

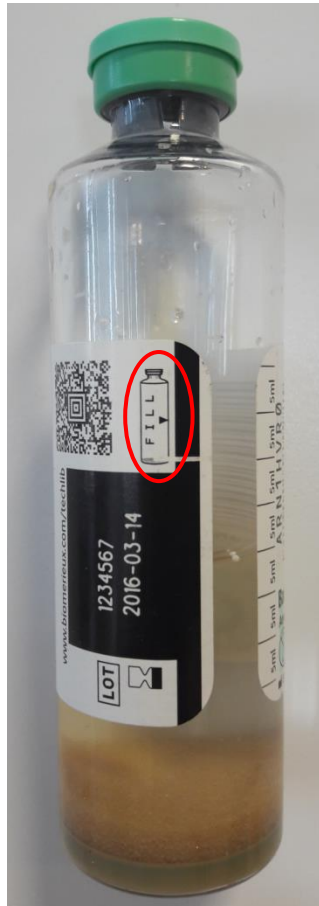
L'HÉMOCULTURE AU LABORATOIRE D'ANALYSES MÉDICALES

I) La phase pré-analytique : les bonnes pratiques de prélèvement des flacons d'hémoculture

• Avant le prélèvement :

1. Repère visuel du niveau de remplissage des flacons :

- Repérer le repère visuel de remplissage (10 mL) des flacons adultes aérobie (verts) et anaérobie (orange).
- Remarque : le repère visuel n'est pas présent sur les flacons pédiatriques (jaunes) : volume optimal : 4 mL ce qui correspond à une graduation.



Remplir les flacons jusqu'au repère noté sur l'étiquette

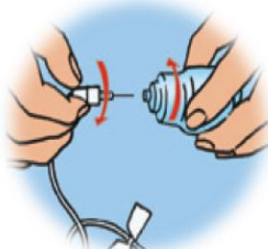


2. Contrôle qualité :

- Vérifier la date de péremption des flacons sur l'étiquette.
- Contrôler la couleur de la pastille : si gris/vert : OK, si **jaune** : **ne pas utiliser**.

3. Organisation :

- Si plusieurs prélèvements : flacons d'hémoculture et tubes de prélèvements sanguins (tube EDTA, tube citraté, etc..), commencer toujours par les flacons d'hémoculture et remplir les tubes après les flacons.
 - Vérifier le matériel nécessaire :
 - Nombre de flacons (4 à 6 soit 2 à 3 paires) et commencer par le flacon aérobie puis le flacon anaérobie.
- Numéroter le premier flacon aérobie qui sera prélevé.**
- Corps de pompe et aiguille à ailettes (épicrânienne).



+

⇒ 2 ou 3 paires

- **Le prélèvement :**

1. Hygiène des mains et désinfection des flacons :

- Lavage des mains du préleveur par friction hydro-alcoolique.
- Retirer la capsule des flacons puis désinfecter le bouchon (alcool à 70° ou bétadine alcoolique)

2. Antisepsie de la peau du patient (selon le protocole validé par le laboratoire) :

- Utiliser de la bétadine alcoolique. Certains protocoles exigent 2 applications successives de l'antiseptique avec séchage entre chaque étape.

Ex : antisepsie en 5 temps : déterSION (1), séchage (2), rinçage (3), désinfection (4), séchage à l'air libre (5)

Lien vidéo sur les règles d'aseptie avant le prélèvement : <https://diag-innov.biomerieux.fr/wp-content/uploads/2021/04/Pr%C3%A9paration-au-pr%C3%A9l%C3%A8vement-h%C3%A9mocultures-et-seringue.mp4>

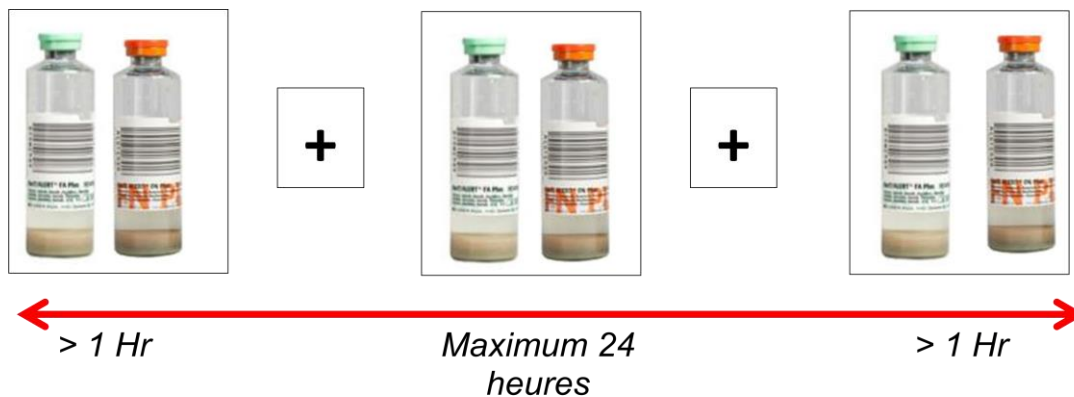
3. Ponction veineuse au pli du coude

- Réaliser de la ponction à l'aide du dispositif de prélèvement : épicroânienne et corps de pompe.
- Débuter par **le flacon aérobie** (air dans tubulure) **puis le flacon anaérobie** et respecter le volume de remplissage (10 mL par flacon).

Remarque : tous les flacons (4 ou 6 flacons) sont prélevés en une seule fois sauf si suspicion d'endocardite.



Recommandations pour suspicion d'endocardite : prélèvements (3 paires) espacés d'une heure minimum et échelonnés sur 24 heures.



Cas particulier des prélèvements sur cathéter :

Aspiration directe **au niveau du cathéter** et en même temps réalisation d'un prélèvement **autour du cathéter (en périphérie)**. Il faut bien noter le site de prélèvement. Permet de connaître **l'origine de la bactériémie pathologique** en fonction du délai de positivité des hémocultures. Si + pour le cathéter en premier avant le prélèvement en périphérie \Rightarrow bactériémie vient du cathéter.

Indicateur de qualité et cause de non-conformité :

- Si le flacon est trop rempli : risque de faux positif.
- Si le flacon n'est pas assez rempli : risque de faux négatif.

• **Après le prélèvement :**

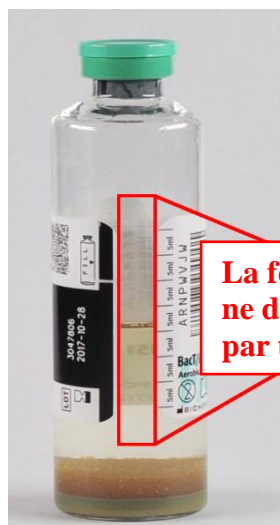
1. Éliminer le dispositif de prélèvement dans un conteneur DASRI.

2. Étiquetage des flacons :

- Si le positionnement de l'étiquette n'est pas correct, la mesure du volume ne peut pas être réalisée par l'automate.

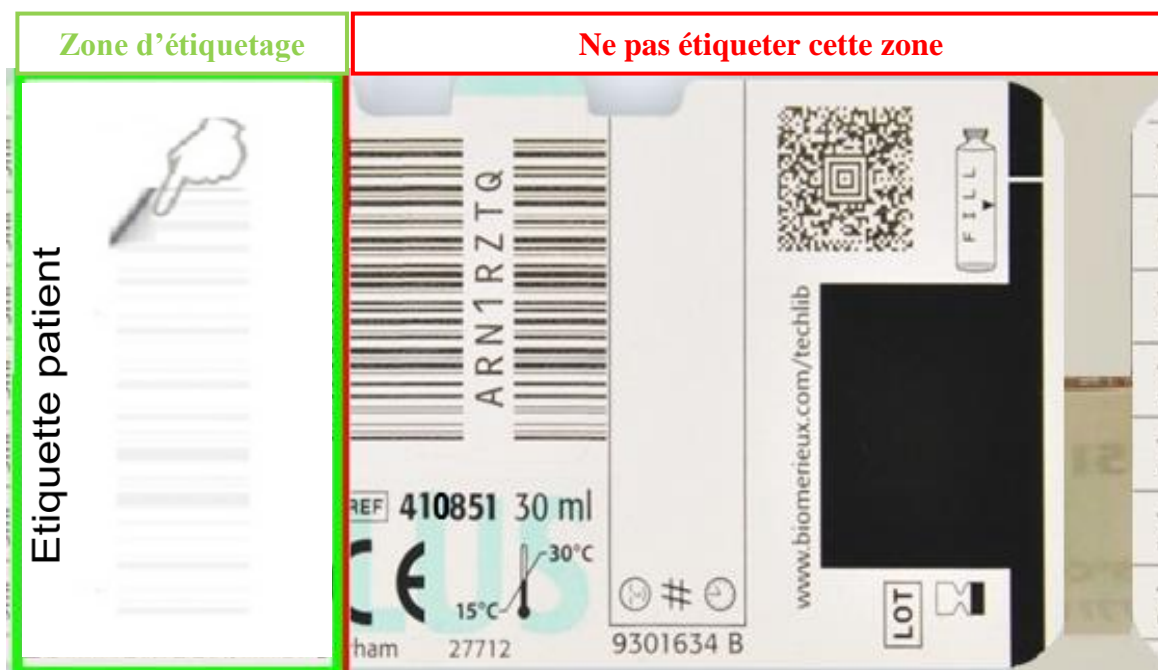
La mesure du volume n'est pas disponible pour les flacons pédiatriques.

- Ne pas écrire sur le fond du flacon.



La fenêtre de lecture ne doit pas être masquée par une étiquette.

Une seule zone est autorisée pour l'étiquetage des flacons :



3. Conserver les flacons à **température ambiante** et acheminer les flacons au laboratoire **le plus rapidement possible** (2 heures maximum).

Lien vidéo sur le prélèvement : <https://biomerieux-1.wistia.com/medias/en6dc8j4cs>

Fiche de synthèse Biomérieux sur la procédure de prélèvement :

Procédure de prélèvement direct des flacons d'hémoculture **BacT/ALERT®**

Recommandations importantes

- Le ratio sang/bouillon recommandé est compris entre 1/5 et 1/10 :

Flacons adultes: (SA/SN; FA/FN; FA Plus/ FN Plus) | volume optimal = 10 ml

Flacons pédiatriques (PF/ PF Plus) : volume optimal = 4 ml (0.05 ml minimum pour PF Plus)

- Ne pas utiliser de flacon dont le fond est jaune ou si la date de péremption est dépassée.
- Ne pas surremplir les flacons car cela peut entraîner des faux-positifs.
- Transmettre le prélèvement d'hémoculture au laboratoire le plus rapidement possible (24 heures maximum).
- Conserver le prélèvement d'hémoculture à 20-25°C avant incubation dans l'automate BacT/ALERT en cas d'impossibilité d'acheminement immédiat.
- Pour un meilleur contrôle du volume de sang inoculé dans le flacon, tracer un repère sur les graduations de l'étiquette.
- Afin d'éviter les contaminations, les flacons d'hémoculture doivent être prélevés avant d'éventuels tubes additionnels.
- Ne pas coller d'étiquette sur le code à barre du flacon.



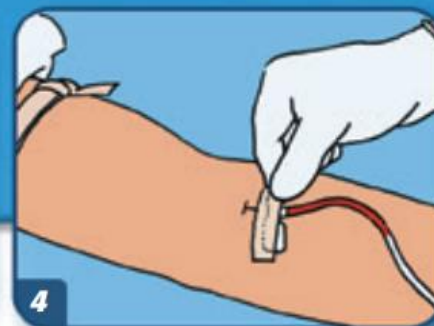
1
Désinfection des mains par friction **hydro-alcoolique**. **Nettoyage** puis **antiseptie** de la peau selon protocole validé par l'établissement, rinçage puis séchage entre chaque étape.



2
Retirer la capsule de protection située sur le dessus des flacons. **Désinfecter le bouchon** à l'aide d'une solution appropriée (type chlorhexidine alcoolique ou Bétadine alcoolique) et laisser sécher au moins 30 secondes.



3
Replier l'adaptateur universel BacT/ALERT « tout en un » au dispositif utilisé pour le prélèvement en prenant soin de **le visser à fond**. L'adaptateur BacT/ALERT permet de prélever les flacons et les tubes. Il est possible d'utiliser un kit de prélèvement tout en un référence 413201 ou 413251 (dispositif stérile avec aiguille + adaptateur).



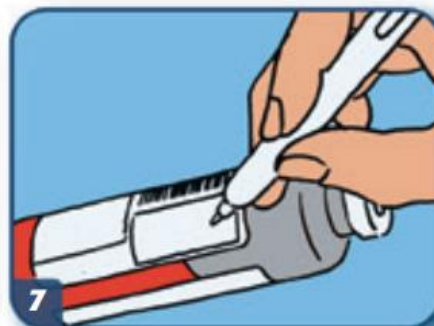
4
Pratiquer la ponction veineuse à l'aide de l'aiguille (Type épicrânienne protégée). Port de gants non stériles.



5
Contrôler la fixation du raccord du dispositif de prélèvement en le maintenant entre le pouce et l'index. Placer l'adaptateur sur le **flacon aérobique*** en le pressant le long du flacon. Tenir l'adaptateur sur le flacon pendant le prélèvement. Procéder de la même façon avec le flacon anaérobie. Contrôler la fixation du raccord lors du changement de flacon. **Prélever au maximum 10 ml de sang par flacon.**



6
Si des tubes doivent être prélevés à la suite des flacons, prélever les tubes directement sur le même adaptateur déjà connecté. **Contrôler la fixation du raccord du dispositif de prélèvement lors du prélèvement des tubes.**



7
Renseigner les flacons suivant votre procédure habituelle. Surtout **ne pas coller d'étiquette sur la partie code à barres détachable du flacon** (procédure décrite au verso).

* Prélever en premier le flacon aérobique (bouchon vert ou bleu) puis le flacon anaérobie (bouchon orange ou violet).

Remarque :

Possibilité de prélever **4 flacons** (2 aérobies et 2 anaérobies) ou **6 flacons** (3 aérobies et 3 anaérobies) **en une seule fois** sauf si suspicion d'endocardite ou de dispositif intra-vasculaire.

II) La phase analytique : étude de l'automate BACT/ALERT VIRTUO®

• Présentation de l'automate :

Le système BACT/ALERT VIRTUO® est un automate de dernière génération offrant une surveillance en continu de la croissance microbienne. Quelques caractéristiques :

- Chargement dit « **Load and Go** » (poser et partir) sur un convoyeur muni de détecteurs de mouvement.
- **Bras robotisé** permettant de charger et de décharger les flacons sans aucune intervention humaine. Le **déchargement des flacons** est signalé par des alertes visuelles et sonores.
- **Traçabilité optimale** grâce à une station Smart Scan qui scanne et enregistre l'ensemble des informations relatives au flacon, au patient, ainsi que les informations sur le numéro de lot et la péremption. L'automate **mesure également le volume de sang** dans chaque flacon au moment du chargement.
- **Capacité d'incubation comprise entre 428 et 1712 alvéoles** ce qui permet de gérer d'importants volumes d'hémocultures. Les flacons d'hémoculture sont incubés à **37°C** sous **agitation permanente**.



• Flacons utilisés par l'automate :

- Il existe une gamme complète de milieux permettant une détection optimale des microorganismes. Les différents flacons présents sur le marché permettent la détection des **bactéries**, des **champignons/levures** et des **mycobactéries**.
- Les nouveaux flacons BACT/ALERT FAN PLUS® sont formulés avec des billes polymériques absorbantes permettant une **neutralisation des antibiotiques** potentiellement présents dans le sang des patients ce qui améliore la détection des microorganismes.
- Ces flacons contiennent un milieu de culture qui favorise la croissance des bactéries et des levures améliorant ainsi le temps de détection des microorganismes.
- Chaque flacon contient un détecteur de dioxyde de carbone (**une pastille « CO₂ sensor »**) qui sert d'indicateur de croissance microbienne.

⇒ Exemple de flacons d'hémoculture : type BACT/ALERT FAN PLUS®

Aérobic



Anaérobic



Pédiatrique



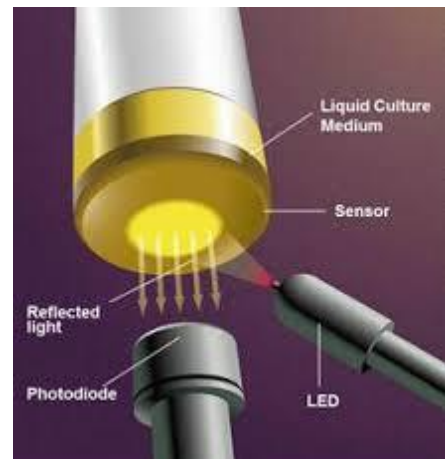
- **Principe de détection des flacons positifs :**

La plupart des automates d'hémoculture **détectent le CO₂** produit au cours de la croissance des bactéries à partir des hydrates de carbone présents dans les milieux de culture.

Dans le système BACT/ALERT VIRTUO®, la mesure du CO₂ fait intervenir un détecteur colorimétrique, « pastille CO₂ sensor » présent dans chaque flacon. Lors de la croissance bactérienne, la **concentration en CO₂ augmente** ce qui induit une **diminution du pH du milieu de culture**. Ce changement de pH provoque le virage colorimétrique de la pastille qui **vire du vert au jaune**.



Une LED envoie un faisceau lumineux sur le sensor. Une photodiode collecte **l'intensité de lumière réfléchi**e par le sensor sous la forme d'unité de réflectance. Les unités de réflectance sont analysées dans le temps. **Les flacons sont lus toutes les 10 minutes**. Des algorithmes optimisés, assurent une détection rapide des microorganismes.



- **Prise en charge des flacons positifs :**

- L'écran de commande tactile de l'automate signale l'état des flacons. Les flacons négatifs (après 5 jours d'incubation) sont directement éliminés dans le conteneur à déchets.
- Les flacons positifs sont signalés sur l'écran, puis placés grâce au bras robotisé au niveau de **l'aire de déchargement de l'automate (voir vidéo)**.

Lien vidéo l'hémoculture du prélèvement à l'automate BACT/ALERT VIRTUO :

<https://podeduc.apps.education.fr/video/15811-lhemoculture-grace-au-bactalert-virtuo/>

- Poursuite de l'analyse des flacons positifs par le technicien :

- **Jour 1 :**

1. Ensemencement de différents milieux de culture :

- À partir du flacon aérobie :

- 1 gélose chocolat enrichie sur le 1^{er} flacon positif. Incubation en atmosphère aérobie enrichie en CO₂.
- 1 gélose au sang sur tous les flacons positifs. Incubation en atmosphère aérobie enrichie en CO₂.

- À partir du flacon anaérobie :

- 1 gélose au sang incubée en atmosphère aérobie enrichie en CO₂.
- 1 gélose au sang incubée en anaérobiose (jarre).

⇒ Permet de déterminer le type respiratoire du germe.

2. Réalisation de Gram à partir des flacons positifs.

- **Jour 2 :**

→ Identification des colonies par spectrométrie de masse (plus rapide) et/ou Vitek puis réalisation d'un antibiogramme (automate Vitek).

III) La phase post-analytique : interprétation des résultats et conclusion

- **Interprétation et validation biologique de l'identification**

La difficulté de l'interprétation réside souvent dans la distinction entre les vraies bactériémies pathologiques et les contaminations au moment du prélèvement. Dans la plupart des laboratoires environ **10 % des hémocultures positives sont des faux positifs dus à des contaminations**. Pour tenter de différencier une contamination d'une vraie infection, on se base principalement sur plusieurs éléments : l'espèce du germe isolé (critère très important), le nombre de flacons positifs au même germe et la présence de signes cliniques.

Remarque : Certains germes dans le sang ne laissent aucun doute sur leur signification pathologique. Exemples : *Salmonella*, streptocoques β -hémolytiques, pneumocoques, *Haemophilus*, *Neisseria meningitidis*, etc...

Par contre l'isolement d'un germe présent naturellement sur la peau ou dans l'environnement est en faveur d'une contamination. L'interprétation est beaucoup plus délicate pour des germes qui peuvent aussi bien être responsables de vraies bactériémies que de simples contaminants.

Les staphylocoques à Coagulase Négatives (SCN) sont fréquemment responsables de bactériémies. Parmi les SCN, *Staphylococcus epidermidis* est souvent isolé sur du matériel étranger (cathéters, prothèses..) ou chez des patients immunodéprimés. Cependant les SCN sont aussi des contaminants très fréquents des flacons d'hémocultures car ils font partie de la flore commensale de la peau.

Si un même germe est isolé de plusieurs flacons, on peut conclure à une véritable bactériémie. De même que **l'isolement d'un même germe au niveau d'une hémoculture et d'un foyer infectieux** (urine, prélèvement pulmonaire, pus abdominal, LCR ...) ou d'une porte d'entrée (cathéter veineux central) est un argument en faveur d'une bactériémie pathologique.

La majorité des hémocultures sont monomicrobiennes. Les bactériémies polymicrobiennes sont peu fréquentes et sont surtout rencontrées dans des contextes particuliers (immunodéprimés). Souvent il s'agit d'une **bactériémie monomicrobienne avec un germe contaminant** (*Corynebacterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus*, *Bacillus*, etc...).

- **Conclusion sur l'antibiogramme et détection d'éventuelles résistances bactériennes aux antibiotiques.**

En parallèle de l'identification un antibiogramme avec des disques d'antibiotiques adaptés est lancé. Il permettra de détecter d'éventuelles résistances bactériennes aux antibiotiques.