés au carbapénème, par exemple l'EDTA pour les carbapénémases de classe B, l'acide phenyl-boronique pour la détection des carbapénémases de classe A. La société Rosco propose une méthode multi-disques permettant de détecter des bactéries productrices de carbapénémases à partir de souches isolées (BioConnections KPC + MBL Confirm ID kit) et suggère d'ajouter un disque comprenant 30 µg de témocilline pour détecter la présence d'une enzyme OXA-48. Cependant, ce test montre que la témocilline n'inhibe pas l'ensemble des souches KPC, AmpC et MBL donc ne permet pas à elle seule une détection spécifique des souches OXA-48.

Ainsi, cet état de la technique ne permet pas la détection spécifique des EPC OXA-48 et nécessite un délai de réponse long, de trois jours. De plus, ces techniques sont mal adaptées à la recherche des CPE dans des prélèvements de selles ou rectaux qui sont utilisés pour la recherche de portage dans le cadre de la prévention des infections à bactéries multi-résistantes.

D'autres méthodes utilisent des milieux chromogènes commerciaux tels le milieu Brilliance CRE (Oxoid®), le milieu CHROMagar® KPC (CHROMagar™, Paris, France), le milieu équivalent Colorex KPC (Biomed Diagnostics Inc.), ou les milieux de la Demanderesse chromID® ESBL ou chromID® CARBA. Ce dernier milieu s'avère capable de détecter une souche OXA-48 de référence mais à condition que l'inoculum soit important (environ 10⁷ CFU/ml). Un autre milieu (Super Carba (Nordmann *et al.*, 2012, J. Clin. Microbiol., *in press*)) a été décrit, qui permet une détection fiable des EPC productrices d'OXA-48, sans toutefois permettre leur identification, ni une détection spécifique car les bactéries produisant d'autres types de carbapénémases ne sont pas inhibées. De plus, ce milieu présente l'inconvénient d'une très courte péremption (environ une semaine) qui limite fortement son utilisation en routine et son industrialisation.

Ainsi, aucune de ces méthodes n'est à la fois suffisamment sensible, spécifique et rapide pour la détection des souches OXA-48 et aucune solution d'amélioration n'a été proposée. La détection des souches OXA-48 présentant un réel intérêt clinique et épidémiologique, il reste à pallier les inconvénients des milieux existants dans ce domaine.

A cet égard, la présente invention porte sur un procédé de détection et/ou d'identification spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :

- 5 a) mettre en contact l'échantillon biologique, susceptible de contenir lesdites bactéries, avec un milieu réactionnel comprenant de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, de préférence comprise entre 200 et 500 mg/L, et un substrat chromogène permettant la détection d'une activité enzymatique spécifique,
- b) incuber l'ensemble de façon à permettre la croissance des bactéries, et
- 10 c) détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48.

La présente invention porte également sur un procédé de détection spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :

- a) mettre en contact l'échantillon biologique avec un milieu réactionnel comprenant au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique, de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, et un agent chélatant des cations divalents,
- 20 b) incuber le dit milieu réactionnel obtenu à l'étape a) de façon à permettre la croissance des bactéries, et
- c) détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48.

25 La présente invention porte également sur un procédé de détection spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :

- a) mettre en contact l'échantillon biologique avec un milieu réactionnel comprenant au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique, de la
- 30 témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L,
- b) incuber le dit milieu réactionnel obtenu à l'étape a) de façon à permettre la
- 35 croissance des bactéries, et
- c) détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48.

La présente invention porte également sur un procédé de détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 et/ou de bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :

- 5 a) mettre en contact l'échantillon biologique avec un premier milieu réactionnel comprenant au moins un premier substrat chromogène permettant de détecter une première activité enzymatique et de la témocilline à une concentration supérieure à 150 mg/L, et un agent chélatant des cations divalents, et séparément, avec un deuxième milieu réactionnel comprenant au moins un deuxième substrat chromogène permettant de détecter une deuxième activité enzymatique et un
 - 10 carbapénème,
 - b) incuber séparément lesdits milieux réactionnels obtenus à l'étape a) de façon à permettre la croissance des bactéries, et
 - c) détecter les souches correspondant aux bactéries résistantes aux carbapénèmes
 - 15 et/ou productrices de carbapénémases de type OXA-48.

La présente invention porte également sur un procédé de détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 et/ou de bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :

- 20 a) mettre en contact l'échantillon biologique avec un premier milieu réactionnel comprenant au moins un premier substrat chromogène permettant de détecter une première activité enzymatique et de la témocilline à une concentration supérieure à 150 mg/L, et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une
 - 25 concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L, et séparément, avec un deuxième milieu réactionnel comprenant au moins un deuxième substrat chromogène permettant de détecter une deuxième activité enzymatique et un carbapénème,
 - b) incuber séparément lesdits milieux réactionnels obtenus à l'étape a) de façon à permettre la croissance des bactéries, et
 - 30 c) détecter les souches correspondant aux bactéries résistantes aux carbapénèmes et/ou productrices de carbapénémases de type OXA-48.

La présente invention porte également sur un milieu de culture prêt à l'emploi pour la détection d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48, comprenant :

- 35
 - une base gélosée nutritive apte à la croissance des entérobactéries,
 - de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L et un agent chélatant des cations divalents,

- au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique.

La présente invention porte également sur un milieu de culture prêt à l'emploi pour la détection d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48, comprenant :

- une base gélosée nutritive apte à la croissance des entérobactéries,
- de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L,
- au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique.

La présente invention porte également sur un usage d'un milieu de culture prêt à l'emploi comprenant :

- une base gélosée nutritive apte à la croissance de bactéries,
- de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L et un agent chélatant des cations divalents ,
- au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique,

pour la détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 et/ou de bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un échantillon biologique

20

La présente invention porte également sur un usage d'un milieu de culture prêt à l'emploi comprenant :

- une base gélosée nutritive apte à la croissance de bactéries,
- de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L,
- au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique, pour la détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 et/ou de bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un échantillon biologique.

30

En effet, les travaux de la Demanderesse ont montré, de façon surprenante, que la témocilline à fortes concentrations, supérieures ou égales à 150 mg/L permet de discriminer spécifiquement les EPC de type OXA-48. De façon préférentielle, la témocilline est utilisée à une concentration comprise entre 150 et 500 mg/L. Ainsi, le procédé selon l'invention permet une détection sensible, spécifique et rapide (généralement en moins de 24 heures) des CPE

35

de type OXA-48, tout en présentant l'avantage d'utiliser un milieu prêt-à-l'emploi et ayant une péremption longue permettant son industrialisation. Avantageusement, le procédé selon l'invention permet également une identification des souches.

- 5 La témocilline est un dérivé 6-alpha-methoxy de la ticarcilline qui est elle-même une pénicilline, parfois employée en combinaison avec l'acide clavulanique. Elle est décrite comme un traitement alternatif contre les entérobactéries multi-résistantes.

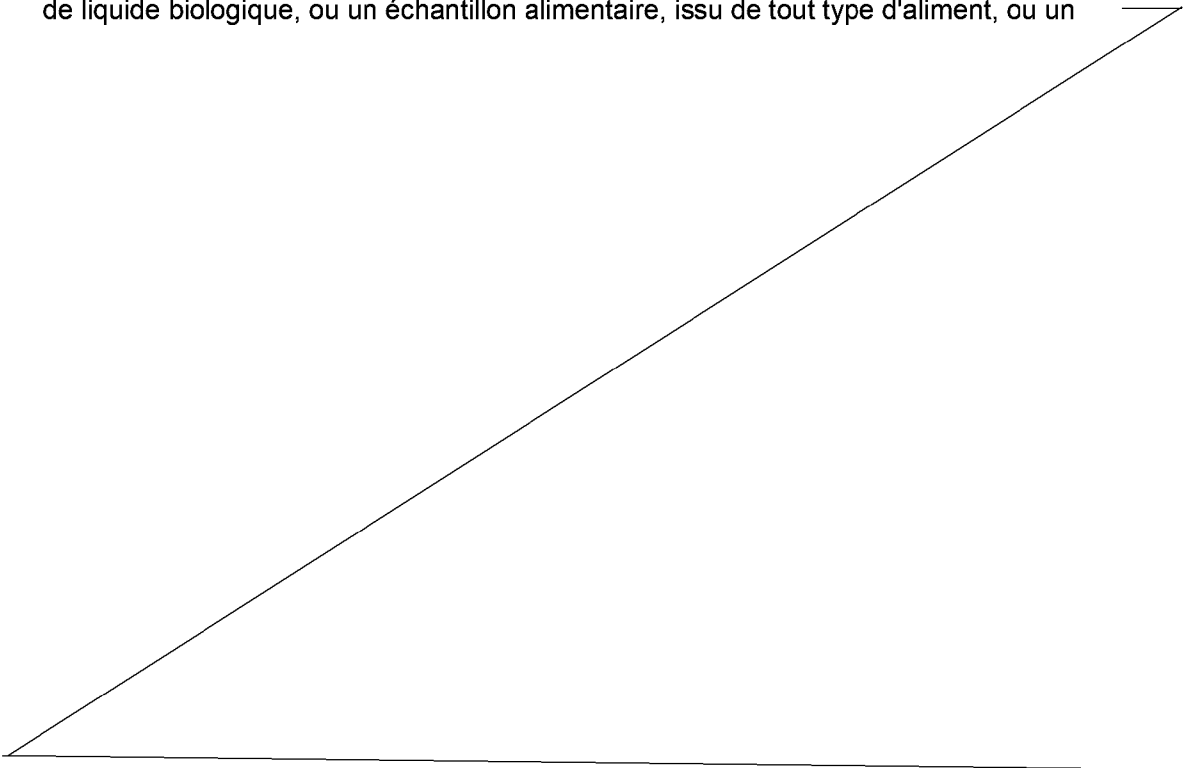
Des tests de susceptibilité *in vitro* ont été conduits par Livermore *et al.* (International Journal of Antimicrobial Agents, 2011 ; 37 : 415-419). Ils indiquent une concentration minimale inhibitrice (CMI) > 256 mg/L, que l'homme du métier interprète comme signifiant que les bactéries testées poussent pour la dernière concentration testée en témocilline de 128 mg/L. Ces tests ont ainsi montré que 18/19 souches de type OXA-48 et 32/35 souches avec une métallo-carbapénémase étaient résistantes à la témocilline. Ceci dissuade l'homme du métier d'utiliser la témocilline dans un milieu visant à détecter spécifiquement les OXA-48.

15

Les définitions ci-après sont précisées afin de mieux comprendre l'invention.

Par échantillon biologique, on entend une petite partie ou petite quantité isolée d'une entité pour l'analyse. Ce peut être un échantillon clinique, humain ou animal, issu d'un prélèvement de liquide biologique, ou un échantillon alimentaire, issu de tout type d'aliment, ou un

20



- échantillon de l'environnement de production ou de transformation d'aliments. Cet échantillon peut être ainsi liquide ou solide. On peut citer d'une manière non limitative, un échantillon clinique de sang total, de sérum, de plasma, d'urines, de fécès, de liquide céphalo-rachidien, de prélèvements de nez, de gorge, de peau, de rectum, de plaie, un
- 5 échantillon alimentaire d'eau, de boissons tels que le lait, un jus de fruits, de yaourt, de viande, d'œufs, de légumes, de mayonnaise, de fromage, de poisson..., un échantillon alimentaire issu d'une alimentation destinée aux animaux, tel que notamment un échantillon issu de farines animales, un échantillon pour contrôle de surface ou d'eau. De façon préférentielle, selon la présente invention, l'échantillon est un échantillon clinique.
- 10 Le prélèvement peut être utilisé tel quel ou, préalablement à l'analyse, subir une préparation de type enrichissement, dilution, extraction, concentration, purification, selon des méthodes connues de l'homme du métier.

- Par milieu réactionnel, on entend un milieu comprenant tous les éléments nécessaires à
- 15 l'expression d'un métabolisme et/ou à la croissance de microorganismes. Le milieu réactionnel peut être solide, semi-solide ou liquide. Par milieu solide, on entend par exemple un milieu gélifié, ou gélosé. L'agar est l'agent gélifiant traditionnel en microbiologie pour la culture des microorganismes, mais il est possible d'utiliser de la gélatine, de l'agarose ou d'autres gélifiants naturels ou artificiels seuls ou en combinaison. Un certain nombre de
- 20 préparations sont disponibles dans le commerce, comme par exemple l'agar Columbia, la gélose Trypcase-soja, la gélose Mac Conkey, la gélose Mueller Hinton ou plus généralement celles décrites dans le Handbook of Microbiological Media (CRC Press).

- Le milieu réactionnel peut comprendre un ou plusieurs éléments en combinaison, tels que des acides aminés, des peptones, des hydrates de carbone, des nucléotides, des minéraux,
- 25 des vitamines ... Le milieu peut comprendre également un colorant. A titre indicatif, on peut citer comme colorant le bleu d'Evans, du rouge neutre, du sang de mouton, du sang de cheval, un opacifiant tel que l'oxyde de Titane ou le kaolin, de la nitroaniline, du vert malachite, du vert brillant, un ou plusieurs indicateurs métaboliques, un ou plusieurs régulateurs métaboliques...

- 30 Le milieu réactionnel peut être un milieu de révélation ou un milieu de culture et de révélation. Dans le premier cas, la culture des microorganismes est effectuée avant ensemencement et, dans le deuxième cas, le milieu de détection et/ou d'identification constitue également le milieu de culture. L'identification signifie la classification des microorganismes dans une espèce ou un groupe d'intérêt.
- 35 L'homme du métier peut également utiliser une bi-boîte, ou boîte de type boîte de Petri comprenant deux compartiments, permettant de comparer aisément deux milieux,

comprenant différents substrats ou différents mélanges sélectifs, sur lesquels on aura déposé un même échantillon biologique.

Le milieu réactionnel peut comprendre un ou plusieurs agents sélectifs. Par agent sélectif, on entend tout composé susceptible d'empêcher ou de ralentir la croissance d'un microorganisme autre que le microorganisme cible. Sans être limitatif, une concentration comprise entre 0,01 mg/l et 5 g/l est particulièrement adaptée à la présente invention.

On peut citer comme agent sélectif, les antibiotiques, les antifongiques, les sels biliaires, le crystal violet, la fushine basique, le vert brillant, les tensioactifs tels le Tergitol™ ... Par antibiotique, on entend tout composé susceptible d'empêcher ou de ralentir la croissance d'une bactérie. Ils appartiennent notamment aux groupes des beta-lactamines, des glycopeptides, des aminosides, des polypeptides, des sulfamides, des quinolones. A titre indicatif, on peut citer notamment les antibiotiques carbénicilline, ticarcilline, témocilline, formidacilline, cefotaxime, cefsulodine, ceftazidime, cefoxitine, ceftriaxone, cefpodoxime, aztréonam, ertapénème, faropénème, doripénème, vancomycine, gentamicine, triméthoprim, tobramycine, moxalactam, fosfomycine, D-cyclosérine, polymixine, colistine, les quinolones telles que l'acide nalidixique.

Par antifongique, on entend tout composé susceptible d'empêcher ou de ralentir la croissance d'une levure ou d'une moisissure. A titre indicatif, on peut citer notamment l'amphotéricine B, le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole, la cycloheximide, la flucytosine.

Par substrat chromogène, on entend un substrat permettant la détection d'une activité enzymatique ou métabolique des microorganismes cibles grâce à un signal détectable directement ou indirectement. Pour une détection directe, ce substrat peut être lié à une partie faisant office de marqueur, fluorescent ou coloré (Orenga *et al.*, 2009 ; J. Microbiol. Methods ; 79(2):139-55). Pour une détection indirecte, le milieu réactionnel selon l'invention peut comporter en sus un indicateur de pH, sensible à la variation de pH induite par la consommation du substrat et révélant le métabolisme des microorganismes cibles. Ledit indicateur de pH peut être un chromophore ou un fluorophore. On citera comme exemples de chromophores le bromocresol pourpre, le bleu de bromothymol, le rouge neutre, le bleu d'aniline, le bleu de bromocresol. Les fluorophores comprennent par exemple la 4-méthylumbellifère, les dérivés de l'hydroxycoumarine ou les dérivés de la résorufine.

Selon la présente invention, le substrat chromogène est préférentiellement choisi parmi les substrats à base d'Indoxyl (3-Indoxyl, 5-Bromo-3-indoxyl, 5-Iodo-3-indoxyl, 4-Chloro-3-indoxyl, 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl, 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl, 6-Bromo-3-indoxyl, 6-Chloro-3-indoxyl, 6-Fluoro-3-indoxyl, 5-Bromo-4-chloro-N-méthyl-3-indoxyl, N-Méthyl-3-indoxyl, Aldol™ ...) ; d'umbellifère (4-Méthylumbellifère, Cyclohexenoesculetine, ...) ;

d'Alizarine ; de p-Naphtolbenzéine ; de Nitrophénol (ortho-Nitrophénol, para-Nitrophénol, ...) ; d'Hydroxyquinoline ; de Cathécol (Cathécol, Dihydroxyflavone, Hydroxyflavone, ...) ; de Résorufine ; de Chlorophénol Red ; de Fluorescéine ; d'Aminophénol (para-Aminophénol, Dichloro-aminophénol, ...) ; de Naphtol (alpha-Naphtol, 2-Naphtol, Naphtol-ASBI, ...) ;
5 d'Aminocoumarine (7-Amino-4-méthyl-coumarine, ...) ; de Naphtylamide ; d'Acridine (Amino-phényl-acridine...) ; d'Amino-phénoxazine (Amino-benzophénoxazinone, Amino-pentyl-resorufine, ...) ; d'Amino-styryl (Amino-styryl-quinolinium, Amino-styryl-lépidinium, ...).

A titre indicatif, les activités enzymatiques ciblées par les substrats chromogènes peuvent appartenir au groupe des hydrolases, préférentiellement aux groupes des osidases, des
10 estérases ou des peptidases. Préférentiellement, les activités enzymatiques ciblées par les substrats chromogènes sont choisies parmi : la glucuronidase, la glucosidase, la galactosidase, la ribosidase, l'estérase, la sulfatase, la phospholipase, l'aminopeptidase et la désaminase.

A titre indicatif, les substrats utilisés pour la détection d'une activité beta-glucuronidase
15 peuvent notamment être le 4-Méthylumbelliféryl-beta-glucuronide, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-glucuronide, le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-glucuronide, le 6-Chloro-3-indolyl-beta-glucuronide, l'Aldol™-beta-glucuronide, l'Alizarine-beta-glucuronide, le Cyclohexenoesculetine-beta-glucuronide ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité beta-galactosidase peuvent notamment
20 être le 4-Méthylumbelliféryl-beta-galactoside, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galactoside, le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-galactoside, le 6-Chloro-3-indolyl-beta-galactoside, l'Aldol™-beta-galactoside, l'Alizarine-beta-galactoside, le Cyclohexenoesculetine-beta-galactoside ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité alpha-galactosidase peuvent
25 notamment être le 4-Méthylumbelliféryl-alpha-galactoside, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-galactoside, le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-alpha-galactoside, le 6-Chloro-3-indolyl-alpha-galactoside ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité beta-glucosidase peuvent notamment
être le 4-Méthylumbelliféryl-beta-glucoside, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-glucoside, le
30 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-méthyl-beta-glucoside, le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-glucoside, le 6-Chloro-3-indolyl-beta-glucoside, l'Aldol™-beta-glucoside, l'Alizarine-beta-glucoside, le Cyclohexenoesculetine-beta-glucoside, le Nitrophényl-beta-glucoside, le Dichloroaminophényl-glucoside ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité alpha-glucosidase peuvent notamment
35 être le 4-Méthylumbelliféryl-alpha-glucoside, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha-glucoside, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-N-méthyl-alpha-glucoside, le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-alpha-

glucoside, le 6-Chloro-3-indolyl-alpha-glucoside, le Nitrophényl-alpha-glucoside ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité ribosidase peuvent notamment être le 4-Méthylumbelliféryl-beta-riboside, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-riboside, le 5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-beta-riboside, le 6-Chloro-3-indolyl-beta-riboside, l'Alizarine-beta-riboside, le Nitrophényl-beta-riboside ou leurs sels.

A titre indicatif, les substrats utilisés pour la détection d'une activité estérase peuvent notamment être les esters d'acides gras linéaires saturés ou insaturés, ayant entre 6 et 14 carbones, préférentiellement entre 7 et 9 carbones et de 4-Méthylumbelliférone, 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl, 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl, 6-Chloro-3-indoxyl, 5-Bromo-3-indolyl ou d'Alizarine ou leurs sels. Préférentiellement, ils sont choisis parmi 4 Méthylumbelliferyl octanoate, 5-Bromo-4 chloro-3-indoxyl octanoate, 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl octanoate, 6-Chloro-3-indoxyl octanoate, 5-Bromo-3-indolyl octanoate ou d'Alizarine octanoate.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité phospholipase peuvent notamment être le 4-Méthylumbelliféryl-phosphatidyl inositol, le 4-Méthylumbelliféryl-phosphatidyl choline, le 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphatidyl inositol, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphatidyl choline, le Nitrophényl-phosphatidyl inositol, le Nitrophényl-phosphatidyl choline ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité aminopeptidase peuvent notamment être la L-Alanyl-7-amido-4-méthylcoumarine, la L-Alanyl-dichloroamido-phényl, la L-Alanyl-7-amido-1-pentyl-phenoxazinone, la L-Alanyl-4-amidostyryl-quinaldinium, ou leurs sels.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité désaminase peuvent notamment être le L-Tryptophane, la L-Phénylalanine, la L-Tyrosine et la L-Histidine.

Les substrats utilisés pour la détection d'une activité sulfatase peuvent notamment être le 4-Méthylumbelliféryl-sulfate, le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-sulfate, le 5-Bromo-6-chloro-3-indoxyl-sulfate, le 3-Indoxyl-sulfate, le Phenolphthaléine-disulfate ou leurs sels.

Préférentiellement, le substrat chromogène est choisi parmi : le 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucopyranoside (X-glucoside), le 5-Bromo-6 chloro-3-indoxyl-beta-D galactopyranoside (Magenta beta-Gal), le 6-Chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronide (Rose-beta-Gur), le 5-Bromo-4 chloro-3-indoxyl-N-méthyl-beta-D-glucopyranoside (GreenA-beta-Glu), le Méthyl-beta-D-glucopyranoside (methyl-beta-D-glucoside), le Lactose, le L-Tryptophane.

Le milieu réactionnel peut également contenir au moins un agent chélatant des cations, de type EDTA, dans le but de complexer le zinc qui est un co-facteur des carbabapénémases de classe B, favorisant ainsi leur inhibition et pouvant ainsi restaurer l'activité d'une beta-

lactamine telle que la témocilline. Avantageusement, la concentration en EDTA est comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L.

D'autres agents chélatants peuvent être cités à titre indicatif : l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoethanol, des dérivés de la phénantroline.

5

Par incuber, on entend porter et maintenir entre 1 et 48 heures, préférentiellement entre 4 et 24 heures, plus préférentiellement entre 16 et 24 heures, à une température appropriée, généralement comprise entre 20 et 50°C, préférentiellement entre 30 et 40°C.

10 Par détecter, on entend déceler à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil optique ou numérique l'existence d'une croissance des bactéries cibles. Avantageusement, lorsque le milieu mis en œuvre comprend un substrat chromogène, la détection peut également permettre une identification taxonomique des bactéries cibles. La détection se fait à l'œil nu ou à l'aide d'un appareil optique ou numérique pour les substrats fluorescents et pour les substrats colorés.

15 Par spécificité, on entend la capacité du procédé ou du milieu réactionnel à donner un résultat négatif lorsque la souche bactérienne recherchée n'est pas présente. En d'autres termes, selon la présente invention, une identification plus spécifique correspond à une réduction du nombre de faux positifs liés aux souches n'exprimant pas de carbapénémase de type OXA-48, sans prétendre inhiber l'ensemble de ces souches.

20 Par sensibilité, on entend la capacité à donner un résultat positif lorsque la souche bactérienne recherchée est présente dans l'échantillon.

Ainsi, la présente invention porte sur un procédé de détection et/ou d'identification spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48, dans un échantillon

25 biologique, comprenant les étapes consistant à :

- a) mettre en contact l'échantillon biologique susceptible de contenir lesdites bactéries avec un milieu réactionnel comprenant un substrat chromogène, et de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, de préférence comprise entre 200 et 500 mg/L,
- 30 b) incuber l'ensemble de façon à permettre la croissance des bactéries, et
- c) détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48.

Avantageusement, le substrat chromogène permet de détecter une activité enzymatique et d'identifier les bactéries détectées.

35

De façon avantageuse, ledit milieu réactionnel est un milieu de culture.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le milieu réactionnel mis en œuvre à l'étape a) comprend en outre un agent chélatant des cations divalents, de type EDTA, préférentiellement à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mM.

Selon mode particulier de réalisation de l'invention, le milieu mis en œuvre à l'étape a)
5 comprend au moins un autre substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique.

De façon préférentielle, l'activité enzymatique détectée pour permettre l'identification des bactéries est choisie parmi les activités estérase, glucosidase, galactosidase, et glucuronidase.

10 De façon préférentielle, les bactéries cibles susceptibles de produire des carbapénémases de type OXA-48 sont des entérobactéries.

Avantageusement, le procédé selon l'invention combine deux milieux réactionnels, l'un comprenant au moins un substrat chromogène et de la témocilline, l'autre comprenant au
15 moins un substrat chromogène et un carbapénème, préférentiellement du faropénème. De façon préférentielle, une boîte type boîte de Petri bi-compartmentée, autrement appelée biboîte, permet de combiner ces deux milieux. Une comparaison des colonies présentes après incubation permet d'identifier les souches correspondant aux bactéries résistantes aux carbapénèmes et/ou productrices de carbapénémases de type OXA-48.

20

La présente invention porte également sur un milieu de culture prêt-à l'emploi pour la détection et/ou l'identification spécifique d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48, comprenant :

- une base gélosée nutritive apte à la croissance des entérobactéries,
- 25 • de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, de préférence comprise entre 200 et 500 mg/L, et
- au moins un substrat chromogène.

Avantageusement, ledit milieu de culture comprend également un agent chélatant des cations divalents, de type EDTA, préférentiellement à une concentration comprise entre 1,0
30 et 2,5 mM.

Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, préférentiellement à une concentration comprise entre 200 et 500 mg/L, dans un milieu réactionnel gélosé ou liquide, pour détecter et/ou identifier
35 spécifiquement des bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 susceptibles d'être comprises dans un milieu biologique.

Au sens de la présente invention, la témocilline est en phase homogène dans le milieu réactionnel, en présence de l'échantillon. La témocilline n'est pas imprégnée sur un disque ou sur une bandelette ou sur un autre contenant indépendant déposé sur ou dans le milieu réactionnel.

5

Les exemples développés ci-dessous ont pour but de faciliter la compréhension de l'invention. Ils sont donnés à titre explicatif et ne sauraient limiter la portée de l'invention.

Exemple 1 : Détermination des CMI à la témocilline d'un panel de souches EPC (par la méthode de dilution en gélose)

10

Souchier utilisé :

Profil de résistance	Nb de souches
Amp C	10
BLSE	10
IMP	13
KPC	12
NDM-1	26
Résistance par imperméabilité (RI)	10
VIM	16
OXA-48	16

15

Milieu réactionnel : la base est un milieu chromID™ CPS (bioMérieux, ref. 43821-43829), comprenant un substrat chromogène de beta-glucuronidase, un substrat chromogène de beta-glucosidase, un substrat chromogène de beta-galactosidase et un substrat de désaminase. A ce milieu de base est ajoutée de la témocilline aux concentrations indiquées ci-après.

20

Gamme en Témocilline testée : 50 – 150 – 200 – 300 mg/L (Témocilline disodique, Eumedica SA, Manage, Belgique)

25 Méthode

les milieux sontensemencés par dépôt d'un spot : 1 µl d'une suspension microbienne en eau physiologique à 0.5 McF, diluée au 1/10.

Incubation 24 h à 37°C.

Lecture après 24 heures d'incubation. On retiendra comme CMI le milieu avec la plus petite concentration en témocilline sur lequel on obtiendra un spot de croissance négatif. Ont été

30

considérés comme négatifs les spots ne présentant que 3 colonies ou moins ou une absence totale de croissance.

Résultats

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI*	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	8	8	25	1	8	10	12	9
150	0	1	1	0	2	0	0	5
200	0	0	0	0	0	0	0	1
300	0	0	0	0	0	0	0	0
> 300	2	3	0	15	0	0	1	1

5 *RI : souches résistantes aux carbapénèmes par imperméabilité

Conclusion

La plupart des souches non-OXA-48 ont des CMI ≤ 200. La majeure partie des souches OXA-48 ont des CMI > 300. Seules quelques souches non OXA-48 ont également des CMI > 300.

10

Détection des souches productrices d'une carbapénémase de type OXA-48 (avec une concentration en Témocilline de 200 mg/L):

Sensibilité	93.8 %
Spécificité	92.8 %

15 La Témocilline semble donc être discriminante des souches productrices d'une carbapénémase de type OXA-48 dès la concentration 150 mg/L et très discriminante à 200 mg/L.

Exemple 2 : Optimisation de la spécificité de détection par l'apport d'inhibiteurs spécifiques

20 Inhibition des souches de classe B (NDM, VIM, IMP) par ajout d'EDTA.

Souchier utilisé :

Profil de résistance	Nb de souches
AmpC	10
BLSE	10
IMP	13
KPC	19
NDM-1	27
Résistance par imperméabilité (RI)	10
VIM	17
OXA-48	15

Base peptonée :

Identique à celle utilisée pour déterminer les CMI à la Témocilline en dilution en gélose (Exemple 1)

Gamme en Témocilline 50-150-200-300 mg/l

Pour chaque concentration en Témocilline, on testera sous forme d' EDTA disodique, les

5 concentrations en EDTA actif suivantes : 0, 1.77, 2.12, 2.47 et 2.83 mmol/L

Méthode : identique à la méthode mise en œuvre à l'exemple 1.

Résultats :

10 Répartition des CMI obtenues avec un milieu à 0 mmol/l d'EDTA

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	18	22	0	8	10	12	9
150	0	0	4	0	2	0	0	6
200	0	0	1	0	0	0	0	1
300	0	0	0	3	0	0	0	0
> 300	0	1	0	12	0	0	1	1

Répartition des CMI obtenues avec un milieu à 1.77 mmol/l d'EDTA actif

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	18	25	0	4	9	12	17
150	0	0	2	0	4	1	0	0
200	0	0	0	0	1	0	0	0
300	0	0	0	0	1	0	0	0
> 300	0	1	0	15	0	0	1	0

Répartition des CMI obtenues avec un milieu à 2.12 mmol/l d'EDTA actif

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	9	18	26	0	4	9	12	17
150	1	0	1	0	3	1	0	0
200	0	0	0	0	2	0	0	0
300	0	0	0	0	1	0	0	0
> 300	0	1	0	15	0	0	1	0

15

Répartition des CMI obtenues avec un milieu à 2.47 mmol/l d'EDTA actif

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	18	26	0	6	10	12	17
150	0	0	1	0	2	0	0	0
200	0	0	0	0	2	0	0	0
300	0	0	0	2	0	0	0	0
> 300	0	1	0	13	0	0	1	0

Répartition des CMI obtenues avec un milieu à 2.83 mmol/l d'EDTA actif

CMI	BLSE	KPC	NDM-1	OXA-48	RI	AmpC	IMP	VIM
≤ 50	10	19	27	3	6	10	12	17
150	0	0	0	1	3	0	0	0
200	0	0	0	0	1	0	0	0
300	0	0	0	3	0	0	0	0
> 300	0	0	0	8	0	0	1	0

20 Conclusion : les EPC de classe B de type VIM et NDM voient leur CMI diminuer en présence d'EDTA de manière proportionnelle à la concentration utilisée. Par contre, l'EDTA semble

favoriser une légère augmentation des CMI pour les souches résistantes aux carbapénèmes par imperméabilité (RI).

Performances obtenues pour une concentration en Témocilline à 300 mg/L

	Sensibilité en %	Spécificité en %
Milieu à 0 mmol/l EDTA	100	97.2
Milieu à 1.77 mmol/l EDTA	100	98.1
Milieu à 2.12 mmol/l EDTA	100	98.1
Milieu à 2.47 mmol/l EDTA	86.7	98.1
Milieu à 2.83 mmol/l EDTA	53.3	99.1

5

L'apport d'EDTA permet une amélioration de spécificité, dès 1.77 mmol/L, sans dégradation de la sensibilité de détection des souches OXA-48 si la concentration reste $\leq$ 2.12 mmol/L.

Exemple 3 : Evaluation des performances d'un milieu prototype défini.

10

Souchier utilisé :

Profil de résistance	Nombre de souches
BLSE	2
IMP	1
KPC	3
NDM-1	1
RI	3
VIM	1
OXA-48	15

Méthode :

15

Les milieux sont préparés en boîtes de Petri diamètre 55 mm. Ils sontensemencés à l'aide d'une suspension bactérienne en eau physiologique à 0.5 McF pour les souches non OXA-48 et avec une dilution au 1/100 et 1/10 000 d'une suspension à 0.5 McF pour les souches

OXA-48. L'ensemencement consiste en un isolement 3 cadrans à l'aide d'un oëse calibrée de 10 µl : dépôt théorique de 10^4 ou 10^2 CFU pour les souches OXA-48 et de 10^6 CFU pour les souches non-productrices d'OXA-48.

Les milieux sont incubés à 37°C. Les lectures seront effectuées après 18 et 24 heures d'incubation.

La densité de croissance, les tailles de colonies, ainsi que la coloration (couleur et intensité) sont évaluées.

10 Milieu réactionnel identique à la base utilisée pour l'Exemple 1. Un système sélectif comprenant un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques spécifique des Gram positifs, des levures et des Gram négatifs non fermentants, ainsi que de la cloxacilline et de l'EDTA, est également ajouté.

15 Gamme en Témocilline : 200, 300, 400, et 500 mg/L

Un milieu à 200 mg/L de témocilline est testé sans système sélectif tel qu'indiqué *supra*.

Résultats à 24 heures d'incubation:

Nb de souches détectées	Concentration en Témocilline en mg/L				
	200	200	300	400	500
	sans système sélectif				
OXA-48 dépôt 10^4 CFU	15/15	15/15	15/15	15/15	12/15
OXA-48 dépôt 10^2 CFU	15/15	15/15	15/15	14*/15	9/15
Non OXA-48 dépôt 10^6 CFU	3**/13	3**/13	1/13	2***/13	2***/13

*dont 3 souches avec 1 seule colonie détectée

20 ** dont 2 souches avec 1 seule colonie

*** dont 1 souche avec 1 seule colonie

Conclusion: l'ajout du système sélectif n'a pas d'impact sur la détection des souches OXA-48. La sensibilité tend à diminuer légèrement, dans cette configuration de milieu réactionnel, à partir de 400 mg/L de témocilline.

25

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection spécifique de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :
 - a) mettre en contact l'échantillon biologique avec un milieu réactionnel comprenant au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique, de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L, et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L,
 - b) incuber le dit milieu réactionnel obtenu à l'étape a) de façon à permettre la croissance des bactéries, et
 - c) détecter les souches correspondant aux bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48.
2. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel la concentration de la témocilline est comprise entre 200 et 500 mg/L.
3. Le procédé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel ledit agent chélatant des cations divalents est l'EDTA.
4. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel lesdites bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 sont des entérobactéries.
5. Le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel au moins un substrat permet de détecter une activité enzymatique choisie parmi les activités estérase, glucosidase, galactosidase, et glucuronidase.
6. Procédé de détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 et/ou de bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un échantillon biologique, comprenant les étapes consistant à :
 - a) mettre en contact l'échantillon biologique avec un premier milieu réactionnel comprenant au moins un premier substrat chromogène permettant de détecter une première activité enzymatique et de la témocilline à une concentration supérieure à 150 mg/L, et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un

dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L, et séparément, avec un deuxième milieu réactionnel comprenant au moins un deuxième substrat chromogène permettant de détecter une deuxième activité enzymatique et un carbapénème,

- 5 b) incuber séparément lesdits milieux réactionnels obtenus à l'étape a) de façon à permettre la croissance des bactéries, et
- c) détecter les souches correspondant aux bactéries résistantes aux carbapénèmes et/ou productrices de carbapénémases de type OXA-48.

- 10 7. Le procédé selon la revendication 6 dans lequel l'étape a) est mise en œuvre sur une biboîte combinant deux milieux tels qu'indiqués à l'étape a), de façon séparée.

8. Milieu de culture prêt à l'emploi pour la détection d'entérobactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48, comprenant :
 - 15 • une base gélosée nutritive apte à la croissance des entérobactéries,
 - de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L,
 - 20 • au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique.

9. Le milieu de culture selon la revendication 8, dans lequel l'agent chélatant des cations divalents est l'EDTA.
- 25
10. Le milieu de culture selon la revendication 8 ou 9, dans lequel la témocilline est présente à une concentration comprise entre 200 et 500 mg/L.

11. Le milieu de culture selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, dans lequel l'activité enzymatique détectée est choisie parmi les activités estérase, glucosidase, galactosidase, et glucuronidase.
- 30
12. Usage d'un milieu de culture prêt à l'emploi comprenant :
 - une base gélosée nutritive apte à la croissance de bactéries,
 - 35 • de la témocilline à une concentration supérieure ou égale à 150 mg/L et un agent chélatant des cations divalents choisi parmi l'EDTA, l'acide

dipicolinique, le 2-mercaptoéthanol et un dérivé de la phénantroline, utilisé à une concentration comprise entre 1,0 et 2,5 mmol/L,

- au moins un substrat chromogène permettant de détecter une activité enzymatique,

5 pour la détection de bactéries productrices de carbapénémases de type OXA-48 et/ou de bactéries résistantes aux carbapénèmes dans un échantillon biologique.

13. L'usage selon la revendication 12, dans lequel l'agent chélatant des cations divalents est l'EDTA.

10

14. L'usage selon la revendication 12 ou 13, dans lequel la témocilline est présente à une concentration comprise entre 200 et 500 mg/L.

15

15. L'usage selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, dans lequel l'activité enzymatique détectée est choisie parmi les activités estérase, glucosidase, galactosidase, et glucuronidase.

16. L'usage selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, dans lequel les bactéries sont des entérobactéries.

20

17. L'usage selon l'une quelconque des revendications 12 à 16, dans une biboîte.