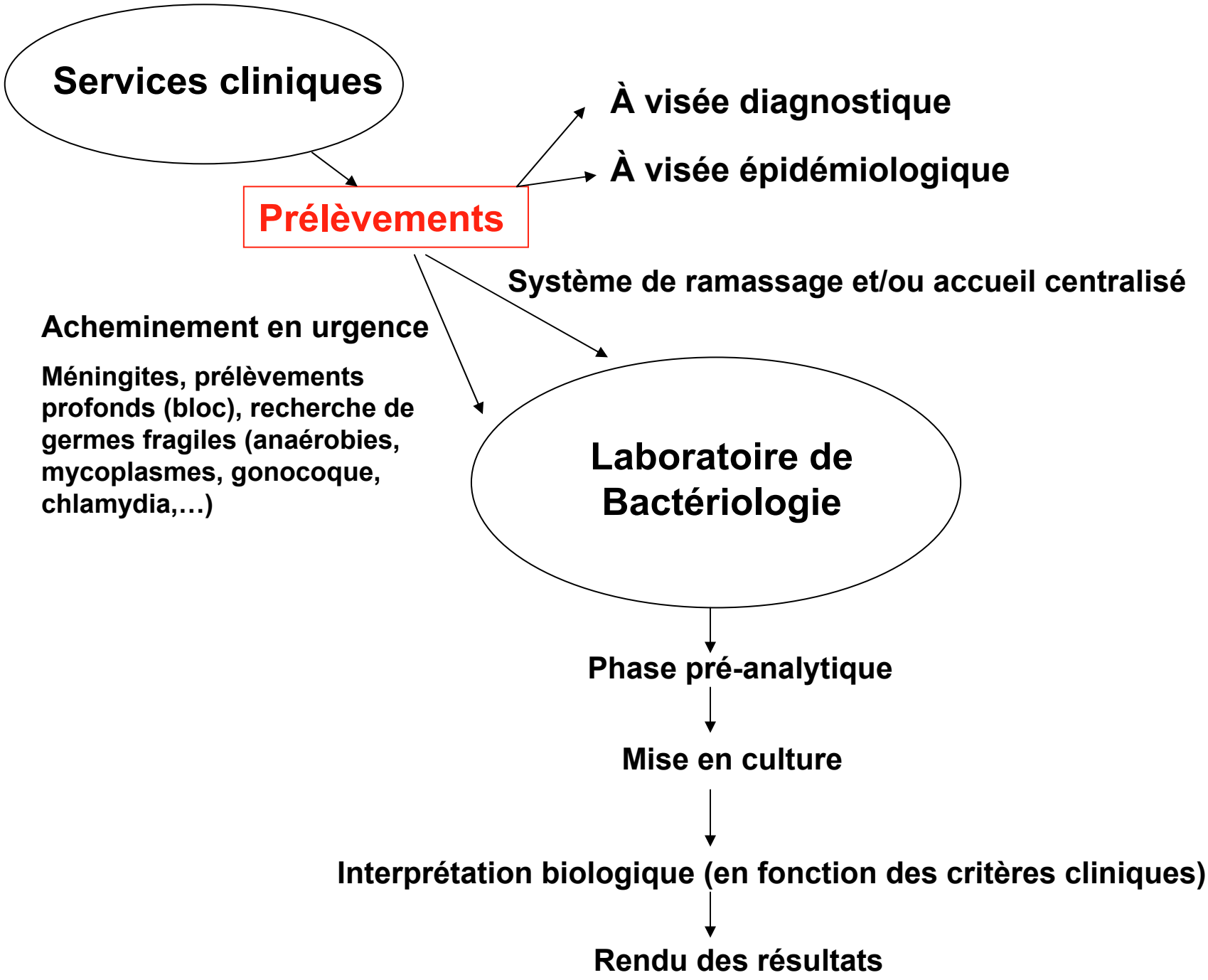
Traitement des prélèvements en Bactériologie

Marie-Cécile Ploy

Bactériologie-Virologie-Hygiène

CHU Dupuytren, Limoges


Services cliniques
À visée diagnostique
À visée épidémiologique
Prélèvements
Système de ramassage et/ou accueil centralisé
Acheminement en urgence
Méningites, prélèvements profonds (bloc), recherche de germes fragiles (anaérobies, mycoplasmes, gonocoque, chlamydia,…)
Laboratoire de Bactériologie
Phase pré-analytique
Mise en culture
Interprétation biologique (en fonction des critères cliniques)
Rendu des résultats

Guide de bonne éxécution des analyses

GBEA

Arrêté de 1994

Les laboratoires doivent mettre en œuvre tous les moyens pour fournir des résultats de qualité et doivent pouvoir faire la preuve de la mise en œuvre de ces moyens

✓**Organisation d'un laboratoire**

personnel (organigramme)

circuit des prélèvements et des résultats

✓**Installation du matériel et locaux**

✓**Maintenance et surveillance des appareils (températures des réfrigérateurs, congélateurs, étuves, calibration des automates,…)**

✓ **Réactifs (agréés, gestion des stocks, des dates de péremption des lots utilisés, conditions de stockage…)**

✓**Informatique (confidentialité, sauvegarde des données, diffusion des résultats, …)**

✓**Archivage des résultats**

✓**Gestion des déchets**

Analyses

- ✓ **procédures pré-analytiques : conditions de prélèvement, d'acheminement au laboratoire**
- ✓ **conservation des échantillons**
- ✓ **éxécution des analyses par des personnes habilitées (techniciens)**
- ✓ **validation des résultats par des personnes habilitées (biologistes)**
- ✓ **cas particulier des analyses médico-légales**
- ✓ **CQ externe et interne**

afssaps
Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Direction de l'évaluation des dispositifs médicaux
Unité contrôle national de qualité des analyses de biologie médicale
Tél. : 01.55.87.42.41
Fax : 01.55.87.42.42

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Saint-Denis, le 26/09/05

1715Z

CHU LIMOGES - HOPITAL DUPUYTREN
LABORATOIRE DE BACTERIO-VIROLOGIE
2 AVENUE MARTIN LUTHER KING
87042 LIMOGES CEDEX

Contrôle National de Qualité
Bactériologie - 05BAC1

Opération clôturée le: 23/05/05

Référence à rappeler : 05BAC1 / 1715Z

Identification bactérienne — Echantillon n° : 406

Réponse du laboratoire :		Réponse attendue
Bactérie commensale :		
[GENF] *Enterococcus faecalis*		Enterococcus faecalis

Cet échantillon contenait un E. faecalis identifié par 39% des participants. Autres réponses : Enterococcus sp. (15,1%), streptocoque groupe D (28,8%), entérocoques autres espèces (1,2%).

Recherche et identification de bactéries pathogènes :		
Salmonella groupe O:6,8 (C2)	Présence	Présence *Salmonella Hadar*
Shigella sp.	Absence	Absence *Shigella sp.*
Campylobacter sp.	Absence	Absence *Campylobacter sp.*
Yersinia enterocolitica	Absence	Absence *Yersinia enterocolitica*

99.7% des 926 participants ont signalé la présence d'une salmonelle. Détail des identifications : 64.4% Salmonella sp., 1.8% S. Hadar, 20.8% Salmonella groupe O:6 (C), 7.5% Salmonella groupe O:6,8 (C2), 1.5% Salmonella groupe O:6,7 (C1), 2% Salmonella OMB+, 2% autre sérotype ou sérogroupe.

Antibiogramme — Echantillon n° : 406

Antibiogramme (maximum 6 antibiotiques testés) à réaliser sur la bactérie entéro-pathogène isolée.

Réponse du laboratoire

Souche pathogène testée : *Salmonella groupe O:6,8 (C2)*

	Lu	Transmis
AMPICILLINE	R	R
AMOXICILLINE + ac.clavu.	I	I
CEFOTAXIME	S	S
Ac.NALIDIXIQUE	R	R
CIPROFLOXACINE	S	S
COTRIMOXAZOLE	S	S

[RG10] Système VITEK 2 bioMérieux

Réponse attendue

Souche pathogène testée : *Salmonella Hadar*

ANTIBIOTIQUES	Lu	Transmis
Amoxicilline	R	R
Amoxicilline + acide clavulanique	R	R
Céfalotine	R	R
Ceftriaxone	S	S
Cefixime	S	S
Cefotaxime	S	S
Gentamicine	S	S
Tobramycine	S	S
Tétracycline	R	R
Cotrimoxazole	S	S
Triméthoprime	S	S
Sulfamides	S	S
Acide nalidixique	R	R
Ofloxacine	S	S
Ciprofloxacine	S	S
Chloramphénicol	S	S
Nitrofuranes	S	S
Pénicillinase haut niveau		

HEMOCULTURES

Sang normalement stérile

Inoculum bactérien faible (< 1UFC/ml) : examen direct à la réception des flacons inutile (cas particulier des fièvres à *Borrelia*)

Bactériémie transitoire (sauf en cas d'endocardite, bactériémie continue)

Corrélation sensibilité et volume de sang recueilli

Généralement 2 à 3 séries d'hémocultures 24h (espace de 30 à 60 minutes)

Coût : B85 si négatif + B60 si culture positive + antibiogramme

Durée d'analyse : 5j en moyenne

incubation prolongée en cas d'endocardite (HACEK), de brucellose

HEMOCULTURES

Ensemencement direct dans le service (précautions d'asepsie)

Flacons aérobies et anaérobies contenant un milieu de culture adapté à toutes les bactéries

Nécessité de dilution du sang : dilution de substances à activité antibactérienne (complément,macrophages, antibiotiques, …)

Les flacons contiennent du SPS : anticoagulant

Culture possible de toutes les bactéries sauf mycobactéries (milieux spéciaux)

Incubation au laboratoire dans des automates à 35°C sous agitation

Analyse en continu (lecture tous les 1/4 d'heure)

Possibilité d'analyser le temps de positivité (infections sur cathéter)

ECBU

Urines normalement stériles

Contamination facile par des bactéries de la flore commensale

Acheminement rapide au laboratoire

Coût : B70 : comprend l'analyse cytologique, la mise en culture, l'identification et l'antibiogramme

Possible screening par utilisation de bandelettes (leucocytes, nitrites)

VPN > 90%

Nécessité de connaître le contexte clinique

ID, ponction sus-pubienne, pathologie rénale ou urologique, femme enceinte, diabétique, patient sondé, …

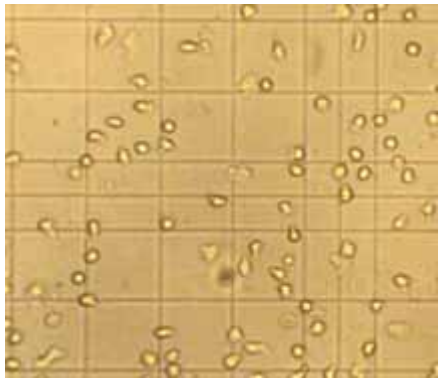
Analyse cytologique : leucocytes et hématies /ml, cristaux, cellules pavimenteuses

Analyse bactériologique : ensemencement d'1 seul milieu

de culture +/- milieu enrichi

Culture quantitative : seuil de significativité : 10^3 UFC/ml

Résultat rendu en 48h



Coproculture

Naturellement contaminée : 10^{12} bactéries / g de selles

Acheminement rapide au laboratoire (sinon +4°C une nuit max)

Parfois écouvillonnage rectal (nnés, recherche de BMR)

Possible recueil sur papier filtre

Recherches ciblées

Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia

Klebsiella oxytoca

Recherches particulières

S. aureus, Clostridium difficile*, Bactéries multi-résistantes (bacilles, entérocoques), *E. coli* 0157H7, *E. coli* entéropathogènes chez l'enfant, *Vibrio cholerae, …

Nécessité du contexte clinique, des aliments en cause si TIAC

Coproculture

Coût : **B180 : comprend la mise en culture, l'identification et antibiogramme**

B80 pour recherche de *C. difficile*

B60 Recherche de la toxine pour *C. difficile*

Examen direct possible (présence de leucocytes)

Milieux sélectifs et milieux d'enrichissement

Délai de rendu des résultats : 72h au minimum, 5j pour *C. difficile*

Liquide céphalo-rachidien

Analyse en urgence : pronostic vital en jeu, pas de délai pour le traitement et/ou la prophylaxie, germes fragiles

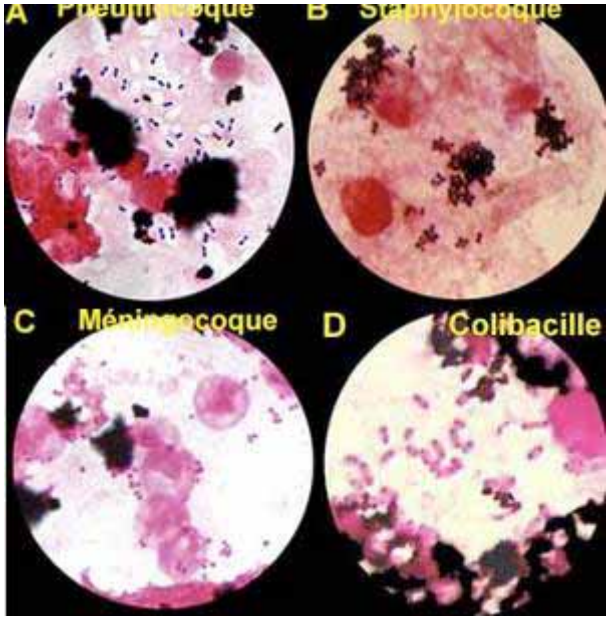
Acheminement immédiat au laboratoire

Analyse macroscopique : liquide « eau de roche », trouble, hémorragique,…

Cytologie éléments et hématies / mm3

Coloration May-Grünwald-Giemsa après cytocentrifugation : formule leucocytaire

Coloration de Gram après cytocentrifugation



Milieux de culture enrichis

Antigènes solubles

- **pneumocoque**
- **méningocoques (A, B, C)**
- ***Haemophilus influenzae***
- ***E. coli* K1 (nné)**

Coût : B200

- **cytologie, ED, culture, identification, antibiogramme**

+ B60 antigènes solubles

Délai de rendu des résultats : au moins 72h

Prélèvements sur écouvillon

Nature des prélèvements variée

Acheminement au laboratoire : 2 h maximum

Gorge, nez, prélèvements périphériques nnés, prélèvements génitaux, prélèvements ophtalmologiques,… `

Prélèvements cutanés

- **si possible préférer le recueil de suppurations (seringue)**
- **difficulté d'interprétation microbiologique (contamination flore cutanée), pertinence des prélèvements d'escarre?**
- **nécessité absolue du site de prélèvement et de renseignements cliniques**

Prélèvements au bloc opératoire : préférer des biopsies ou liquides ou pièces opératoires

Très mauvais mode de prélèvements pour la recherche d'anaérobies ou de germes fragiles

B110 à B200 selon la localisation

Prélèvements broncho-pulmonaires

Expectorations, aspirations bronchiques, lavage broncho-alvéolaire, brosse

Acheminement au laboratoire : 1h max

Analyse cytologique quantitative sur expectorations (nombre de cellules et de polynucléaires par champ)

Prélèvements pouvant être contaminés par la flore oropharyngée

Coloration de Gram

Expectorations ensemencées que si <10 cellules/champ et > 25 polynucléaires/champ

Ensemencement sur milieux riches et milieux sélectifs

Culture quantitative : par exemple 10^6 UFC/ml

Recherches particulières : *Legionella*, mycobactéries, …

Coût : B200

analyse cyto-bactériologie, identification et antibiogramme

Rendu des résultats : 48 à 72h, 10j pour les légionelles

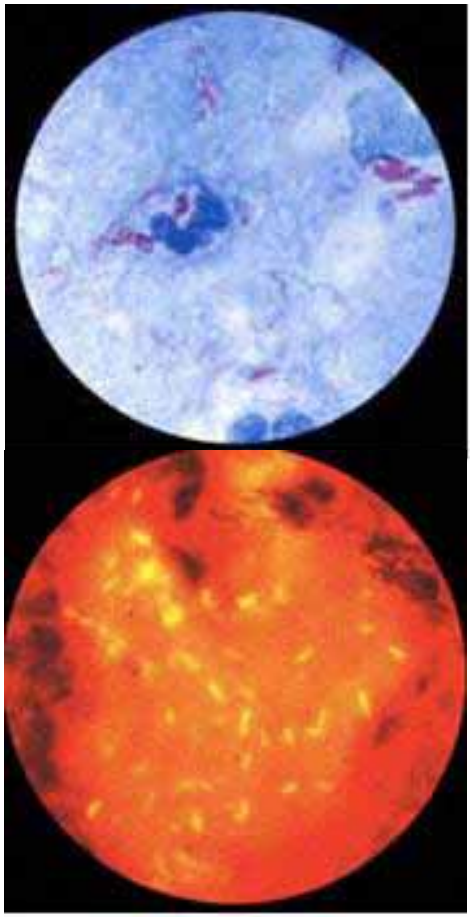
Antigènes urinaires

Recherche d'antigènes solubles de pneumocoque ou de légionelles (*L. pneumophila* sérogroupe 1)

Délai de rendu des résultats : 20 min

25 euros / patient/test

Mycobactéries



Prélèvements

- **expectorations de qualité**
- **tubages gastriques 3j de suite**
- **urines 3 j de suite**
- **biopsies, liquides de ponction, …**

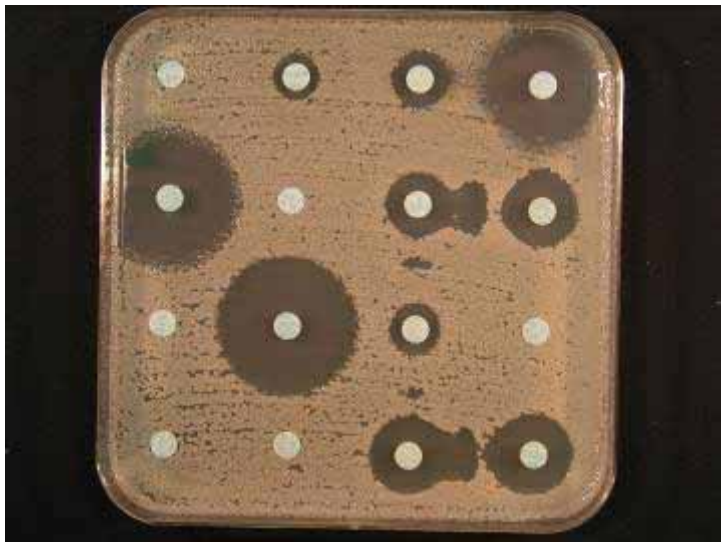
Décontamination

Examen direct : auramine et Ziehl (BAAR)

Culture en milieu solide et en milieu liquide (raccourcit les délais de culture

Antibiogramme en 8-10 j

Et quand ça pousse …



Délais ?

Quand la culture est positive

identification : 24h

antibiogramme : 24h

Délai de rendu des résultats :

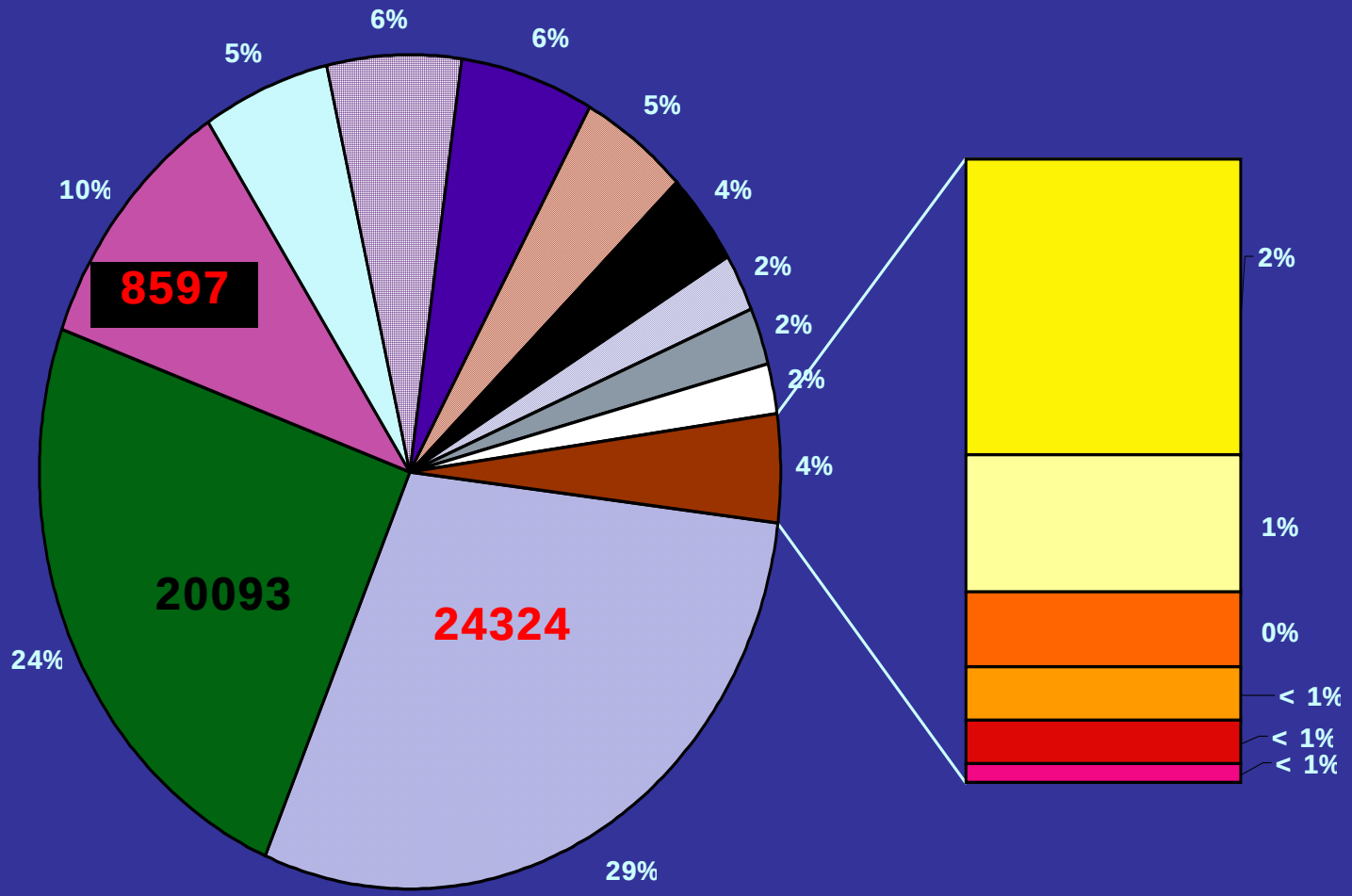
48h au minimum si négatif

5 - 10 j anaérobies, biopsies osseuses, légionelles

5j hémocultures, voire 3 semaines

jusqu'à 8 semaines pour les mycobactéries

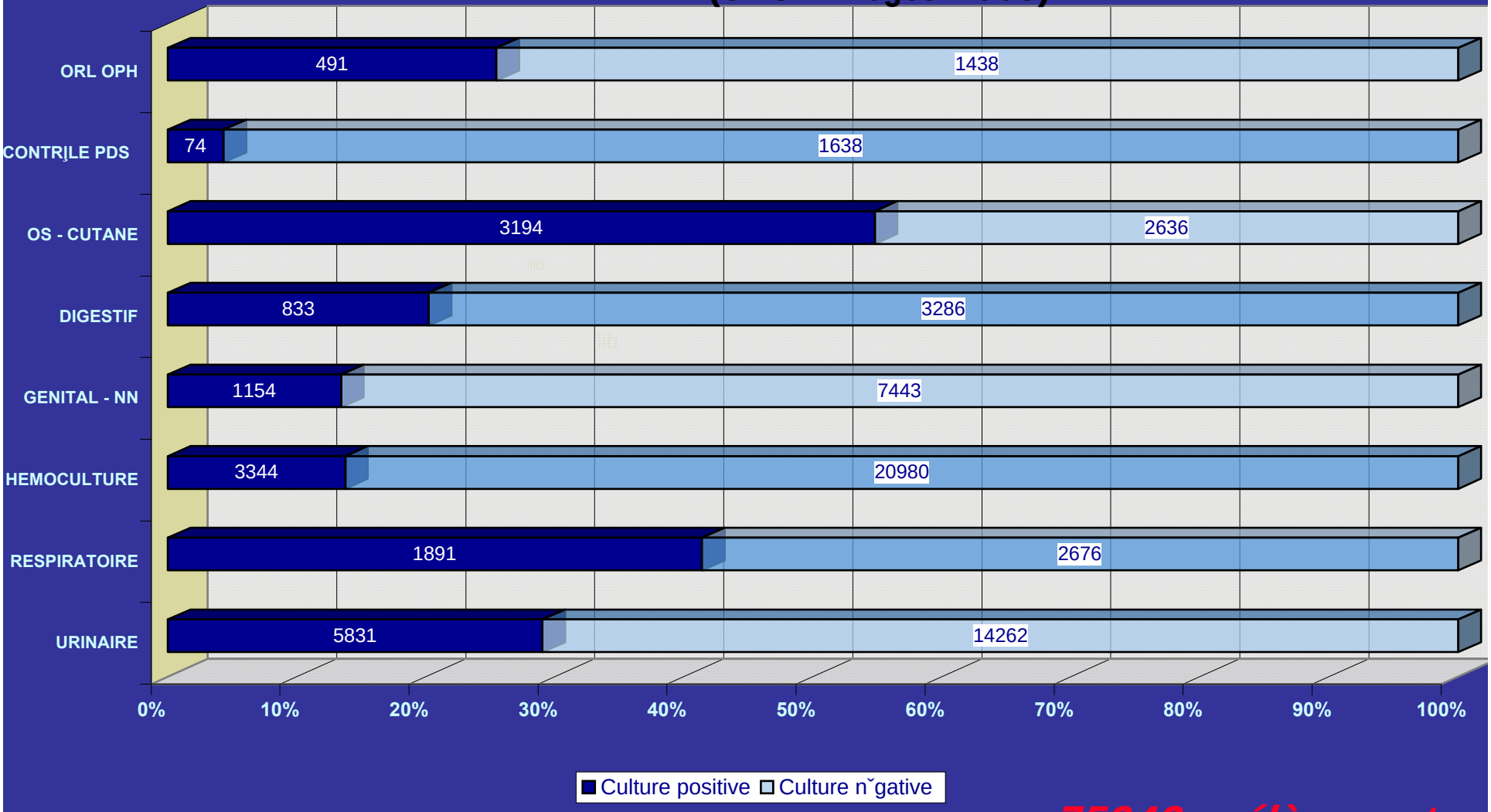
Répartition par types des prélèvements (CHU Limoges



HEMOCULTURE
GENITAL - NOUVEAU NE
PEAU - TISSU MOU
DIGESTIF
MYCOBACTERIES
PDT SANGUINS - BQUE DE TISSUS - CONTROLE
OS - ARTICULATION
CARDIO-VASCULAIRE
DIVERS
URINAIRE
RESPIRATOIRE
SEROLOGIE
MATERIEL
ORL - STOMATOLOGIE
SYSTEME NERVEUX
MEDECINE DU TRAVAIL
OPHTALMOLOGIE

82990 prélèvements

Pourcentage de cultures positives en fonction du type de prélèvement (CHU Limoges 2005)



75942 prélèvements

Importance de la collaboration entre le laboratoire et les services cliniques