

Bactériémies- Hémocultures



Hémocultures = prélèvements les plus fréquents en milieu hospitalier

« Hémoculture » = mise en culture du sang
pour recherche de bactérie et/ou de champignon

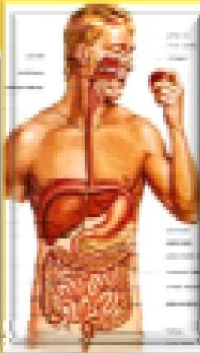
① hémocultures



Définitions et rappels

- Le sang = milieu normalement stérile
- Bactériémie - Fongémie = présence de micro organismes dans le sang

Bactériémies physiologiques (asymptomatiques, transitoires)



Bactériémies symptomatiques (bactériémies "vraies")

- SRIS
- Sepsis grave
- Choc septique

+/- symptômes liés au foyer primitif

La bactériémie peut être transitoire, intermittente ou continue.

- **La bactériémie transitoire** est une décharge de quelques minutes à quelques heures, survenant après irritation d'une muqueuse colonisée par une flore microbienne ou manipulation de tissus infectés. Elle peut être spontanée (exemple pendant un brossage dentaire ou au cours de la digestion) ou provoquée par des gestes invasifs tels des soins dentaires, une endoscopie digestive, une cystoscopie, un massage prostatique, la mise en place d'une sonde urinaire, un geste chirurgical ou un dispositif intra vasculaire (cathéter, perfusion intraveineuse).
- Les bactériémies transitoires sont généralement sans conséquences thérapeutiques puisqu'elles ne sont pas associées à un foyer de multiplication tissulaire.
- D'ailleurs, il faut 7 minutes environ pour que le courant circulatoire se nettoie de ces bactériémies grâce au système réticulo-endothélial (foie, rate, moelle osseuse) et à la phagocytose.
- Le risque existe cependant chez l'immunodéprimé ou chez le sujet souffrant d'un certain type de cardiopathies, dites « à risque » de greffe oslérienne.

- **La bactériémie intermittente**

est retrouvée dans les infections à Bacilles gram négatif, les suppurations, la pneumonie et l'ostéomyélite .Elle survient, disparaît puis revient avec le même germe. Elle est classiquement associée à une infection cloisonnée, non ou mal drainée, telle un abcès intra abdominal ou un empyème sous dural, mais se voit aussi dans des infections tissulaires focalisées (exemple de la Brucellose focalisée).

- **La bactériémie continue** s'observe dans la fièvre typho-paratyphoïdique, la Brucellose, l'endocardite, l'Endartérite et les anévrysmes mycotiques.
- Le sang est continuellement inoculé par des germes, soit à partir d'un foyer ganglionnaire (Adénite mésentérique dans la fièvre typhoïde), soit à partir de l'endocarde ou d'un autre foyer endovasculaire.
- Le système réticulo-endothélial est activé pour assurer la détersion des micro organismes , cependant , si la décharge microbienne est massive ou si l'agent microbien a la capacité de se multiplier rapidement dans la circulation sanguine , le système réticulo-endothélial peut être dépassé et des métastases septiques à distance peuvent alors se créer .
- Les signes infectieux peuvent aller du Sepsis simple jusqu'au choc septique ; Le tableau clinique consiste souvent en un Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS) , qui associe 2 des signes suivants : Fièvre , hypotension, tachycardie, tachypnée, leucopénie, hyperleucocytose.
- Il faut préciser que ce syndrome se voit également dans des situations cliniques non infectieuses (exemple : Blessures ou brûlures).

MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES

- **1- Mécanisme thrombophlébitique :**
 - la porte d'entrée est généralement tégumentaire
 - (exemple : manipulation d'un furoncle). Le germe , (*Staphylococcus aureus*) , se localise dans la paroi d'une veine de voisinage , au sein d'un coagulum de fibrine et de cellules sanguines : c'est le thrombus infecté , à partir duquel se détachent des microembols qui ensemencent massivement le sang. Des métastases septiques peuvent toucher le cerveau , les poumons , les os ainsi que d'autres tissus.
- **2- Mécanisme à point de départ lymphatique :**
 - la porte d'entrée est souvent digestive .Au niveau de la lumière intestinale , les bactéries pathogènes telles *Salmonella typhi* traversent la muqueuse intestinale sans provoquer de lésion, puis gagnent les ganglions mésentériques, Les bactéries restées au niveau des ganglions mésentériques, sont lysées d'où libération d'endotoxines (risque de choc endotoxinique).

- **3- Mécanisme endocarditique** : S'observe principalement dans le cas de lésions cardiaques préexistantes telles les valvulopathies rhumatismales et certaines cardiopathies congénitales, ainsi que chez les porteurs de prothèses cardiaques, vasculaires ou de stimulateurs cardiaques.
- A la faveur d'une bactériémie le plus souvent d'origine dentaire, le germe arrive au coeur et adhère au sein d'un amas de fibrine et de plaquettes (végétation) , à la surface de l'endocarde lésé ou du matériel étranger intravasculaire.
- A partir de cette végétation, les bactéries (ainsi que les enzymes et toxines bactériennes) sont continuellement relarguées dans le sang, ce qui provoque une fièvre permanente bien que souvent peu élevée.
- La végétation peut se fragmenter en embols disséminant le germe dans l'organisme et obstruant des artères
- Il faut noter que la population bactérienne au sein des végétations, est très élevée (10⁹ à 10¹¹) mais ces bactéries sont à l'abri des défenses naturelles et des antibiotiques à cause de la faible vascularisation locale ; de plus, ces bactéries sont métaboliquement défectives ce qui les rend difficiles à cultiver

- **4- Autres mécanismes physiopathologiques** : on peut distinguer :
 - **Le mécanisme de la septicémie néonatale** ,
 - **Le mécanisme de la translocation digestive chez le sujet neutropénique** ,
 - **Le mécanisme de la bactériémie nosocomiale**
 - **Le cas des Drogués** : Certains toxicomanes font des bactériémies à *Kingella* en nettoyant le site de ponction avec de la salive .
 - **Les bactériémies à *Bartonella quintana* chez les SDF** : le mécanisme impliqué serait le passage du germe à partir des déjections des poux du corps qui parasitent les SDF, via les lésions cutanées de grattage.

II- Agents étiologiques et principales indications de l'hémoculture :

- Les agents pathogènes spécifiques :

Leur isolement d'une hémoculture établit le diagnostic d'emblée car ils sont associés à une pathologie infectieuse donnée: C'est le cas des Salmonelles Majeures (*S.typhi* et *S.paratyphi*) , des Brucelles , du Méningocoque et du Pneumocoque .

- Les agents pathogènes opportunistes :
- Leur incrimination s'appuie sur la fréquence de leur isolement en hémoculture, la ou les portes d'entrée potentielles dans l'organisme et le statut immunitaire du patient .En effet, ces agents font partie de la flore normale du corps humain et animal et sont même parfois des saprophytes de l'environnement.
- Leur caractère ubiquitaire en fait de fréquents contaminants des milieux de culture .
- On peut distinguer entre autres, les Staphylocoques (espèce *aureus* ou à coagulase négative), les Enterocoques mais beaucoup plus souvent des bacilles à gram négatif tels les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.
- De même, on assiste depuis une vingtaine d'années à l'émergence croissante en milieu hospitalier, de microorganismes appelés nouveaux agents d'infection nosocomiale, connus jusqu'alors comme de banales bactéries de l'environnement : Nous citerons *Acinetobacter baumannii* et *Stenotrophomonas maltophilia*.

III- Les critères de qualité de l'hémoculture :

- Prélever le sang avant toute antibiothérapie, au moment des pics fébriles
- Prélever un volume important de sang par flacon d'hémoculture (7 à 10 ml) afin de bien diluer les facteurs limitants. Chez le nouveau-né , l'inoculum bactérien dans le sang est plus élevé que chez l'adulte : on peut donc limiter le volume de sang prélevé à quelques ml seulement (1 à 2 ml). Par contre, chez l'enfant, il faut un volume plus important de sang car la concentration bactérienne dans le sang , diminue avec l'âge. On recommande alors d'adapter le volume de sang mis en culture au poids de l'enfant.
- Effectuer plusieurs hémocultures pour ne pas "passer à côté" d'une bactériémie intermittente.

1- le prélèvement de sang :

- Le préleveur doit se désinfecter les mains et porter des gants.
- Le prélèvement doit être effectué avant toute antibiothérapie ou au cours d'une fenêtre thérapeutique .
- Le moment du prélèvement doit correspondre à un pic fébrile, souvent annoncé par des frissons .Si le patient présente une fièvre en plateau ou dans le cas d'un foyer microbien endovasculaire, le moment du prélèvement importe peu puisque les décharges microbiennes sont continues.
- Le site de prélèvement doit être soigneusement désinfecté , du centre vers la périphérie , l'aide d'un coton imbibé de Polyvidone iodée ou , en cas d'allergie à l'iode , d'Alcool à 70°.
- Il ne faut plus palper la veine après cette étape .On utilisera de préférence un dispositif pour hémoculture, permettant d'effectuer un prélèvement de sang en circuit fermé. A défaut, on pourra utiliser une seringue de 20 ml.



2- Les milieux

- On trouve dans le commerce divers modèles de flacons d'hémoculture, les uns pour incubation conventionnelle, les autres spécifiques pour incubateurs automatisés
- En incubation classique, diverses options sont proposées :
- la présentation Biphase (phase solide - phase liquide) retrouvée dans le modèle CASTANEDA (BIORAD) ou HEMOLINE (BIOMERIEUX).
- L'hémoculture automatisée BACTEC (BD) ou BACTALERT (BIOMERIEUX).
- Le bouillon pour hémoculture de l'Institut Pasteur d'Algérie.



3- Nombre de flacons et volume de sang à prélever :

- Les prélèvements doivent être répétés afin de majorer les chances d'isolement de l'agent causal.
- Classiquement, on admet 2 à 3 hémocultures, c'est à dire 4 à 6 flacons (2 à 3 paires Aérobie et anaérobie sur une période de 24 h. Si on ne peut pas temporiser le traitement , on effectuera avant d'administrer les antibiotiques, 3 hémocultures espacées de 30 mn à 1 h , en choisissant le moment où le patient est fébrile ($> 38^{\circ}\text{C}$) .
- Pour ce qui est du volume de sang à prélever, il doit être de 10 ml par flacon chez l'adulte, de 2 à 5 ml chez l'enfant et de 1 ml chez le nouveau-né et le nourrisson. Certains auteurs recommandent d'adapter le volume de sang prélevé au poids de l'enfant

Volume de sang à mettre en culture chez l'enfant

Poids de l'enfant (Kg)	Volume de sang					
	Culture 1		Culture 2		Culture 3	
	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie	Aérobie	Anaérobie
≤ 1		0,5 à 2				
1,1 - 2		1,5 à 4,5				
2,1 - 12,7		3 à 6				
12,8 - 36,3	5	5 à 7	5 à 7	5		
> 36,3	10	10	10	10	10	10

4- La procédure de prélèvement AER-ANAER :



- Après ponction veineuse et une fois le sang ayant rempli la tubulure , on pique en premier , le flacon « ANAER ».on laisse couler le volume de sang nécessaire et on clampé . On pique ensuite le flacon « AER » et on déclampé pour laisser le sang s'écouler, puis on ôte l'aiguille du bras du patient et on laisse le sang restant dans la tubulure, couler dans le flacon « AER », entraînant de l'air à sa suite.
- A défaut d'un dispositif de prélèvement, on peut utiliser une seringue de 20 ml.

5- L'acheminement au laboratoire

- Les flacons d'hémoculture sont correctement étiquetés avec nom, prénom du malade, service d'hospitalisation, date, heure du prélèvement et température du patient au moment de l'hémoculture. Ils sont rapidement acheminés au laboratoire d'analyse , de préférence enveloppés dans du coton afin de les maintenir à une température proche de celle de l'organisme .Ils sont immédiatement placés à l'étuve à 37°C.
- Une fiche de renseignements cliniques doit impérativement accompagner les flacons vers le laboratoire

6- suivi des flacons d'hémoculture :



- Au laboratoire , les flacons sont examinés chaque jour à partir de la 6ème heure d'incubation , à la recherche d'un signe de culture . La surveillance des flacons est visuelle , basée sur la recherche d'un trouble , d'un voile en surface, d'une hémolyse , d'un coagulum , de dépôts blanchâtres floconneux au fond du flacon ou de particules adhérentes sur sa paroi interne. En cas de flacon biphasique (CASTANEDA) , l'apparition de colonies sur la paroi gélosée pose le diagnostic d'hémoculture positive.

Aspect macroscopique	Bactérie en cause
Turbidité	<i>Bacilles à Gram – aérobies</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i>
Hémolyse	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>
Production de gaz	<i>Bactéries aero-anaérobies ou anaérobies strictes</i>
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colonies au fond du flacon	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Nocardia sp.</i>

- Toutes les manipulations se font sous hotte bactériologique à flux laminaire. Le port d'un masque et de gants est indispensable.
- Au moindre signe de culture, on effectue une coloration de Gram sur un échantillon prélevé par ponction aseptique de l'opercule à l'aide d'une seringue stérile. Cette information est alors immédiatement transmise au clinicien.
- Des prélèvements d'échantillons à partir de chaque flacon sontensemencés parallèlement sur des milieux de culture à la moindre suspicion de culture, de façon systématique à 18-24 h , 5-6ème jour et à la fin de la période de surveillance des flacons , qui est généralement de 10 à 15 jours.
- **Pour chaque flacon positif, on détermine :**
 - la morphologie des colonies
 - les tests à l'oxydase et à la catalase
 - une identification biochimique et antigénique
 - des tests de sensibilité , CMI



8- AntibioGramme d'urgence :

- On peut effectuer un antibiogramme directement à partir d'une hémoculture positive en réalisant un inoculum équivalent à 0,5MF à partir du bouillon d'hémoculture .Un gélose Mueller-Hinton est inoculée par technique « d'inondation ». La corrélation avec l'antibiogramme normalisé serait retrouvée dans 95% des cas.

9- Cas particulier du cathéter vasculaire :


- La bactériémie sur cathéter vasculaire représente actuellement une cause croissante d'hémocultures positives, avec la multiplication des porteurs de cathéters sur terrain immunodéprimé tels les patients traités par antimitotiques et immunosuppresseurs. L'ablation du cathéter peut faire disparaître les bactériémies .La mise en culture du cathéter retrouve alors le même agent microbien que celui isolé par hémoculture , qui est souvent un germe de la flore cutanée (SCN, Propionibacterium, Micrococcus , Bacillus....) .

V- Interprétation :

Incrimination certaine	
Bactérie Pathogène spécifique	<p>Incriminer l'agent quelque soit le nombre de flacons positifs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>S.typhi, S.paratyphi, Brucella sp.</i> - <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Campylobacter jejuni</i> (terrain +++) - <i>Streptococcus A, B, S.pneumoniae, H.influenzae, N.meningitidis</i> .
Bactérie Pathogène opportuniste	<ul style="list-style-type: none"> • Incriminer si plusieurs hémocultures positives • Minimum de 2 hémocultures espacées positives au même germe : <ul style="list-style-type: none"> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Acinetobacter sp.</i> - Entérobactéries : <i>E.coli, KP, Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Proteus sp.</i> - Anaérobies stricts : <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacteroides fragilis</i> - Levures : <i>Candida albicans</i> • Rechercher la ou les portes d'entrée du germe

Incrimination à discuter

Staphylococcus coag-
Propionibacterium
Streptococcus alpha
Micrococcus sp.
Bacillus sp.

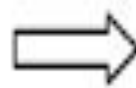
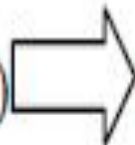
1^{er} cas : 2 flacons espacés « positifs »  Incriminer le germe

2^{ème} cas : 1 ou 2 flacons de la même hémoculture « positifs » :

- Services Oncologie ou Réa ou présence d'un KT :
 Identifier le germe + antibiogramme + demander d'autres hémoc
 + rechercher la ou les portes d'entrée et/ou culture de KT
- Autres services : Concertation avec clinicien
 Souillure probable (?)

Hémocultures
 polymicrobiennes

Vérifier TERRAIN :

- Immunocompétent  Souillure (faute d'asepsie)
- Immunodéprimé
 (Hémopathie, brûlé...)  Infection polymicrobienne

Les hémocultures négatives :

- Il est fréquent de constater une négativité des hémocultures alors que la clinique et les examens paracliniques évoquent un syndrome infectieux bactérien . L'échec de l'hémoculture peut être due à la prise préalable d'antibiotiques , à l'inoculation d'une quantité trop faible de sang , à un milieu pour hémoculture de qualité médiocre , à une incubation trop courte ou à l'utilisation de milieux de culture inappropriés. D'autres causes doivent être évoquées :
 - Fièvre non infectieuse (néoplasie, allergie, collagénose...)
 - Infection virale , tuberculeuse
 - Rickettsiose, Bartonellose, Chlamydiose (hémocultures spécifiques)

Le diagnostic des endocardites infectieuses :

L'endocardite infectieuse est l'infection de la tunique interne du cœur .Le sang imprégnant continuellement l'endocarde infecté, il véhicule de façon permanente les germes responsables de l'infection : Il y a bactériémie continue.

Le diagnostic se base sur une association de critères cliniques, microbiologiques, biologiques et histologiques : Ce sont les critères de DUKE , modifiés en 2000 par Li et Sexton. Les hémocultures font partie des critères microbiologiques

1) CERTAINE :

a- SOIT en présence d'une preuve histologique ou microbiologique :

- Germe révélé par l'examen histologique ou la culture de la valve
ou
- L'histologie de la valve ne retrouve pas le germe mais retrouve des lésions typiques d'endocardite infectieuse

b- SOIT en présence d'une association de 2 critères MAJEURS

Ou

1 critères MAJEUR et 3 critères MINEURS

Ou

5 critères MINEURS

2) POSSIBLE : en présence d'une association de 1 critère MAJEUR et 1 critère MINEUR

Ou

3 critères MINEURS

3) EXCLUE :

- Autre diagnostic retrouvé
ou
- Disparition des signes cliniques après ≤ 4 jours d'antibiothérapie
ou
- Absence de preuve histologique ou microbiologique à la chirurgie

Critères modifiés de DUKE pour le diagnostic de l'Endocardite Infectieuse

A- Critères Majeurs :

1- Hémocultures positives :

- à *Streptocoques viridans* , *Streptococcus bovis* , Groupe *HACCEK* , *Staphylococcus aureus* , ou *Enterococcus sp.* en l'absence de foyer primaire) : à raison de :

- 2 séries espacées de plus de 12heures ou
- 3 à plus de 4 séries dont la 1^{ère} et la dernière sont espacées $\geq 1h$

- à *Coxiella burnetii* : 1 seule hémoculture positive ou un titre d'anticorps anti-Coxiella anti-phase I $>1 :800$

2- Echocardiographie : Echocardiographie positive à EI (critère non détaillé ici)

Nouveau souffle de regurgitation (critère non détaillé ici)

B- Critères mineurs :

- 1- Cardiopathie à risque
- 2- Toxicomanie intra-veineuse
- 3- Fièvre ($T^{\circ} \geq 38^{\circ}C$)
- 4- Facteurs vasculaires : Embolies artérielles majeures, infarctus pulmonaire septique , anevrismes mycotiques , hémorragies intra-crâniennes , hémorragies conjonctivales , lésions de Janeway.
- 5- Facteurs immunologiques : Glomerulonephrite, nodules d'osler, tâches de Roth, Facteur rhumatoïde
- 6- Microbiologie :
 - **Hémocultures positives mais ne vérifiant pas la définition d'un critère majeur (sauf Staphylococcus coagulase négative isolé dans une seule hémoculture ou encore isolement d'un microorganisme non susceptible de causer une EI)**
ou
 - **preuve sérologique d'une infection active par un micro-organisme plausible**
- 7- Echocardiogramme compatible avec une EI mais ne vérifiant pas la définition d'un critère majeur.

VI- Optimiser l'hémoculture:

1-Limites de l'hémoculture classique :

- Manque de sensibilité (germes à croissance lente)
- Délai de positivité prolongé (3-5 jours)

2-Techniques permettant d'améliorer la sensibilité des hémocultures :

- Coloration à l'Acridine orange :

- Avantages : coût faible, technique rapide
- Limites : technique lourde, faible spécificité, faible sensibilité

- ISOLATOR ou technique de Centrifugation-lyse :

- Avantages : Délai de positivité diminué
- Limites : A mettre rapidement en culture Contamination +++ Sensibilité faible

- Résines : Elles retiennent les molécules antibiotiques véhiculées par l'échantillon de sang prélevé chez le patient.

- Automates pour hémoculture : Détection de CO₂ BACTEC 460 (C14), BACTEC NR 660 (autres), BACT/ALERT (système colorimétrique).



Conclusion :

L'hémoculture est un examen incontournable en maladies infectieuses. C'est la clé de voûte du diagnostic étiologique de tout syndrome infectieux fébrile inexpliqué. Sa fiabilité est étroitement dépendante de la procédure de prélèvement sanguin et de la qualité des flacons d'hémoculture. La grande diversité de ces agents (et leurs exigences nutritives variées) fait qu'il n'y a pas de milieu universel en matière de flacon pour hémoculture. Il s'agit donc de choisir les espèces microbiennes à rechercher en fonction de l'anamnèse et du tableau clinique et de leur mettre à disposition, les milieux pour hémoculture appropriés. Ceci est devenu possible grâce à l'avènement des automates qui, en plus de réduire significativement le délai de positivité des hémocultures, mettent à la disposition du médecin une large gamme de milieux pour hémoculture spécifiques à différentes espèces microbiennes