

Etape préanalytique en bactériologie : aspects pratiques à l'attention du médecin praticien

Dr MYRIAM M. EYER^{a,c} et SARA DROZ^{b,c}

Rev Med Suisse 2016; 12: 1714-7

Le médecin contribue considérablement à la fiabilité des résultats de bactériologie par l'adéquation de sa prescription, la qualité de son prélèvement, de son conditionnement et de son transport. Un prélèvement à visée diagnostique est utile si le résultat de l'analyse influe sur l'attitude thérapeutique. Il présente un risque de contamination minimal, est généralement obtenu de manière invasive, ou est destiné à la recherche de germes désignés. Pour la prise en charge correcte des échantillons, le médecin se référera au guide technique du laboratoire. De plus, il veillera à fournir au microbiologiste les renseignements cliniques et administratifs, puisque d'eux dépend la démarche analytique opérée au laboratoire. Une collaboration étroite entre médecins et microbiologistes est décisive.

Preanalytical step in bacteriology: a practical overview for family physicians

Physicians play a key role in the accuracy of bacteriological results by appropriate prescription and the quality of sample collection, preservation and transport. Samples for diagnostic purposes are of use if analysis results have an impact on the therapeutic approach. They have minimal risk of contamination, are usually obtained invasively, and may be targeted to detection of specific bacteria. Physicians should refer to the laboratory technical manual to provide proper sample quality. Furthermore, they have to provide clinical and administrative information to the microbiologist, because the laboratory analytical process depends on these. Close collaboration between physicians and microbiologists is essential.

INTRODUCTION

La prise en charge correcte d'un échantillon biologique au cours des étapes successives de préanalytique, analytique et postanalytique, allant de la prescription jusqu'à l'intégration des résultats dans le processus diagnostique, est cruciale.¹ Le médecin est le garant de la qualité de la phase préanalytique, qui précède l'évaluation proprement dite de l'échantillon au laboratoire.

PRESCRIPTION

Le médecin doit cerner lui-même le but de sa demande, et le faire savoir au mieux au microbiologiste pour que ce dernier puisse orienter sa démarche analytique et déterminer:

- Quel germe doit être isolé. Quels milieux ensemencer, à quelle atmosphère, à quelle température d'incubation.
- Si le résultat de l'examen microscopique doit être communiqué en urgence.
- Si une numération bactérienne est nécessaire.
- Parmi les germes isolés, lesquels rapporter.
- Jusqu'à quel niveau de précision pousser l'identification bactérienne.
- Si un antibiogramme est nécessaire.

La nature de l'échantillon, les renseignements administratifs et les circonstances présidant au prélèvement sont à préciser, tels les symptômes, une antibiothérapie en cours ou planifiée, un séjour en hôpital ou à l'étranger, une colonisation par un germe résistant, les comorbidités (par exemple, immunosuppression) (**tableau 1**).

CONDITIONS TECHNIQUES

Le laboratoire fournit un guide technique pour l'obtention d'échantillons adéquats, qui décrit leurs conditions de prélèvement et de transport. Le médecin doit absolument s'y référer. Les conditions préanalytiques spécifiques ont été présentées dans un article précédent de cette revue.² Nous évoquerons ici quelques aspects plus généraux.

Moment du prélèvement

Un prélèvement à visée diagnostique devrait dans toute la mesure du possible être fait avant l'initiation de l'antibiothérapie. En cas de réponse insuffisante à un traitement instauré sans analyse préliminaire, le diagnostic devrait être reconsidéré (s'agit-il vraiment d'une infection?) et une fenêtre thérapeutique peut être envisagée en cas de tableau clinique non menaçant. Sinon, des modalités particulières, telles une incubation prolongée ou une recherche par biologie moléculaire, sont à considérer d'entente avec le laboratoire. Dans les

TABLEAU 1	Renseignements essentiels à inscrire sur la feuille de demande d'analyse
-----------	--

- Données administratives du patient (nom, prénom, sexe, date de naissance, adresse)
- Nom, prénom et coordonnées du prescripteur
- Date et heure exacte du prélèvement
- Nature exacte de l'échantillon et type(s) d'analyse(s) demandée(s)
- Renseignements cliniques: symptômes, antibiothérapie en cours ou planifiée, séjour en hôpital ou à l'étranger, colonisation par un germe résistant, comorbidités (p. ex. immunosuppression)

^a Service des maladies infectieuses, Institut central des hôpitaux, Hôpital du Valais, 1951 Sion, ^bDr pharm., ^cInstitut für Infektionskrankheiten, Universität Bern, 3010 Bern
myriam.eyer@hopitalvs.ch | sara.droz@ifik.unibe.ch

cas particuliers où l'excrétion des germes est intermittente ou leur quantité faible, il faut prélever 3 fois de suite à 3 jours d'intervalle. Il en est ainsi de la recherche de mycobactéries dans les expectorations ou les urines. Ici, le moment de prélèvement – le matin au réveil – est en outre important.

Site de prélèvement

Les bons sites sont situés à proximité du foyer infectieux ou de ses extensions secondaires. Un prélèvement à visée diagnostique est utile si le résultat de l'analyse influence l'attitude thérapeutique. Il a un risque de contamination minimal et est généralement obtenu de manière invasive. Il s'agit notamment du sang, des liquides internes prélevés par paracentèse au travers de la peau ou de muqueuses préalablement décontaminées, des abcès ponctionnés, des échantillons profonds obtenus chirurgicalement, du liquide de lavage bronchoalvéolaire, de l'urine du milieu du jet ou prélevée par sondage unique.

A l'inverse, l'échantillon est peu utile s'il reflète une colonisation plutôt que l'agent pathogène. C'est le cas, excepté pour les analyses épidémiologiques et autres rares exceptions, des échantillons obtenus par voie non invasive, provenant de la peau, d'une plaie et de muqueuses.³ Ainsi, un frottis d'orifice de fistule est fortement susceptible de contenir une flore commensale. Les biomatériaux traversant la peau (mèches, drains) sont eux aussi sujets à contamination. Il est inutile d'adresser les liquides recueillis dans des récipients de drains, les souches isolées reflétant les germes les plus aptes à se multiplier secondairement *ex vivo* plutôt que le pathogène.

Quantité

Le volume de l'échantillon doit être suffisant. Dans le cas contraire, le microbiologiste sélectionne d'entente avec le clinicien les procédures d'isolement des germes les plus souvent en cause dans le tableau clinique. En particulier lors de lésions chroniques ayant peu de germes, des volumes insuffisants peuvent conduire à des résultats faussement négatifs.

Méthode

Le recueil s'effectue selon les règles d'asepsie. La méthode du prélèvement et son conditionnement garantissent la viabilité des bactéries, et l'absence de dégradation de molécules spécifiques (ADN, toxine et anticorps). Pour le diagnostic des infections, les frottis sont généralement à proscrire, en raison du faible volume et des risques de dessiccation et de contamination. Une autre erreur fréquente est d'adresser du matériel de biopsie fixé, par exemple, dans du formol. Nombre de bactéries sont fragiles et requièrent un échantillonnage spécifique. Ainsi, les bactéries anaérobies doivent être maintenues en permanence à l'abri de l'air, car l'oxygène leur est toxique.

TRANSPORT

Récipients

Idéalement, les ponctions, biopsies et corps étrangers sont acheminés dans un tube stérile. Les échantillons de faible

volume ou pouvant contenir des germes fragiles ne supportant pas le délai nécessitent des milieux spéciaux tamponnés, gélosés, réducteurs et pauvres en éléments nutritifs, qui conservent l'humidité, évitent le stress oxydatif et maintiennent l'équilibre des populations bactériennes initiales. Les prélèvements peuvent en outre être acheminés dans des milieux de culture (par exemple bouteilles d'hémocultures).

L'emballage doit permettre l'identification des échantillons, leur intégrité, la sécurité du personnel, et être conforme aux prescriptions légales, soit l'ordonnance sur le transport des marchandises dangereuses par route (SDR), par rail (RSD) et celle sur les conseillers à la sécurité (OCS).⁴ En fonction du risque que représente un pathogène donné, il est classé dans une catégorie de transport.⁵ En Suisse, les envois concernent majoritairement des pathogènes de risque 2, et de catégorie B de transport. Ils doivent être acheminés dans un emballage triple, conforme à l'instruction P650 de la SDR, que les laboratoires ont à disposition et qui se compose :

- D'un ou plusieurs tube(s) de prélèvement.
- D'un emballage interne comprenant :
 - un conteneur rigide de protection;
 - un emballage secondaire imperméable aux fluides;
 - en cas d'échantillons fluides, du matériau absorbant, à placer à l'intérieur de l'emballage secondaire.
- D'un emballage externe mesurant au moins 100 mm × 100 mm, marqué d'un losange d'avertissement «UN3373» et portant l'inscription «Matériel biologique catégorie B».

Délai de transport et conservation

Les petits échantillons et les biopsies doivent être acheminés rapidement au laboratoire, si possible dans les 2 heures. Ce délai est raccourci si des bactéries fragiles sont recherchées. Le délai maximal acceptable jusqu'à l'analyse d'un échantillon conservé en atmosphère réfrigérée est de 24 heures. La conservation à + 4 °C, inhibant la prolifération bactérienne, est recommandée quand des cultures semi-quantitatives sont indiquées (par exemple, urines). L'acheminement des échantillons pouvant contenir des bactéries sensibles au froid (par exemple, *Haemophilus*, *Neisseria*) doit être assuré à température ambiante de + 20° C. C'est le cas notamment des échantillons oculaires ou respiratoires. La conservation des prélèvements dits «stériles», où un seul germe est recherché, se fait aussi à température ambiante.

RÉCEPTION DES ÉCHANTILLONS

L'évaluation minutieuse des prélèvements à leur arrivée au laboratoire est décisive. Un échantillon inapproprié pour les analyses demandées, de quantité insuffisante, mal conditionné, de nature indéterminée ou incorrectement identifié peut rendre l'analyse impossible.

DIFFÉRENTS TYPES DE PRÉLÈVEMENT

Nous présentons ci-après quelques aspects généraux sur les prélèvements les plus fréquemment adressés par le médecin praticien.

Sang

Les hémocultures sont à effectuer avant l'instauration de l'antibiothérapie, lors de la phase ascendante d'une poussée fébrile ou de frissons. Celles exceptionnellement prélevées en cours d'antibiothérapie sont à réaliser à la fin de l'intervalle posologique (concentration antibiotique minimale). On veillera à ce que l'antiseptique ait eu le temps de sécher, car son injection dans le circuit de prélèvement peut causer des résultats faussement négatifs. Certains pathogènes ont des exigences de culture particulières. Il faut donc prélever les flacons par paire (aérobie/anaérobie). Ceux-ci ne sont pas prévus pour les mycobactéries ou les champignons dimorphes, qui nécessitent des milieux spéciaux. La concentration des germes dans le sang étant basse chez l'adulte, il faut prélever un volume suffisant, soit 10 ml par flacon.⁶ Chez les petits enfants (< 15 kg), un flacon pédiatrique est ensemencé avec 1 à 3 ml de sang.⁷ Le sang doit être prélevé par ponction (un site de ponction différent pour chaque paire, à préciser sur la demande). Le prélèvement à travers un cathéter périphérique est à proscrire en raison du risque de colonisation de celui-ci. Il faut veiller à ne pas injecter d'air du conduit lors de l'inoculation du flacon anaérobie. L'intervalle optimal entre 2 ponctions dépend de la situation clinique: 2 à 3 paires d'hémocultures sont prélevées d'affilée lorsque l'antibiothérapie ne peut pas être différée, ou alors étalées sur un intervalle minimal de 12 heures lors de suspicion d'endocardite «subaiguë».⁸ Une suspicion d'endocardite est à notifier explicitement sur la demande car elle influence le temps d'incubation. Les flacons d'hémoculture devraient immédiatement être acheminés, mais peuvent toutefois être conservés à température ambiante pendant quelques heures.

Urine

Idéalement, une analyse bactériologique semi-quantitative des urines se fait sur un prélèvement aseptique d'urine du milieu du jet ou par sondage unique.⁹ Sauf rares exceptions (grossesse et chirurgie urogénitale), les bactériuries asymptomatiques ne sont ni une indication au traitement ni au diagnostic.¹⁰ Notamment, les cultures urinaires ne sont pas indiquées pour des urines malodorantes ou troubles, ou en routine pour bilan d'admission.

Selles

L'examen de selles dures est inapproprié pour le diagnostic de gastroentérite. Selon le contexte clinique, les entéropathogènes causant des diarrhées aiguës acquises en communauté, par exemple, *Salmonella* spp., ou au contraire nosocomiales, par exemple, le *Clostridium difficile* toxigène, seront recherchés.¹¹

Expectoration bronchique

L'expectoration est certes rapide et non invasive, mais souvent contaminée par la flore buccale. Il faut prélever les expectorations le matin à jeun ou loin des repas et après hygiène buccale.

Le patient doit émettre un crachat en toussant fortement dans un pot de recueil stérile. Au besoin, une induction de la toux par aérosol hypertonique de NaCl ou une assistance physiothérapeutique est indiquée.¹² Le laboratoire évalue la qualité du prélèvement par microscopie.¹³ En l'absence de cellules inflammatoires ou lorsque la contamination par la flore buccale est massive (présence de cellules épithéliales), l'analyse devrait être refusée. Une culture négative ne signifie pas forcément absence d'infection bactérienne, certains germes atypiques, par exemple, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, n'étant pas, ou difficilement cultivables dans des conditions standards.

Prélèvement cutané

Les circonstances (morsure d'animal, drogue intraveineuse, blessure en milieu aquatique, etc.) sont à mentionner. La distinction entre plaies superficielles et profondes est importante, la recherche d'anaérobies n'étant judicieuse que sur les échantillons profonds sans contact avec l'air. Les cultures standards permettent d'isoler les bactéries et levures courantes. Cependant, la recherche de dermatophytes, champignons filamenteux et mycobactéries nécessite des milieux spéciaux et des incubations prolongées.

CONCLUSION

Le médecin contribue à la fiabilité des résultats de bactériologie par la qualité de sa prescription et celle du prélèvement, du conditionnement et du transport. Une collaboration étroite avec le laboratoire est essentielle.

Conflit d'intérêts: Les auteurs n'ont déclaré aucun conflit d'intérêts en relation avec cet article.

IMPLICATIONS PRATIQUES

- La réalisation d'un examen de bactériologie utile dépend étroitement de l'adéquation de la prescription et des conditions techniques de prélèvement et de transport, dont le médecin praticien est le garant
- Une collaboration étroite entre le médecin et le microbiologiste est décisive. En cas de doute sur le type ou sur la technique de prélèvement, il ne faut pas hésiter à contacter le laboratoire
- Un prélèvement à visée diagnostique est de bonne qualité si le résultat de l'analyse est susceptible d'influer sur l'attitude thérapeutique. Il présente un risque minimal de contamination par la flore commensale
- Sauf rares exceptions, les cultures d'urines n'ont aucune valeur diagnostique chez le patient asymptomatique
- Le frottis de plaie n'est d'aucune utilité, car il reflète la colonisation par des germes de la flore cutanée et ne permet pas de mettre en évidence les germes responsables de l'infection

1 ** Baron EJ, Miller JM, Weinstein MP, et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of

America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM) (a). Clin Infect Dis 2013;57:e22-121.

2 * Fracheboud D, Chuard C. Microbiologie de qualité: la contribution du

médecin praticien. Rev Med Suisse 2007;3:2294-8.

3 Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin

Microbiol Rev 2001;14:244-69.

4 Office fédéral des routes. Marchandises dangereuses. Internet: www.astra.admin.ch/themen/schwerverkehr/00246/index.html?lang=fr (consulté le 8.8.2016).

- 5 Swiss Expert Committee for Biosafety SECB. Category B infectious substances. Internet: www.efbs.admin.ch/en/transport-import-export/transport-sheets/11-human-pathogens-and-zoonotic-agents/transport-sheet-112/#c4984 (consulté le 8.8.2016).
- 6 Ilstrup DM, Washington JA. The importance of volume of blood cultured in the detection of bacteremia and fungemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983;1:107-10.
- 7 Wilson ML. General principles of specimen collection and transport. *Clin Infect Dis* 1996;22:766-77.
- 8 Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: Utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am J Med* 1994;96:200-9.
- 9 Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis* 2004;38:1150-8.
- 10 Nicolle LE, Bradley S, Colgan R, et al. Infectious diseases society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* 2005;40:643-54.
- 11 Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. *Clin Infect Dis* 2001;32:331-51.
- 12 Paggiaro PL, Chanez P, Holz O, et al. Sputum induction. *Eur Respir J* 2002;37 (Suppl.):3s-8.
- 13 Musher DM, Montoya R, Wanahita A. Diagnostic value of microscopic sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004;39:165-9.

* à lire

** à lire absolument