

# Journée des référents en antibiothérapie

## Atelier Prélèvements microbiologiques

Dr Thibaut Fraisse, CH Alès  
Dr Catherine Lechiche, CHU Nîmes  
Dr Alix Pantel, CHU Nîmes  
Rodez, 14 septembre 2017

# Pourquoi cet atelier ?

- ▶ **Un mauvais prélèvement en microbiologie**
  - Erreur diagnostique
    - Pas de diagnostic des bactéries impliquées dans le processus infectieux
    - Détection de contaminants
  - Traitement inadapté
    - Echec thérapeutique
    - Sélection de BMR, ...
  - Cout : temps, financier ...

La bonne analyse commence ...  
....avant la porte du laboratoire

# Appel médecin du SSR locomoteur:

« J'ai une patiente qui a un ECBU avec un *Pseudomonas aeruginosa* multi-résistant et un *Clostridium difficile* toxinogène dans les selles. Qu'est ce que j'en fais? »

- ▶ Pourquoi est-elle en SSR? (histoire médicale)
  - ▶ Pourquoi a-t-elle eu ces prélèvements microbiologiques?
- 

# Histoire de la maladie

- ▶ Patiente de 48 ans, sans antécédent notable
- ▶ Opérée fin avril d'un CLE
- ▶ Méningite avec spondylodiscite post-opératoire à *Klebsiella pneumoniae*
- ▶ Séjour d'un mois en réanimation avec colonisation urinaire à *P. aeruginosa* BMR sortie sous ofloxacine 200 mg x2 pour 3 mois
- ▶ Passage en médecine colite à *C. difficile* (10 j de fidaxomycine) puis candidémie à *C parapsilosis*
- ▶ Transfert en SSR mi-juillet 2017

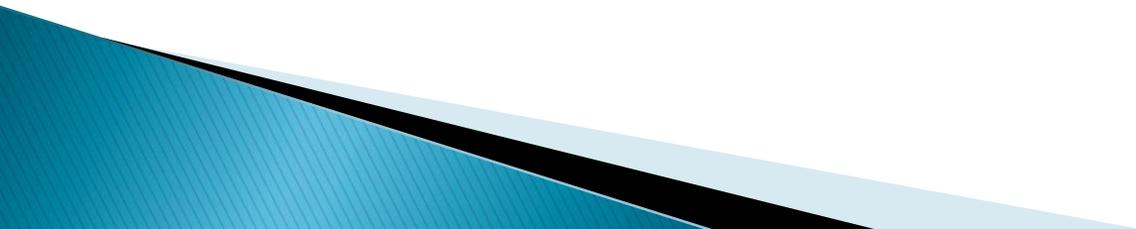
# Motif des prélèvements?

- ▶ ECBU pour vérifier si le *P. aeruginosa* était toujours là
- ▶ Recherche de *C. difficile* pour des douleurs abdominales, transit alterne constipation avec débâcle de selles un peu plus importantes, selles moulées.

**VOULEZ VOUS D'AUTRES ELEMENTS AVANT  
DE DONNER VOTRE AVIS?**

- ▶ Aucune fièvre
- ▶ Etat général préservé
- ▶ Pas de signes fonctionnels urinaires, pas de sonde
- ▶ Au plan biologique:
  - CRP il y a 5 jours 10 mg/l
  - NFS:
    - Hb 10.8g, VGM 82,
    - Plaquettes 460000,
    - GB 8000 dont 5800 PNN, 200 PNE, 1500 lymphocytes, 500 monocytes
  - Fibrinogène 5 g/l

**Votre avis?**



# Notre avis?

## ▶ ECBU:

Colonisation = bactériurie asymptomatique

⇒ PAS D'ANTIBIOTIQUE

⇒ Précautions renforcées en hygiène des mains  
en particulier

# Colonisation urinaire

- Mise en évidence d'un microorganisme, lors d'un prélèvement urinaire correctement réalisé, sans que ce micro-organisme ne génère en soi de manifestations cliniques

- ⇒ Pas de seuil (sauf femme enceinte)
- ⇒ La leucocyturie n'intervient pas dans la définition

- **Fréquente**

- ⇒ Sujets âgés > 65 ans: 10% des hommes, 20% des femmes
- ⇒ Patients sondés (100 % à 1 mois, 3 % d'acquisition / journée de sondage)
- ⇒ Patients porteurs d'une vessie neurologique (70%)
- ⇒ Femmes enceintes (! 20-40% PNA)
- ⇒ Diabétiques

- **Qui dépister?**

- ⇒ **Procédure urologique invasive**
- ⇒ **Femme enceinte ( $\geq 4^{\text{ème}}$  mois)**

⇒ **ATB**

# Prélèvements microbiologiques

Bactéries amenées  
dans le prélèvement

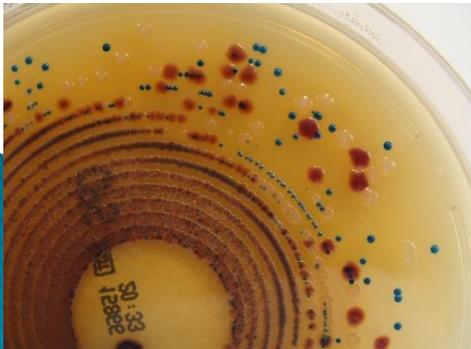
Bactéries locales non  
pathogènes

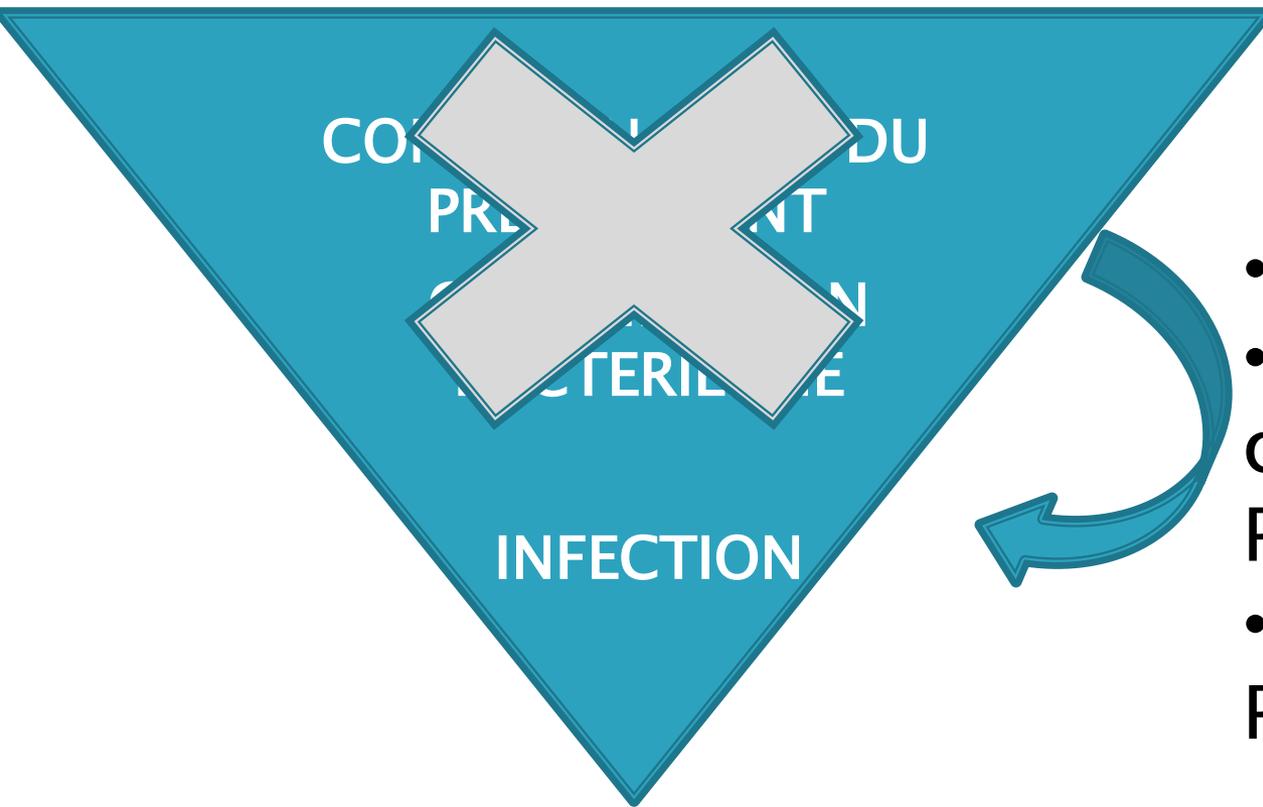
Bactérie responsable de  
l'infection du site

CONTAMINATION DU  
PRELEVEMENT

COLONISATION  
BACTERIENNE

INFECTION





- CLINIQUE +++
- Examens para-cliniques (CRP, PCT?)
- QUALITE DES PRELEVEMENTS

Résultat même positif du prélèvement ne permet pas de distinguer une colonisation d'une infection

# Prélèvements microbiologiques



## PL ou ECBU même combat

Ce n'est pas parce que l'ECBU est plus facile à réaliser qu'il ne faut pas réfléchir avant de le prescrire

- ▶ **ECBU= Pas systématique**
  - **Suspicion clinique d'infection urinaire**
  - **+ / - BU préalable**

# Prélèvements ECBU

## ■ Patient usuel:

- ⇒ > 4 h miction précédente (matin)
- ⇒ Après une toilette soigneuse +++
  - Femme: vulve et méat
  - Homme: prépuce et méat
- ⇒ Milieu de jet

## ■ Patient sondé:

- ⇒ Clamper la sonde 10 min.
- ⇒ Désinfection et ponction chambre de prélèvement

## ■ Nouveau-né:

- ⇒ Désinfection
- ⇒ Poche adhésive

## ■ Incontinent ou handicapé:

- ⇒ Femme: sonde de petit calibre
- ⇒ Homme: collecteur pénien

- **Qualité du prélèvement**  
⇒ **Qualité de l'examen**
- **Avant tout traitement antibiotique !!**
- **Acheminement rapide au laboratoire**

≤ 2h à TA  
≤ 24h à 4° C



Ac. borique, ≤ 48h à TA  
Remplissage correct



« J'ai une patiente ~~qui a un ECBU avec un~~  
~~*Pseudomonas aeruginosa* multi-~~  
~~résistant~~ et un *Clostridium difficile*  
toxinogène dans les selles. Qu'est ce  
que j'en fais? »

# Notre avis?

## ▶ *Clostridium difficile*:

- Symptomatologie plus douteuse: portage ?  
Symptômes en lien?
- Précautions *Clostridium* en attendant
- Imagerie ASP ou TDM abdominal pour rechercher fécalome haut, colite: RAS
- Rectoscopie: signe de colite pseudomembraneuse? (RAS)
- Si aucun signe de colite ou diagnostic différentiel => **pas de traitement**
- Si élément pour une infection active => rappeler pour le traitement

# Prélèvements *C. difficile*

- ▶ Patient symptomatique:  
diarrhée = Selles liquides (moule le pot)

## L'échelle de Bristol

Constipation		Selles idéales		De plus en plus vers la diarrhée		
Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6	Type 7
						
Petites crottes dures et détachées, ressemblant à des noisettes. Difficiles à évacuer	En forme de saucisse, mais dures et grumeleuses.	Comme une saucisse, mais avec des craquelures sur la surface.	Ressemble à une saucisse ou un serpent, lisse et douce.	Morceaux mous, avec des bords nets (néanmoins aisés à évacuer).	Morceaux duveteux, en lambeaux, selles détrempées.	Pas de morceau solide, entièrement liquide.

# Portage asymptomatique *C. difficile*

- ▶ 90% des enfant de moins de 1 an
- ▶ 1–3% des adultes en communautaire (dont souches toxinogènes)
- ▶ Après le traitement : 7% de patients ont une culture positive (\*)
- ▶ 1 à 4 semaines après le traitement: jusqu'à 56% de cultures positives (\*\*)

# Portage asymptomatique *C. difficile*

27th **ECCMID** Vienna, Austria  
22 – 25 April 2017  
Session EP137 Intra-abdominal infections  
EP 0707 mini-oral

Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* in French hospitals:  
preliminary results of the PORTADIFF study



A. LE MONNIER<sup>1</sup>, E. BILLE<sup>2</sup>, N. BOURGEOIS-NICOLAOS<sup>3</sup>, V. CATTOIR<sup>4</sup>, E. FARFOUR<sup>5</sup>, I. GRALL<sup>6</sup>, D. LECOINTE<sup>7</sup>, A. LIMELETTE<sup>8</sup>, G. MARCADE<sup>9</sup>, A. MIZRAHI<sup>1</sup>, I. POILANE<sup>10</sup>, P. POUPY<sup>11</sup>, J.-R. ZAHAR<sup>12</sup>, on behalf of the GMC group

Enquête 1 jour donné dans 10 hôpitaux  
721 patients inclus 73 ans de moyenne d'âge  
79 patients (11%) porteurs de *C. difficile* dont 54 % souches Toxi+

## FDR de colonisation:

- Antibiothérapie dans les 3 mois
- Hospitalisation dans les 2 mois
- Durée de séjour avant le dépistage
- Antécédent d'infection à *C. difficile*
- Prise d'Inhibiteurs de la pompe à proton

Suivi à 1 mois: 6 infections à *C. difficile* parmi les 722 patients (dont 3 colonisés par souche toxigène)

# Diagnostic ICD: Recommandations

- **Tester uniquement les selles diarrhéiques**

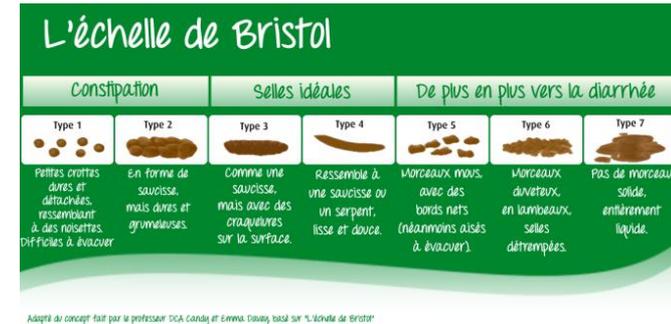
⇒ Aspects 5,6,7 échelle de Bristol

- **Ne pas rechercher chez l'enfant < 3 ans**

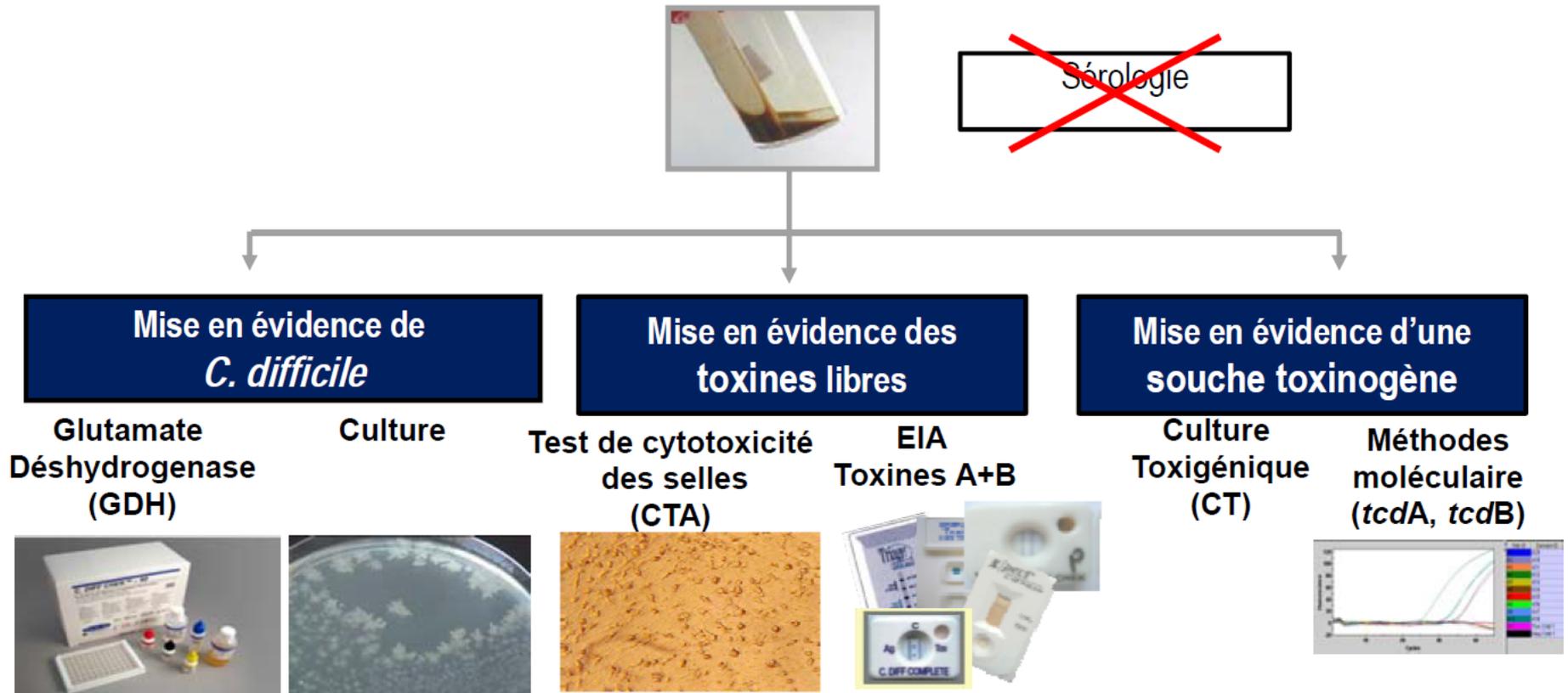
⇒ Portage très fréquent jusqu'à 1 an puis diminution progressive

⇒ Recherche uniquement sur demande médicale

- **Prélever les selles avant de démarrer le traitement**



# Aspects techniques du diagnostic des ICD



16<sup>es</sup> JNI, Nancy, du 10 au 12 juin 2015

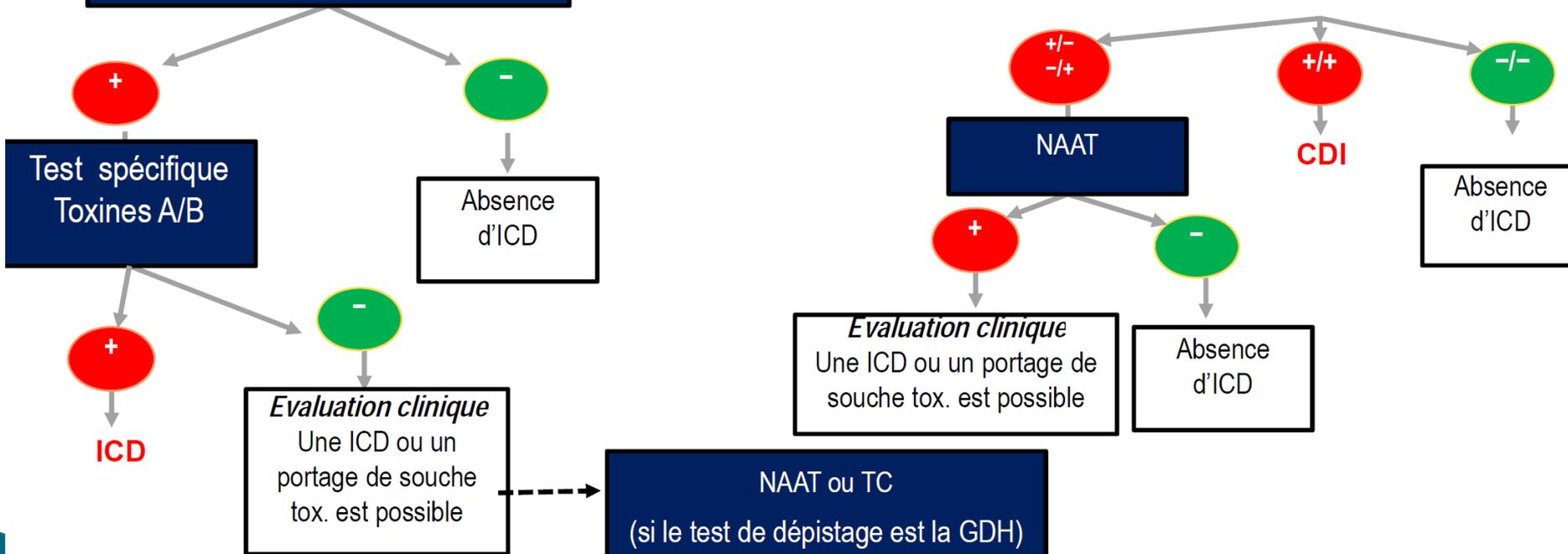
EIA, enzyme immunoassay;  
GDH, glutamate dehydrogenase, NAAT: nucleic acid amplification tests

# Algorithmes diagnostiques (2016)

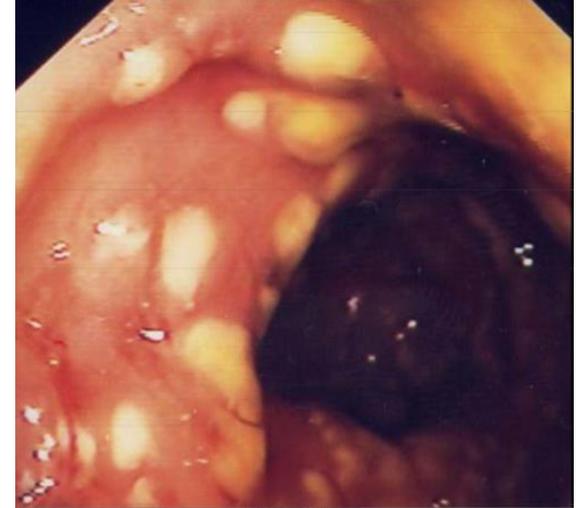


**Test de dépistage sensible  
NAAT ou GDH EIA**

**GDH-toxine A/B**



La rectosigmoidoscopie ou la coloscopie permettent aussi le diagnostic avec l'aspect de colite pseudomembraneuse

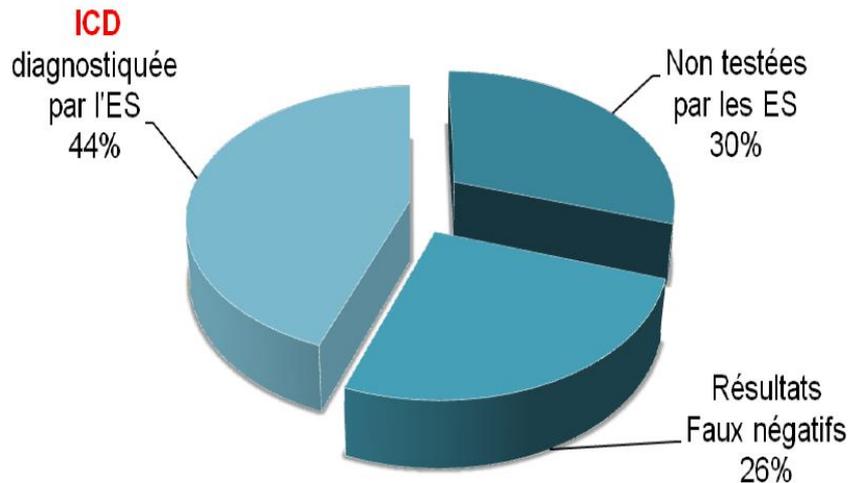


# Sous-diagnostic des ICD en France



## ■ Patients hospitalisés

- ⇒ Etude EUCLID 2012/2013: 70 ES
- ⇒ Analyse de 651 selles diarrhéiques envoyées au laboratoire indépendamment de la demande du clinicien



**Prévalence CD toxigène 9,7%**

**56% des ICD non diagnostiqués par l'ES**

⇒ **Défaut de sensibilisation**

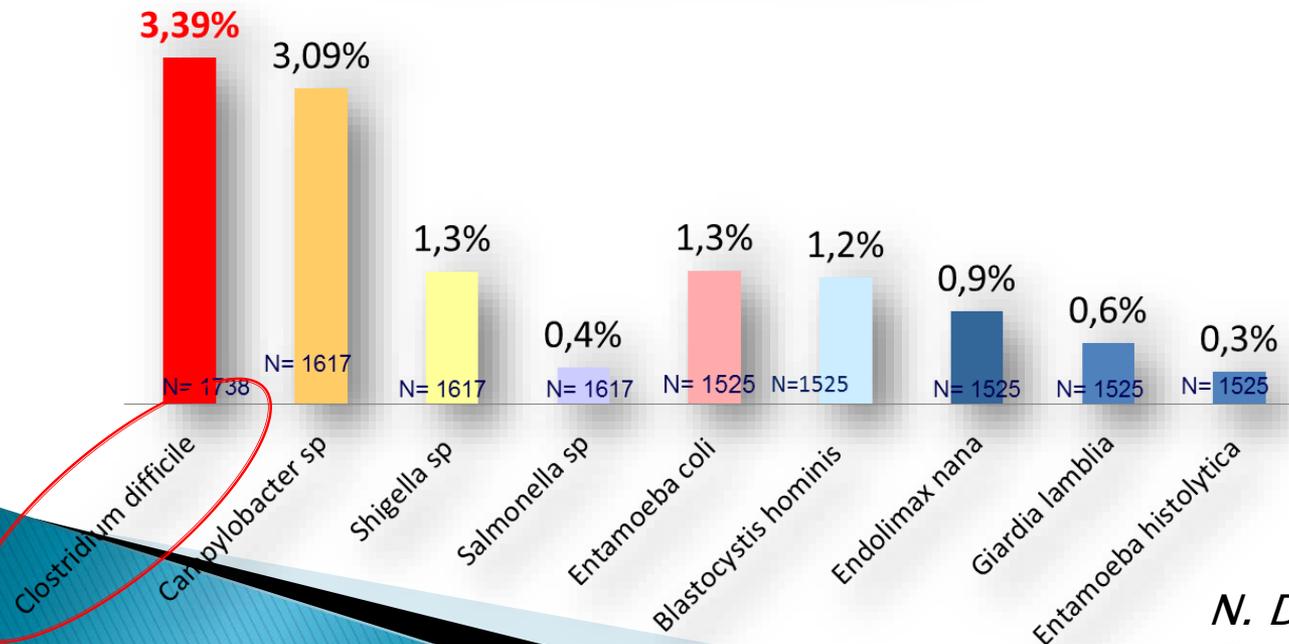
⇒ **Mauvaise sensibilité des tests EIA**

# Sous-diagnostic des ICD en France

- **En communautaire**

- ⇒ Etude COMMUNODIFF (résultats préliminaires)
- ⇒ 1738 patients adressés pour coproculture

Prevalence of CD and enteric pathogens



1<sup>er</sup> pathogène

# Diagnostic ICD: Recommendations

- Eviter les redondances < 7 jours en cas de résultat négatif

⇒ Gain diagnostique faible

Auteurs	Technique	Patients (n)	Gain diagnostique
Aichinger et al. 2008 <sup>1</sup>	EIAA + B, PCR	5,788	1.9% (7 days)
		2,827	1.7% (7 days)
Renshaw et al. 1996 <sup>2</sup>	CTA	2,009	1%

⇒ Perte de spécificité

- Ne pas faire de contrôle microbiologique de guérison



*Barbut F, JNI 2015*

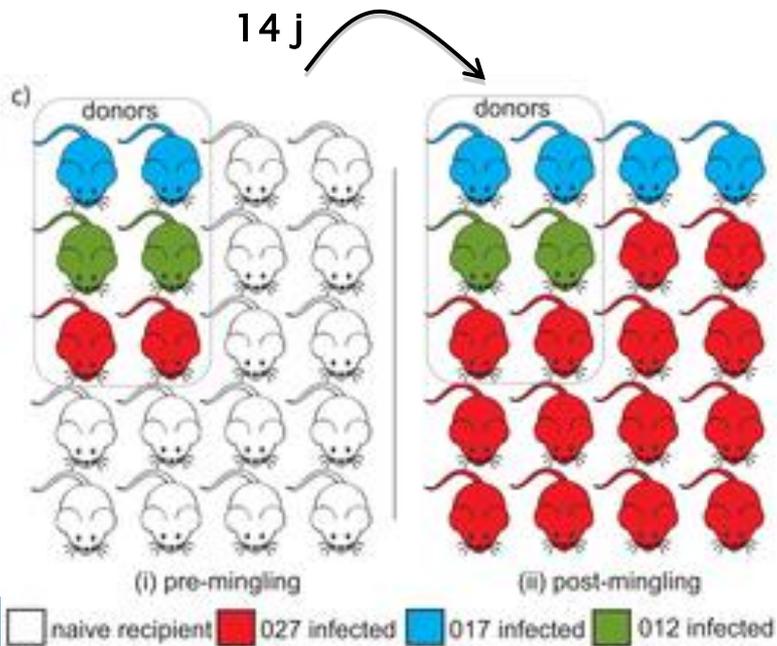
*Sethi et al., ICHE 2010*

# ! Ribotype 027

- Hyperproduction *in vitro* des toxines A et B, toxine binaire
- Potentiel épidémiogène ++



Lawley TD et al., PLoS Pathogens 2012



## Forme épidémique et/ou sévère

Infection communautaire à CD motivant l'hospitalisation	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non
Transfert en réanimation pour infection à CD	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non
Décès lié à l'infection à CD dans les 30 jours	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non
Hyperleucocytose $>20\ 000/\text{mm}^3$	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non
Traitement chirurgical de l'infection à CD	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non
Epidémie ou cas groupés d'infections à CD	<input type="checkbox"/> oui	<input type="checkbox"/> non



Envoi souche au CNR

Figure 1. Epidemic *C. difficile* 027/B1 causes persistent infection with enhanced transmissibility compared to other virulent variants.

# Coprocultures standards

## ▶ Intérêt faible :

- Seules 0,5 à 14% des coprocultures sont positives **SI LES SELLES SONT PATHOLOGIQUES**

## ▶ Ne prélever :

- Que les selles diarrhéiques (cf *Clostridium*)

- Et Les patients à risque

- Personnes âgées
- Immunosuppression
- Valvulopathie ou anévrisme aortique
- Insuffisance rénale

Ou les contextes particuliers  
TIAC

Voyage  
Epidémie

Ou les formes graves

Septicémie  
Abdomen chirurgical  
Troubles neurologiques

Pas d'intérêt à la coproculture standard chez le patient hospitalisé depuis plus de 72 h en dehors de ce contexte

# L'hôpital local à 90km de votre CH vous sollicite pour un avis:

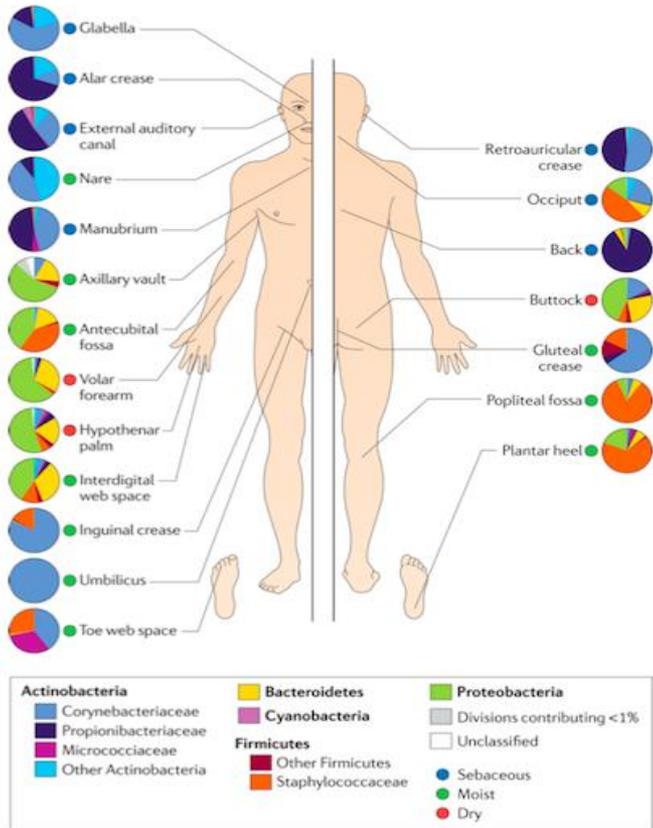
- ▶ Patiente de 96 ans
- ▶ Antécédents: AOMI stade 3, I veineuse, PTH bilatérale avec ulcères mixtes depuis 5 ans
- ▶ Vit à domicile avec IDE, auxiliaires de vie
- ▶ Épisode d'oedème des membres inférieurs avec fièvre et syndrome inflammatoire (CRP 200, GB 17100)
- ▶ Traitement à domicile Amoxicilline acide clavulanique puis ceftriaxone SC
- ▶ Mise à l'admission sous Pristinamycine sans efficacité



Que proposez vous?

- ▶ Il faudrait documenter l'infection pour cibler l'antibiothérapie

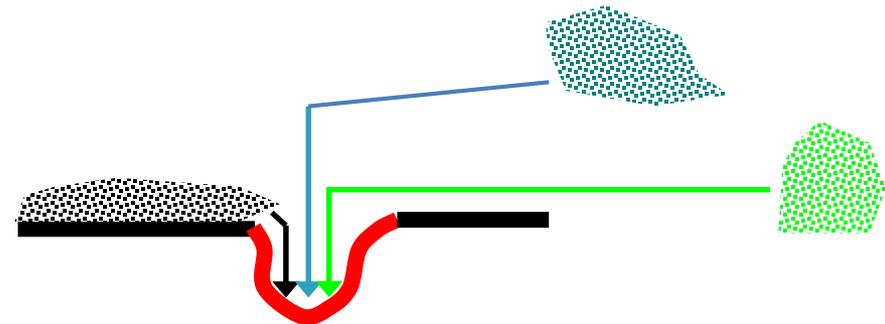
# Colonisation



Grice et al., Nature Reviews Microbiology 2011

## Phénomène physiologique

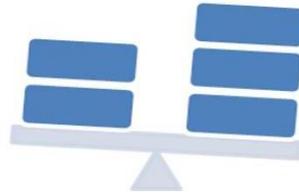
- ⇒ 15-30000 espèces bactériennes provenant de la flore commensale cutanée, des flores endogènes ou de l'environnement
- ⇒ Bactéries peu virulentes



Remerciements: Pr Lavigne, Dr Remy et Dr Schuldiner

# Infection $\neq$ Colonisation

Colonisation



Infection

La plaie est **obligatoirement colonisée** par la flore commensale du patient ou par des espèces bactériennes provenant de l'environnement ou des flores endogènes du patient.

➔ La présence de bactéries sur une plaie ne signifie donc pas qu'elle soit infectée

Objectifs du prélèvement :

- limiter l'isolement des bactéries colonisantes
- identifier les bactéries réellement infectantes

# Préparation de la plaie : Lavage

- Du pied : à l'eau et au savon
- De la plaie : au sérum physiologique
- **Antiseptiques ?**
  - à prohiber lors des soins: pas de preuve d'efficacité
  - possible lors d'un prélèvement mais **rinçage obligatoire** au sérum physiologique



# Préparation de la plaie : DéterSION



## Débridement de la plaie chirurgical ++ ou mécanique

- ⇒ **Intérêt diagnostique: Exploration des différents compartiments de la plaie, visualisation complète, extension, corps étrangers**
- ⇒ **Intérêt pronostique: Réalisation de prélèvements fiables**
- ⇒ **Intérêt thérapeutique: Exérèse des tissus nécrosés, dévitalisés, fibreux, réduction de l'inoculum bactérien, drainage des exsudats**
- ⇒ **Intérêt préventif: Correction de déformations**



**AOMI**

# Procédures de prélèvement



## Écouvillonnage superficiel : à éviter

- passage d'un écouvillon de coton sur une surface de 1cm<sup>2</sup> de la plaie dans un mouvement de zig-zag combiné à une rotation
- ne pas prélever sur les bords
- recueille la flore colonisante, ignore les bactéries anaérobies

## Curetage-écouvillonnage de la base de l'ulcère :

- prélèvement de tissu après grattage de la base de l'ulcère (curette, scalpel)
- indiquée pour les prélèvements superficiels et les plaies anfractueuses profondes

# Procédures de prélèvement

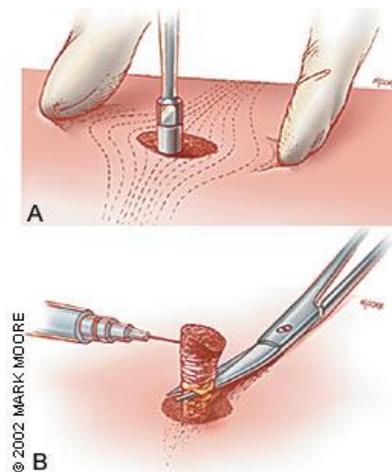


## Aspiration à l'aiguille fine :

- Par zone saine désinfectée (antiseptique)
- Plaies avec liquide purulent, collecté dans un abcès profond
- En l'absence de liquide, injecter 1 à 2 mL de sérum physiologique
- Envoi au laboratoire de la seringue ayant servi au prélèvement, sans aiguille, purgée d'air, bouchée hermétiquement et stérilement

## Biopsie tissulaire : à privilégier

- Prélèvements de 2-3 fragments issus de  $\neq$  zones
- Passage par peau saine
- Tube stérile avec quelques gouttes de sérum  $\phi$
- Au lit du malade, après préparation de la plaie





*Remerciements: Pr Lavigne, Dr Remy et Dr Schuldiner*

# Procédures de prélèvement

## Biopsie osseuse : à privilégier

- méthode de référence pour le diagnostic d'ostéite
- par chirurgie ou par ponction percutanée en peau saine après désinfection de la zone de prélèvement
- peut être guidée par l'imagerie
- pot stérile avec quelques gouttes de sérum  $\phi$

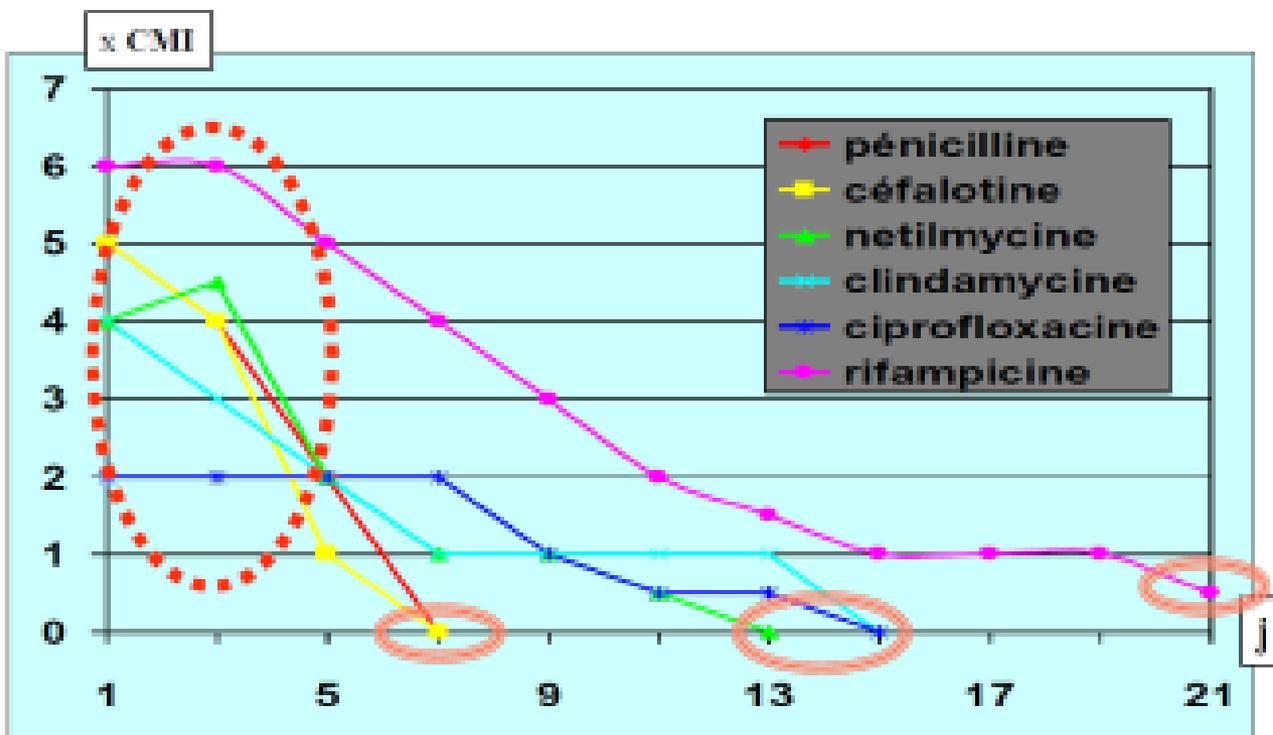


## Hémocultures aéro-anaérobies

- utiles en cas d'infection grade 4, bactériémies secondaires à des ostéites
- acheminement rapide au laboratoire de microbiologie



# «Fenêtre» antibiotique avant biopsie osseuse



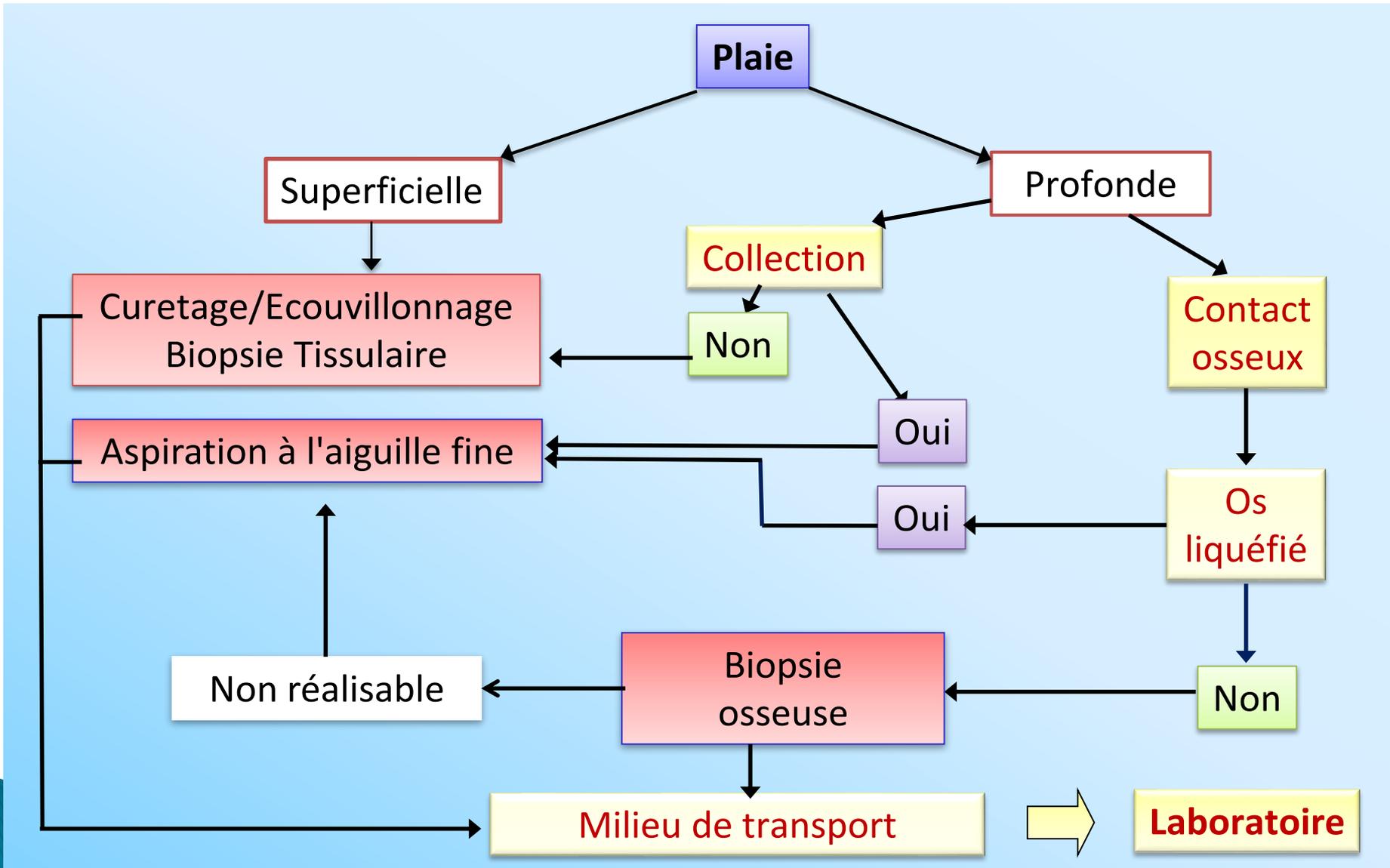
Witso et al. Acta Orthop Scand, 1999

**Prélèvement AVANT mise sous antibiotique !**

Remerciements: Pr Lavigne, Dr Remy et Dr Schuldiner

Witso et al., 1999

# Le niveau d'atteinte détermine le type de prélèvement:



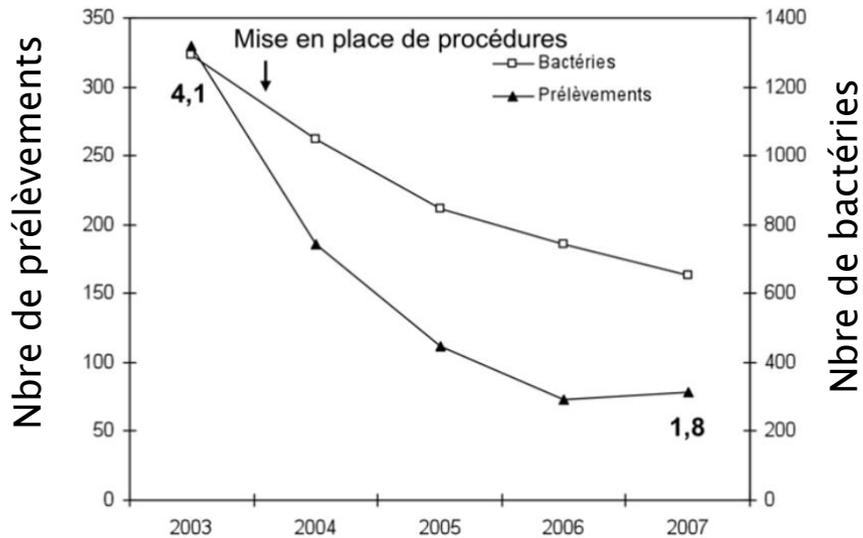
# Interprétation des résultats

**Il n'existe à ce jour aucun moyen formel permettant de différencier une colonisation d'une infection !!!**

**➔ L'interprétation doit tenir compte :**

- des conditions de recueil du prélèvement
- du délai de transport du prélèvement au laboratoire
- des conditions de transport du prélèvement
- du type de bactéries isolées
- du nombre de prélèvements où la même bactérie est isolée (cas des bactéries commensales)
- **de la clinique +++**

# Mise en place de procédures (CHU de Nîmes–2003)



Depuis 2003 :

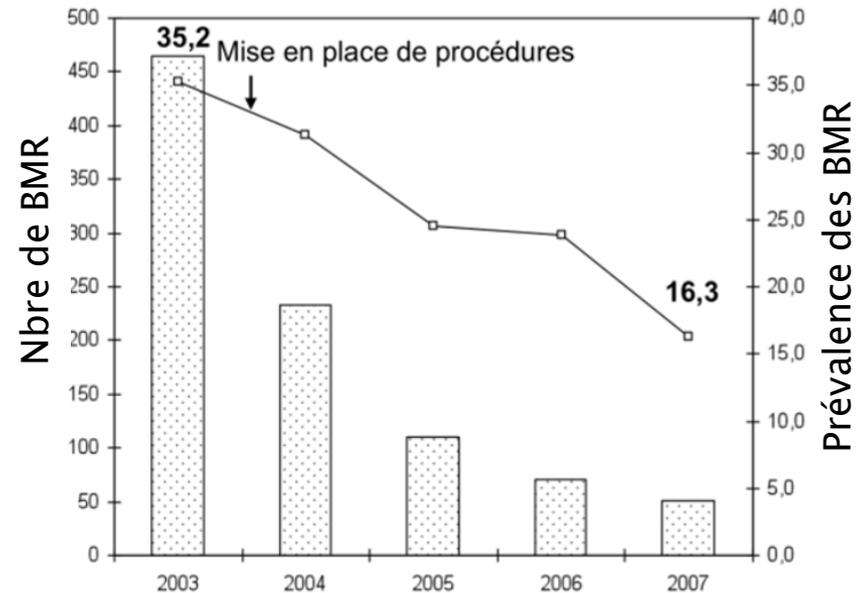
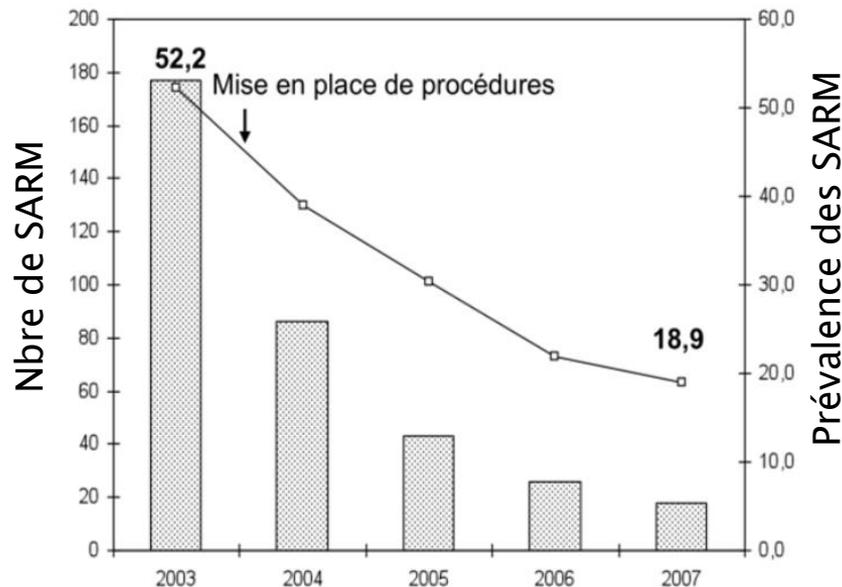
Nbre de BMR divisé par 2

Economie

. Prélèvements 21 000 €

. ATB 162 000€

Nbre d'amputations divisé par 3



Remerciements: Pr Lavigne, Dr Remy et Dr Schuldiner

Sotto et al, Diabetologia 2010

- ▶ Le médecin du service de médecine de l'établissement vous appelle pour adaptation antibiotique
- ▶ M. Robert M. 84 ans, diabétique a été admis 72 h auparavant, en provenance de son EHPAD, pour une pneumopathie hypoxémiante de la base droite. Il évolue bien sous Augmentin mais 1 des 2 Hémocultures prélevées aux urgences montre un *Staphylocoque epidermidis* résistant à l'Augmentin

**Hémoculture (Flacon anaérobie)**

Hémoculture anaérobie 1. Staphylococcus epidermidis

	.
	1
PENICILLINE G	R (> 0.25)
OXACILLINE	R (> 2.0)
GENTAMICINE	R (2.0)
AMIKACINE	R (16.0)
TOBRAMYCINE	R (<= 1.0)
TETRACYCLINE	R (> 8.0)
ERYTHROMYCINE	R (> 4.0)
CLINDAMYCINE	R (> 8.0)
PRISTINAMYCINE	I (1.0)
LINEZOLIDE	S (1.0)
CO-TRIMOXAZOLE	S (<= 10.0)
NITROFURANTOINE	S (<= 16.0)
OFLOXACINE	R (> 4.0)
ACIDE FUSIDIQUE	R (> 16.0)
FOSFOMYCINE	R (> 64.0)
RIFAMPICINE	R (> 2.0)

Légende: Susceptibilité (CMI)

**Hémoculture (Flacon aérobie) stérile**

- ▶ Quelle adaptation antibiotique ?
  - ▶ Y a-t-il d'autres prélèvements à réaliser ?
- 

# Hémocultures

## Les difficultés: ROLE FONDAMENTAL DU PRELEVEUR

❑1. Faire en sorte que la bactérie présente dans le sang soit introduite dans le flacon

= suffisamment de sang mis en culture

sinon la culture restera stérile ! FAUX NEGATIF

❑2. Eviter d'introduire une bactérie de la peau : éviter les contaminations

= Respect des conditions d'antisepsie

# 1. Importance du Volume dans le flacon

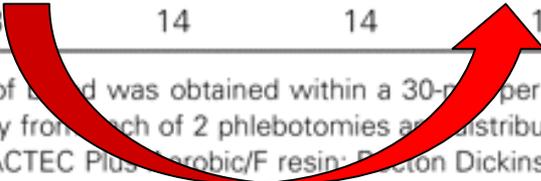
- Nombreuses études ont montré :

- 2 flacons mis en culture: 69% de sensibilité
- 4 flacons mis en culture: 90% de sensibilité
- 6 flacons mis en culture : 98% de sensibilité
- + de 6 flacons : pas mieux que 6 flacons

 **+ 29%**

*Lee et al. J Clin Microbiol 2007*

Patient group	No. of patients, by volume of blood			
	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
No endocarditis	235	305	346	371
Endocarditis	13	14	14	14

 **+ 37%**

**NOTE.** A total of 40 mL of blood was obtained within a 30-min period; 20 mL was obtained separately from each of 2 phlebotomies and distributed equally between 1 aerobic (BACTEC Plus Aerobic/F resin; Becton Dickinson) and 1 anaerobic (BACTEC Lytic/10 Anaerobic/F; Becton Dickinson) bottle.

*Cockerill et al. Clin Infect Dis 2004*

# 1.Importance de la quantité de sang prélevé

- ▶ Volume optimal : 10 ml par flacon
- ▶ Acceptable : 8 à 10 ml



Volume total prélevé : 40 à 60 ml

Prescription médicale d'hémocultures pour un épisode =  
2 à 3 paires de flacons correctement remplis,  
sur une période de 24H =  
4 à 6 flacons

## 2. Contaminations trop fréquentes

- ⇒ SCN
- ⇒ Corynébactéries
- ⇒ *Propionibacterium acnes*
- ⇒ *Bacillus* spp

**1. Antiseptie 4 temps:** déterSION, rinçage, séchage, désinfection

### Quels désinfectants ?

méta-analyse (4 études): 21 300 hémocultures

**solutions alcooliques** > solutions aqueuses

RR = 0,53 (CI95% : 0,31 - 0,90)



Caldeira et al. *J Hosp. Infect.* 2011

### Désinfection :

- solution alcoolique (PVI ou chlorhexidine)
- même gamme que produit de déterSION
- laisser agir – séchage spontané (30 sec minimum)

# La ponction unique : prélever les 6 flacons en 1 fois

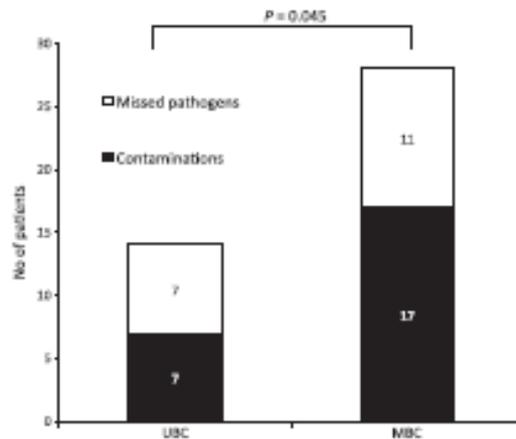
ORIGINAL ARTICLE

10.1111/1469-0691.12656

## Unique blood culture for diagnosis of bloodstream infections in emergency departments: a prospective multicentre study

S. Dargère<sup>1</sup>, J.-J. Parienti<sup>2,3</sup>, E. Roupie<sup>4</sup>, P.-E. Gancel<sup>4</sup>, E. Wiel<sup>5</sup>, N. Smaiti<sup>5</sup>, C. Loiez<sup>6</sup>, L.-M. Joly<sup>7</sup>, L. Lemée<sup>8</sup>, M. Pestel-Caron<sup>8</sup>, D. du Cheyron<sup>9</sup>, R. Verdon<sup>1</sup>, R. Leclercq<sup>3,10</sup>, V. Cattoir<sup>3,10</sup> and UBC study group<sup>a</sup>

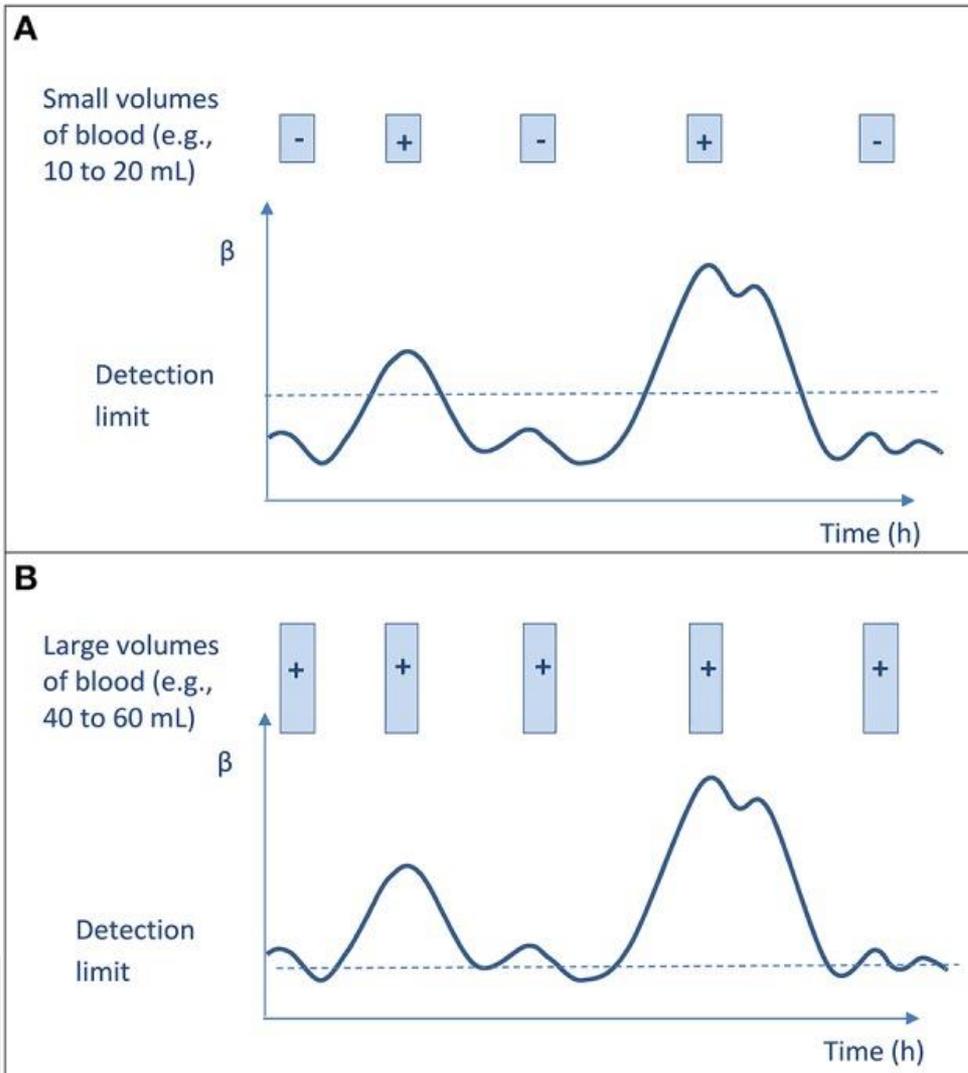
Article published online: 28 April 2014



**FIG. 4.** Comparison of the technique of unique blood cultures (UBC) with that of multiple blood cultures (MBC) for patients with contaminations (white bars) and missed pathogens (black bars).

Moins de contaminations  
Moins de faux négatifs

# Hémocultures



## Recommandations REMIC 2015

**Volume total optimal  
= 40-60 mL**



**6 flacons  
(ou 4 bien remplis)**



# Hémocultures

- **Détection des bactériémies équivalente, à volume de sang égal, quelque soit la stratégie de prélèvement (unique ou multiple) sur 24h**

## **Avantages du prélèvement unique:**

- ⇒ **Moindre taux de contamination**
- ⇒ **Gain de temps pour mise en route antibiothérapie**
- ⇒ **Pas d'oubli des prélèvements 2 et 3**
- ⇒ **Moindre sollicitation du patient**
- ⇒ **Diminution du risque AES, moindre temps personnel**

# Intérêt des Prélèvements respiratoires

- ▶ Qu'en pensez vous ?

# Intérêt des Prélèvements respiratoires

- ▶ A but épidémiologique, en établissement de soins
  - Prélèvements grippe en EHPAD au début de l'épidémie
  - Suspicion de Coqueluche
  - Suspicion de Légionellose

# Intérêt des Prélèvements respiratoires

- ▶ A but thérapeutique
  - Suspicion de germes atypiques
  - Terrain d immunosuppression
  - Patient susceptible d avoir acquis des BMR: mucoviscidose, BPCO

# Pré requis pour un ECBC interprétable

- ▶ A jeûn, idéalement le matin
- ▶ En absence d'antibiothérapie idéalement
- ▶ En absence de toute cigarette
- ▶ Prothèses dentaires ôtées
- ▶ Dents brossées
- ▶ Après rinçage bucco-dentaire avec du serum physiologique ou de l'eau du robinet
- ▶ Après un effort de toux (sputum expectoré) ou après kinésithérapie (sputum induit)
  
- ▶ Le prélèvement est recueilli dans un pot stérile (muni d'un bouchon sécurisé permettant le transport).
- ▶ Bien identifier le matériel avec le nom du patient et la nature et date du prélèvement
- ▶ L'exsudat produit doit provenir d'une origine profonde et **ne pas être un exsudat rhinopharyngé contaminé par la salive.**
- ▶ Il n'est pas nécessaire d'envoyer plus d'une (bonne) expectoration par jour au laboratoire.

## Prélèvement pour diagnostic grippe

- introduire l'écouvillon dans une narine, aller le plus loin possible vers le naso-pharynx
- frotter vigoureusement le coton de façon à détacher le plus possible de cellules épithéliales
- décharger l'écouvillon dans le milieu de transport
- avec le même écouvillon, refaire le même geste dans l'autre narine, puis casser l'écouvillon dans le milieu de transport
- après identification, transporter à température ambiante

**Laisser l'écouvillon dans le milieu de transport,  
ne pas oublier de préciser la localisation de l'écouvillonnage**



[http://www.nejm.org/action/showMediaPlayer?doi=10.1056%2FNEJMe0903992&aid=NEJMe0903992\\_attach\\_1&area=](http://www.nejm.org/action/showMediaPlayer?doi=10.1056%2FNEJMe0903992&aid=NEJMe0903992_attach_1&area=)

# Secteur Sérologie

## ■ Sérologies utiles dans des contextes cliniques précis:

- Syphilis
- *Brucella* (CNR)
- *Bartonella henselae* ou *B. quintana*
- *Borrelia* spp.
- *Francisella* spp.
- Rickettsies

## ■ Sérologies inutiles:

- Coqueluche
- Typhoïde
- *Helicobacter pylori*
- Streptocoque, staphylocoque
- *Listeria*
- Mycobactéries
- Gonocoque, pasteurelle, shigelles

## ■ Sérologies discutables

(valeur diagnostique incertaine):

- *Legionella pneumophila*
- *C. trachomatis, pneumoniae, psitacci*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Yersinia enterocolitica*
- *Campylobacter jejuni*

# Nouvelles technologies en Microbiologie

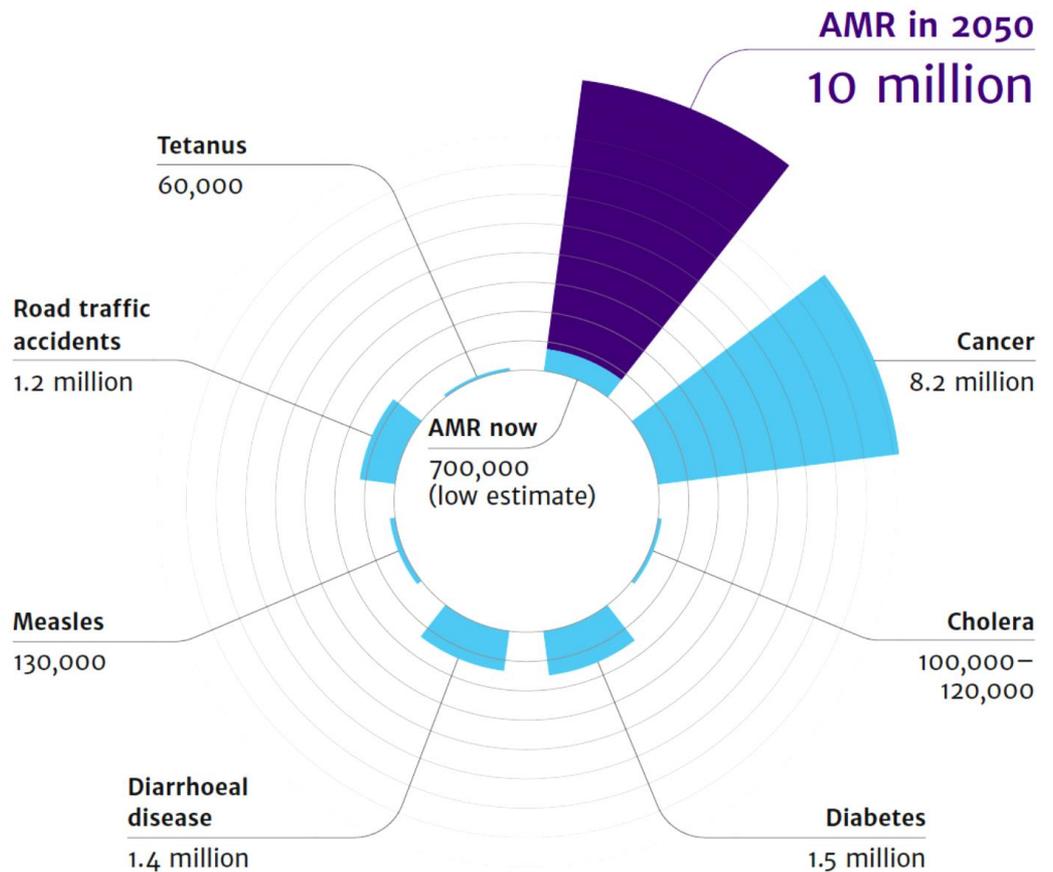
# Contexte

- Diffusion des Bactéries MultiRésistantes (BMR)
- Emergence des Bactéries Hautement Résistantes (BHRé)
- Impact



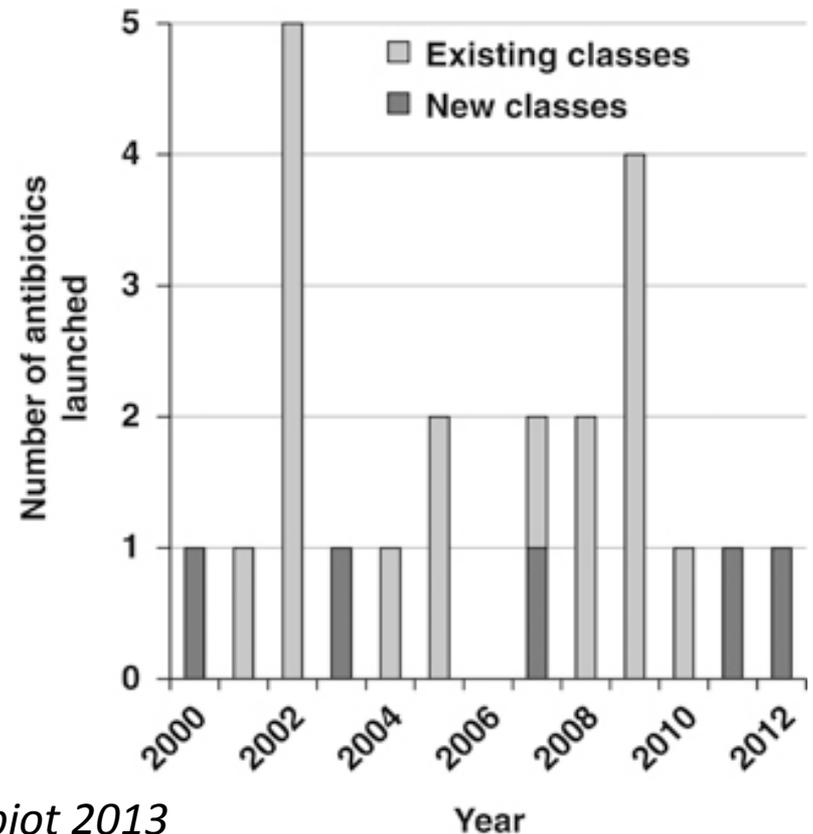
Review on  
Antimicrobial  
Resistance

*O'Neill J. 2016*



# Contexte

- Diffusion des Bactéries MultiRésistantes (BMR)
- Emergence des Bactéries Hautement Résistantes (BHRe)
- Impact
- Peu de nouvelles classes d'ATB

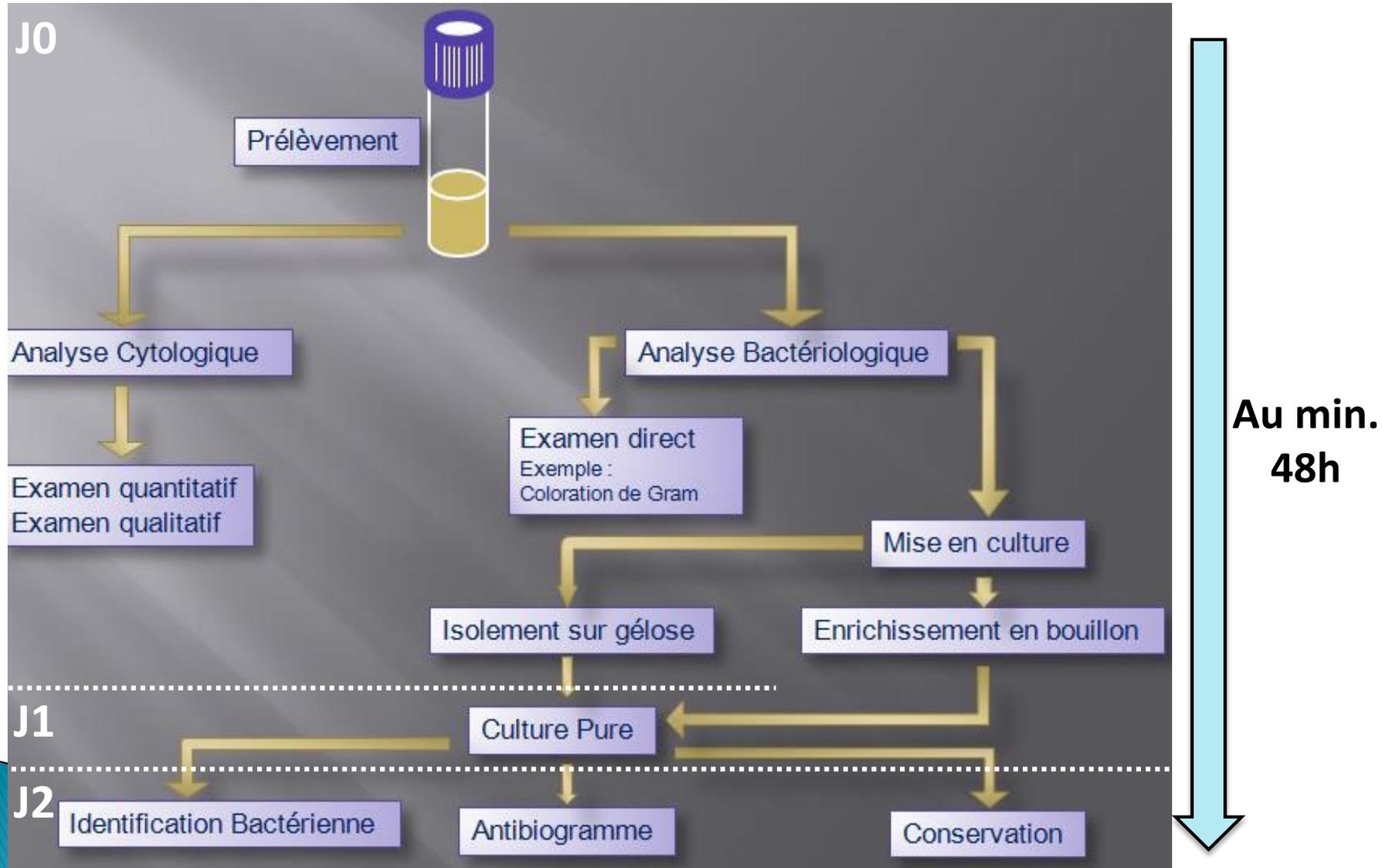


*Butler MS et al., J Antibiot 2013*

# Nouvelles solutions?

- ⇒ **Bon usage des ATB**
- ⇒ **Respect des précautions d'hygiène/Prévention des infections**
- ⇒ **Nouvelles solutions thérapeutiques**
- ⇒ **Amélioration du diagnostic +++**
  - **Diagnostic plus rapide: bactérie et résistance**
  - **Différenciation infection/colonisation**
  - **Diagnostic amélioré pour les infections « complexes »: os, plaies chroniques, endocardites**

# Diagnostic bactériologique classique



# Nouvelles solutions?

**Diagnostic classique**  
48-72h



**Spectrométrie de masse**



**Biologie moléculaire**

# Nouvelles solutions?

**Diagnostic classique**  
48-72h



**Spectrométrie de masse**



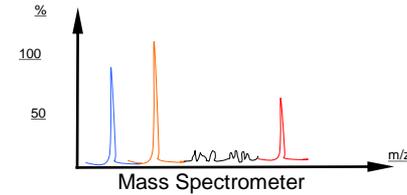
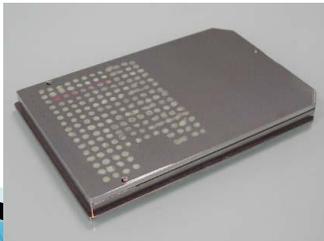
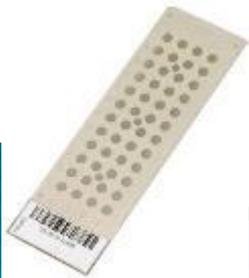
**Biologie moléculaire**

# Spectrométrie de masse

## ■ MALDI-TOF MS:

**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization

-**T**ime of **F**light **M**ass **S**pectrometry



Detection

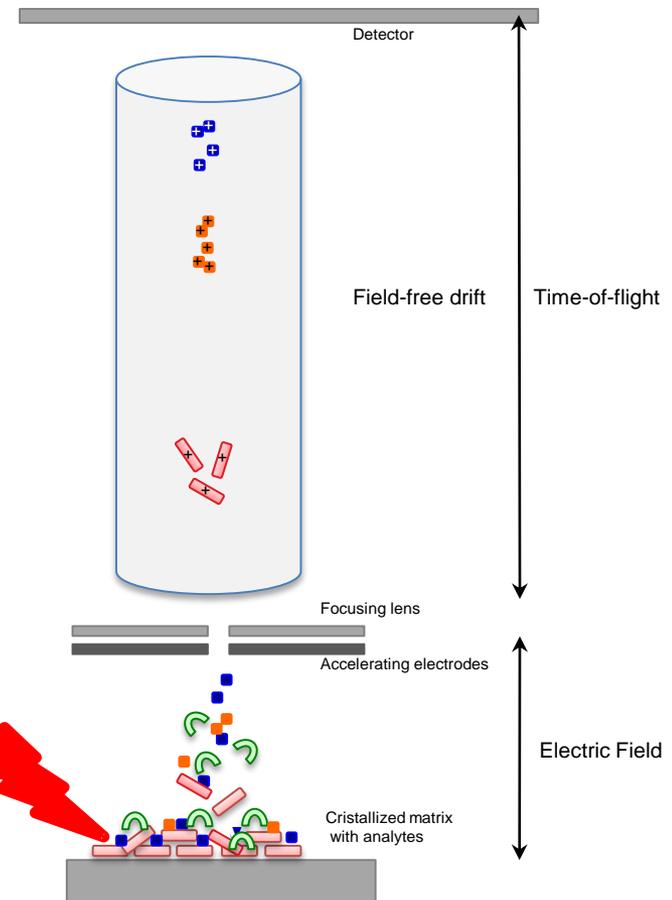
Separation

Acceleration

Ionization

Laser beam

Desorption

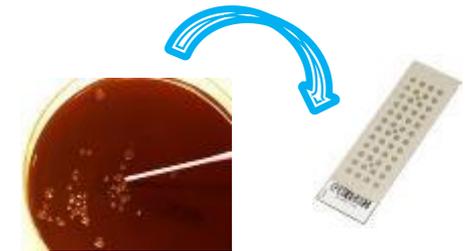
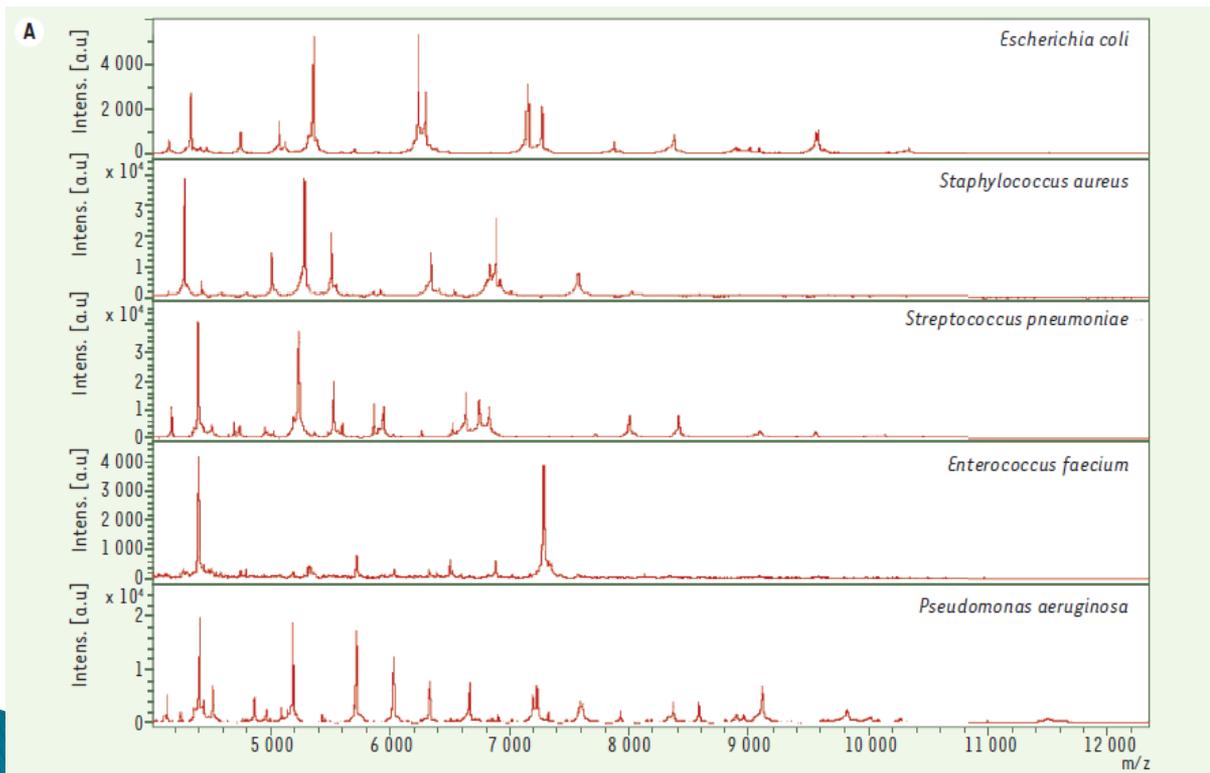


# Spectrométrie de masse

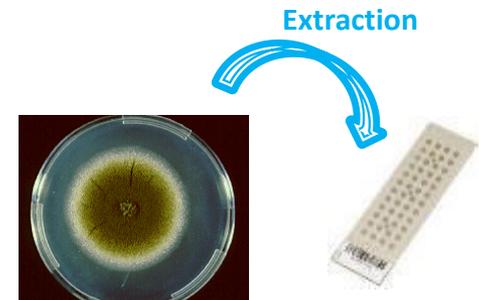
- MALDI-TOF MS:

⇒ Identification / colonie

Identification universelle



10 minutes



20 minutes

# Spectrométrie de masse

## ■ MALDI-TOF MS:

- ⇒ Identification / colonie
- ⇒ Identification / prélèvement



Authors	Sample		Id species level	Id genus level	Main identification difficulty
La Scola et al. [43]	Blood (n = 599)	positive blood culture	76%	76%	<i>Streptococcus</i> sp., ← polymicrobial samples
Stevenson et al. [44]	Blood (n = 212)	positive blood culture (179), spiked bottles (33)	80.2%	80.2%	<i>Streptococcus mitis</i> group, ← <i>Propionobacterium acnes</i>
Ferroni et al. [45]	Blood (n = 685)	positive blood culture (388), spiked bottles (312)	89%	98%	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ← <i>Streptococcus mitis</i> group ←
Christner et al. [46]	Blood (n = 277)	positive blood culture	94.2%	95%	Cocci Gram +
Ferreira et al. [47]	Blood (n = 300)	positive blood culture	42.6%, GN: 83.3%, GP: 31.8%	71.6%, GN: 96.6%, GP: 65.7%	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i>
Ferreira et al. [48]	Urine (n = 220)	positive urine samples > 10 <sup>5</sup> CFU/ml	91.8%, GN: 93.6%, GP: 66.6% <i>E. coli</i> 97.6%	92.7%, GN: 94.6%, GP: 66.6%	<i>Streptococcus</i> sp., <i>Enterococcus</i> sp., <i>Raoultella</i> sp.

# Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Improves Appropriateness of Antibiotic Treatment of Bacteremia

Anne L. M. Vlek\*, Marc J. M. Bonten, C. H. Edwin Boel

253 patients with bacteriemia:

**Table 3.** Effect of direct MALDI-TOF MS on identification time and antibiotic switching.

	Direct MALDI-TOF MS (n = 89)	Standard care (n = 164)	p-value
Median identification time in hours (IQR)	16.4 (10.3–42.9)	45.2 (35.5–55.9)	<0.001
Episodes with ID time			
<10 h	23.6%	0.6%	<0.001
10–35 h	44.9%	23.2%	0.001
35–50 h	16.9%	36.6%	0.001
>50 h	14.6%	39.6%	<0.001
Median time until first switch in antibiotic therapy in hours (IQR)	17.5 (9.8–38.8)	24.0 (9.5–47.0)	0.30

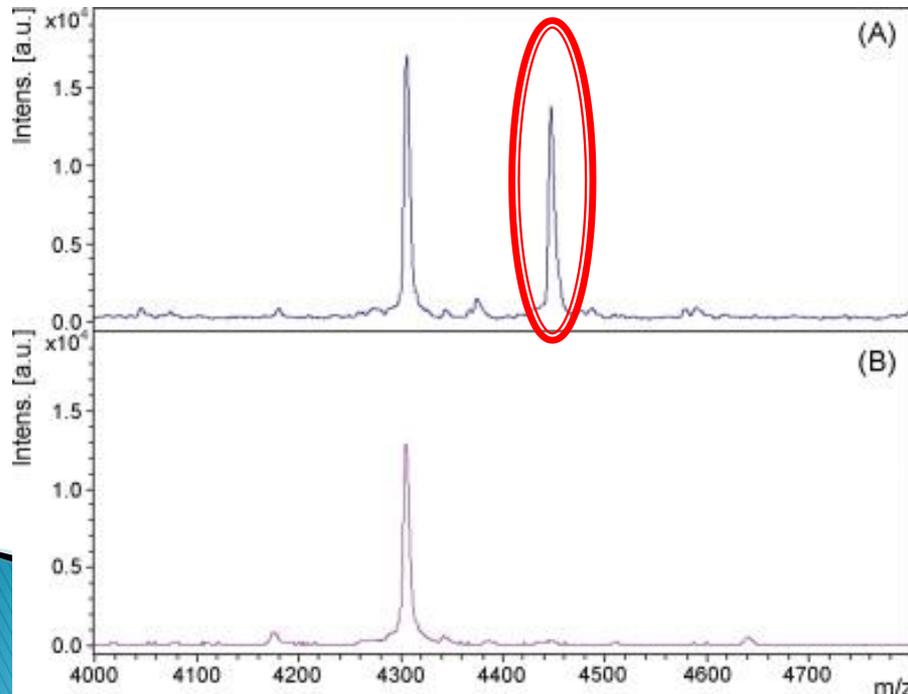
**Table 4.** Effect of direct MALDI-TOF MS on proportion of appropriate treatment.

	Direct MALDI-TOF MS	Standard care	
% (n) of episodes with appropriate therapy <24 h after positive BC <sup>a</sup>	75.3% (67)*	64.0% (105)*	+ 11%
% (n) of episodes with inappropriate therapy <24 h after positive BC <sup>a</sup>	4.5% (4)*	14.6% (24)*	
% (n) of episodes without antibiotic therapy <24 h after positive BC <sup>a</sup>	20.2% (18) (6.7% (6) other interventions <sup>b</sup> , 13.5% (12) contaminated BC)	21.4% (35) (4.3% (7) other interventions <sup>b</sup> , 11.0% (18) contaminated BC, 6.1% (10) not applicable <sup>c</sup> )	

# Spectrométrie de masse

## ■ MALDI-TOF MS:

- ⇒ Identification / colonie
- ⇒ Identification / prélèvement
- ⇒ Identification de toxines, ex: PVL



**PVL +**

**PVL -**

# Spectrométrie de masse

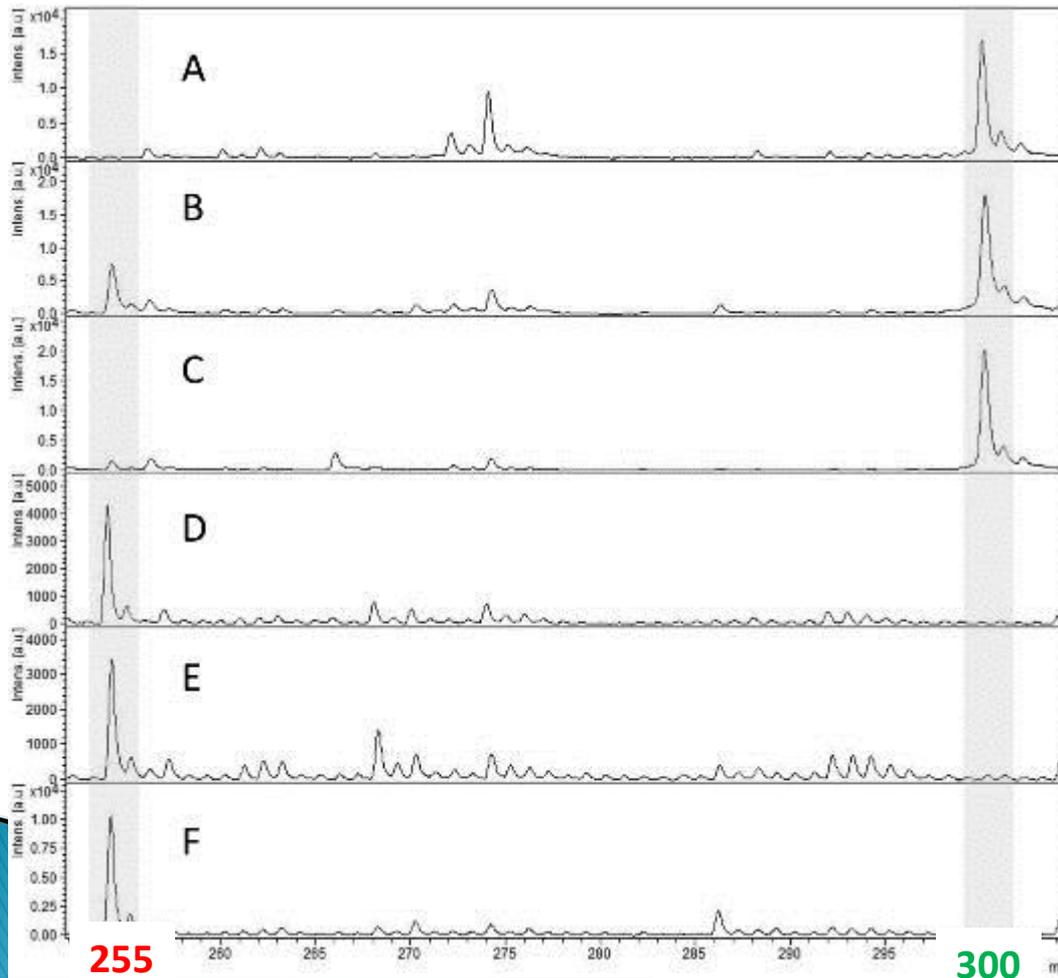
- **MALDI-TOF MS:**

- ⇒ Identification / colonie
- ⇒ Identification / prélèvement
- ⇒ Identification de toxines, ex: PVL
- ⇒ Identification des mécanismes de résistance

# Spectrométrie de masse

C. Lasserre *et al.*, JCM 2015:

MALDI-TOF spectra of imipenem hydrolysis assays after a 20-min incubation at 37° C.



Pas de carbapénémase

Pas de carbapénémase

Pas de carbapénémase

Carbapénémase (OXA-48)

Carbapénémase (KPC)

Carbapénémase (NDM)

# Nouvelles solutions?

**Diagnostic classique**  
48-72h



Spectrométrie de masse

**Biologie moléculaire**

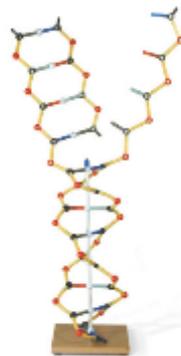
# Biologie moléculaire: quelles cibles?

ADN



- ⇒ **Gènes spécifiques de pathogènes**
- ⇒ **Gènes de virulence**
- ⇒ **Gènes de résistance**
- ⇒ **ADN ribosomal 16S + Séquençage**

ARN



- ⇒ **Génome viral**
- ⇒ **Microorganismes viables: expression des gènes**

# Biologie moléculaire: Objectifs

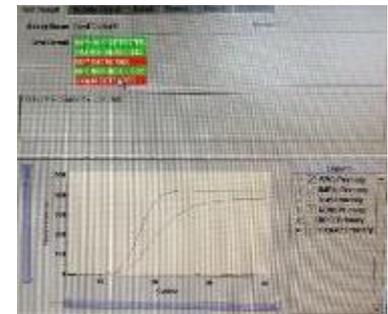
- ⇒ **Diagnostique**
  - A partir de la culture
  - A partir du prélèvement
- ⇒ **Thérapeutique**
- ⇒ **Epidémiologique**
  - Typage d'un mécanisme de résistance
  - Recherche de facteurs de virulence
  - Analyse de clonalité

# Point-of-care: Lab-on-a-chip concept

## ■ Système GeneXpert, Cepheid

- ⇒ Directement à partir du prélèvement
- ⇒ Microplateforme semi-automatisée
- ⇒ Système fermé
  - Extraction
  - PCR real-time
  - PCR simplex ou multiplex
  - CQI
- ⇒ Résultats: 30 min-2h
- ⇒ Coût

- ⇒ Xpert® EV
- ⇒ Xpert® Flu (+H1N1)
- ⇒ Xpert® MTB/RIF
- ⇒ Xpert® *C. difficile*/Epi 027
- ⇒ Xpert® MRSA/SA Nasal/SA BC
- ⇒ Xpert® CARBA-R
- ⇒ Xpert® *vanA*
- ⇒ Xpert® CT/NG
- ⇒ Xpert® GBS



# Point-of-care: Approche syndromique

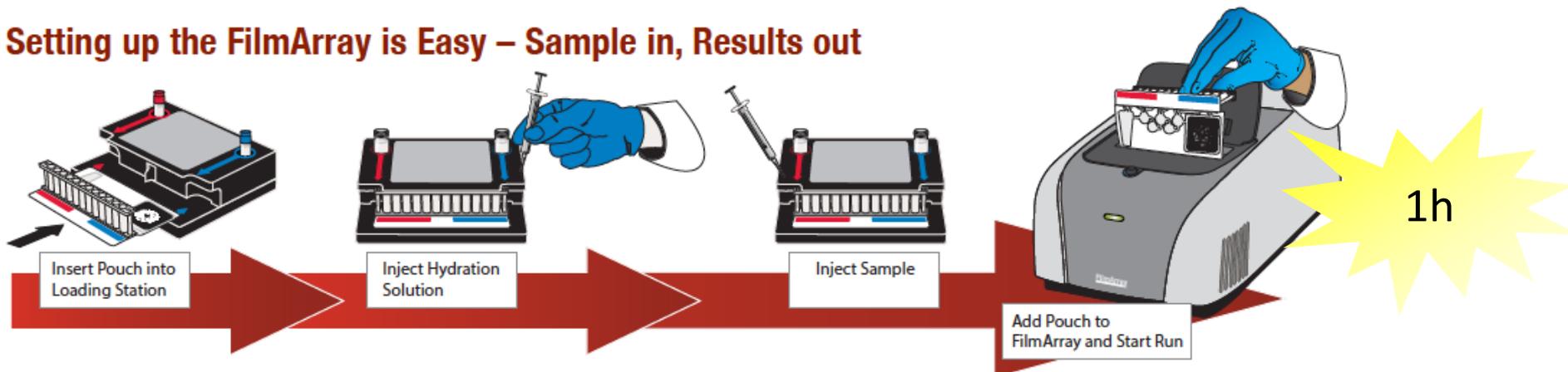
## ■ bioMérieux: FilmArray

⇒ 1/run



- ⇒ **Blood Culture Identification Panel:**
  - 24 cibles: G+/G-/levures
  - Résistance (*mecA*, *blaKPC*, *vanA/B*)
- ⇒ **Respiratory Panel:**
  - 20 cibles bactériennes et virales
- ⇒ **Gastrointestinal Panel:**
  - 22 cibles bactériennes virales et parasitaires
- ⇒ **Meningitis/Encephalitis Panel:**
  - 16 cibles bactériennes, virales et fongiques

Setting up the FilmArray is Easy – Sample in, Results out



# Approche syndromique, biopuces

- Multiplexage puis hybridation, directement à partir de l'échantillon

Ex: MobiDiag

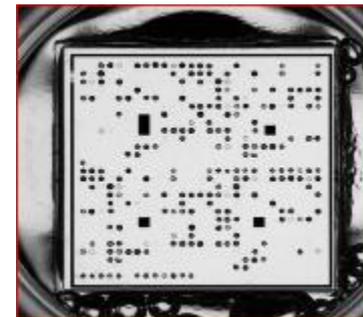
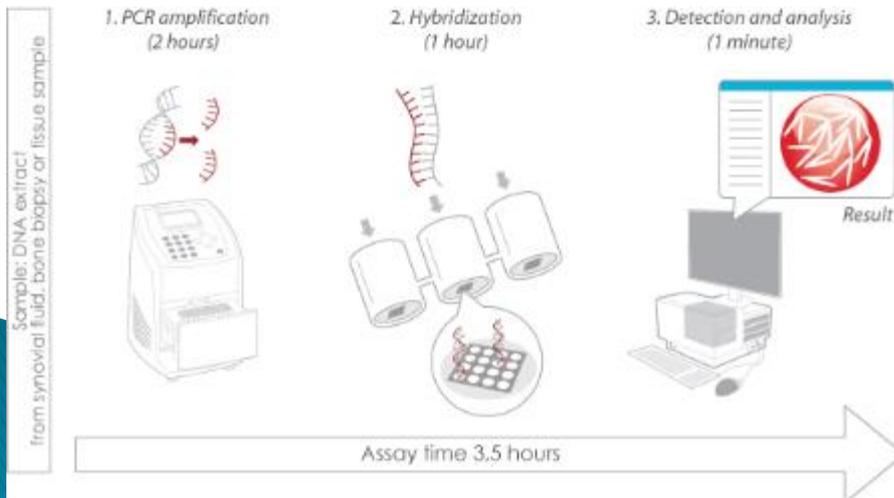


⇒ Diagnostic classique :

- Endocardites: 3 - 21 j
- Ostéites: 3-14 j

⇒ Diagnostic par biopuces à ADN :

- Endocardites: 4 h
- Ostéites: 3,5 h



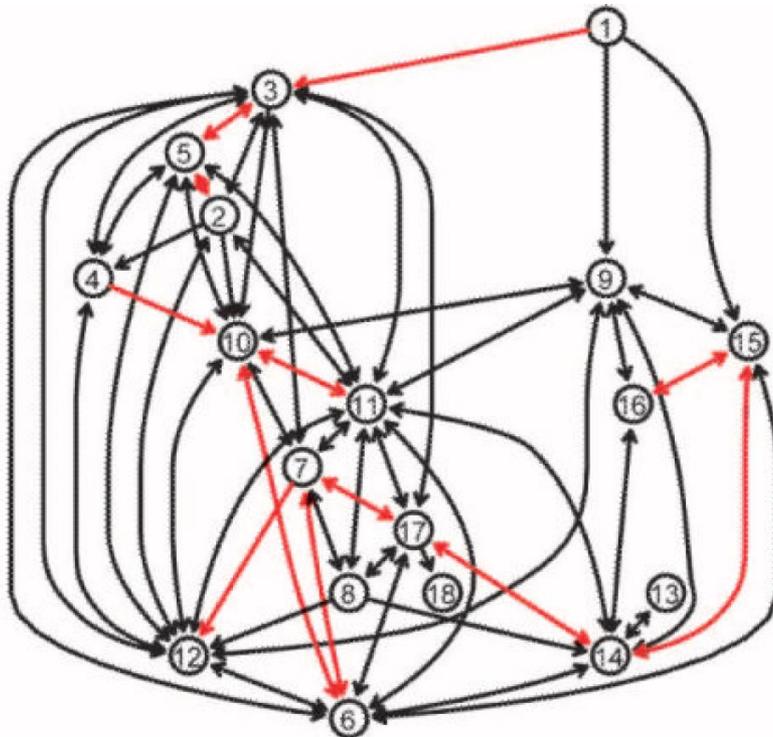
# A venir.. NGS

Snitkin ES *et al.*, Sci Transl Med 2012

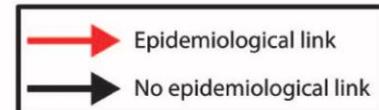
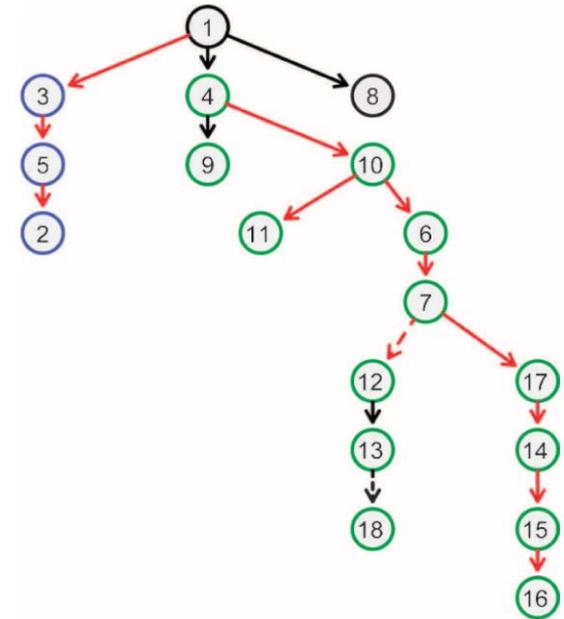
Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing

Epidémie Kp KPC  
18 cas, New York

c



NGS  
→

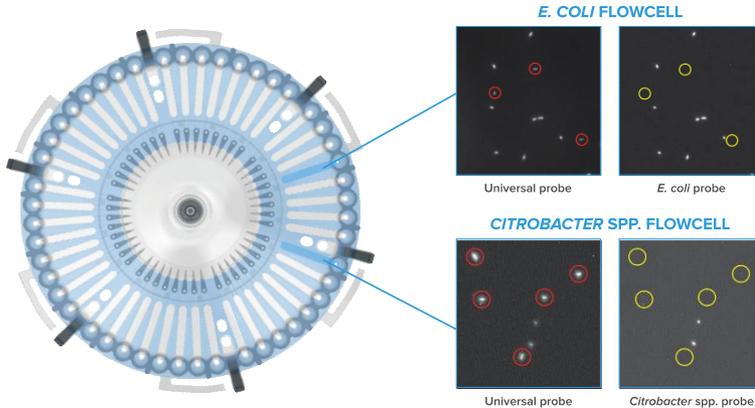


# Autre: Accelerate Pheno™ system

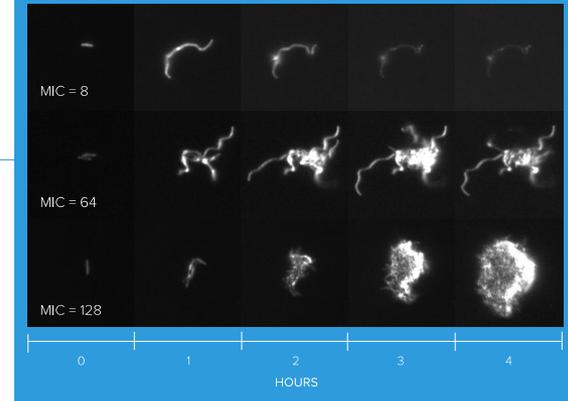


## ■ ID° et ATBG rapides

A partir des flacons d'hémocultures



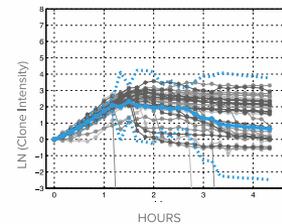
*E. COLI* STRAINS VS. PIPERACILLIN-TAZOBACTAM



**Minimum Inhibitory Concentrations**  
MICs are determined by matching growth patterns to reference growth profiles that are correlated to broth microdilution MICs. The results are then interpreted as Susceptible (S), Intermediate (I), or Resistant (R) based on FDA, CLSI, or EUCAST breakpoints and expert rules.

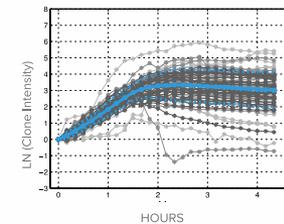
**MIC = 8**

FDA (S) CLSI (S) EUCAST (S)



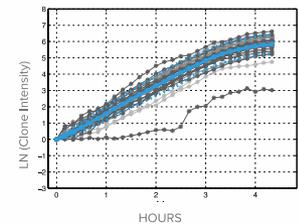
**MIC = 64**

FDA (I) CLSI (I) EUCAST (R)



**MIC = 128**

FDA (R) CLSI (R) EUCAST (R)



## ⇒ FISH

- Identification en 1h30
- Détection des prélèvements polymicrobiens

## ⇒ Analyse morphocinétique en [ATB]

- ATBG en 7h