

17 • Hémoculture

Plan du chapitre

1• Contextes

2• Objectifs

- 1-Réaliser un prélèvement de qualité
- 2-Choisir des conditions de culture appropriées
- 3-Détecter précocement la croissance bactérienne
- 4- Effectuer des investigations spécifiques
- 5- Interpréter les résultats

1• Contextes

Le sang est normalement stérile. Un état septicémique ou plus généralement un "état infectieux grave", se caractérise par un passage répété de microbes dans le sang. Toute fièvre d'origine indéterminée, surtout si elle est accompagnée de signes cliniques évocateurs d'infection, doit donner lieu à la pratique d'hémocultures. Bates, en 1990, a proposé des critères prédictifs de bactériémies.

Tableau 1 : Prédiction de la bactériémie d'après Bates

**Score 6 : fort risque de bactériémie ;
score 2 : faible risque**

Facteur de prédiction	Points
Température maximale > 38°3 C	3
Maladie rapidement fatale	4
Maladie terminale	2
Présence de frissons	3
Toxicomanie par voie veineuse	4
Abdomen chirurgical	3
Facteur de comorbidité majeur ^a	3

a Coma ou mort cérébrale, perforation digestive, multi-traumatisé ou brûlé, arrêt cardio-respiratoire dans les 24 heures, pancréatite aiguë, détresse respiratoire, insuffisance hépatique aiguë ou chronique

Il convient de choisir des techniques de détection sensibles et spécifiques, permettant la croissance de micro-organismes à culture délicate, donnant des résultats rapides et sûres à manipuler pour le personnel. Que l'on utilise les méthodes visuelles classiques ou un automate pour détecter la positivité des flacons d'hémocultures, un certain nombre de paramètres doivent être pris en considération.

2• Objectifs

1- Réaliser un prélèvement de qualité

C'est le préalable essentiel à tout examen de bactériologie. Le prélèvement de sang pour hémoculture doit satisfaire à plusieurs critères ou exigences.

➤ Eviter les contaminants et travailler en sécurité

- L'antisepsie de la peau doit se faire successivement avec de l'alcool à 70 % puis un produit iodé, teinture d'iode ou polyvidone iodée. Une à deux minutes de contact sont nécessaires pour obtenir l'effet antiseptique maximal de la polyvidone iodée. L'activité bactéricide de la teinture d'iode est plus rapide que celle de la polyvidone iodée. Après la ponction veineuse le produit iodé potentiellement irritant est enlevé avec de l'alcool à 70 %.
- La désinfection du capuchon du flacon d'hémoculture est réalisée avec de l'alcool à 70 % ou un produit iodé que l'on laisse sécher avant usage.
- La ponction veineuse est la seule méthode fiable pour prélever du sang en vue de la culture. Les autres sites de prélèvement notamment les recueils de sang par cathéter augmentent de façon significative la fréquence des contaminants.
- La pratique des prélèvements pour hémoculture expose le préleveur à des risques liés au sang du malade. La transmission des virus des hépatites, en particulier hépatite C (VHC) est le risque le plus important avant le VIH.

➤ Prélever une quantité de sang suffisante

La densité des bactéries présentes dans le sang est généralement très faible chez l'adulte. Une quantification faite par centrifugation-lyse (Isolator) au cours de bactériémies significatives a montré que la densité bactérienne était inférieure à 1 UFC/ml dans des pourcentages importants d'épisodes. Il existe une relation directe entre le volume de sang inoculé dans les flacons d'hémoculture et le rendement de la technique. Un volume de 20 ml de sang prélevé augmente le pourcentage de positivité de 30%, comparativement à un volume de 10 ml qui est le mini-

mum souhaitable chez l'adulte. De la même façon l'augmentation du volume de sang inoculé dans les flacons augmente la sensibilité de la détection de la positivité par un automate.

Chez l'enfant, la densité des bactéries dans le sang est plus importante que chez l'adulte. Ainsi, un prélèvement de 1 à 2 ml est considéré comme satisfaisant. Ce volume peut être accru en fonction de l'âge.

➤ **Effectuer le nombre de prélèvements nécessaires**

Si l'on excepte les infections du système vasculaire, particulièrement les endocardites bactériennes, au cours desquelles la bactériémie est permanente, au cours des autres situations cliniques, la bactériémie peut être soit transitoire, soit intermittente.

Plusieurs auteurs ont analysé le nombre d'hémocultures nécessaires pour détecter la totalité des épisodes bactériémiques.

Il faut en conclure que 3 ou même 2 hémocultures par 24 heures sont suffisantes pour isoler la totalité des bactéries ou des levures responsables d'épisodes bactériémiques.

Un espace de temps de 30 à 60 minutes entre deux prélèvements de sang a été recommandé.

2- **Choisir des conditions de culture appropriées**

➤ **Aérobiose-Anaérobiose**

Il est classique pour une même hémoculture d'ensemencer un jeu de deux flacons, l'un incubé en aérobiose, l'autre en anaérobiose. Considérant la diminution importante de la fréquence des bactéries anaérobies, la question de savoir s'il est opportun de continuer à utiliser systématiquement des flacons anaérobies est aujourd'hui posée. Il n'y a pas de réponse univoque. Il est probable que cela puisse être possible dans certains services, mais pas dans d'autres comme la chirurgie gynécologique ou colo-rectale. De plus, certaines bactéries aéro-anaérobies comme les Streptocoques et Entérocoques se développent plus rapidement en anaérobiose. Enfin, l'utilisation de deux flacons permet de doubler le volume de sang inoculé ce qui accroît la sensibilité de l'hémoculture.

➤ **Dilution du sang**

Le sang des malades contient de nombreuses substances à activité antibactérienne : complé-

ment, lysozyme, cellules phagocytaires et des antibiotiques dans environ un tiers des cas. La dilution du sang dans le bouillon atténue l'effet de ces substances. La dilution au 1/10 est celle qui donne le meilleur résultat. Cependant une dilution inférieure, jusqu'à 1/5, est encore possible. Quant à une dilution supérieure à 1/10, elle est sans inconvénients sinon de réduire la quantité de sang inoculé. Au total, plus grand est le volume de bouillon dans le flacon, meilleur est l'effet de dilution. Utiliser des flacons contenant un plus petit volume de bouillon pour les hémocultures de pédiatrie n'apporte pas d'avantage significatif.

➤ **Le polyanéthol sulfonate de sodium (SPS)**

C'est l'anticoagulant très généralement utilisé dans les bouillons pour hémoculture à une concentration de 0,025 à 0,05 %. Le SPS favorise la croissance de la plupart des bactéries car il inhibe l'activité bactéricide du sérum, il inhibe la phagocytose, il inactive le complément, neutralise le lysozyme et les antibiotiques de la famille des aminosides.

Néanmoins, le SPS peut avoir un effet inhibiteur sur certaines souches de *Neisseria*, de *Peptostreptococcus anaerobius* ou de *Streptobacillus moniliformis*. Il est donc préférable d'utiliser une concentration de 0,025 % de SPS. L'addition de gélatine à la concentration de 1,2 % peut neutraliser l'effet inhibiteur du SPS.

➤ **Neutralisation des antibiotiques**

Des résines adsorbantes de cations ou le charbon activé ont un certain effet neutralisant des antibiotiques.

Une mesure utile et, semble-t-il, peu souvent prise en considération est de réaliser les prélèvements pour hémocultures, "à la vallée", à distance de l'administration des antibiotiques.

3- **Détecter précocement la croissance bactérienne**

➤ **Durée d'incubation des flacons d'hémocultures**

Une incubation à l'étuve à 35°C pendant 7 jours est suffisante en routine. Avec les automates une durée de 5 jours a été validée. Au delà de ce délai les bactéries détectées sont généralement des contaminants qui étaient présents en faible quantité dans le prélèvement.

Un temps d'incubation plus long peut être nécessaire pour des micro-organismes particuliers :

champignons, bactéries du groupe HACEK, *Brucella* ou *Legionella* ou encore pour des patients suspects d'endocardite et dont les prélèvements ont été réalisés alors que le malade recevait des antibiotiques.

↳ Méthodes conventionnelles

◆ Examen macroscopique des flacons

Chaque jour ou mieux deux fois par jour, les flacons sont inspectés en vue de rechercher des signes témoignant d'une croissance visible. Avec une certaine habitude il est possible en fonction de l'aspect d'un flacon de pressentir l'identité de la bactérie en cause (Tableau 2). Il est à signaler que certaines bactéries comme les *Neisseria*, les *Haemophilus* et les *Campylobacter* troublent peu ou pas le bouillon de culture et que l'usage d'un flacon diphasique s'avère utile pour ces espèces.

Tableau 2 : Orientation présomptive de la bactérie responsable en fonction de l'aspect du flacon d'hémoculture

Signe observé	Bactérie en cause
Turbidité	Bacilles à Gram négatif aérobies Staphylocoque, <i>Bacteroides</i>
Hémolyse	Streptocoque, Staphylocoque <i>Listeria</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i>
Production de gaz	Bacilles à Gram négatif aérobies anaérobies
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>

◆ Amélioration de la précocité et de la sensibilité de la détection de la croissance bactérienne

Plusieurs procédés ont pour objectif d'améliorer la précocité et la sensibilité de la détection de la croissance bactérienne :

- l'agitation des flacons aérobies pendant les premières 24 heures d'incubation accélère la croissance bactérienne, mais elle est difficile à mettre en pratique si l'on ne dispose pas d'un automate ;
- l'aération des flacons aérobies avec un dispositif adapté favorise la croissance des *Pseudomonas* ;
- la détection précoce de la croissance en pratiquant un examen direct au microscope du bouillon de culture avec de l'acridine orange est une technique rarement utilisée ;
- l'ike repiquage systématique précoce (entre 6 et 72 h) du flacon anaérobie sur gélose

chocolat incubée en aérobiose à 35°C est parfois recommandé mais peu réalisable ;

- les systèmes diphasiques permettent la croissance précoce de colonies sur le milieu gélosé. Ceci est intéressant pour les espèces bactériennes à croissance délicate ;
- le système Signal utilise un seul flacon sur lequel est adapté un dispositif permettant de signaler la surpression produite dans le flacon par la croissance microbienne.

◆ La centrifugation-lyse : le système Isolator

Ce système permet de recueillir 8 à 10 ml de sang et de concentrer les micro-organismes avant d'ensemencer les milieux gélosés adaptés à la croissance de ces micro-organismes. La solution présente dans le tube contient de la saponine pour lyser les leucocytes et les érythrocytes, du polypropylène glycol pour éviter la formation de mousse due à la saponine et du SPS comme anticoagulant.

Après centrifugation du tube dans un rotor à angle fixe de 35° pendant 30 minutes à 3 000 g, le surnageant est éliminé et le concentré est homogénéisé au vortex puis ensemencé sur différents milieux gélosés appropriés. Isolator 1,5 est le même système sans étape de centrifugation. Pratiqué avec des tubes de 1,5 ml, il est utilisable en pédiatrie.

Le système Isolator est très performant pour l'isolement des micro-organismes suivants : mycobactéries, levures à croissance difficile et champignons filamenteux, bactéries exigeantes (HACEK, *Bartonella*, *Legionella*). Le système Isolator permet en outre de quantifier la bactériémie, ce qui serait utile pour mettre en évidence une infection sur cathéter.

Ce système a cependant quelques inconvénients. Le risque de contamination lors des manipulations oblige à travailler sous hotte, mais surtout c'est une méthode manuelle très consommatrice du temps du manipulateur, ce qui est un facteur limitant.

↳ Méthodes de détection automatisées

◆ Les quatre systèmes commercialisés actuellement en France (tableau 3)

- Ces systèmes ont des caractéristiques communes dont les principales sont les suivantes :
 - Pas de maintenance quotidienne.
 - Détection automatique des positifs.

Tableau 3 : Caractéristiques des automates actuellement commercialisés en France

Type	Principe de détection	Nbre de lecture quotidienne	Volume de bouillon par flacon
Bactec 9240	mesure non invasive de CO ₂ par fluorescence	toutes les 10 mn	25 ml
Vital	mesure de variation CO ₂ - H ₂ et/ou pH par fluorescence	toutes les 15 mn	40 ml
BacT/Alert	mesure du CO ₂ par «sensor» indicateur de pH	toutes les 10 mn	40 ml
Bio Argos	mesure du CO ₂ par infra-rouge à travers le verre	programmé 8 à 2	25 ml

- Détection des flacons pré-incubés.
- Gestion des données.
- Connexion bi-directionnelle possible.
- Statistiques et sauvegarde.
- Télémaintenance possible.

Le principe de détection de ces quatre automates est la mesure directe ou indirecte du CO₂ produit dans les flacons.

- **Bio Argos**

Cet appareil mesure la production de CO₂ à travers le verre par spectrophotométrie. Pour des raisons de coût, chaque appareil n'est équipé que d'une seule cellule de lecture. Le dosage du CO₂ se fait après transfert du flacon vers un plateau de lecture. La mesure du CO₂ est prise "à la volée" pendant trois secondes pendant la rotation du flacon.

- **BacT/Alert**

Le principe est d'incorporer dans chaque flacon un détecteur colorimétrique "CO₂ sensor" de coloration verte. Le sensor est séparé du bouillon par une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que le CO₂. La production du CO₂ entraîne une diminution du pH et le sensor devient jaune. Le virage de couleur est interprété par réflectométrie, chaque lecture compare la variation de couleur à la précédente, chaque flacon dispose de sa propre cellule de lecture.

- **Bactec 9240**

Le principe est également basé sur l'existence d'un sensor sensible aux variations de pH. Le CO₂ produit abaisse le pH, cette décroissance est mesurée par une coloration fluorescente

elle-même mesurée par une photodiode.

- **Vital**

Dans les flacons se trouve une molécule fluorescente à l'état natif qui voit sa fluorescence s'éteindre en présence de phénomènes biologiques produits par la croissance bactérienne. C'est la technique HFT (Homogenous Fluorescence Technology). Cette molécule fluorescente n'est pas seulement sensible au CO₂, la croissance est aussi détectée par variation du pH et modification du potentiel d'oxydo-réduction. Chaque flacon dispose de sa propre cellule de lecture équipée d'une diode d'excitation émettant une lumière verte. La lumière rouge émise est filtrée et transmise par une fibre optique vers un compteur de photons.

L'évaluation de ces systèmes a donné lieu à de nombreuses études. La Société Française de Microbiologie a formulé des recommandations visant à prévenir les nombreux biais qui peuvent se rencontrer dans les travaux visant à évaluer ces automates.

4- Effectuer des investigations spécifiques

↳ Recherche de mycobactéries

Mycobacterium avium-intracellulare (complexe MAC) est la mycobactérie la plus fréquemment rencontrée au cours du Sida. Le diagnostic de l'infection repose sur la mise en évidence de la bactérie par hémocultures ou accessoirement dans la moelle osseuse ou des prélèvements biopsiques. D'autres mycobactéries, plus rares, *M. kansasii* ou *M. tuberculosis* peuvent être isolées d'hémocultures dans ce contexte.

Plusieurs méthodes sont appropriées pour détecter les mycobactéries par hémocultures. Se reporter au chapitre consacré aux Mycobactéries.

↳ **Autres micro-organismes**

Les méthodes destinées à cultiver des micro-organismes ayant des exigences nutritives particulières doivent être mises en œuvre sur des critères cliniques rigoureux.

◆ **Bactéries à croissance lente et/ou difficile**

D'une façon générale, il apparaît que les méthodes de détection automatisées de la croissance bactérienne sont plus rapides que les méthodes conventionnelles mais elles ne sont pas plus sensibles que la méthode Isolator. Ces bactéries à croissance lente et/ou difficile exigent pour leur culture des conditions particulières. Elles peuvent être détectables par des automates. Nous résumons ci-dessous les données concernant la culture de ces bactéries.

- ***Brucella*** - Certaines souches sont exigeantes en CO₂. Le sang est inoculé en flacon diphasique type Castaneda, incubé 6 semaines à 37°C. Les subcultures se feront sur gélose Trypticase Soja additionnée de 5% de sérum de boeuf ou sur *Brucella* agar- incubée en atmosphère de 5% de CO₂.
- ***Campylobacter*** - Culture à 37°C en micro-aérophilie dans une atmosphère de 5% de CO₂ sur milieu de Skirrow, Butzler ou Karmali incubés 72 heures.
- ***Legionella*** - Culture sur milieu BCYE incubé à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Observation pendant 10 jours.
- ***Mycoplasme - Ureaplasma*** - Culture en bouillon PPLO ou gélose A3 incubé en micro-aérophilie à 37°C et observé 3 jours.
- ***Leptospira*** - Recueil du sang sur tube hépariné et ensemencement en tubes de milieu Tween-Albumine ou EMJH incubés à 30°C à l'obscurité. Observation hebdomadaire des cultures au microscope à fond noir pendant deux mois.
- **Groupe HACEK** - *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingella kingae* sont des espèces responsables d'endocardites bactériennes qui se développent len-

tement. Elles peuvent nécessiter une incubation des flacons d'au moins 14 jours, ce qui est supérieur à la durée usuelle de l'incubation des flacons placés dans un automate.

- **Streptocoques déficients (*Abiotrophia*)** - Certaines souches de streptocoques du groupe viridans exigent du pyridoxal pour leur croissance. Ces souches peuvent être trouvées comme responsables de bactériémies ou d'endocardites. Elles se caractérisent par une croissance en bouillon et une absence de croissance en milieu gélosé. Le besoin en pyridoxal est mis en évidence par la croissance sur gélose au sang additionnée de 0,001% de pyridoxal ou par un test de satellitisme autour d'une strie de *S. aureus*.
- ***Bartonella (Rochalimaea)*** - Ces bactéries retirées de l'ordre des Rickettsiales sont responsables de bactériémies, d'angiomatoses et de pélioses bacillaires chez des malades infectés par le VIH. Leur culture sur milieu acellulaire est lente et délicate. Le culot d'un tube Isolator est ensemencé sur gélose au sang de lapin ou de mouton incubée en atmosphère de 5% de CO₂ pendant 6 semaines. La PCR est particulièrement intéressante pour des bactéries qui mettent plusieurs semaines pour donner des colonies.

◆ **Endocardites à hémocultures négatives**

Des procédures recommandées pour le diagnostic étiologique des endocardites infectieuses ont été publiées par l'Association pour l'Étude et la Prévention de l'Endocardite Infectieuse. Elles sont reproduites plus loin.

Au cours des endocardites infectieuses, les hémocultures peuvent rester négatives dans plus de 10% des cas, même si elles sont prélevées avant toute antibiothérapie. Une étude nationale a montré l'intérêt dans ces situations de rechercher la preuve sérologique d'une infection à *Chlamydia* ou à *Coxiella burnetii*. Cependant l'existence de réactions sérologiques croisées entre *Chlamydia* et *Bartonella* a été décrite.

La responsabilité de *Bartonella (Rochalimaea)* dans les endocardites qui, il y a peu, auraient été considérées comme "à hémocultures négatives" a été mise en évidence récemment.

Une autre cause d'endocardites à hémocultures négatives pourrait être la courte durée usuelle (5 à 7 jours) d'incubation des flacons dans les automates. Cette durée est probablement insuffisante pour détecter toutes les souches à croissance lente et difficile. Aussi il conviendrait que le biologiste soit systématiquement informé de toute suspicion d'endocardite infectieuse de façon à prolonger le temps d'incubation des flacons de ces malades ou procéder à des repiquages de ces flacons.

◆ Levures et moisissures

Les champignons sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Les facteurs de prédisposition des patients concernés sont : l'immunodépression, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, de cathéters veineux centraux, en particulier pour l'administration de solutions d'hyperalimentation. Les résultats récents indiquent que la détection des fongémies constitue un des examens-clés du diagnostic des mycoses invasives, comme les candidoses.

Bien qu'il existe peu d'études incluant un nombre suffisant d'isolats fongiques permettant de l'affirmer, il y a toutes les raisons de penser que les facteurs critiques influençant la détection des bactériémies, jouent également un rôle décisif pour la mise en évidence des fongémies. Ainsi, la répétition des prélèvements, le volume de sang mis en culture par rapport au volume de milieu, la formulation du milieu et les conditions d'incubation (aération, température et durée) sont des facteurs influençant l'efficacité des hémocultures. La température optimale de culture varie de 27°C à 30°C pour les champignons filamenteux, à 37°C pour les levures. De même, la durée d'incubation est variable, de 2 à 3 jours pour la plupart des levures, à 3 à 6 semaines pour les champignons dimorphiques. A noter que parmi les levures, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata* et *Candida krusei* demandent généralement une incubation plus prolongée pour être détectés que *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ou *Candida parapsilosis*. Néanmoins, malgré l'optimisation de ces variables dans les meilleures méthodes d'hémoculture actuellement en usage, ces dernières restent

encore trop souvent négatives dans les infections fongiques disséminées.

Les milieux biphasiques sont classiquement considérés comme les meilleurs pour la croissance des champignons. Le milieu "Brain Heart Infusion" (BHI) apparaît comme le meilleur pour la détection des levures.

Le développement des automates a constitué un progrès par rapport aux procédés traditionnels de détection des fongémies. Mais c'est aussi l'adaptation des milieux à la croissance fongique qui a considérablement amélioré la rapidité de détection des fongémies et la fréquence d'isolement des champignons (tout particulièrement des levures) dans l'hémoculture.

Le milieu Bactec Fungal Medium améliore la sensibilité de détection de la croissance des espèces difficiles (*C. neoformans*, *C. glabrata*, *Fusarium*, *Penicillium marneffeii* et autres champignons filamenteux). Ce milieu comporte du chloramphénicol et de la tobramycine, inhibant la croissance des bactéries habituellement retrouvées au cours des septicémies bactério-fongiques, ainsi qu'un agent lytique conduisant au relargage des champignons endocellulaires.

Le système Isolator de lyse-centrifugation est aujourd'hui la meilleure méthode de détection des fongémies, en particulier pour la mise en évidence de *Histoplasma capsulatum* et de *Cryptococcus neoformans*. Il convient également au diagnostic des fongémies à *Malassezia furfur*, aux fusarioses et pénicillioses.

Le choix d'un procédé et d'un milieu d'hémoculture doit prendre en compte différents éléments, tels que la taille du laboratoire, la proportion et le nombre de malades à risques. Ainsi, il est nécessaire de rappeler que les *Candida* spp. restent des espèces fongiques majoritairement retrouvées, et de loin, en pathologie fongique. Pour ces espèces, les différents systèmes d'hémoculture (conventionnels, Bactec ou Isolator) présentent des efficacités sensiblement équivalentes.

5- Interpréter les résultats

Les données épidémiologiques montrent que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont les deux espèces les plus souvent isolées en situation de

pathogénicité. La fréquence d'isolement des Staphylocoques à coagulase négative (SCN) s'est accrue considérablement au cours des deux dernières décennies, mais seulement 10 à 20 % de ces isolats ont une signification clinique. La majorité des SCN isolés par hémoculture sont des contaminants, ce qui pose parfois des problèmes difficiles d'interprétation.

D'autres micro-organismes ont vu leur fréquence d'isolement par hémocultures s'accroître : *Enterococcus*, Levures, Mycobactéries. En revanche, la fréquence d'isolement des bactéries anaérobies reste faible notamment chez les enfants.

L'identification des micro-organismes isolés par hémoculture permet de préjuger de leur signification clinique. *S. aureus*, *E. coli*, les *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* et *Candida albicans* sont en situation de pathogénicité dans plus de 90 % des cas. Au contraire, les *Bacillus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* sont responsables de bactériémies significatives dans moins de 5 % des cas. Le problème se complique avec les Streptocoques du groupe viridans, les *Enterococcus* et les SCN.

Pour attribuer une signification clinique à une hémoculture il est dangereux de se baser sur le fait que les deux flacons (aérobie et anaérobie) ou seulement l'un des flacons est positif. En effet, des études de corrélations clinico-biologiques ont montré que dans la moitié des cas pour les pathogènes et le tiers des cas pour les contaminants, il y a croissance dans les deux flacons, alors que 49 % des pathogènes et 68 % des contaminants ne poussent que dans un seul flacon.

En pratique, la signification clinique d'un micro-organisme isolé par hémoculture est d'autant plus probable qu'il sera retrouvé dans des prélèvements successifs. C'est répéter que la réalisation d'une seule hémoculture isolement est insuffisante, car elle sera d'interprétation difficile puisque la majorité des micro-organismes isolés sont des opportunistes et non des bactéries pathogènes spécifiques.

En conclusion, la variété des micro-organismes pouvant être trouvés dans le sang s'est accrue à mesure que la proportion de malades immunodéprimés augmentait. Les espèces en cause sont nombreuses et ont des exigences nutritives variées qui font que le milieu de culture universel n'existe pas. Le choix des espèces à rechercher et donc le choix du milieu de culture repose donc sur les données probabilistes, donc sur des critères cliniques.

Bibliographie

- BATES D.W., COOK F., GOLDMAN L., LEE T.H. - Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospective validated model. *Ann. Intern. Med.* 1990 ; 113 : 495-500.
- BEEBE J.L., KONEMAN E.W. - Recovery of uncommon bacteria from blood : association with neoplastic disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995 ; 8 : 336-5.
- BISMUTH M., COURCOL R. - Les automates d'hémocultures en 1994. *La Lettre de l'infectiologie* 1994 ; 9 : 423-31.
- MAINARDI J.L., VANDENESCH F., CASALTA J.P., et al. Recommandations pour le diagnostic microbiologique et l'étude anatomopathologique des valves cardiaques au cours des endocardites infectieuses. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 1995 ; 10 : 12-5.
- MATHIEU D., NGUYEN J., GRENIER B., VERON M. - Recommandations pour l'évaluation des automates pour hémocultures. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 1994 ; 9 : 179-83.
- MERMEL L.A., MALI G. - Detection of bacteremia in adults : consequences of culturing an inadequate volume of blood. *Ann. Intern. Med.* 1993 ; 119 : 270-2
- REIMER L.G., WILSON M.L., WEINSTEIN M.P. - Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997 ; 10 : 445-65.
- WEINSTEIN M.P. - Current blood culture methods and systems : clinical concepts, technology and interpretation of results. *Clin. Infect. Dis.* 1996 ; 23 : 40-6.
- WEINSTEIN M.P., TOWNS M.L., QUARTEY S.M. et al. - The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s : a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin. Infect. Dis.* 1997 ; 24 : 584-602.

Annexe

Recommandations pour le diagnostic microbiologique et l'étude anatomo-pathologique des valves cardiaques au cours des endocardites infectieuses

Microbiologistes : Mainardi J.L., Vandenesch F., Casalta J.P., N'Guyen J., Benoît C., Tissot-Dupont H., Maugein J., Weber M., Bouvet A., Etienne J.

Anatomopathologistes : Loire R., Vissuzaine C., Bruneval P.

Association pour l'Etude et la Prévention de l'Endocardite Infectieuse. CHU Bichat-Claude Bernard. 46, rue Henri Huchard. 75877 Paris Cedex 18.

Les procédures recommandées pour l'amélioration du diagnostic étiologique des endocardites infectieuses concernent les examens suivants :

- les hémocultures sur milieux usuels aéro- et anaérobie qui sont pratiquées dans tous les cas. Elles permettent en effet la multiplication de la plupart des souches de streptocoques, staphylocoques et entérocoques responsables de la majorité des cas d'endocardites infectieuses ;
- les hémocultures sur milieux spéciaux qui sont recommandées pour la détection de micro-organismes plus exigeants ou à développement intracellulaire ;
- les examens sérologiques qui peuvent compléter ces recherches ;
- enfin les techniques microbiologiques et anatomopathologiques d'étude des valves cardiaques et des prothèses.

1- Hémocultures

Il existe lors des endocardites infectieuses une bactériémie constante qui permet de réaliser des hémocultures quelle que soit la température du patient. Pour améliorer la fréquence des isollements bactériens lors des endocardites infectieuses, il apparaît particulièrement important d'adresser les hémocultures au laboratoire de bactériologie avec les informations cliniques pertinentes : porte d'entrée supposée de l'agent pathogène, caractéristiques cliniques et évolutives de la maladie, permettant de choisir les techniques de culture les mieux adaptées aux micro-organismes suspectés.

↳ Nombre et type d'hémocultures

- * En l'absence de traitement antibiotique dans les jours précédents, il est recommandé de réaliser une première série de trois hémocultures dans un intervalle de 24 heures, le temps minimum espaçant deux hémocultures devant être d'une heure. Compte tenu des risques de contamination, les hémocultures ne doivent pas être prélevées au travers d'un cathéter. Le même protocole est proposé pour les enfants.
- * Le lendemain, si ces hémocultures demeurent stériles, il est recommandé d'effectuer deux à trois autres hémocultures en diversifiant les milieux et les techniques pour favoriser la croissance de micro-organismes plus exigeants. Ainsi, le système de lyse-centrifugation "Du Pont Isolator" (Merck Clevenot) permet à la fois de libérer des micro-organismes intra-cellulaires, de les concentrer et de les ensemercer sur des milieux plus performants. Ce système est indiqué pour l'isolement des levures, des champignons et de bactéries à croissance difficile comme *Bartonella* (ex-*Rochalimea*). Pour la recherche des bactéries pathogènes intra-cellulaires comme *Coxiella burnetii*, deux tubes de sang (10 ml) prélevés sur héparine peuvent être confiés au Centre de Référence des Rickettsies de Marseille. L'acheminement pourra être réalisé à température ambiante par courrier rapide.
- * Si le malade a reçu des antibiotiques, l'usage des milieux contenant des résines absorbantes est recommandé.

↳ Volume

Environ 7 à 10 ml de sang veineux dans chaque flacon pour 70 à 100 ml de bouillon, soit 14 à 20 ml de sang par hémoculture. En fait, le volume de sang ensemercé dans chaque flacon doit correspondre à 10% du volume du milieu sauf indication contraire du fabricant.

↳ Milieux

- * Hémocultures conventionnelles ou système automatisé : pour chaque hémoculture, un flacon pour culture aérobie et un flacon pour culture anaérobie doivent être ensemercés. Les milieux utilisés doivent permettre l'isolement des bactéries les plus souvent responsables d'endocardites (streptocoques, entérocoques et staphylocoques). Ils doivent conte-

nir de l'hémine et du nicotinamide-adenine-dinucléotide qui favorisent la croissance des germes du groupe HACCEK des radicaux thiols apportés par exemple par la L-cystéine utiles à la croissance de certains streptocoques déficients (*Streptococcus adjacens* et *S. defectivus*) et aussi des *Legionella*, ainsi qu'un certain nombre de vitamines, comme la vitamine B6 sous forme de pyridoxal et la vitamine K3.

- * En cas d'utilisation des systèmes de type Isolator, les culots de centrifugation peuvent êtreensemencés rapidement sur des milieux adaptés aux bactéries les plus exigeantes comme certaines souches de streptocoques, de *Lactobacillus*, ou de *Campylobacter*, en incubant les milieux dans les atmosphères appropriées. La culture de *Bartonella* sur milieu acellulaire peut être obtenue en ensemençant la totalité d'un tube Isolator sur des milieu gélosés "chocolat isovitaléx" et en incubant ces milieux à 30°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le système Isolator présente par ailleurs un intérêt pour la culture de la plupart des levures : le milieu de Sabouraud (utilisé en tube et sans visser complètement le bouchon) peut être conservé plusieurs semaines permettant la culture des champignons à croissance lente. Dans des contextes particuliers, comme ceux évocateurs de tuberculose ou de légionellose, l'ensemencement de milieux spéciaux, précisés au chapitre des valves, est recommandé.

↳ **Température**

La température d'incubation des flacons doit être de 35-37°C.

↳ **Durée d'incubation**

Elle doit être prolongée pendant quatre semaines, y compris en cas d'utilisation d'un système automatisé d'hémocultures. Dans ce dernier cas, il pourra être nécessaire de ré-enregistrer les flacons d'hémocultures.

↳ **Coloration de Gram et sub-cultures**

En cas d'hémocultures négatives, que l'on utilise ou non un système automatisé d'hémocultures, il est recommandé de réaliser

- **dès le troisième jour d'incubation**, une coloration de Gram et une sub-culture des flacons aérobies et anaérobies sur milieu gélosé "chocolat-isovitaléx" pour la culture des bactéries du groupe HACEK et sur

milieu gélosé Columbia supplémenté par 5 % de sang de mouton pour la recherche des streptocoques. Une strie de staphylocoque permet de visualiser les colonies satellites de *Streptococcus adjacens* et de *S. defectivus*. L'incubation est réalisée pendant 2 à 5 jours sous CO₂ pour les milieux de repiquages des flacons aérobies et en anaérobiose pour ceux des flacons anaérobies. Enfin une sub-culture sur un milieu liquide peut être proposée, par exemple sur milieu coeur-cerveille, de Todd-Hewitt enrichi en chlorhydrate de pyridoxal (10 mg/ml), ou de Rosenow.

- **au septième jour d'incubation**, une coloration de Gram et des sub-cultures peuvent être réalisées sur des milieux gélosés "chocolat-isovitaléx" pour permettre la croissance des bactéries du groupe HACCEK ; l'incubation est réalisée pendant 5 jours sous 5-10% de CO₂ ou en anaérobiose selon le flacon d'origine.

L'intérêt d'une sub-culture à la fin de la période d'incubation n'est pas démontré.

2- Sérologies bactériennes et fongiques

Si les hémocultures sont négatives après 3 jours d'incubation, il est recommandé de faire les examens sérologiques suivants :

- *Chlamydia psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis*
- *Brucella*
- *Legionella*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Bartonella (ex-Rochalimea)*
- *Candida* (voire selon le contexte *Aspergillus*, *Histoplasma*). Pour la détection des anticorps vis à vis de *Candida* ou *Aspergillus* il est recommandé d'utiliser deux techniques utilisant des principes différents : une technique de précipitation (électrosynérèse, immuno-électrophorèse) et une technique de type IF ou ELISA. Par ailleurs, la détection d'antigène circulant par méthode immunologique est réalisée par certains laboratoires.
- *Coxiella burnetii*. Concernant cette sérologie, il est nécessaire de déterminer par immunofluorescence les titres des anticorps contre les antigènes de phase I et de phase II. En cas d'endocardite de la fièvre Q, le taux d'anticorps contre l'antigène de phase I est supérieur à 800 en IgG. Des informations complémentaires peuvent être données par le Centre de Référence des Rickettsies.

3- Techniques d'études des valves cardiaques

↳ Prélèvement

En per-opératoire, aucun tamponnement d'antiseptique ne doit être effectué sur la valve cardiaque. La valve sera recueillie dans un pot stérile ne contenant aucun liquide et doit parvenir en totalité au laboratoire de Bactériologie.

↳ Analyse au laboratoire de Bactériologie

1. A l'arrivée en bactériologie, la valve est déposée dans un mortier stérile sur un champ stérile ou dans une boîte de Pétri stérile (facilite l'observation). L'opérateur porte un masque et travaille de préférence sous hotte. Il faut repérer les différents types de lésion comme les perforations, calcifications ou végétations. La formation des techniciens de laboratoire pour apprendre à reconnaître les lésions peut se faire avec les anatomopathologistes ou les chirurgiens. Une description écrite ou dessinée de la valve peut être proposée, voire une photographie.
2. La valve doit être coupée au niveau de la végétation. Un fragment est destiné à l'anatomopathologie, l'autre à la bactériologie.
3. Sur le fragment de végétation destiné à l'anatomopathologie et avant son envoi, il est recommandé de réaliser trois empreintes sur lames. Les lames sont séchées et fixées à l'éthanol. Une coloration de Gram, une coloration de Ziehl-Neelsen, voire une coloration de Giemsa ou à l'acridine-orange peuvent être effectuées. Ces colorations permettent de mettre en évidence la plupart des bactéries et les mycobactéries. Une lame colorée à l'acridine-orange peut être secondairement colorée par une autre coloration (de Gram, de Giemsa.....). Le tissu destiné à l'anatomopathologiste peut être alors placé dans un fixateur (formol dilué au 1/10) surtout si l'examen anatomo-pathologique doit être différé (nocturne, week-end...).
4. Le fragment de végétation destiné à la bactériologie est dilacéré dans un mortier à l'aide d'un pilon ou au moyen d'un "potter" en présence d'environ 1 ml de bouillon coeur-cerveille. Il est recommandé de faire une coloration de Gram sur le broyat, d'ensemencer les milieux de culture définis ci-après et de congeler à - 80°C le résidu de broyat.

5. Ensemencement et durée d'incubation des milieux suivants :

* milieu gélosé "chocolat" additionné d'isovitalax incubé sous 5 % de CO₂ pendant 10 jours. Un tel milieu résiste beaucoup mieux à la dessiccation s'il est utilisé sous forme de milieu gélosé en pente dans un tube. Autrement, pour éviter le dessèchement des milieux gélosés, il est préférable d'utiliser un système de jarre dont le fond est recouvert de papier absorbant humidifié ; l'enrichissement en CO₂ peut être réalisé au moyen d'une bougie ou d'un système Gaspak.

L'incubation doit être réalisée à 37°C, mais une seconde boîte identique ou un milieu gélosé au sang doit être ensemencé et incubée sous 5 % de CO₂ pendant 45 jours entre 28 et 32°C pour favoriser la croissance de *Bartonella*.

* deux milieux gélosés à 5% de sang incubés l'un sous O₂, l'autre sous CO₂ pendant 10 jours permet une meilleure croissance des streptocoques par rapport aux milieux gélosés chocolats. L'apport de CO₂ favorise la croissance de *Streptococcus mutans*, *S. anginosus* et *S. constellatus*.

* milieu gélosé "Columbia" contenant 5 % de sang et incubé sous H₂ pendant 10 jours pour la culture de certains streptocoques et des bactéries anaérobies.

* milieu gélosé "BCYE" additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et incubé dans une jarre sous CO₂ à 35-37°C pendant 10 jours (le SVF favorise notamment la croissance de *Legionella micdadei* et de *L. bozemanii*).

* milieu de Lowenstein ou de Middlebrook conservé 6 semaines à 35-37°C pour la culture des mycobactéries.

* un milieu liquide légèrement réducteur, enrichi et faiblement gélosé favorise la multiplication *in vitro* des bactéries qui au sortir de l'organisme ont besoin d'une atmosphère réduite en oxygène et d'un support pour leur multiplication. L'un des milieux suivants est préconisé :

- milieu coeur-cerveille gélosé à 1 % et enrichi de 1 à 3 % d'isovitalax

- bouillon glucosé tamponné additionné du contenu d'un tube "viande-foie (VF)" et enrichi de 1 à 3 % d'isovitalax
- milieu de Schaedler semi-gélosé enrichi de 1 à 3 % d'isovitalax.

Ce milieu liquide est incubé à 35-37°C pendant 1 mois.

6. En présence d'une endocardite sur prothèse :

- si une végétation est présente, il faut faire l'analyse bactériologique comme précédemment,
- en l'absence de végétation, il faut demander au chirurgien d'individualiser à part le tissu pathologique prélevé au niveau de la désinsertion de la prothèse. Ce tissu doit être analysé comme une végétation. Sur la prothèse, il est conseillé d'ajouter du bouillon glucosé tamponné et de réaliser une première coloration de Gram. A la 48ème heure d'incubation, faire une coloration de Gram et ensemercer les différents milieux comme pour une valve native.

7. Dans tous les cas, congeler le reste du broyat de la valve ou un fragment de végétation à - 80°C. Pour permettre la culture de bactéries intracellulaires, il est possible d'adresser à l'Unité des Rickettsies de Marseille, la valve ou un fragment qui a été congelé immédiatement à - 80°C, le transport étant réalisé dans de la carboglace.

➔ **Etude anatomopathologique des valves cardiaques**

Quand l'analyse bactériologique a été effectuée, les tissus valvulaires restants sont fixés dans du formol au 10^e et adressés au laboratoire d'Anatomie Pathologique. Sur la feuille de transmission, le bactériologiste doit noter l'aspect des lésions qu'il a prélevées et que le pathologiste ne pourra plus retrouver (à moins qu'un dessin ou une photographie n'ait été réalisée).

◆ **Analyse macroscopique des prélèvements**

- Valve native

Noter la taille du prélèvement adressé, sa composition (tissu valvulaire, cordages, piliers).

Décrire la présence éventuelle de végétation, d'ulcération, de perforation, de thrombus, de rupture de cordages.

- Bioprothèse de valve

Noter, outre les classiques végétations et

les thrombus, les aspects de perforation ou de déchirure (dégénératifs ou infectieux).

Noter l'existence éventuelle d'une collerette de tissu cardiaque fibreux sur l'anneau d'insertion prothétique qui soit prélevable pour l'histologie.

- Prothèse mécanique

Noter surtout la présence de thrombus.

Noter l'existence éventuelle d'une collerette de tissu cardiaque fibreux sur l'anneau d'insertion prothétique qui soit prélevable pour l'histologie.

Pour l'ensemble de ces différents types de prélèvement, une photographie macroscopique peut être utile.

◆ **Analyse histologique**

Faire des prélèvements orientés sur les lésions constatées (végétation, perforation, déchirure, thrombose...) ou inclure en totalité les prélèvements de petite taille en les répertoriant sur le schéma ou une photographie Polaroid de la valve.

Fixer les prélèvements dans le formol dilué au 10^e.

Coloration systématique : hématoxyline-éosine-safran (HES).

En cas d'infiltration inflammatoire définissant le processus d'endocardite, faire les colorations complémentaires suivantes :

- coloration de Gram,
- coloration de Grocott et/ou PAS,
- coloration de Giemsa pour certaines bactéries notamment du genre *Bartonella*,
- coloration de Machiavello pour *Chlamydia* et les rickettsies.

A partir des blocs d'inclusion en paraffine stockés, peuvent être faites, à la demande dans les laboratoires spécialisés, des études d'immunofluorescence ou d'hybridation *in situ* pour la détermination d'agents pathogènes particuliers tels les rickettsies.

◆ **Résultats de l'étude histopathologique**

L'endocardite est définie par l'infiltration inflammatoire de la valve. Il faut préciser l'intensité de l'infiltrat inflammatoire et sa composition : polynucléaires, macrophages, lymphocytes. De la formule inflammatoire, peut se dégager la notion d'évolutivité inflammatoire des lésions : - présence de

polynucléaires correspondant à des lésions actives ; - absence de polynucléaires avec présence de macrophages et de fibrose, correspondant à des lésions cicatricielles. Cependant, il n'y a pas de stricte corrélation anatomo-bactériologique : la présence de quelques polynucléaires n'est pas toujours synonyme de persistance de bactéries et l'absence de polynucléaires n'élimine pas la persistance de bactéries intracellulaires dans les macrophages. Il se surajoute parfois des lésions contribuant au diagnostic : foyers de nécrose valvulaire, thrombose inflammatoire...

Caractérisation histopathologique des bactéries par l'utilisation de colorations spéciales : souvent les bactéries pyogènes abondantes sont visibles sous forme de petites colonies dès la coloration HES. Dans d'autres situations, les agents pathogènes ne sont mis en évidence que par l'utilisation de colorations spéciales. Certaines bactéries ne sont détectées qu'en situation intracellulaire et ce fait doit être noté car il oriente vers certains types de bactéries.

4- Conclusion

L'endocardite infectieuse reste une pathologie non exceptionnelle dans les centres de chirurgie cardiaque. Bien que le laboratoire de Bactériologie soit le partenaire principal impliqué dans le traitement des prélèvements valvulaires, la contribution du laboratoire d'Anatomie Pathologique est importante pour :

- l'analyse macroscopique des lésions permettant une bonne orientation des prélèvements bactériologiques,
- confirmer le diagnostic d'endocardite par la présence d'une inflammation. Cet élément devient fondamental lorsque le bactériologiste doute de la réalité pathologique des bactéries isolées. Le résultat de l'étude histopathologique contribue alors à la détection d'éventuelles contaminations,
- conserver les prélèvements en vue d'études en immunofluorescence ou en hybridation *in situ*.