



HAL
open science

Antibiogramme direct sur flacon d'hémoculture positif: mise au point et intérêt en thérapeutique

Cédric Paquin

► **To cite this version:**

Cédric Paquin. Antibiogramme direct sur flacon d'hémoculture positif: mise au point et intérêt en thérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01495351

HAL Id: dumas-01495351

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01495351>

Submitted on 24 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN

UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2016

N°

MEMOIRE POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE
MEDICALE

Tenant lieu de THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 10 octobre 2016 par

Cédric PAQUIN

Né le 1^{er} juin 1988 à Harfleur

**Antibiogramme direct sur flacon d'hémoculture positif :
mise au point et intérêt en thérapeutique**

Sous la direction de Madame le Docteur Sophie BOYER

Président du jury : Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

Membres du jury : Madame le Docteur Sophie BOYER

Monsieur le Professeur François CARON

Monsieur le Professeur Benoît MISSET

Monsieur le Docteur Christian CATTOEN

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Professeur Martine Pestel Caron de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous remercie également pour la qualité de votre enseignement et pour la bienveillance dont vous faites quotidiennement preuve à mon égard. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude ainsi que de mon respect le plus sincère.

Je remercie Madame le Docteur Sophie Boyer de m'avoir guidé dans l'élaboration de ce travail, de la genèse à la rédaction. Merci pour la qualité de votre encadrement, pour vos conseils avisés et pour votre patience, même lorsque nous devions travailler à des heures tardives. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude ainsi que de mon respect le plus sincère.

Je remercie Monsieur le Professeur François Caron d'avoir accepté de juger ce travail et de m'avoir passionné lors des conférences du DUCAI. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Professeur Benoît Misset d'avoir accepté de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie Monsieur le Docteur Christian Cattoen d'avoir accepté de venir de Valenciennes pour juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce projet, à commencer par l'ensemble des biologistes du laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen, ainsi que mes co-internes de ce semestre. Merci de m'avoir soutenu et supporté tout au long de ces 6 mois si particuliers. Votre implication m'a permis de consacrer du temps à ce travail, et je vous témoigne ici ma profonde gratitude pour cela. Je remercie tout particulièrement Pierre, stagiaire technicien qui s'est beaucoup impliqué dans les manipulations. Merci de t'être montré digne de confiance, et pour ton sérieux teinté de bonne humeur.

Je remercie affectueusement mes parents, pour l'amour que vous me portez et la confiance que vous mettez en moi. Merci de m'avoir toujours laissé libre de mes choix et de m'apporter votre aide inconditionnelle en toutes circonstances.

Merci à ma grande sœur Emilie, pour les liens fraternels qui nous unissent et se renforcent au fil des années. Merci pour tes conseils et ton soutien inestimable.

Merci à mes neveux chéris Emre et Adem d'être aussi adorables et intrépides. Je suis fier d'être votre tonton même si je ne suis pas toujours être aussi présent que je le voudrais.

Merci à mon beau-frère Gençer d'être avant tout mon ami depuis de nombreuses années.

Merci à Ana d'être à mes côtés. Merci pour ta fraîcheur et ta personnalité hors du commun, qui me sont désormais indispensables. Envisager l'avenir avec toi me comble de bonheur. Merci aussi d'avoir pris particulièrement soin de moi pendant que je rédigeais cette thèse.

Merci à mes amis de toujours, tout particulièrement à Nico, Manue, Pich, Wiwi, Alban et Nino.

Merci à Florent et Hélène, merci aux amis de la fac Maxime, Rémi, Fred, Emilie et tout particulièrement merci à Victor, mon binôme et camarade de bibliothèque le plus assidu. Ce fut un plaisir de travailler avec toi toutes ces années, et je te dois beaucoup.

Merci à ceux qui sont devenus mes amis durant ces années d'internat, pour les bons moments passés et ceux à venir. Merci à Florian et Jennifer pour vos apéros Corses, à Shrapppy pour nos soirées canapé épiques, à Sandrine pour ton sens de la fête, à Maud pour l'histoire de « la petite compresse », à Imen pour le 15 août, à Vero pour nos élucubrations diagnostiques dieppoises, à Coombs, Elsa, Ismaël, Céline (dite « Doc Tournusse »), Julien, Anaïs, Elise et Charline pour nos apéros « bactério », à Benoît pour ton soutien et ton répertoire de chants si particulier, merci à Sylvie de faire en sorte qu'on ne s'ennuie jamais en cytologie. Merci aux dieppois Olivier, Emilie et Elodie pour votre encadrement, et pour ces 6 mois passés avec vous dont je garde un souvenir précieux. Merci à Jovani pour tout ce que tu m'as appris, je te souhaite le meilleur pour ton retour à Beyrouth. Merci aux autres biologistes qu'il m'a été donné de côtoyer et qui m'ont transmis une partie de leur savoir.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2015 - 2016
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoît VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno BACHY (<i>surnombre jusque 01/11/15</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>surnombre</i>)	HCN	Commission E.P.P. D.P.C. Pôle Qualité
Mr Guy BONMARCHAND (<i>surnombre</i>)	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition

Mme Danièle DEHESDIN (<i>surnombre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>surnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE (<i>surnombre</i>)	HCN	Urologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mr Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUJA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique

M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Réanimation médicale
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation

Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Digestive
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique

Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najja GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
----------------------------	-------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie
Mr François HALLOUARD	Galénique
Mme Caroline LAUGEL	Chimie organique
Mr Souleymane ABDOUL-AZIZ	Biochimie
Mme Maité NIEPCERON	Microbiologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mr Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS-MÉDECIN GÉNÉRALISTE

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Lucille **PELLERIN** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (phar)	Neurosciences (Néovasc)
Mme Pascaline GAILDRAT (phar)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (phar)	Chirurgie Expérimentale
Mr Antoine OVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (phar)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

Sommaire

1	Introduction	16
1.1	Bactériémies	17
1.1.1	Définition	17
1.1.1	Physiopathologie	17
1.1.2	Manifestations cliniques	18
1.1.3	Epidémiologie	19
1.1.4	Traitement	22
1.2	Hémocultures	25
1.2.1	Prélèvement	25
1.2.2	Milieux de culture	27
1.2.3	Incubation des flacons	27
1.2.4	Prise en charge des flacons positifs au CHU de Rouen	28
1.3	Objectifs de ce travail	30
2	Matériels et méthodes	31
2.1	Mise au point de la méthode de l'antibiogramme directement à partir du flacon d'hémoculture positif	31
2.1.1	Création d'un abaque permettant le contrôle de l'inoculum	31
2.1.2	Définition du volume le mieux adapté pour obtenir l'inoculum requis.	32
2.1.3	Validation des performances de la méthode	34
2.1.4	Essais de mise au point complémentaires	37
2.2	Evaluation du service rendu au CHU de Rouen	39
3	Résultats	41
3.1	Mise au point de la méthode de l'antibiogramme directement à partir du flacon d'hémoculture positif	41
3.1.1	Création d'un abaque permettant l'obtention de l'inoculum souhaité	41
3.1.2	Définition du volume le mieux adapté pour obtenir l'inoculum requis	43
3.1.3	Impact des facteurs liés aux flacons d'hémocultures positifs sur les inocula obtenus	46
3.1.4	Validation des performances de la méthode	49
3.1.5	Essais de mise au point complémentaires	58
3.2	Evaluation du service rendu au CHU de Rouen	59
4	Discussion	63
5	Conclusion	74
6	Bibliographie	75
7	Annexes	79

Table des illustrations

<i>Figure 1</i> Altération de la flore commensale et rupture de la tolérance immune dans l'intestin causées par le traitement antibiotique du sepsis. D'après A Lobo et al. (31).	24
<i>Figure 2</i> Système automatisé BD BACTEC® (Beckton Dickinson) utilisé au CHU de Rouen.	28
<i>Figure 3</i> Rendu des identifications et antibiogrammes en fonction de l'heure de prise en charge des flacons d'hémoculture positifs au CHU de Rouen.	29
<i>Figure 4</i> Abaque de référence – Staphylocoques.	42
<i>Figure 5</i> Abaque de référence – Bacilles à Gram négatif.	42
<i>Figure 6</i> Abaque de référence - Pseudomonas.	42
<i>Figure 7</i> Abaque de référence - Streptocoque.	42
<i>Figure 8</i> Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution - Staphylocoques	43
<i>Figure 9</i> Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – S.aureus.	44
<i>Figure 10</i> Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – Staphylocoques à coagulase négative.	44
<i>Figure 11</i> Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution - Entérobactéries.	45
<i>Figure 12</i> Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – Bacilles à Gram négatif non fermentaires	45
<i>Figure 13</i> Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – Streptocoques autres que S.pneumoniae	46
<i>Figure 14</i> Diagramme d'Ishikawa représentant les facteurs susceptibles d'influencer le résultat.	56
<i>Figure 15</i> Molécules employées en probabiliste par ordre de fréquence.	60
<i>Figure 16</i> Bénéfices attendus de la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture détectés positifs entre midi et minuit sur une période de 41 jours au CHU de Rouen.	62
<i>Tableau 1</i> Germes impliqués et localisations secondaires associées (11).	19
<i>Tableau 2</i> Validation des performances de la méthode en portée B - Critères à évaluer.	35
<i>Tableau 3</i> Dénombrement des colonies et détermination des inocula pour la création de l'abaque.	41
<i>Tableau 4</i> Evaluation de l'influence du type de flacons sur les inocula obtenus	47
<i>Tableau 5</i> Evaluation de l'influence de la richesse des examens directs sur les inocula obtenus.	47
<i>Tableau 6</i> Evaluation de l'influence du délai de positivité sur les inocula obtenus	48
<i>Tableau 7</i> Evaluation de l'influence de l'indice de fluorescence à la détection de la positivité sur les inocula obtenus.	49
<i>Tableau 8</i> Essais de répétabilité - P. aeruginosa ATCC 27853	51
<i>Tableau 9</i> Essais de répétabilité - E.faecalis ATCC 29212.	51
<i>Tableau 10</i> Essais de répétabilité - E.coli ATCC 25922	52
<i>Tableau 11</i> Variabilité inter-opérateur pour l'antibiogramme - S. aureus ATCC 29213	53
<i>Tableau 12</i> Maîtrise des risques.	56
<i>Tableau 13</i> Influence du type de gélose et de l'atmosphère d'incubation sur les diamètres d'inhibition autour de la gentamicine pour la souche E. faecalis ATCC 29212.	58
<i>Tableau 14</i> Germes isolés des flacons d'hémocultures positifs constituant des diagnostics classés par ordre de fréquence.	59
<i>Tableau 15</i> Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Staphylocoques.	79
<i>Tableau 16</i> Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : S. aureus.	79
<i>Tableau 17</i> Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Staphylocoques à coagulase négative.	79
<i>Tableau 18</i> Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Entérobactéries.	79
<i>Tableau 19</i> Résumé des inoculas obtenus en fonction des dilutions testées : Streptocoques (autres que pneumocoque).	80
<i>Tableau 20</i> Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Bacilles Gram négatif non fermentaires.	80
<i>Tableau 21</i> Comparaison de méthode - Entérobactéries	80

1 Introduction

Le sang est un milieu normalement stérile. Un état bactériémique se caractérise par le passage répété de micro organismes dans le sang. L'examen qui permet d'établir le diagnostic biologique et étiologique de la présence de micro organismes dans le sang est l'hémoculture.

Les bactériémies, qu'elles soient d'origine communautaire ou nosocomiale, ont des conséquences importantes en termes de morbidité et de mortalité (1)(2). Il a été montré que la mortalité chez les patients bactériémiques recevant une antibiothérapie appropriée (à laquelle le germe causant l'infection est sensible) était significativement plus faible que chez ceux recevant une antibiothérapie inappropriée (3). D'autres études ont montré le bénéfice d'un traitement antibiotique approprié sur la prévention de l'émergence de résistances et sur le coût engendré par ces résistances, lié notamment aux journées d'hospitalisation, examens de laboratoires et mesures d'isolement supplémentaires éventuelles à mettre en œuvre (4). Il apparaît dès lors important que l'antibiogramme soit disponible le plus rapidement possible afin d'ajuster le traitement antibiotique de manière précoce.

Les recommandations actuelles du CA-SFM/EUCAST (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie/European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) préconisent la réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé en ensemençant des suspensions bactériennes réalisées à partir de cultures visibles (5). La détermination de la sensibilité aux antibiotiques de souches isolées de flacons d'hémocultures positifs se fait à partir de subcultures de ces germes sur milieux solides, ce qui nécessite généralement un délai de 24h après la positivation des flacons d'hémocultures. Ce travail a pour but la mise au point d'une méthode cadrée et maîtrisée sur le plan analytique permettant la réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé directement à partir des flacons d'hémocultures positifs, afin de réduire de 24h le délai de rendu de l'antibiogramme. Ce travail s'inscrit dans le cadre du groupe travail « Réalisation de l'antibiogramme directement sur flacon d'hémoculture positif » du CA-SFM, dont l'objectif est de synthétiser les résultats des centres participants afin de proposer des recommandations pour la réalisation de l'antibiogramme directement à partir des flacons d'hémocultures positifs.

1.1 Bactériémies

1.1.1 Définition

Une bactériémie correspond à la présence de bactéries dans le sang. Un état bactériémique est objectivé par la présence d'au moins une hémoculture positive (dont le prélèvement a été motivé par des signes cliniques), sauf pour des micro-organismes saprophytes ou commensaux à pouvoir pathogène limité (staphylocoques à coagulase négative, *Bacillus* spp. autres que *B. anthracis*, *Corynebacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Micrococcus* spp.) pour lesquels deux hémocultures positives prélevées à des moments différents dans un intervalle de temps limité (<48h) sont exigées pour retenir le diagnostic (6).

1.1.1 Physiopathologie

Les bactériémies sont des événements fréquents, résultant de lésions muqueuses ou tégumentaires, spontanées (à l'occasion de diverses pathologies) ou bien au décours de traumatismes. Le processus débute par l'inoculation du sang par un foyer infectieux initial, appelé « porte d'entrée ». Les bactériémies peuvent être classées selon trois schémas physiopathologiques, selon leur point de départ et l'existence ou non d'un relai endo-circulatoire (7) :

- Les bactériémies à point de départ thrombophlébitique. Elles sont secondaires à la constitution au niveau de la porte d'entrée d'un thrombus colonisé par des germes, et dont la fragmentation entraîne un passage périodique de germes dans le torrent circulatoire. Ces « embols septiques » constituent aisément des localisations secondaires, notamment pulmonaires, ostéo-articulaires ou endocarditiques. Ce type de bactériémies est généralement causé par des germes pyogènes (entérobactéries dont *Escherichia coli*, cocci à Gram positif comme *Staphylococcus aureus*, streptocoques du groupe D, pneumocoque, ou bien germes anaérobies stricts tels que *Bacteroides fragilis*).
- Les bactériémies à point de départ lymphatique. Dans ce cas, les bactéries sont transportées par des macrophages jusqu'aux ganglions drainant les territoires des portes d'entrée. Dans un second temps, la diffusion sanguine se fait depuis les ganglions via les vaisseaux lymphatiques. Les germes en cause dans ce type de

bactériémies sont des germes spécifiques donnant lieu à des syndromes spécifiques (*Salmonella typhi* et fièvre typhoïde, brucelles et brucelloses par exemple).

- Les bactériémies secondaires à des endocardites. Ce type de bactériémies est lié à la constitution d'un foyer bactérien sur une lésion valvulaire ou sur du matériel prothétique, autour duquel un caillot de fibrine se forme. Cet ensemble constitue une « végétation », responsable des manifestations cliniques de l'endocardite. Les germes et leurs toxines sont libérés de manière permanente à partir de ce foyer. Les espèces bactériennes rencontrées dans ce type de bactériémies sont celles pourvoyeuses d'endocardites (principalement staphylocoques et streptocoques).

Cet état peut être transitoire, intermittent ou bien permanent (8), et donner lieu ou non à des manifestations cliniques.

- Les bactériémies transitoires correspondent à des décharges brèves de bactéries dans le sang, généralement sans manifestations cliniques et spontanément résolutive. C'est le cas lors des brossages de dents, au cours desquels on observe environ 10% de bactériémies sans que cela ne donne lieu à des manifestations cliniques (9).
- Les bactériémies continues correspondent à des décharges continues à partir d'un foyer infectieux, notamment lors d'endocardites, ou encore de brucelloses ou fièvres typhoïdes.
- Les bactériémies intermittentes correspondent à des décharges bactériennes répétées, à la suite d'infections diverses.

1.1.2 Manifestations cliniques

1.1.2.1 Sepsis et choc septique

Les bactériémies peuvent se compliquer de sepsis, c'est-à-dire un état inflammatoire généralisé (SRIS) secondaire à une infection. Ce terme tire son origine du grec ancien σήψις signifiant « putréfaction ». Le consensus international de 2016 pour la définition du sepsis et du choc septique définit le sepsis comme un « dysfonctionnement d'organe mettant en jeu le pronostic vital, causé par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection » (10).

Le choc septique est défini comme un sepsis au cours duquel une défaillance circulatoire et des perturbations du métabolisme cellulaire sont observés et suffisamment marqués pour déterminer une surmortalité. Cliniquement, le choc septique est défini par une hypotension

résistant au remplissage (nécessitant l'administration de drogues vasopressives pour maintenir une PAM \geq 65 mmHg), et une hyperlactacidémie (>2 mmol/l).

1.1.2.2 Localisations secondaires

Les bactériémies peuvent donner lieu à des localisations secondaires qui varient en fonction du germe impliqué et du terrain du patient. Le tableau ci-après résume les localisations secondaires en fonction des germes impliqués dans les bactériémies.

Tableau 1 Germes impliqués et localisations secondaires associées (11).

Germes	Localisations secondaires
<i>Staphylococcus aureus</i>	Endocarde, os, articulation, méninges, matériels étrangers implantés
Streptocoques du groupe D, Streptocoques non groupables, Entérocoques	Endocarde
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Méninges, articulations, péritoine, péricarde
<i>Bacteroides</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp, <i>Fusobacterium</i> spp.	Cerveau

Toute bactériémie à germe pourvoyeur d'endocardite (*S. aureus*, streptocoques non groupables, streptocoques du groupe D et entérocoques) entraîne la réalisation systématique d'une échographie. Les autres localisations secondaires doivent être recherchées par des examens complémentaires en fonction de la clinique (12).

1.1.3 Epidémiologie

1.1.3.1 Incidence

Les surveillances épidémiologiques menées à travers le monde suggèrent que l'incidence des bactériémies est en hausse. Une étude norvégienne conduite par Haug *et al.* relevant tous les épisodes de bactériémie survenus à l'hôpital universitaire de Bergen fait état d'une augmentation du nombre global de bactériémies (communautaires et nosocomiales) de 4.26 pour 1000 admissions de 1974 à 1979 à 8.71 pour 1000 admissions en 1988 et 1989 (13), tandis que le recueil des cas de sepsis aux Etats-Unis de 1979 à 2000 effectué par Martin *et al.* fait état d'une augmentation du nombre de cas de 82.7 à 240.4 pour une population de

100 000 personnes (14). En France, des études rapportent une prévalence globale de 10 bactériémies pour 1000 admissions (15). L'étude de J. Rodriguez-Baño *et al.* menée en 2006 dans 15 hôpitaux andalous fait état de 14.7 épisodes de bactériémie pour 1000 admissions (16).

Les bactériémies représentent 10,1% des infections nosocomiales en France d'après le rapport de l'enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales de 2012 menée par l'Institut de Veille Sanitaire (17). Les résultats préliminaires de l'étude SPA-BACT (SPILF/ONERBA) menée dans les établissements de santé français de novembre 2014 à février 2015 et portant sur la prise en charge des épisodes bactériémiques a relevé 2348 épisodes de bactériémie, avec une répartition équilibrée des bactériémies d'origine communautaire (51%) et nosocomiale (49%, parmi lesquelles 10% d'infections liées aux soins) (18). Une répartition équivalente a été observée dans l'étude de J. Rodriguez-Baño *et al.* avec 57% d'infections nosocomiales (16).

1.1.3.1 Germes impliqués

Au cours de l'étude SPA-BACT 2014, la grande majorité (93%) des cultures étaient mono-microbiennes. Le germe retrouvé en premier lieu était *Escherichia coli*, présent dans 29% des infections devant *S. aureus* (17%), les entérobactéries des genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (11%), les autres entérobactéries (8%), les staphylocoques à coagulase négative (10%), les streptocoques (7%) et entérocoques (6%). *Streptococcus pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient retrouvés dans une proportion équivalente d'infections (3%). Au total, une proportion similaire de bactériémies à germes à Gram positif et négatif a été observée dans cette étude (18). Ces résultats sont corrélés à ceux d'une autre étude française, menée par Alfonsi *et al.* d'octobre à novembre 2011 dans 23 hôpitaux du nord de la France, qui faisait état d'une répartition des agents infectieux responsables des bactériémies analogue à celle observée dans l'étude SPA-BACT 2014 (19). Cette répartition des germes s'explique par les fréquences relatives des infections se compliquant de bactériémies : dans l'une et l'autre des études précitées la porte d'entrée urinaire était la plus fréquemment retrouvée, expliquant ainsi la prédominance de *E. coli* qui est le premier germe responsable d'infections urinaires communautaires.

L'écologie des bactériémies semble liée à l'évolution des pratiques. L'étude norvégienne menée par Haug *et al.* a montré une augmentation de la proportion des cas de bactériémies à staphylocoques, notamment à coagulase négative, entre les années 1970 et 1980. Les auteurs expliquaient ce changement par une augmentation des bactériémies à portes d'entrée cutanées au cours de la seconde période étudiée, mise sur le compte d'une utilisation alors plus importante de dispositifs intra-vasculaires (13). La consommation d'antibiotiques a également un impact sur l'écologie des bactériémies. Ainsi, l'étude de M. Brady *et al.* a montré une augmentation conjointe entre 2008 et 2013 de la consommation d'antibiotiques en Irlande, de la proportion d'isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae* multi-résistantes et du nombre de bactériémies documentées à ce germe (20).

1.1.3.2 Conséquences en terme de mortalité et de coût

Les études françaises récentes attribuent aux bactériémies une mortalité globale allant de 12,2 % (attribuable : 60%) (19) à 13,38% (attribuable : 65%) (18). Ces chiffres corroborent ceux d'autres études dans le monde qui concernent des cohortes de patients atteints de bactériémies communautaires et nosocomiales (13)(14). L'étude américaine de Diekema *et al.* a montré que la mortalité des bactériémies était significativement plus importante lorsqu'il s'agissait d'infections nosocomiales : dans cette étude prospective qui comparait les infections communautaires et nosocomiales survenues dans deux hôpitaux américains entre 1999 et 2000, une mortalité de 34% a été observée pour les bactériémies nosocomiales vs 14% pour les épisodes communautaires (21).

La mortalité est différente selon la sévérité du tableau clinique. Ainsi l'étude d'Alfonsi *et al.* a montré une mortalité significativement plus élevée chez les patients en sepsis sévère et en choc septique (22,5% vs. 7,1%) (19). La mortalité de ces infections diffère également selon le germe en cause. Les bactériémies documentées à bacilles à Gram négatif (BGN) semblent de pronostic plus sombre que les bactériémies à staphylocoques. Dans la cohorte de patients de réanimation de l'étude menée par Diego Delle Rose *et al.*, la prévalence des bactériémies à germes à Gram positif était supérieure à celle des bactériémies à germes à Gram négatif (48,6% vs 43,7%), mais la mortalité était nettement supérieure chez les patients infectés par un germe à Gram négatif (41% pour les staphylocoques vs 67.6 % pour *K. pneumoniae*) (22). Aussi la mortalité pour une espèce bactérienne donnée diffère en fonction des résistances acquises. Une étude grecque d'Eleni Mouloudi *et al.* a ainsi montré que la mortalité chez des

patients de réanimation bactériémiques à des souches de *K. pneumoniae* sensibles aux carbapénèmes était significativement moins élevée (41%) que chez les patients infectés par des souches de cette même espèce résistantes aux carbapénèmes par production carbapénémases de type metallo-bêta-lactamase (56%) ou de type KPC (79%) (23).

Les bactériémies engendrent un coût important. L'étude multicentrique de Stewardson *et al.* portant sur les patients bactériémiques de 10 hôpitaux européens entre janvier 2010 et décembre 2011 a montré un allongement de la durée moyenne d'hospitalisation et un surcoût engendré allant de 4.4 jours et 4000 euros par patient hospitalisé présentant un épisode de bactériémie à entérobactérie sensible aux céphalosporines de troisième génération à 12.2 jours et 11 000 euros pour les bactériémies à *S. aureus* résistants à la méticilline (24). L'enjeu économique semble encore plus important chez les patients de réanimation : l'étude de Steven M. Brunelli *et al.* a montré parmi les patients porteurs d'un cathéter veineux central un allongement moyen de la durée d'hospitalisation de 7 jours pour un surcoût de 128 000 \$ chez ceux qui présentaient un épisode de bactériémie (25).

1.1.4 Traitement

1.1.4.1 Traitement probabiliste

Les patients bactériémiques doivent bénéficier d'un traitement antibiotique probabiliste précoce, parentéral, bactéricide et orienté en fonction de l'examen direct (12). Le traitement doit être adapté aux sensibilités naturelles des germes potentiellement en cause selon la porte d'entrée présumée, ainsi qu'à l'écologie locale des résistances acquises.

L'administration d'un traitement inapproprié, c'est-à-dire auquel le germe en cause n'est pas sensible, a des conséquences importantes en termes de mortalité. L'étude de Ching-Chi Lee *et al.* portant sur la prise en charge de patients bactériémiques au sein d'un service d'urgences taïwanais entre 2007 et 2008 a montré une mortalité à 28 jours significativement plus élevée chez les patients recevant une antibiothérapie inappropriée (16,3%) ou pas d'antibiothérapie (11,5%) versus ceux qui recevaient un traitement approprié (7%) (26). L'étude d'Abraham *et al.* portant sur la prise en charge des bactériémies en réanimation chirurgicale a par ailleurs montré un allongement de la durée moyenne d'hospitalisation de 47 à 83 jours lorsque le traitement antibiotique n'était pas approprié (27). Le délai de mise en œuvre du traitement probabiliste est inversement proportionnel à la mortalité. L'étude de

Nagel *et al.* qui s'intéressait à des patients bactériémiques à staphylocoques à coagulase négative a montré qu'un délai moyen d'instauration de traitement efficace de 34 heures était associée à une mortalité de 3% contre 21% lorsque ce délai était de 58 heures (28).

1.1.4.2 Importance de l'adaptation du traitement

La réévaluation de l'antibiothérapie selon les données de l'antibiogramme est primordiale. D'abord, elle permet d'instaurer une antibiothérapie efficace lorsque le traitement probabiliste ne l'était pas. Ensuite, les bénéfices individuels de la réadaptation de traitements efficaces vers des molécules de spectre moins large ont été rapportés dans la littérature. L'étude de Paul M. *et al.*, qui est une revue systématique et une méta-analyse de toutes les études comparant la mortalité des patients bactériémiques ayant bénéficié d'une désescalade de l'antibiothérapie versus ceux pour lesquels le traitement de première ligne avait été maintenu, rapporte que la mortalité est significativement moins élevée chez les patients bénéficiant d'une désescalade de l'antibiothérapie (29). Une étude de Lee *et al.* qui évaluait l'impact de la réévaluation de l'antibiothérapie chez des patients bactériémiques à entérobactéries a montré un bénéfice de non seulement en terme de mortalité (10,5% vs 54,4%), mais également en terme de sévérité du tableau clinique, de durée d'hospitalisation et de durée de séjour en réanimation (30). Une altération de la flore intestinale engendrée par l'utilisation d'antibiotiques à spectre large peut expliquer ce constat. Le rôle protecteur de ce microbiote a des mécanismes multiples. Il protège l'hôte de germes potentiellement pathogènes en exerçant une compétition vis-à-vis de la consommation de nutriments et de la liaison à la muqueuse intestinale. Cette flore permet aussi le maintien d'une barrière muqueuse, régule la réponse inflammatoire, produit des substances antimicrobiennes et stimule les cellules de Paneth pour qu'elles excrètent des peptides aux propriétés antimicrobiennes au niveau de l'épithélium intestinal. *Bacteroides fragilis* et le polysaccharide A présent au niveau de sa capsule ont été identifiés comme participant activement à cette symbiose, en maintenant une réponse inflammatoire adaptée et protectrice pour l'hôte (31). Par conséquent, les molécules à spectre large comprenant les germes anaérobies semblent être les plus délétères.

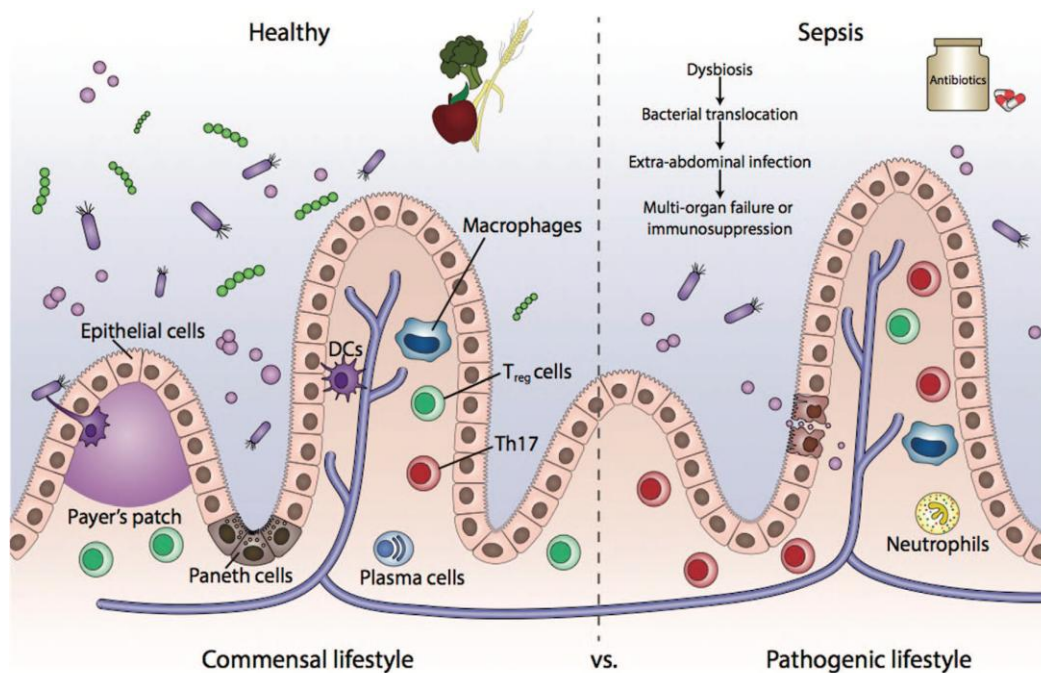


Figure 1 Altération de la flore commensale et rupture de la tolérance immunitaire dans l'intestin causées par le traitement antibiotique du sepsis. D'après A Lobo *et al.* (31).

Enfin, l'adaptation de l'antibiothérapie aux données de l'antibiogramme a un intérêt collectif et écologique majeur. Dans une époque où le développement de nouvelles chimiothérapies antibactériennes est de plus en plus sporadique (32), la pression de sélection exercée par l'utilisation excessive d'antibiotiques, notamment à large spectre, menace la santé des populations. Ce constat incite les sociétés savantes à adopter des politiques de limitation de la consommation d'antibiotiques et à préconiser l'adaptation des traitements pour des molécules de spectre aussi étroits que les données de l'antibiogramme le permettent. Outre les politiques mises en œuvre, l'utilisation plus raisonnée des molécules disponibles passe par une évolution des pratiques de laboratoire. Les biologistes médicaux doivent œuvrer à mettre à disposition des cliniciens une documentation microbiologique aussi rapidement que possible. Le déploiement de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) au cours de la dernière décennie a permis une réduction du délai de rendu des identifications bactériennes d'environ 24 heures par rapport aux techniques d'identification phénotypiques traditionnelles, et de nombreuses études ont d'ores et déjà mesuré le bénéfice apporté par cette technique sur le pronostic des patients (33)(34). Concernant la détermination de la sensibilité aux antibiotiques, la réduction des délais de rendu se heurte au fait que les méthodes employées (dilution en milieu liquide et diffusion en milieu solide) nécessitent des subcultures sur milieux gélosés. La Société de

Réanimation de Langue Française (SRLF) et la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation (SFAR) ont proposé dans une conférence de consensus de 2014 que l'identification bactérienne et la réalisation de l'antibiogramme se fassent directement à partir du flacon d'hémoculture positif (35). Cette pratique demeure un axe d'amélioration, en l'absence de préconisation des sociétés savantes de microbiologie et des fournisseurs d'automates d'antibiogrammes en milieu liquide.

1.2 Hémocultures

L'hémoculture est un examen biologique qui consiste à mettre en culture du sang circulant, qui est normalement stérile. Le but premier d'une hémoculture est la détection d'une bactériémie ou d'une fongémie. Elle permet d'obtenir en culture la souche bactérienne présumée responsable d'une infection en vue d'une identification et d'un antibiogramme. Cet examen est indiqué devant tout signe évocateur d'un syndrome infectieux ou de sepsis, à type de fièvre, d'hypothermie, de frissons, mais également pour documenter certains types d'infection comme une endocardite ou une infection sur dispositif intra-vasculaire (hémocultures avec délai de positivité).

1.2.1 Prélèvement

Le prélèvement des flacons d'hémoculture est une étape primordiale de l'examen. Il consiste en une collecte de sang veineux avec laquelle des milieux de culture liquide, contenus dans des flacons, sont immédiatementensemencés. Sa bonne réalisation conditionne la valeur diagnostique de celle-ci. Les risques associés à des prélèvements non conformes sont :

- Une fausse négativité, qui peut survenir en cas de remplissage insuffisant des flacons, d'un nombre insuffisant de flacons prélevé, un prélèvement réalisé après instauration d'un traitement antibiotique ou encore un délai trop important entre le prélèvement et l'incubation des flacons.
- Une fausse positivité, qui correspond à la mise en évidence de germes qui n'étaient pas présents dans le sang du patient, mais inoculés au moment du prélèvement. On parle de « contamination » des flacons d'hémocultures. Les germes responsables de

ces contaminations peuvent provenir de la peau ou de l'environnement immédiat du patient, du matériel utilisé pour la ponction ou encore des mains du personnel soignant.

Les éléments de maîtrise et les bonnes pratiques de prélèvement découlent de ces risques. Plusieurs études récentes se sont intéressées à ces pratiques et à la stratégie de prélèvement offrant la meilleure sensibilité et spécificité. Une revue de B. Lamy *et al.* présentait un état de l'art en 2015 (36). Plusieurs enseignements quant aux pratiques de prélèvement peuvent en être tirés :

- L'antisepsie stricte de la peau et de l'opercule des flacons réduit le risque de contamination, et la chlorhexidine en solution alcoolique est à ce titre l'antiseptique offrant la meilleure efficacité.
- La ponction veineuse périphérique expose à un risque de contamination moins élevée que la ponction par cathéter. Elle doit être privilégiée, excepté si une infection par le matériel est suspectée. Dans ce cas, des prélèvements doivent être réalisés simultanément par le dispositif et en périphérie pour déterminer la différence de délai de positivité (en faveur d'une infection de dispositif intra-vasculaire si la détection de la positivité est plus précoce d'au moins 2 heures).
- Le prélèvement doit être fait avant la mise en œuvre d'un traitement antibiotique. Si un traitement est déjà instauré, une fenêtre thérapeutique peut être observée. Si cela est impossible, le prélèvement doit être réalisé juste avant une administration, à la vallée de la concentration sanguine en antibiotiques.
- La sensibilité est proportionnelle au volume de sang prélevé. Aussi la Société Française de Microbiologie préconise le prélèvement de 4 à 6 flacons pour obtenir une sensibilité optimale (37).
- La stratégie du prélèvement unique d'un nombre suffisant de flacons correctement rempli versus des prélèvements répétés d'un nombre moins important de flacons garantit une sensibilité équivalente tout en étant plus spécifique (moins de flacons contaminés).

1.2.2 Milieux de culture

La plupart des flacons d'hémoculture commercialisés contiennent un milieu trypticase-soja additionné de nombreux facteurs de croissance (vitamines, sucres, hémine, cystéine, etc.) permettant la croissance des germes les plus exigeants et d'un anticoagulant (généralement du polyanéthol sulfonate de sodium). Il existe des flacons aérobies (contenant de l'oxygène) et des flacons anaérobies (contenant de l'hydrogène), souvent prélevés par paires afin de cultiver indifféremment des germes préférant l'une ou l'autre des atmosphères. Ces deux types de flacons contiennent également du CO₂, pour permettre la culture de bactéries exigeantes telles que les *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus* ou encore *Brucella* et *Campylobacter*.

1.2.3 Incubation des flacons

Il existe des systèmes manuels (dont la détection de la positivité est visuelle) et des systèmes automatisés d'incubation des flacons d'hémoculture.

Les systèmes automatisés comportent des étuves assurant de manière autonome une incubation à 35°C et une agitation continue des flacons. Ils comprennent un système de détection de la croissance microbienne. Le principe de détection des trois systèmes disponibles en France est fondé sur une mesure du CO₂ produit par le métabolisme des micro-organismes. Cette mesure est directe en ce qui concerne le système VersaTREK® (Thermoscientific), grâce une sonde externe qui mesure la variation de pression au sein de chaque flacon. Elle est indirecte pour les systèmes Bact/ALERT 3D® (bioMérieux) et BD BACTEC® (Beckton Dickinson), via un sensor situé au fond de chaque flacon qui réagit au CO₂ en produisant de la fluorescence (système BD BACTEC®) ou un virage coloré détecté par réflectométrie (système bioMérieux). Quel que soit le système, chaque flacon est placé dans une cellule pourvue d'un système de lecture qui effectue des mesures toutes les 10 minutes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction de paramètres de positivité préprogrammés. Un signal lumineux et/ou sonore indique la présence de flacons détectés positifs, pour que ceux-ci soient pris en charge.

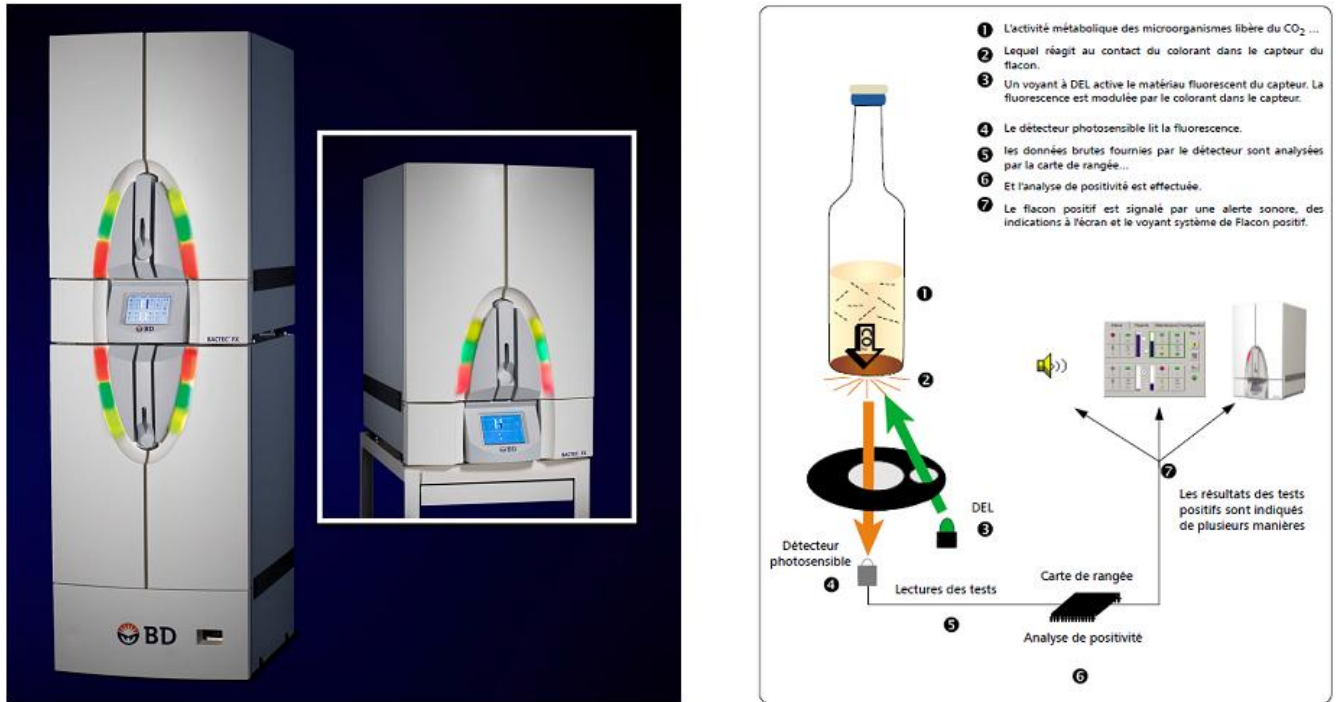


Figure 2 Système automatisé BD BACTEC® (Beckton Dickinson) utilisé au CHU de Rouen

1.2.4 Prise en charge des flacons positifs au CHU de Rouen

Le CHU de Rouen est équipé d'un automate BD BACTEC® (Beckton Dickinson). Les flacons sont réceptionnés au laboratoire et incubés dans l'automate 24h/24h tous les jours de la semaine. La gestion des hémocultures et de l'automate constitue un poste technique individualisé au sein du laboratoire. Les flacons détectés positifs sont pris en charge de 7h à 17h tous les jours. Sous un poste de sécurité microbiologique (PSM), du milieu de culture est prélevé de façon aseptique à l'aide d'aiguilles de subculture afin de réaliser :

- Un état frais pour observer la morphologie et la mobilité des bactéries.
- Une coloration de Gram après réalisation d'un frottis, permettant une orientation thérapeutique.
- Un ensemencement sur des milieux de culture gélosés sélectifs et non sélectifs, adaptés au type de bactérie observé afin de réaliser une identification et un antibiogramme.

Le résultat de l'examen direct est communiqué au médecin du service prescripteur par un interne, sous la responsabilité du biologiste, et confronté aux renseignements cliniques.

Les recommandations actuelles du CA-SFM/EUCAST préconisent la réalisation des antibiogrammes par ensemencement de suspensions bactériennes réalisés à partir de cultures visibles (5). Les fioles détectées positives avant midi font l'objet d'une subculture sur gélose de plusieurs gouttes du milieu liquide sans étalement pendant quatre heures. Cette technique est mise en œuvre dans le but d'obtenir des colonies isolées dès l'après-midi. Une identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et un antibiogramme sont réalisés à partir de ces colonies, permettant ainsi la mise à disposition du clinicien de l'identification bactérienne le jour de la détection de la positivité, et celle de l'antibiogramme le lendemain. Les fioles se positivant après 12h ne bénéficient pas de ce traitement, l'identification n'est alors rendue que le lendemain et l'antibiogramme 48h plus tard.

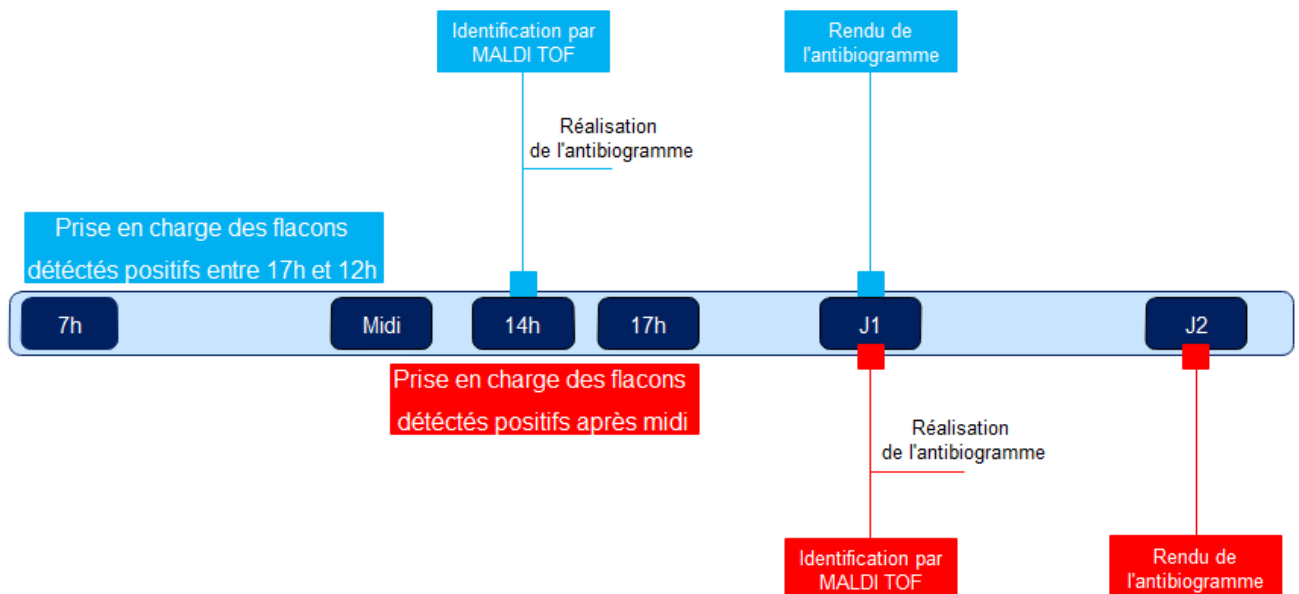


Figure 3 Rendu des identifications et antibiogrammes en fonction de l'heure de prise en charge des fioles d'hémoculture positifs au CHU de Rouen.

1.3 Objectifs de ce travail

Ce travail a pour but de réduire de 24h le délai de rendu de l'antibiogramme pour les flacons d'hémoculture détectés positifs après midi au CHU de Rouen. Nous avons comme objectifs :

- La mise au point d'une méthode cadrée et maîtrisée sur le plan analytique permettant la réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé directement à partir des flacons d'hémocultures positifs. Cette méthode devait pouvoir faire l'objet d'une accréditation.
- L'évaluation du bénéfice potentiel du rendu de l'antibiogramme de manière plus précoce sur une période de 41 jours au CHU de Rouen.

Les recommandations du CA-SFM/EUCAST définissent la méthode de réalisation des suspensions bactériennes devant être ensemencées pour réaliser les antibiogrammes : « A partir d'une culture visible du prélèvement réalisée sur milieu non sélectif, réaliser une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland » (5). La détermination de la densité bactérienne d'une solution obtenue en diluant le milieu de culture contenu dans les flacons d'hémoculture positifs par turbidimétrie (au moyen d'un densitomètre) est impossible de par la présence d'hématies et d'autres éléments en suspension. La mise au point de la méthode avait donc pour but premier de définir un mode opératoire permettant d'obtenir de manière fiable et reproductible des suspensions bactériennes équivalentes à des suspensions de 0,5 McFarland (McF) à partir de dilutions des flacons d'hémoculture positifs.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du groupe « Réalisation de l'antibiogramme directement sur flacon d'hémoculture positif » du CA-SFM, dont l'objectif est de synthétiser les résultats des centres participants afin de proposer des recommandations pour la réalisation de l'antibiogramme directement à partir des flacons d'hémocultures positifs.

2 Matériels et méthodes

2.1 Mise au point de la méthode de l'antibiogramme directement à partir du flacon d'hémoculture positif

La mise au point de la méthode s'est déroulée en 3 étapes, en adéquation avec le protocole proposé par le CA-SFM.

- Création d'un abaque permettant de contrôler l'inoculum obtenu lors de la dilution de flacons d'hémoculture positifs.
- Définition du volume le mieux adapté pour obtenir l'inoculum requis : cette étape vise à déterminer la dilution des flacons d'hémocultures positifs permettant l'obtention d'une densité bactérienne équivalente à celle d'une suspension de 0,5 McF, afin de reproduire les conditions de réalisations de l'antibiogramme recommandées par le CASFM/EUCAST (5).
- Validation des performances de la méthode : Nous avons effectué les vérifications préconisées par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC) pour une méthode adaptée de la méthode de référence, dite « de portée B » (38) afin d'apporter la preuve de la maîtrise de la méthode.

2.1.1 Création d'un abaque permettant le contrôle de l'inoculum

Le CASFM/EUCAST rapporte qu'une suspension de 0.5 McF correspond à un inoculum « d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^8$ UFC/mL pour *E. coli* » (5). Une suspension de 3 McF correspond à une densité bactérienne d'environ 10^9 UFC/ml. Nous souhaitons réaliser un abaque visuel obtenu après ensemencement de 10 µl de suspensions bactériennes dont la densité variait de 10^4 UFC/ml à 10^9 UFC/ml. Pour cela, des suspensions mères de 3 McF et 0.5 McF ont été réalisées à partir des souches *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Plusieurs dilutions successives de ces suspensions ont été réalisées selon le schéma suivant :

- La suspension de densité 3 McF (« suspension 1 », 10^9 UFC/ml) a été diluée au $1/1000^{\text{ème}}$ afin d'obtenir une suspension de 10^6 UFC/ml (dilution 1).

- La suspension de densité 0.5 McF (« suspension 2 », 10^8 UFC/ml) a été diluée au $1/1000^{\text{ème}}$ afin d'obtenir une suspension de 10^5 UFC/ml (dilution 1).
- La suspension de densité 0.5 McF a été diluée au $1/10^{\text{ème}}$ afin d'obtenir une suspension de 10^7 UFC/ml (suspension 3). Cette suspension a été diluée au $1/1000^{\text{ème}}$ pour obtenir une suspension de 10^4 UFC/ml (dilution 1).

Afin de vérifier la valeur exacte de la densité bactérienne de chaque suspension, les suspensions mères ont été diluées jusqu'à obtenir des suspensions permettant le dénombrement des colonies après ensemencement de cent microlitres au râteau sur des géloses.

Afin de construire l'abaque permettant d'évaluer l'inoculum bactérien, dix microlitres des différentes suspensions allant de 10^4 UFC/ml à 10^9 UFC/ml ont été ensemencées à l'aide d'une oëse déchargée sur la gélose en réalisant une strie verticale jusqu'au milieu de la boîte puis des stries horizontales en partant du point de dépôt. Des milieux de culture appropriés aux différentes espèces bactériennes ont été utilisés (milieu chromogène chromID CPS Biomérieux pour *E. coli*, TSA Biomérieux pour *S. aureus* et *P. aeruginosa* et géloses au sang COS biomérieux pour *E. faecalis*). Les géloses ont été incubées 18 à 24 heures puis photographiées.

Les différents essais de dilution réalisés sur les flacons d'hémoculture positifs ont été ensemencés de la même façon afin d'estimer leur densité bactérienne par comparaison avec l'abaque.

2.1.2 Définition du volume le mieux adapté pour obtenir l'inoculum requis.

2.1.2.1 Essais de dilution

Différents essais de dilution des flacons d'hémocultures positifs dans du sérum physiologique ont été effectués de manière quotidienne afin de déterminer le rapport nombre de gouttes/volume de solution saline optimal pour l'obtention d'un inoculum permettant la réalisation d'antibiogramme direct. A chaque essai, dix microlitres de ces suspensions ont été ensemencés pour évaluation de la densité bactérienne. Les ensemencements ont été faits sur milieux chromogènes chromID CPS Biomérieux pour les germes dont la morphologie évoquait une entérobactérie, TSA Biomérieux pour les staphylocoques et géloses au sang

COS Biomérieux pour les streptocoques. Les cultures ont été incubées 18 à 24h à 35°C en aérobie pour les bacilles à Gram négatif et les staphylocoques, en atmosphère à 5% de CO₂ pour les streptocoques.

Les essais de dilutions ont été faits sur :

- 70 souches d'entérobactéries parmi lesquelles 47 *E. coli*, 8 *Enterobacter cloacae*, 5 *K. pneumoniae*, 4 *Klebsiella oxytoca*, 4 *Proteus mirabilis* et 2 *Citrobacter freundii*.
- 77 souches de staphylocoques parmi lesquelles 32 *S. aureus*, 25 *Staphylococcus epidermidis*, 12 *Staphylococcus hominis*, 5 *Staphylococcus capitis*, 2 *Staphylococcus haemolyticus* et 1 *Staphylococcus caprae*.
- 49 souches de Streptocoques dont 14 *Streptococcus gallolyticus*, 12 *E. faecalis*, 6 *Enterococcus gallinarum*, 6 *Streptococcus pyogenes*, 4 *Streptococcus agalactiae*, 4 *Streptococcus sanguinis* et 3 *Streptococcus dysgalactiae*.
- 25 bacilles à Gram négatif non fermentaires parmi lesquels 14 *P. aeruginosa*, 10 *Burkholderia multivorans* et 1 *Pseudomonas spp.*

Des essais de 1, 5 et 10 gouttes dans 2 ml et de 5 et 10 gouttes dans 10 ml ont été réalisés.

Il n'a pas été fait d'essais pour les cultures dont la morphologie évoquait à l'examen direct un germe anaérobie, ni pour les bacilles à Gram positif.

Il est à noter que les essais effectués sur des souches de *S. pneumoniae* ont été exclus de l'étude en raison de l'obtention de résultats insatisfaisants et aléatoires (cette espèce devra faire l'objet d'une étude complémentaire ultérieure).

2.1.2.2 Evaluation de l'impact des facteurs liés aux flacons sur les inocula obtenus

A chaque essai de dilution, des données relatives aux flacons d'hémoculture positifs ont été relevés :

- Le délai de positivité en heures.
- Le type de flacon (aérobie ou anaérobie).
- La richesse de l'examen direct, évaluée au grossissement x1000 sur une échelle de 1 à 3 (1 = moins d'un germe par champ ; 2 = un à 10 germes par champ ; 3 = plus de 10 germes par champ).

- L'indice de fluorescence à la détection de la positivité par l'automate.

Nous avons voulu évaluer l'influence de ces facteurs sur l'obtention de l'inoculum souhaité pour une même dilution (5 gouttes dans 2ml de sérum physiologique pour les staphylocoques, les entérobactéries et les bacilles à Gram négatifs non fermentaires ; 15 gouttes dans 2ml de sérum physiologique pour les streptocoques). Nous avons dénombré les essais ayant abouti à l'obtention de l'inoculum attendu et les essais ayant abouti à l'obtention d'inocula différents de l'inoculum attendu. Afin d'évaluer le lien entre ces différentes données et les inocula obtenus, un test de Student a été réalisé pour les variables quantitatives (délai de positivité, indice de fluorescence) et un test du χ^2 (avec correction de Yates pour les tableaux à 2x2 entrées) a été utilisé pour les variables qualitatives (richesse de l'examen direct et type de flacon). Les tests statistiques ont été réalisés avec l'outil de statistiques en ligne BiostaTGV (39).

2.1.3 Validation des performances de la méthode

La réalisation de l'antibiogramme direct sur flacons d'hémocultures positifs est définie par le COFRAC comme un sous-processus du processus complexe « Antibiogramme manuel par diffusion en milieu gélosé », ayant déjà fait l'objet d'un dossier de vérification de méthode (**Famille:** Microbiologie – **Sous-domaine:** Microbiologie – **Sous-famille :** Bactériologie)(40). Selon le CASFM/EUCAST, l'antibiogramme doit être réalisé en ensemençant une « solution salée [de] turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland [élaborée] à partir d'une culture visible du prélèvement » (5). La méthode développée ici ne respecte pas cette préconisation, ce qui la place en portée B. Les points à évaluer, selon le SH-GTA 04 (38), sont résumés dans le tableau ci-après.

Tableau 2 Validation des performances de la méthode en portée B - Critères à évaluer.

Critères à évaluer	Exigences relatives à la validation d'une méthode qualitative en portée B	Modalité d'évaluation	Justification
Fidélité (répétabilité et fidélité intermédiaire)	Essai	Essai	
Justesse/exactitude (approche)	Essai	Essai	
Incertitudes/facteurs de variabilité et évaluation	Maîtrise des facteurs de variabilité	Analyse de risques	
Comparaison avec méthode déjà utilisée au laboratoire ou autre méthode du laboratoire (appareil en miroir, EBMD) et analyse des discordances	Essai	Essai	
Interférences (lipémie, hémoglobine plasmatique, bilirubine, médicaments, ...)	Essai	Non applicable	
Contamination entre échantillons (s'il y a lieu)	Essai	Vérifiée au moment de la lecture de l'antibiogramme	Formation/habilitation du personnel
Robustesse	Essai	Essai	
Intervalle de référence (valeurs usuelles)	Essai	Données bibliographiques	Recommandations CASFM/EUCAST pour les diamètres critiques des antibiotiques
Limite de détection	Essai	Non applicable	
Spécificité/sensibilité analytique	Essai	Non applicable	

La validation des performances de la méthode a consisté en une évaluation des points énumérés dans le tableau ci-dessus. Aucune évaluation des incertitudes de mesure n'a été effectuée car « l'apport de l'estimation de l'incertitude de mesure et les aspects mathématiques associés à l'estimation de l'incertitude de mesure, outre la faisabilité, apparaissent inappropriés aux besoins cliniques réels » selon le QUAMIC (41).

2.1.3.1 Fidélité

L'évaluation de la répétabilité a été faite en inoculant des flacons d'hémoculture avec des suspensions des souches *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *E. faecalis* ATCC 29212. Les flacons ont été incubés dans l'automate et à la détection de leur positivité, dix antibiogrammes ont été réalisés pour chaque souche à partir de dix dilutions (réalisées selon la méthode définie par les essais d'inocula) des flacons et les diamètres d'inhibition ont été relevés à l'aide d'un pied à coulisse après 18 à 20h d'incubation afin d'évaluer les CV de répétabilité pour chaque pastille d'antibiotique testée.

La fidélité intermédiaire a été évaluée en faisant varier le paramètre « opérateur ». Un flacon d'hémoculture a été inoculé avec une suspension de la souche de référence *S. aureus* ATCC 29213. A partir de ce même flacon d'hémoculture, cinq opérateurs ont réalisé 2

antibiogrammes chacun à partir de deux dilutions (réalisées selon la méthode définie par les essais d'inocula), et relevé à l'aide d'un pied à coulisse les diamètres d'inhibition après 18 à 20h d'incubation. Des CV de reproductibilité ont été calculés pour chaque pastille d'antibiotique testée.

2.1.3.2 Exactitude

Le laboratoire est abonné à différents programmes d'évaluation externe de la qualité (EEQ), notamment auprès du CTCB et d'AGLAE, et participe aux contrôles nationaux de qualité de l'ANSM. Il est prévu de réaliser les antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture positifs à chacun des programmes d'EEQ « hémoculture ». A l'heure actuelle, nous avons réalisé des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture positifs qui avaient été inoculés avec les 2 suspensions envoyées lors de l'EEQ « hémoculture » AGLAE de juin, afin de déterminer la concordance des phénotypes retrouvés par rapport au groupe de pairs et ainsi évaluer l'exactitude de notre méthode.

2.1.3.1 Analyse des risques

Une analyse de risque concernant les phases pré-analytique, analytique et post-analytique de cette méthode a été menée. Elle a consisté en une étude bibliographique, ainsi qu'en une analyse des risques selon la méthode des 5M. Les différents risques et éléments de maîtrise propres à cette méthode ont été représentés sous la forme d'un diagramme d'Ishikawa et d'un tableau.

2.1.3.2 Comparaison de méthodes

La comparaison de méthodes a consisté à réaliser quotidiennement des antibiogrammes à partir des flacons d'hémocultures positifs, et à comparer les résultats obtenus avec ceux des antibiogrammes réalisés à partir de ces mêmes échantillons selon la méthode de référence (suspensions de 0,5 McF réalisées à partir de cultures visibles à J+1 de la positivité des flacons).

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de concordance de catégorisation S/I/R de chaque couple famille bactérienne/antibiotique. Nous avons fixé notre seuil de concordance minimum à 80%.

Les erreurs ont été catégorisées selon la méthode proposée par le QUAMIC 2014 (41) et dénombrées.

VME : Erreur très majeure soit une souche R rendue S.

ME : Erreur majeure soit une souche S rendue R.

mE : Erreur mineure soit une souche S rendue I ou I rendue R (et inversement).

Le protocole du groupe de travail « Réalisation de l'antibiogramme directement sur flacon d'hémoculture positif » du CASFM impose le nombre de souches à tester pour la comparaison de méthodes, à savoir 25 entérobactéries, 10 bacilles à Gram négatif non fermentaires, 25 staphylocoques et 25 streptocoques.

2.1.3.3 Robustesse

La robustesse d'une procédure d'analyse est définie comme « une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode » (38). Nous avons estimé que les essais réalisés lors de la détermination de la variabilité inter-opérateur vérifiaient à ce titre la robustesse de la méthode.

2.1.4 Essais de mise au point complémentaires

2.1.4.1 Evaluation de l'impact du type de flacon et du temps passé à température ambiante sur les inocula obtenus à partir des échantillons positifs à pneumocoque.

Les souches de *S. pneumoniae* isolées d'échantillons cliniques sont fragiles. Le pneumocoque est un germe se lysant facilement au sein des flacons d'hémoculture une fois la positivité détectée, ce qui le rend particulièrement difficile à subcultiver. La mise au point d'une méthode permettant d'obtenir des inocula compatibles avec la réalisation de l'antibiogramme de façon répétable en diluant des fioles positives à ce germe est de ce fait

plus difficile. Afin d'évaluer l'influence du type de flacon et du temps passé à température ambiante après détection de la positivité pour les fioles positives à pneumocoque, nous avons inoculé deux paires de flacons (aérobies et anaérobies) avec la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619. Nous les avons incubées dans notre automate et extrait lorsque toutes avaient été détectées positives. Une paire a été laissée à température ambiante, l'autre a été maintenue à 35°C dans une étuve. Des essais de dilution de 15 gouttes dans 2 ml de sérum physiologique ont été réalisés toutes les deux heures pendant 8 heures sur chacune des fioles. Dix microlitres de ces suspensions ont été étalés sur géloses au sang COS biomérieux et incubées en atmosphère aérobie plus 5% de CO₂ pendant 18 à 24h. Les inocula ont été estimés à l'aide de l'abaque pour chacun des essais.

2.1.4.2 Evaluation de l'influence de la nature de la gélose employée et de l'atmosphère d'incubation sur l'évaluation du niveau de résistance des entérocoques aux aminosides.

Lorsque des diplocoques en chainettes sont observés à l'examen direct d'un flacon positif, il est impossible de déterminer s'il s'agit d'une souche de l'espèce *Streptococcus* ou *Enterococcus*. Le CA-SFM préconise de réaliser les antibiogrammes sur gélose MH+sang et d'incuber en aérobiose sous 5% de CO₂ les espèces du genre *Streptococcus* et sur gélose MH en aérobiose pour les espèces du genre *Enterococcus*. Dans le but d'harmoniser les pratiques, nous avons choisi de réaliser les antibiogrammes de tous les flacons positifs à diplocoques dans les conditions préconisées pour le genre *Streptococcus*.

Afin d'évaluer l'influence de cette pratique sur la détermination du niveau de résistance aux aminosides des entérocoques, nous avons inoculé un flacon avec la souche *E. faecalis* ATCC 29212. Ce flacon a été incubé dans notre automate, et à la détection de la positivité, deux géloses MH et deux géloses MH+sang ont été inoculées à partir d'une dilution de 15 gouttes de milieu dans 2 ml de sérum physiologique. Des pastilles de gentamicine 30 µg ont été disposées sur chaque gélose. Ces géloses ont été incubées pendant 20h en aérobiose sous 5% de CO₂. Les diamètres d'inhibition autour des pastilles ont été mesurés au pied à coulisse et comparés aux diamètres attendus pour ce couple souche/antibiotique (5).

2.2 Evaluation du service rendu au CHU de Rouen

Selon les recommandations du CASFM, les antibiogrammes doivent être lus 16 à 24h après leur ensemencement (5). Nous estimons que la lecture des antibiogrammes peut être faite jusqu'à 16h au laboratoire. Par ailleurs, les hémocultures détectées positives entre minuit et midi font l'objet d'une culture rapide le matin qui permet l'obtention de colonies isolées, à partir desquelles l'antibiogramme peut être réalisé dès l'après-midi par la méthode conventionnelle pour un rendu le lendemain. Ceci est impossible pour les fioles détectées positives après midi, et il apparaît donc que la réalisation de l'antibiogramme directement à partir des flacons d'hémocultures positifs permettrait une réduction de 24h du délai de rendu de l'antibiogramme pour les hémocultures détectées positives entre midi et minuit.

Nous avons évalué le service rendu par la mise en place de cette méthode pour les flacons d'hémocultures détectés positifs par l'automate durant une période de 41 jours (21/07/2016 au 31/08/2016). Les flacons ont été classés en trois catégories :

- Flacons constituant des diagnostics, c'est-à-dire premières hémocultures à germes considérés comme pathogènes ou deuxièmes hémocultures positives aux mêmes micro-organismes saprophytes ou commensaux.
- Flacons qui documentaient des bactériémies connues.
- Flacons considérés comme contaminés (cultures isolées à germes commensaux ou saprophytes).

Des données ont été recueillies à partir des informations consignées dans le système informatique du laboratoire et dans le dossier médical informatisé des patients :

- Date et heure de détection de la positivité par l'automate.
- Résultat de l'examen direct.
- Traitement probabiliste instauré avant communication de l'examen direct et traitement probabiliste instauré après communication de l'examen direct le cas échéant.
- Identification du/des germe(s) impliqué(s) et phénotype(s) de résistance.
- Caractère multi-résistant du/des germe(s) (BMR).

A partir de ces données, nous avons défini la proportion de flacons pour lesquels la réalisation de l'antibiogramme directement à partir des fioles positives aurait permis un gain de 24h dans le délai de rendu de l'antibiogramme (flacons détectés positifs entre midi et

minuit). Parmi ces flacons nous avons établi la proportion de ceux pour lesquels le rendu de l'antibiogramme aurait permis de modifier une antibiothérapie inefficace (à laquelle le germe impliqué n'était pas sensible), de modifier l'antibiothérapie pour des molécules à spectre plus étroit ou encore d'identifier une BMR et de mettre en œuvre un isolement contact des patients. Il est à noter que le traitement évalué était celui que recevait le patient au moment du rendu de l'antibiogramme (modifié ou non après communication de l'examen direct).

3 Résultats

3.1 Mise au point de la méthode de l'antibiogramme directement à partir du flacon d'hémoculture positif

3.1.1 Création d'un abaque permettant l'obtention de l'inoculum souhaité

Les colonies des différentes souches ont été dénombrées à partir des cultures de 10 µl des dilutions de chaque suspension. Les résultats des dénombrements et des densités bactériennes pour les différents germes testés ont été consignés dans le tableau ci-après. Les densités correspondant à la suspension de 0.5McF (soit la densité attendue pour la réalisation de l'antibiogramme) ont été représentées en rouge.

Tableau 3 Dénombrement des colonies et détermination des inocula pour la création de l'abaque.

	Suspension 3 (0.5 McF 1/10 ^{ème})				Suspension 2 (0.5 McF)				Suspension 1 (3 McF)			
	Dilution 3	Dilution 2	Dilution 1	Suspension mère	Dilution 3	Dilution 2	Dilution 1	Suspension mère	Dilution 3	Dilution 2	Dilution 1	Suspension mère
<i>E. coli</i>	7 UFC/ 100 µl	72 UFC/ 100 µl (7.10 ² UFC/ml)	7.10 ³ UFC/ml (~10 ⁴ UFC/ml)	7.10 ⁶ UFC/ml (~10 ⁷ UFC/ml)	7 UFC/ 100 µl	67 UFC/ 100µl (7.10 ² UFC/ml)	7.10 ⁴ UFC/ml (~10 ⁵ UFC/ml)	7.10 ⁷ UFC/ml (~10 ⁸ UFC/ml)	5 UFC/ 100 µl	60 UFC/ 100 µl (6.10 ² UFC/ml)	6.10 ⁵ UFC/ml (~10 ⁶ UFC/ml)	6.10 ⁸ UFC/ml (~10 ⁹ UFC/ml)
<i>P. aeruginosa</i>	1 UFC/ 100 µl	30 UFC/ 100 µl (3.10 ² UFC/ml)	3.10 ³ UFC/ml (~10 ³ UFC/ml)	3.10 ⁶ UFC/ml (~10 ⁶ UFC/ml)	6 UFC/ 100 µl	20 UFC/ 100µl (2.10 ² UFC/ml)	2.10 ⁴ UFC/ml (~10 ⁴ UFC/ml)	2.10 ⁷ UFC/ml (~10 ⁷ UFC/ml)	5 UFC/ 100 µl	50 UFC/ 100 µl (5.10 ² UFC/ml)	5.10 ⁵ UFC/ml (~10 ⁵ UFC/ml)	5.10 ⁸ UFC/ml (~10 ⁸ UFC/ml)
<i>S. aureus</i>	19 UFC/ 100 µl	97 UFC/ 100 µl (10 ³ UFC/ml)	10 ⁴ UFC/ml	10 ⁷ UFC/ml	17 UFC/ 100 µl	135 UFC/ 100µl (10 ³ UFC/ml)	10 ⁵ UFC/ml	10 ⁸ UFC/ml	22 UFC/ 100 µl	180 UFC/ 100 µl (~2.10 ³ UFC/ml)	2.10 ⁶ UFC/ml (~10 ⁶ UFC/ml)	2.10 ⁹ UFC/ml (~10 ⁹ UFC/ml)
<i>E. faecalis</i>	6 UFC/ 100 µl	77 UFC/ 100 µl (8.10 ² UFC/ml)	8.10 ³ UFC/ml (~10 ⁴ UFC/ml)	8.10 ⁶ UFC/ml (~10 ⁷ UFC/ml)	7 UFC/ 100 µl	80 UFC/ 100µl (8.10 ² UFC/ml)	8.10 ⁴ UFC/ml (~10 ⁵ UFC/ml)	8.10 ⁷ UFC/ml (~10 ⁸ UFC/ml)	7 UFC/ 100 µl	87 UFC/ 100 µl (9.10 ² UFC/ml)	9.10 ⁵ UFC/ml (~10 ⁶ UFC/ml)	9.10 ⁸ UFC/ml (~10 ⁹ UFC/ml)

Les géloses correspondant aux suspensions mères et aux dilutions 1 ont été photographiées pour construire les abaques ci-après.

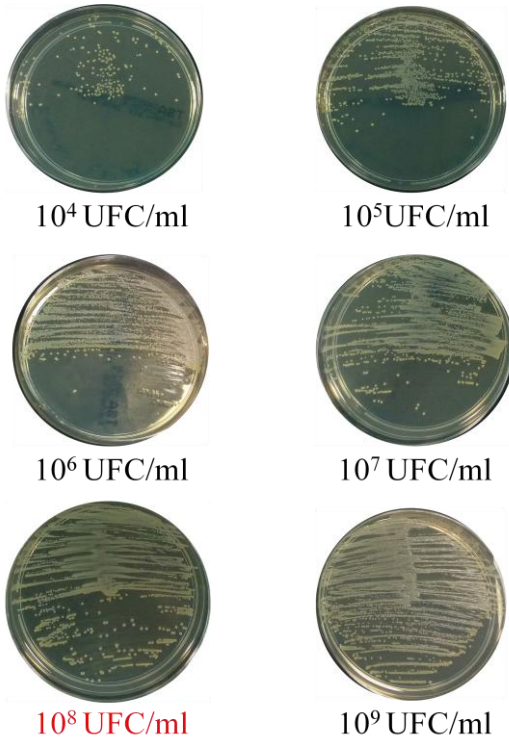


Figure 4 Abaque de référence – Staphylocoques.

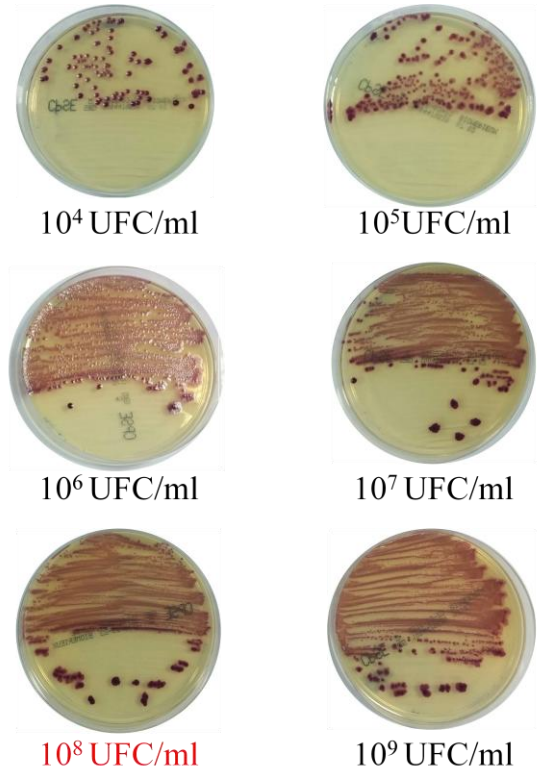


Figure 5 Abaque de référence – Bacilles à Gram négatif.

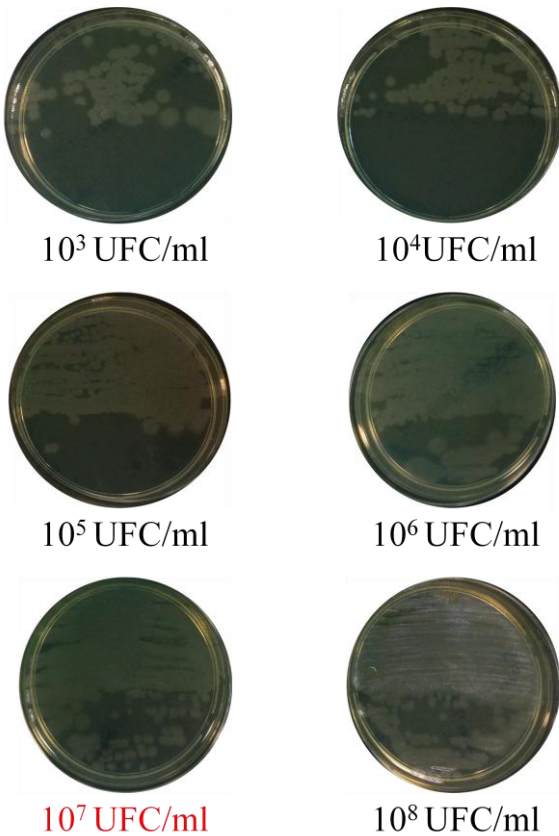


Figure 6 Abaque de référence - Pseudomonas.

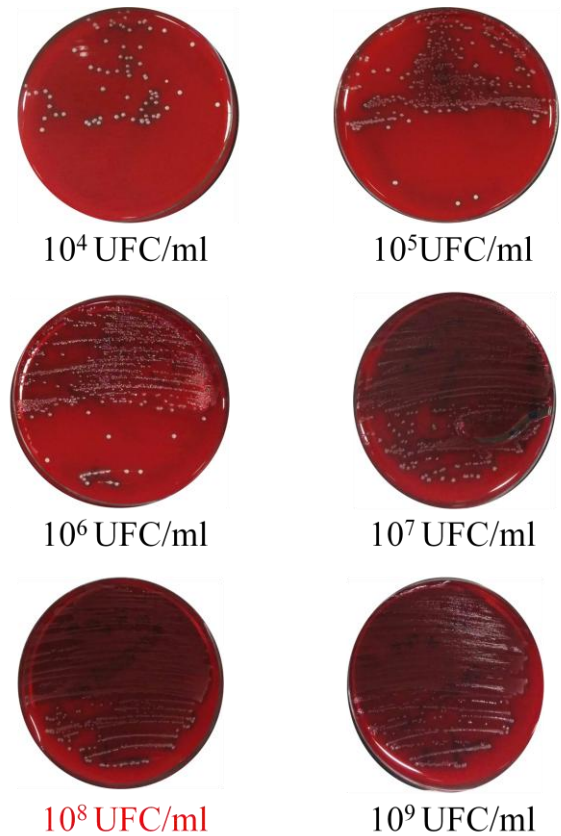


Figure 7 Abaque de référence - Streptocoque

3.1.2 Définition du volume le mieux adapté pour obtenir l'inoculum requis

Les différents essais de dilution effectués ont permis de déterminer les dilutions permettant d'obtenir le plus fréquemment des inocula se rapprochant d'une suspension de 0,5 McF.

3.1.2.1 Staphylocoques

Concernant les staphylocoques, la dilution des fioles positives permettant l'obtention la plus fréquente de l'inoculum souhaité était 5 gouttes dans 2 ml de sérum physiologique avec 67% d'obtention de l'inoculum souhaité pour les staphylocoques toutes espèces confondues, 62% pour l'espèce *S. aureus*, et 64% pour les staphylocoques à coagulase négative. Un tableau résumant les inocula obtenus en fonction des dilutions testées a été consigné en annexe. Les graphiques ci-après représentent les inocula obtenus selon les essais de dilution effectués (les boîtes représentent les inocula minimum, maximum et moyens obtenus et la ligne en pointillés l'inoculum cible pour la réalisation de l'antibiogramme).

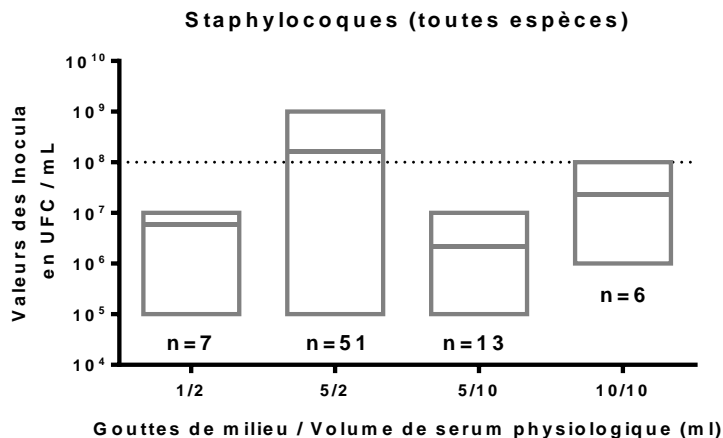


Figure 8 Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution - Staphylocoques

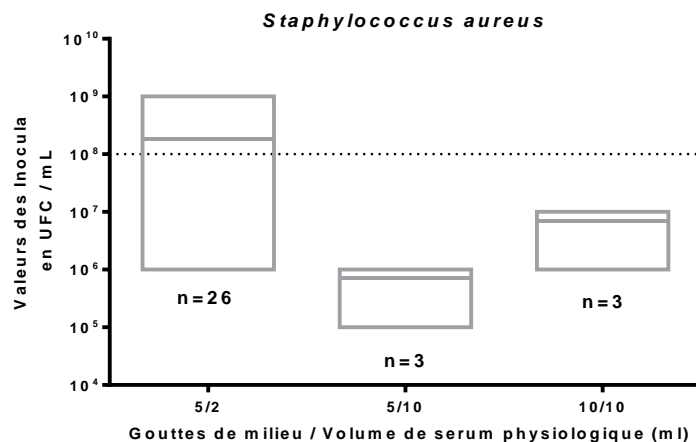


Figure 9 Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – S.aureus

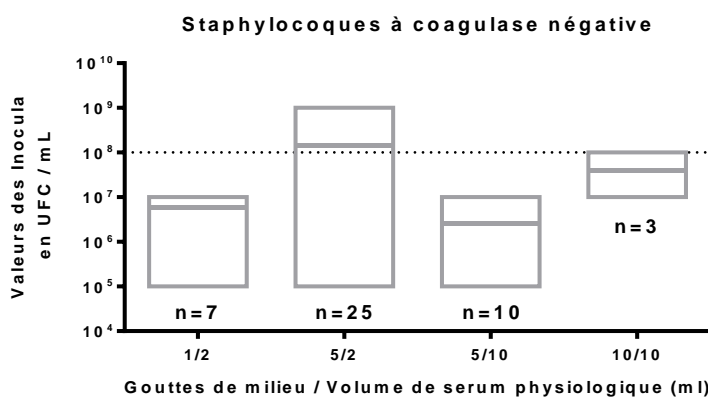


Figure 10 Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – Staphylocoques à coagulase négative

3.1.2.2 Entérobactéries

Pour les entérobactéries la dilution des fioles positives permettant l'obtention la plus fréquente de l'inoculum souhaité était également 5 gouttes dans 2 ml de sérum physiologique avec 71% d'obtention de l'inoculum souhaité. Un tableau résumant les inocula obtenus en fonction des dilutions testées a été consigné en annexe. Le graphique ci-dessous représente les inocula obtenus selon les essais de dilution effectués ont été représentés dans le graphique ci-après.

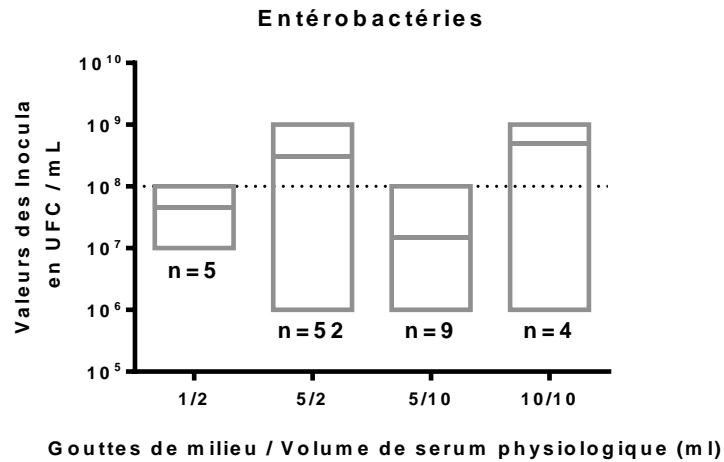


Figure 11 Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution - Entérobactéries

3.1.2.3 Bacilles à Gram négatifs non fermentaires

Les essais effectués sur les bacilles à Gram négatifs non fermentaires nous ont permis d'établir que la dilution des fioles positives permettant l'obtention la plus fréquente de l'inoculum souhaité était 5 gouttes dans 2 ml de sérum physiologique avec 44% d'obtention de l'inoculum souhaité de 10^7 UFC/ml. Un tableau résumant les inocula obtenus en fonction des dilutions testées a été consigné en annexe. Le graphique ci-dessous représente les inocula obtenus selon les essais de dilution effectués

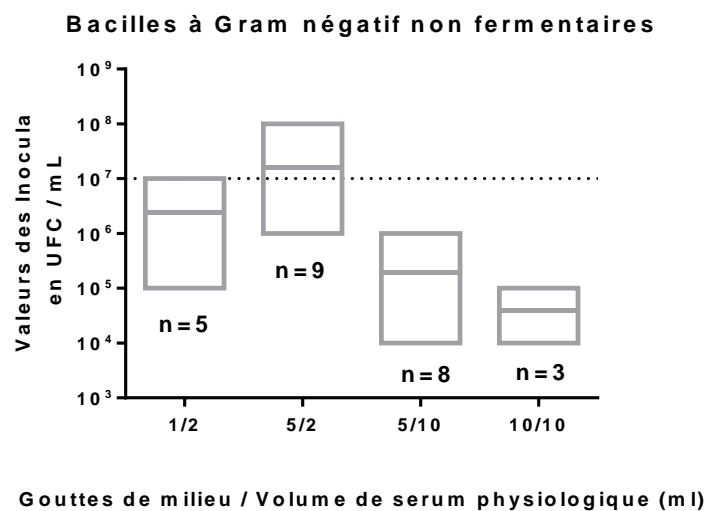


Figure 12 Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – Bacilles à Gram négatif non fermentaires

3.1.2.4 Streptocoques

Les essais effectués sur les streptocoques nous ont permis d'établir que la dilution des fioles positives permettant l'obtention la plus fréquente de l'inoculum souhaité était 15 gouttes dans 2 ml de sérum physiologique pour les streptocoques autres que *Streptococcus pneumoniae* (67% d'obtention de l'inoculum souhaité). Le graphique ci-dessous représente les inocula obtenus selon les essais de dilution effectués.

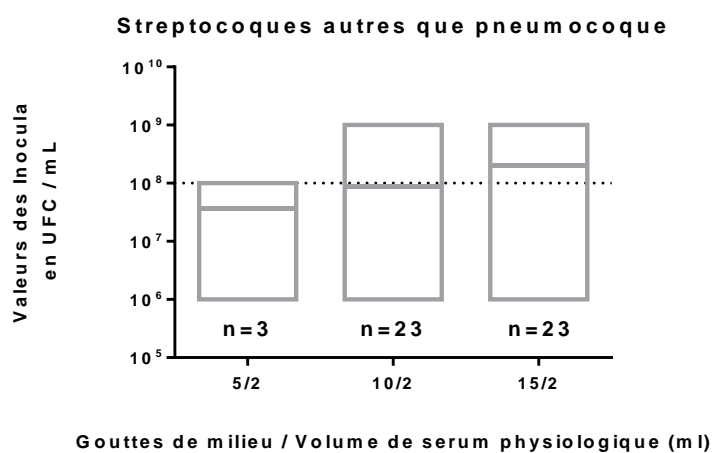


Figure 13 Représentation des inocula obtenus selon les différents essais de dilution – Streptocoques autres que *S.pneumoniae*

Les essais effectués sur des pneumocoques (n=14) ont donné des résultats aléatoires et insatisfaisants, cette espèce a donc été exclue de l'étude et devra faire l'objet d'une étude ultérieure afin de mettre au point une méthode permettant d'obtenir un inoculum compatible avec la réalisation de l'antibiogramme.

3.1.3 Impact des facteurs liés aux flacons d'hémocultures positifs sur les inocula obtenus

3.1.3.1 Type de flacon

Afin d'évaluer l'influence du type de flacon sur l'inoculum obtenu, les essais de dilution ont été classés en deux groupes selon qu'ils aient abouti ou non à l'inoculum correspondant à l'inoculum souhaité pour l'antibiogramme. La variable « type de flacon » est une variable qualitative. L'indépendance des variables « type de flacon » et « inoculum obtenu

correspondant à l'inoculum souhaité» a été évaluée pour les différents types de germe par un test du Khi² avec correction de Yates (tableau à 2x2 entrées). Les résultats de ces tests ont été consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 Evaluation de l'influence du type de flacons sur les inocula obtenus

Germes	Type de flacon	Inocula obtenus de 10 ⁸ UFC/ml	Autres	P-value
Staphylocoques	Aérobie	25	8	0,19
	Anaérobie	9	8	
Entérobactéries	Aérobie	16	9	0,42
	Anaérobie	21	6	
Streptocoques autres que <i>S.pneumoniae</i>	Aérobie	15	13	0,97
	Anaérobie	12	9	

La P-value est supérieure à 0,1 pour chaque test. Il ne semble pas y avoir de lien entre le type de flacon et l'inoculum.

3.1.3.2 Richesse de l'examen direct

L'évaluation de l'influence de la richesse de l'examen direct sur les inocula obtenus a été faite à partir de données de flacons positifs à staphylocoques et entérobactéries uniquement, afin d'étudier des effectifs statistiquement significatifs. Pour la même raison, les flacons avec une richesse d'examen direct d'indice 1 et 2 ont été regroupés. L'indépendance des variables qualitatives « richesse de l'examen direct » et « inoculum obtenu correspondant à l'inoculum souhaité pour l'antibiogramme » ont été évalués par un test du Khi² avec correction de Yates.

Tableau 5 Evaluation de l'influence de la richesse des examens directs sur les inocula obtenus

Germes	Richesse de l'examen direct	Inocula obtenus de 10 ⁸ UFC/ml	Autres	P-value
Staphylocoques	1 ou 2	19	9	0,92
	3	13	7	
Entérobactéries	1 ou 2	15	6	0,66
	3	13	8	

La P-value est supérieure à 0,1 pour les deux tests, nous ne mettons pas en évidence de relation entre la richesse de l'examen direct et l'inoculum.

3.1.3.3 Délai de positivité

Le délai de positivité d'un flacon d'hémoculture est une variable quantitative. Afin d'évaluer l'influence du délai de positivité sur l'inoculum obtenu, nous avons effectué pour les différents groupes de germes un test de Student avec comme hypothèse l'égalité des délais de positivité au sein des groupes « inoculum obtenu compatible avec l'antibiogramme » et « inoculum obtenu différent de l'inoculum attendu pour l'antibiogramme ». Les résultats de ces tests ont été consignés dans le tableau ci-après.

Tableau 6 Evaluation de l'influence du délai de positivité sur les inocula obtenus

Germes	Inocula obtenus	Délai de positivité moyen (h)	Délai min-max (h)	Nombre d'essais	P-value
Staphylocoques toutes espèces	10 ⁸ UFC/ml	18,54	1,93-84,12	34	0,87
	Autres	19,14	5,95-38,2	17	
<i>S.aureus</i>	10 ⁸ UFC/ml	13,79	1,93-84,12	18	0,77
	Autres	12,36	5,95-26,73	8	
Staphylocoques à coagulase négative	10 ⁸ UFC/ml	23	9,28-53,93	16	0,56
	Autres	25,17	17,17-38,2	9	
Entérobactéries	10 ⁸ UFC/ml	9,52	1,12-48,43	37	0,8
	Autres	10,13	2,27-35,27	15	
Streptocoques autres que <i>S.pneumoniae</i>	10 ⁸ UFC/ml	14,42	1,4-37,22	17	0,3
	Autres	19,5	8,12-33,22	6	
Bacilles à Gram négatifs non fermentaires	10 ⁷ UFC/ml	18,62	13,62-24,58	4	0,99
	Autres	18,66	19,58-46,72	5	

La P-value pour chaque test est supérieure à 0,1 : nous ne mettons pas en évidence de différence entre le délai de positivité des flacons dont la dilution avait abouti à un inoculum compatible avec l'antibiogramme et celui des autres flacons. L'obtention d'un inoculum compatible avec l'antibiogramme ne semble pas dépendre du délai de positivité.

3.1.3.4 Indice de fluorescence à la détection de positivité

De la même façon, l'indice de fluorescence à la détection de positivité des flacons est une variable quantitative. Afin d'évaluer l'influence de ce paramètre sur l'inoculum obtenu, nous avons effectué pour les différents groupes de germes un test de Student avec comme hypothèse l'égalité des indices de fluorescence au sein des groupes « inoculum obtenu compatible avec l'antibiogramme » et « inoculum obtenu différent de l'inoculum attendu pour l'antibiogramme ». Les résultats ont été consignés dans le tableau ci-après.

Tableau 7 Evaluation de l'influence de l'indice de fluorescence à la détection de la positivité sur les inocula obtenus

Germes	Inocula obtenus	Indice de fluorescence moyen	Indice min-max	Nombre d'essais	P-value
Staphylocoques toutes espèces	10 ⁸ UFC/ml	0,62	0,43-0,89	34	0,23
	Autres	0,58	0,43-0,81	17	
<i>S.aureus</i>	10 ⁸ UFC/ml	0,64	0,51-0,89	18	0,14
	Autres	0,57	0,46-0,79	8	
Staphylocoques à coagulase négative	10 ⁸ UFC/ml	0,6	0,43-0,77	16	0,85
	Autres	0,6	0,43-0,81	9	
Entérobactéries	10 ⁸ UFC/ml	0,7	0,44-0,98	37	0,56
	Autres	0,68	0,5-0,92	15	
Streptocoques autres que <i>S.pneumoniae</i>	10 ⁸ UFC/ml	0,65	0,53-0,83	17	0,54
	Autres	0,61	0,48-0,91	6	
Bacilles à Gram négatifs non fermentaires	10 ⁷ UFC/ml	0,57	0,46-0,63	4	0,61
	Autres	0,6	0,53-0,65	5	

Pour chaque test la P-value est supérieure à 0,1. De la même façon ces résultats ne montrent pas de corrélation entre l'indice de fluorescence à la détection de la positivité et l'inoculum obtenu en diluant les flacons.

3.1.4 Validation des performances de la méthode

3.1.4.1 Répétabilité

Pour effectuer les essais de répétabilité, dix antibiogrammes ont été réalisés à partir de dix dilutions pour chacune des souches. Il n'existe pas de recommandations concernant une valeur acceptable de CV pour les diamètres d'inhibition, nous avons retenu 7%, ce qui correspond à un écart type maximum de 0,7 mm pour un diamètre de 10 mm. Les valeurs cibles pour

chaque couple souche/antibiotique sont celles données par le CA-SFM (5). Nous avons calculé des bornes correspondant à la moyenne obtenue plus ou moins un écart type. Le résultat était considéré conforme si les bornes retrouvées expérimentalement étaient incluses dans celles fournies par le CA-SFM, acceptable si la moyenne et l'une des deux bornes étaient incluses dans l'intervalle des diamètres limites et non conforme si les bornes retrouvées n'étaient pas incluses dans l'intervalle des diamètres limites CA-SFM. Les résultats des essais effectués ont été consignés dans les tableaux ci-après.

Tableau Essais de répétabilité - *S.aureus* ATCC 29213

S. aureus ATCC 29213	Diamètre cible CA SFM (mm)	Moyenne (mm) n= 10	Ecart-type (mm)	CV(%)	Bornes (m +/- 1 ET)	Diamètres limites CA SFM (mm)	Conclusion
Antibiotique							
Pénicilline G	15	16	0,5	3,23	15,5-16,5	12-18	Conforme
Céfoxitine	27	26	0,5	1,78	25,5-26,5	24-30	Conforme
Tobramycine	23	24	0,7	3,09	23,3-24,7	20-26	Conforme
Gentamicine	22	24	0,8	3,21	23,2-24,8	19-25	Conforme
Erythromycine	26	28	1	3,57	27-29	23-29	Conforme
Clindamycine	26	28	1	3,57	27-29	23-29	Conforme
Norfloxacine	21	22	0,8	3,52	21,2-22,8	18-24	Conforme
Lévofloxacine	26	26	0,3	1,15	25,7-26,3	23-29	Conforme
Rifampicine	33	32	0,5	1,42	31,5-32,5	30-36	Conforme
Ac fusidique	29	31	0,5	1,56	30,5-31,5	26-32	Conforme
Cotrimoxazole	29	28	0,8	2,9	27,2-28,8	26-32	Conforme
Furanes	20	20	0,3	1,49	19,7-20,3	17-23	Conforme
Triméthoprim	25	26	0,7	2,59	25,3-26,7	22-28	Conforme
Linézolide	24	24	1	4,36	23-25	21-27	Conforme

Les résultats des essais de répétabilité sont conformes aux exigences pour l'ensemble des antibiotiques testés concernant la souche *S. aureus* ATCC 29213.

Tableau 8 Essais de répétabilité - *P. aeruginosa* ATCC 27853

<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Diamètre cible CA SFM (mm)	Moyenne (mm) n=10	Ecart-type (mm)	CV(%)	Bornes (m +/- 1ET)	Diamètres limites CA SFM (mm)	Conclusion
Antibiotique							
Ticarilline	NC	25	0,5	2,16	24,5-25,5	NC	Conforme
Ticar + ac clav	24	28	0,8	2,98	27,2-28,8	20-28	Acceptable
Pip+tazobactam	26	28	0,7	2,65	27,3-28,7	23-29	Conforme
Ceftazidime	24	26	0,5	1,86	25,5-26,5	21-27	Conforme
Céfépime	27	31	1,1	3,68	29,9-32,5	24-30	Acceptable
Aztréonam	26	30	0,9	3,1	29,1-30,9	23-29	Non conforme
Imipénème	24	23	0,8	3,63	22,2-23,8	20-28	Conforme
Méropénème	30	31	1	3,21	30-32	27-33	Conforme
Gentamicine	20	22	0,5	2,33	21,5-22,5	17-23	Conforme
Tobramycine	23	26	0,6	2,29	25,4-26,6	20-26	Acceptable
Amikacine	22	26	0,5	2,08	25,5-26,5	18-26	Acceptable
Lévofloxacine	23	22	0,6	2,87	21,4-22,6	19-26	Conforme
Ciprofloxacine	29	28	1,1	3,89	26,9-29,1	25-33	Conforme

Les résultats des essais de répétabilité sont conformes aux exigences pour 8 molécules sur 13, acceptables pour 4 et non conforme pour l'aztréonam concernant la souche *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Tableau 9 Essais de répétabilité - *E. faecalis* ATCC 29212

<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Diamètre cible CA SFM (mm)	Moyenne (mm) n=10	Ecart-type (mm)	CV(%)	Bornes (m +/- 1ET)	Diamètres limites CA SFM (mm)	Conclusion
Antibiotique							
Ampicilline	18	20	1,0	4,8	19-21	15-21	Conforme
Imipénème	27	25	1,0	3,8	24-26	24-30	Conforme
Pristinamycine	14	19	0,7	3,5	18,3-19,7	11.-17	Conforme
Norfloxacine	19	17	0,7	4,4	16,3-17,7	16-22	Conforme
Lévofloxacine	22	20	0,7	3,4	19,3-20,7	19-25	Conforme
Vancomycine	13	15	0,5	3,6	14,5-15,5	10.-16	Conforme
Teicoplanine	18	18	0,6	3,2	17,4-18,6	15-21	Conforme
Cotrimoxazole	30	29	0,9	3,3	28,1-29,9	26-34	Conforme
Gentamicine	15	22	1,0	4,7	21-23	12-18	Non conforme

Les résultats des essais de répétabilité sont conformes aux exigences pour 8 molécules sur 9 et non conformes pour la gentamicine concernant la souche *E. faecalis* ATCC 29212.

Tableau 10 Essais de répétabilité - *E.coli* ATCC 25922

<i>E. coli</i> 25922	Diamètre cible (mm)	Moyenne (mm)	Ecart-type (mm)	CV(%)	Bornes (m +/- 1ET)	Diamètres limites CA SFM (mm)	Conclusion
Antibiotique	CA SFM	(n= 10)					
Ampicilline	19	21	0,6	3,09	20,4-21,6	15-22	Conforme
Amox+clav	21	22	0,7	3,20	21,3-22,7	18-24	Conforme
Ticarcilline	27	26	1,0	3,86	25-27	24-30	Conforme
Ticar +clav	27	26	0,9	3,64	25,1-26,9	24-30	Conforme
Pipéracilline	24	23	0,60	2,63	22,4-23,6	21-27	Conforme
Pip+tazobactam	24	23	1	3	22-24	21-27	Conforme
Céfalaxine	18	20	0,5	2,26	19,5-20,5	15-21	Conforme
Céfoxitine	26	24	0,7	2,72	23,3-24,7	23-29	Conforme
Céfotaxime	28	30	0,9	3,10	29,1-30,9	25-31	Conforme
Ceftazidime	26	29	0,7	2,42	28,3-29,7	23-29	Conforme
Céfépime	34	33	0,4	1,20	32,6-33,4	31-37	Conforme
Aztréonam	32	34	1,3	3,77	32,7-35,3	28-36	Conforme
Imipénème	29	30	1,0	3,32	29-31	26-32	Conforme
Méropénème	31	33	0,9	2,71	32,1-33,9	26-34	Conforme
Ertapénème	33	34	1,3	3,72	32,7-35,3	29-36	Conforme
Gentamicine	23	23	0,6	2,82	22,4-23,6	19-26	Conforme
Tobramycine	22	22	0,4	1,80	21,6-22,4	18-26	Conforme
Nétilmicine	21	23	0,5	2,35	22,5-23,5	18-24	Conforme
Amikacine	23	23	0,3	1,31	22,7-23,3	19-26	Conforme
Ac nalidixique	25	28	1,5	5,37	26,5-29,5	22-28	Acceptable
Norfloxacine	32	30	1,5	4,92	28,5-31,5	28-35	Conforme
Ofloxacine	31	30	0,5	1,69	29,5-30,5	29-33	Conforme
Ciprofloxacine	35	34	1,2	3,45	32,8-35,2	30-40	Conforme
Furanes	20	22	0,5	2,46	21,5-22,5	17-23	Conforme
Triméthoprim	25	27	0,6	2,35	26,4-27,6	21-28	Conforme
Cotrimoxazole	26	28	0,7	2,34	27,3-28,7	23-29	Conforme
Céfixime	25	25	0,9	3,46	24,1-25,9	23-27	Conforme
Céfuroxime	23	24	0,8	3,30	23,2-24,8	20-26	Conforme
Mécillnam	27	26	0,8	3,16	25,2-26,8	24-30	Conforme

Concernant la souche *E. coli* ATCC 25922, les résultats des essais de répétabilité sont conformes aux exigences pour 28 molécules sur 29 et acceptables pour une molécule.

3.1.4.2 Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire a été évaluée en faisant varier le paramètre « opérateur ». Cinq opérateurs ont réalisé 2 antibiogrammes chacun à partir de deux dilutions d'un flacon d'hémoculture positif inoculé avec la souche *S. aureus* ATCC 29213. Il n'existe pas de

recommandations concernant une valeur acceptable de CV, nous avons retenu 10%, ce qui correspond à un écart type maximum de 1 mm pour un diamètre moyen de 10 mm. Les valeurs cibles sont celles données par le CA-SFM (5). Nous avons calculé des bornes et catégorisé les résultats en « conformes », « acceptables » et « non conformes » de la même façon que lors des essais de répétabilité.

Tableau 11 Variabilité inter-opérateur pour l'antibiogramme - *S. aureus* ATCC 29213

<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Diamètre cible CA SFM (mm)	Moyenne (mm) n= 10	Ecart-type (mm)	CV(%)	Bornes (m +/- 1 ET)	Diamètres limites CA SFM (mm)	Conclusion
Pénicilline G	15	16	1,1	7,01	14,9-17,1	12-18	Conforme
Céfoxitine	27	26	0,7	2,73	25,3-26,7	24-30	Conforme
Tobramycine	23	26	0,9	3,69	25,1-26,9	20-26	Acceptable
Gentamicine	22	25	1	4,16	24-26	19-25	Acceptable
Erythromycine	26	29	1,3	4,51	27,7-30,3	23-29	Acceptable
Clindamycine	26	29	1,8	6,25	27,2-30,8	23-29	Acceptable
Norfloxacine	21	23	1,1	4,76	21,9-24,1	18-24	Acceptable
Lévofloxacine	26	27	1,4	5,06	25,6-28,4	23-29	Conforme
Rifampicine	33	34	1,7	4,99	32,3-35,7	30-36	Conforme
Ac fusidique	29	35	2,3	6,54	32,7-37,3	26-32	Non conforme
Cotrimoxazole	29	29	1,8	6,2	27,2-30,8	26-32	Conforme
Furanes	20	21	0,8	3,79	20,2-21,8	17-23	Conforme
Triméthoprim	25	27	1	3,85	26-28	22-28	Conforme
Linézolide	24	25	1,4	5,77	23-6-26,4	21-27	Conforme

Les résultats des essais de fidélité intermédiaire sont conformes aux exigences pour 8 molécules sur 14, acceptables pour 5 molécules et non conformes pour l'acide fusidique.

3.1.4.3 Exactitude

Les flacons qui avaient été inoculés avec les suspensions de l'EEQ « hémoculture » AGLAE de juin ont été détectés positifs avec une souche de *S. aureus* pour l'une et de *P. aeruginosa* pour l'autre. Les antibiogrammes réalisés directement à partir de ces flacons ont montré des phénotypes de résistance sauvages pour les deux souches. Ces résultats étaient en accord avec ceux obtenus dans le groupe antibiogramme par diffusion en milieu gélosé.

3.1.4.4 Comparaison de méthodes

3.1.4.4.1 Entérobactéries

Nous avons comparé les résultats obtenus lors de la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémocultures positifs à ceux de la méthode de référence (suspensions de 0,5 McF réalisées à partir de cultures visibles à J+1 de la positivité des flacons). Trente antibiotiques différents ont été testés pour 25 souches d'entérobactéries dont 18 *E. coli*, 1 *P. mirabilis*, 1 *K. pneumoniae*, 1 *C. freundii*, 1 *P. vulgaris*, 1 *Pantoea* spp. 1 *Aeromonas* spp. et 1 *H.alvei*. Les résultats montrent 100% de concordances entre les deux méthodes pour la catégorisation de 25 molécules sur 30, $\geq 90\%$ de concordance pour les molécules suivantes : mécillinam (une VME, une ME), nétilmicine (une mE), pipéracilline (une mE), ticarcilline/acide clavulanique (une ME) et céfépime (une mE). Ces résultats ont été consignés dans un tableau en annexe. Par ailleurs, 4 germes étaient producteurs de bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE), et ce phénotype a pu être détecté à chaque fois par l'antibiogramme réalisé directement à partir du flacon d'hémoculture.

3.1.4.4.2 Staphylocoques

Pour les staphylocoques, seize antibiotiques différents (pénicilline G, céfoxitine, kanamycine, tobramycine, gentamicine, érythromycine, clindamycine, pristnamycine, norfloxacin, lévofloxacin, rifampicine, acide fusidique, cotrimoxazole, nitrofurantoïne, triméthoprime et linézolide) ont été testés pour 25 souches parmi lesquels 7 *S. aureus*, 9 *S. epidermidis*, 4 *S. haemolyticus*, 3 *S. hominis* et 2 *S. capitis*. Les résultats montrent 100% concordance des résultats entre les deux méthodes. Parmi les *S.aureus*, 2 étaient résistants à la méticilline et l'antibiogramme réalisé à partir du flacon a permis d'identifier ce phénotype à chaque fois.

3.1.4.4.3 Streptocoques

Pour les streptocoques, les essais ont été effectués sur 20 souches parmi lesquels 5 *E. faecalis*, 5 *S. mitis/oralis*, 5 *S. dysgalactiae*, 3 *S. pyogenes*, et 1 *S. gallolyticus* et 1 *S.lutetiensis*. Nous avons testé 12 antibiotiques (pénicilline G, érythromycine, clindamycine, pristnamycine, rifampicine, norfloxacin, lévofloxacin, vancomycine, teicoplanine, cotrimoxazole, tétracyclines, gentamicine) pour les espèces du genre *Streptococcus*

appartenant aux groupes A,B,C ou G de la classification de Lancefield, 11 pour les autres souches de l'espèce *Streptococcus* et 9 pour les entérocoques. Les résultats montrent 100% de concordance pour la catégorisation de 11 molécules sur 12. Seule l'érythromycine avait un taux de concordance de 95% (une mE).

3.1.4.4.4 Bacilles à Gram négatif non fermentaires

Pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires, douze antibiotiques différents ont été testés (lévofloxacine, ciprofloxacine, amikacine, tobramycine, gentamicine, méropénème, imipénème, aztréonam, céfépime, céftazidime, pipéracilline+tazobactam, pipéracilline, ticarcilline+clavulanate, ticarcilline) pour les 6 souches de *P. aeruginosa* recueillies à ce jour. Les résultats montrent 100% de concordance entre les résultats obtenus par les deux méthodes.

3.1.4.5 *Analyse des risques*

3.1.4.5.1 Etude bibliographique

Le risque le plus important concernant la réalisation de l'antibiogramme directement à partir des flacons d'hémoculture positifs est la mauvaise maîtrise de l'inoculum. L'étude menée par Noussair L. et Nicolas-Chanoine M-H. en 2007 a montré que les concentrations bactériennes dans les flacons d'hémoculture positifs étaient sensiblement identiques pour un type de germe donné (entérobactérie, pneumocoque ou staphylocoque) au moment de la détection de la positivité des flacons, car cette détection se fait à la moitié ou à la fin de la phase exponentielle de croissance bactérienne. Cette étude a par ailleurs montré que la concentration bactérienne ne variait pas de manière significative au delà du délai de positivité des flacons (42). Il s'agit de la seule étude publiée proposant un protocole pour la réalisation d'antibiogramme directement à partir de flacons d'hémocultures positifs par inoculation de milieu dilué sans prétraitement préalable. D'autres études ont proposé des protocoles reposant sur des prétraitements (centrifugations) permettant d'isoler les bactéries du milieu de culture. La plupart utilisaient des automates d'antibiogrammes en milieu liquide. Ces protocoles étaient trop éloignés du nôtre pour que nous puissions en tirer des enseignements quand à la maîtrise des inocula (43) (44).

3.1.4.5.2 Analyse des risques selon la méthode des 5M

Les risques associés à la méthode ont été analysés selon la méthode d'Ishikawa, dite « des 5 M » (Matériel, Méthode, Matière, Milieu, Main d'œuvre). Ces risques et les moyens de maîtrise associés ont été retranscrits dans un diagramme et dans un tableau, ci-après.

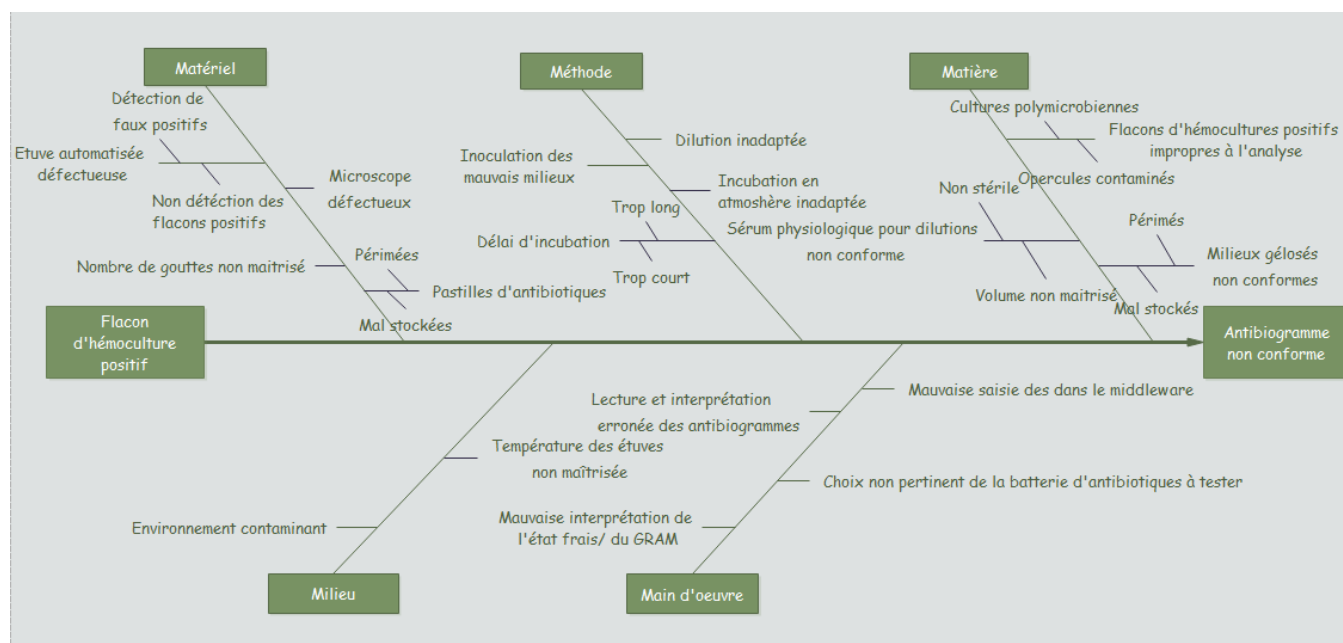


Figure 14 Diagramme d'Ishikawa représentant les facteurs susceptibles d'influencer le résultat.

Tableau 12 Maîtrise des risques.

Type	Points critiques	Risques	Eléments de maîtrise	Moyens de maîtrise
Matériel	Etuve automatisée	Non détection des flacons positifs	Température 35 +/- 1°C	Contrôle quotidien T° incubateurs
			Maintenances	Respect programme maintenance
			Suivi délai de détection	Procédure CIQ mensuel
	Microscope	Mauvaise lecture/interprétation de l'état frais ou du GRAM	Périodicité des maintenances	Fiche de vie microscope
			Maîtrise des équipements	CIQ quotidien avec souches de référence
	Dispositif de repiquage des flacons positifs	Nombre et volume des gouttes délivrées non maîtrisés, dilutions aléatoires, antibiogrammes erronés	Utilisation d'un dispositif compte-gouttes	BD Luer-Lok®, dispositif individuel prêt à l'emploi pour le repiquage de flacons positifs.
	Pastilles d'antibiotiques	Pastilles périmées ou altérées, résultats erronés	Respect des préconisations fournisseur pour le stockage	Suivi et cartographie des enceintes réfrigérées
			Suivi des dates de péremption	Logiciel de gestion de stocks SAPANET, dater les cartouches à ouverture (validité de 6 semaines à +4°C)

Type	Points critiques	Risques	Eléments de maîtrise	Moyens de maîtrise
Matériel	Géloses	Géloses périmées ou altérées, pas de croissance bactérienne, croissance bactérienne insuffisante	Respect des préconisations fournisseur pour le stockage	Suivi et cartographie des enceintes réfrigérées
			Suivi des dates de péremption	Logiciel de gestion de stocks SAPANET
	Etuves	Température ou atmosphère non maîtrisée. Pas de croissance bactérienne.	Atmosphères et températures contrôlées	Surveillance de l'atmosphère par sonde interne et souche témoin de croissance. Cartographie des étuves, suivi continu informatisé, sondes raccordées.
Méthode	Dilution des flacons positifs	Suspension de concentrations non adaptées à la réalisation de l'antibiogramme	Procédure de dilution pour reproduire un 0,5 McF	Etude expérimentale
	Milieux de culture et batteries d'antibiotiques adaptés	Inoculation de milieux de culture inadaptés, certaines sensibilités non rendues	Choix de milieu et des batteries d'ATB adaptés	Procédure analytique
			Personnel formé	Formation et habilitation du personnel
	Incubation en atmosphère adaptée	Pas de croissance bactérienne	Choix d'atmosphère adapté	Procédure analytique
			Personnel formé	Formation et habilitation du personnel
Délai d'incubation	Croissance bactérienne trop faible/trop importante	Incubation 18 à 24h	Procédure analytique Date d'ensemencement au dos des géloses	
Matière	Cultures mono-microbiennes	Antibiogramme erroné ou non fiable	Coloration de GRAM monomorphe	Formation et habilitation du personnel
			Asepsie lors de l'ouverture des flacons	Décontamination opercule avant ouverture
	Dilution dans sérum physiologique stérile	Antibiogrammes contaminés/erronés.	Utilisation de sérum physiologique stérile	Ampoules API NaCl 0,85 % (Biomérieux®)
	Repiquage sur milieux gélosés conformes	Utilisation de milieux périmés ou altérés/antibiogrammes erronés	Respect des préconisations fournisseur pour le stockage	Suivi et cartographie des enceintes réfrigérées
Suivi des dates de péremption			Logiciel de gestion de stocks SAPANET	
Milieu	Environnement non contaminant	Antibiogrammes contaminés/erronés.	Travail en conditions non contaminantes	Utilisation de postes de sécurité microbiologique
Main d'œuvre	Lecture et interprétation de l'état frais et de la coloration de Gram	Dilution inadaptée, ensemencement des mauvais milieux de culture, utilisation de la mauvaise batterie d'antibiotique et inoculation en atmosphère inadaptée	Personnel formé	Formation et habilitation du personnel
	Bonne lecture et interprétation des antibiogrammes	Rendu de résultats d'antibiogrammes erronés	Personnel formé	Formation et habilitation du personnel
	Saisie manuelle des résultats	Erreurs de saisie, rendu de résultats erronés	Double saisie (interne et biologiste) des antibiogrammes	Procédure de saisie des résultats

3.1.5 Essais de mise au point complémentaires

3.1.5.1 *Evaluation de l'impact du type de flacon et du temps passé à température ambiante sur les inocula obtenus à partir des échantillons positifs à pneumocoque.*

Tous les essais effectués sur des fioles anaérobies ont donné des inocula de 10^8 UFC/ml, indifféremment du fait que la fiole ait été conservée à température ambiante ou à 35°C dans une étuve. Les essais effectués sur fioles aérobies ont abouti à un inoculum inférieur à 10^4 UFC/ml pour les deux fioles lors du premier essai (à l'extraction de l'automate), un inoculum inférieur à 10^4 UFC/ml pour l'essai réalisé sur la fiole conservée en étuve à 35°C à 2h de l'extraction de l'automate, aucune subculture pour la fiole laissée à température ambiante à 2h de l'extraction ni pour les autres essais réalisés à 4, 6 et 8h de l'extraction des fioles, qu'elles aient été conservées à température ambiante ou à 35°C .

3.1.5.2 *Evaluation de l'influence de la nature de la gélose employée et de l'atmosphère d'incubation sur l'évaluation du niveau de résistance des entérocoques aux aminosides.*

Les diamètres obtenus lors de l'essai effectué sur un flacon positif avec la souche *E. faecalis* ATCC 29212 et visant à déterminer l'influence des facteurs « gélose » et « atmosphère d'incubation » sur la détection du niveau de résistance des entérocoques aux aminosides ont été consignés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 13 Influence du type de gélose et de l'atmosphère d'incubation sur les diamètres d'inhibition autour de la gentamicine pour la souche *E. faecalis* ATCC 29212.

Diamètres limites CA SFM pour la souche <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (mm)	Atmosphère	Gélose	Diamètres d'inhibition (mm)	Conclusion
12-18	Aérobiose	MH	14	Conforme
		MH+sang	21	Non conforme
	Aérobiose + 5% de CO ₂	MH	11	Non conforme
		MH+sang	22	Non conforme

Seul l'essai réalisé dans les conditions préconisées par le CASFM pour cette espèce (gélose MH en aérobiose) a donné un résultat conforme.

3.2 Evaluation du service rendu au CHU de Rouen

Le nombre de flacons d'hémocultures détectés positifs sur la période étudiée (41 jours) était de 640. Parmi ces flacons, 8 ont donné des levures en cultures pures. Parmi les 632 flacons positifs à bactéries, nous avons dénombré 273 flacons positifs avec des staphylocoques (dont 66 *S. aureus*), 231 avec des entérobactéries (dont 136 *E. coli*), 130 avec des streptocoques (dont 69 du genre *Enterococcus*, 53 *Streptococcus*, 7 *Granulicatella* et 1 *Gemella*) et 53 avec d'autres germes. Parmi ces flacons, 186 (29,5%) constituaient des diagnostics, 348 (55%) documentaient des bactériémies connues et 98 (15,5%) avaient été considérés comme contaminés. Parmi les flacons constituant des diagnostics, nous avons dénombré 55% (n=103) d'examen directs montrant des BGN, 24% (n=44) des cocci à Gram positif de type staphylocoque, 16% (n=30) des cocci à Gram positif de type diplocoque, 4% (n=8) une flore poly-microbienne et un des bacilles à Gram positif. Les espèces bactériennes isolées des flacons positifs constituant des diagnostics ont été classés par ordre de fréquence dans le tableau ci-après.

Tableau 14 Germes isolés des flacons d'hémocultures positifs constituant des diagnostics classés par ordre de fréquence.

Germes	N	BMR	Germes	N	BMR
<i>Escherichia coli</i>	61	6 ^a	<i>Citrobacter sp.</i>	3	
Staphylocoques à coagulase négative	26		<i>Achromobacter sp.</i>	2	
Entérobactéries du groupe KES	21	2 ^a	<i>Granulicatella adiacens</i>	2	
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	2 ^b	<i>Haemophilus influenzae</i>	2	
<i>Enterococcus faecalis</i>	15		<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11		<i>Campylobacter fetus</i>	1	
<i>Bacteroides sp.</i>	6		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	
<i>Streptococcus bovis</i>	6		<i>Enterococcus faecium</i>	1	
<i>Proteus mirabilis</i>	5		<i>Proteus vulgaris</i>	1	
Streptocoques oraux	5		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	
Autres germes anaérobies	5		<i>Salmonella Typhimurium</i>	1	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4		<i>Salmonella Paratyphi A</i>	1	
<i>Aerococcus sp.</i>	3		<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	
<i>Morganella morganii</i>	3		<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3		<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	

^a Entérobactéries sécrétrices de Bêta-Lactamases à Spectre Etendu (BLSE) ; ^b *S.aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Les flacons constituant des diagnostics étaient pour 85% (n=158) des cultures mono-microbiennes et pour 15% (n=28) des cultures poly-microbiennes (dont 3 flacons pour lesquels le deuxième germe était un contaminant). Les données de l'antibiogramme de 5.4%

(n=10) des flacons constituant de diagnostics mettaient en évidence des germes multi-résistants parmi lesquels 8 entérobactéries (6 *E. coli* et 2 *K. pneumoniae*) sécrétrices de BLSE et 2 *S.aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Les informations relatives aux traitements probabilistes étaient disponibles pour 95% (n=176) des flacons positifs classés comme diagnostics. Une proportion de 29,5% (n=52) de ces patients n'avaient pas reçu de traitement au moment de la communication de l'examen direct, et 20% (n=35) n'en recevaient toujours pas avant le rendu de l'antibiogramme malgré la communication de l'examen direct. Parmi les patients qui bénéficiaient d'un traitement probabiliste (n=141), 39% (n=55) se voyaient administrer une céphalosporine de troisième génération (C3G), au premier rang desquelles la ceftriaxone, qui représentait 80% des prescriptions de C3G (n=44). Une proportion de 24,8% des patients traités (n=35) recevaient l'association pipéracilline/tazobactam et 19,1% (n=27) de la vancomycine. Des aminosides étaient prescrits dans 27% (n=38) des traitements probabilistes.

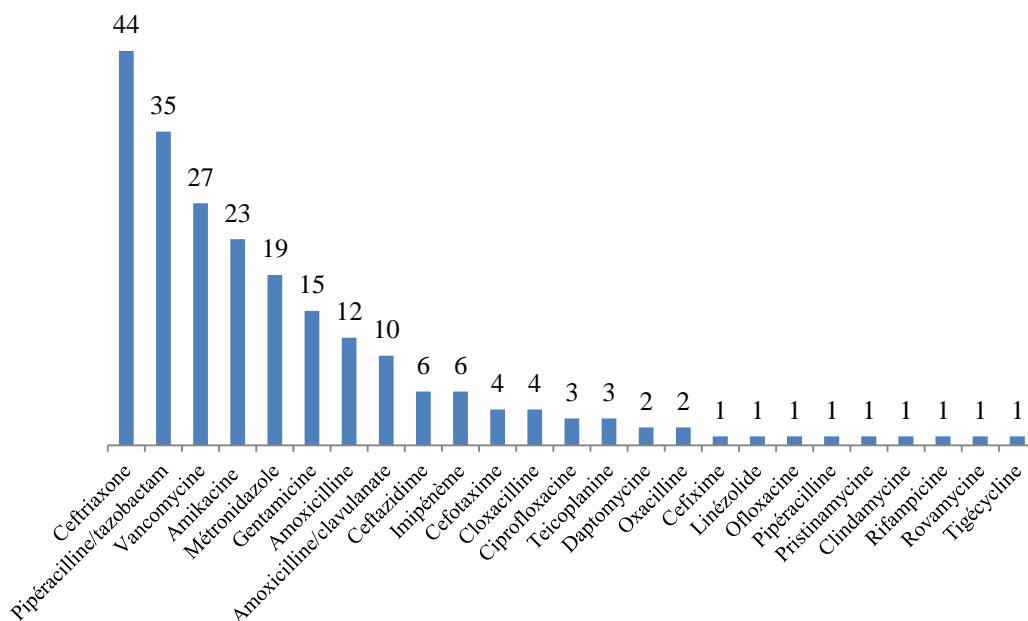


Figure 15 Molécules employées en probabiliste par ordre de fréquence.

Une proportion de 47,5% des patients traités (n=67) recevait une association d'antibiotiques, parmi lesquels 79% (n=53) recevaient une bithérapie et 21% (n=14) plus de deux molécules.

Le traitement probabiliste administré s'avérait inefficace (germe non sensible aux molécules administrées selon les données de l'antibiogramme) dans 17,7% des cas (n=25). Il s'agissait :

- De l'administration d'une C3G pour des bactériémies avec des entérobactéries résistantes (n=5, 3 céphalosporinases déréprimées et 2 BLSE), des entérocoques (n=4), des *P. aeruginosa* (n=2), une *Egghertella lenta* (n=1).
- De l'emploi de bêta-lactamines pour des bactériémies à staphylocoques résistants à la méticilline (n=3).
- De l'utilisation de l'association amoxicilline/clavulanate pour des infections à entérobactéries résistantes (n=2, un *E. coli* BLSE et une *M.morganii*) et à streptocoques oraux de sensibilité diminuée aux bêta-lactamines (n=1).
- De l'administration de l'association pipéracilline/tazobactam pour des entérobactéries résistantes (n=5, 3 céphalosporinases déréprimées, une BLSE et une oxacillinase).
- De l'utilisation de l'imipénème pour une bactériémie avec une souche de *E. faecium* résistante aux bêta-lactamines (n=1).
- De l'emploi de la daptomycine pour le traitement d'une bactériémie avec une souche de *S. epidermidis* résistant à cet antibiotique (n=1).

Parmi les traitements jugés efficaces selon les données de l'antibiogramme (n=116), 72,4% (n=84) pouvaient être réévalués vers des molécules à spectre plus étroit.

Les flacons détectés positifs entre midi et minuit étaient au nombre de 351, dont 4 ont donné des levures en cultures pures. Les flacons positifs à bactéries (n=347) sur cette période représentaient 54,9% de ceux relevés durant la période de l'étude. Parmi ceux-ci, 28,8% (n=100) ont été considérés comme des diagnostics, 58,8% (n=204) des flacons correspondaient à des bactériémies connues et 12,4% (n=43) des flacons considérés comme contaminés. Les informations relatives aux traitements probabilistes étaient disponibles pour 92% (n=92) des flacons constituant des diagnostics. Parmi ces patients, 28,3% (n=26) ne recevaient aucun traitement probabiliste au moment de la communication de l'ED, et 18,5% (n=17) ne recevaient toujours aucun traitement après. Parmi les 81,5% de patients qui recevaient un traitement probabiliste (n=75), 17,3% (n=13) se voyaient administrer un traitement auquel le germe impliqué n'était pas sensible selon les données de l'antibiogramme, 75,8% (n=47) des traitements efficaces (n=62) pouvaient être réévalués vers des molécules à spectres plus étroits avec les données de l'antibiogramme. Les données de l'antibiogramme mettaient en évidence un phénotype de BMR pour 4% (n=4) des flacons

détectés positifs considérés comme des diagnostics durant cet intervalle (4 *E. coli* sécréteurs de BLSE).

Les bénéfices attendus quand à la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture détectés positifs entre midi et minuit ont été résumés dans le diagramme ci-après.

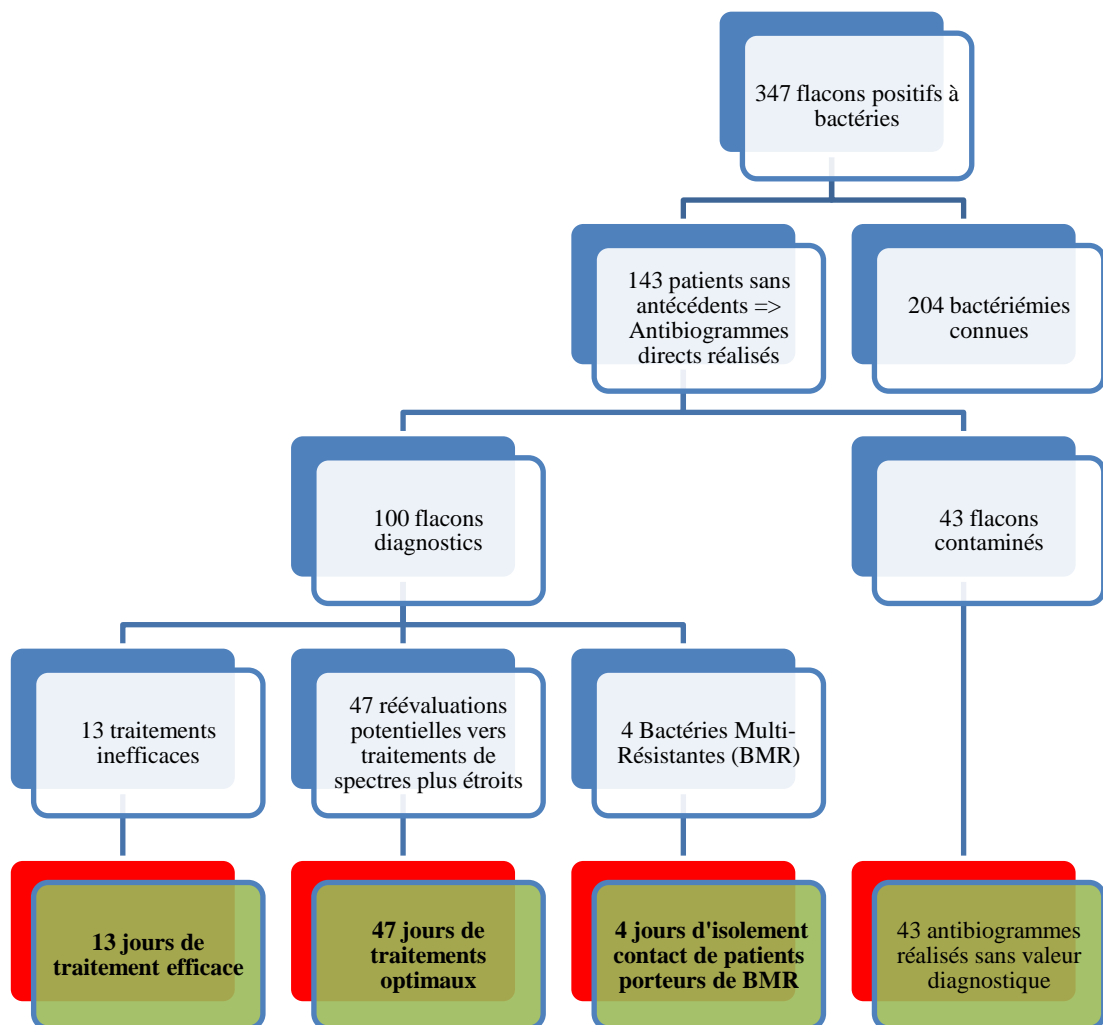


Figure 16 Bénéfices attendus de la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture détectés positifs entre midi et minuit sur une période de 41 jours au CHU de Rouen.

4 Discussion

Nous souhaitons réduire de 24 heures le délai de rendu de l'antibiogramme grâce à la mise au point d'une méthode permettant sa réalisation directement à partir du flacon d'hémoculture positif. L'étude bibliographique réalisée pour l'analyse des risques liés à cette pratique a montré que la majorité des études portant sur la réalisation des antibiogrammes directement à partir des flacons d'hémoculture positifs avaient opté pour un protocole reposant sur la séparation des bactéries du milieu de culture par centrifugation (2000g pendant 10 minutes) afin de réaliser des suspensions de 0,5 McF permettant la réalisation d'antibiogrammes en milieu liquide par des automates Vitek2® bioMérieux (43)(44) ou Phoenix® Beckton Dickinson (45). Ce prétraitement et les culots bactériens obtenus semblent être une alternative intéressante à la subculture de 4h pour le raccourcissement du délai de mise à disposition de l'identification bactérienne grâce à la spectrométrie de masse (MALDI TOF). En ce qui concerne la détection de la résistance bactérienne aux antibiotiques, nous avons opté pour la réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé directement à partir de dilutions de gouttes des flacons d'hémoculture positifs dans du sérum physiologique. Cette approche présente plusieurs avantages. D'abord, elle est plus aisée à mettre en œuvre et nécessite moins de manipulations, qui sont autant de risques de contamination des échantillons et de source d'accident pour le personnel technique (notamment d'exposition aux virus). Ensuite, cela permet dans le cas de cultures poly-microbiennes, d'évaluer le profil de sensibilité global de différents germes sur un même antibiogramme ou bien encore du germe d'intérêt en présence d'une souillure. Ceci constitue un avantage par rapport à la méthode en milieu liquide, pour laquelle il est nécessaire d'invalider l'antibiogramme en cas de subcultures poly-microbiennes, car il est impossible de savoir quel germe a cultivé dans tel ou tel puits des cartes incubées dans les automates d'antibiogramme en milieu liquide. Cette approche présente aussi un avantage par rapport aux méthodes conventionnelles, car elle doit permettre de détecter différentes sous-populations d'une même espèce. Les méthodes conventionnelles de l'antibiogramme en milieu gélosé reposent sur la réalisation d'une suspension de 0,5 McF à partir de subcultures des flacons positifs en milieu solide, ce qui nécessite généralement l'emploi d'une à deux colonies seulement, et donc un risque de ne pas étudier une sous-population présente initialement dans le milieu de culture et qui aurait un profil de résistance différent.

L'analyse des risques par la méthode des 5M a permis de mettre en évidence que la plupart des risques et éléments de maîtrise associés à cette méthode étaient ceux inhérents à la gestion

des flacons d'hémoculture positifs et à la réalisation d'antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé. Le risque majeur lié à cette méthode est l'utilisation d'un inoculum bactérien inapproprié à la réalisation de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé. Ce risque découle de l'impossibilité d'utiliser un densitomètre pour déterminer la densité bactérienne des dilutions, comme dans la méthode de référence décrite par le CASFM/EUCAST, du fait d'hématies et d'autres éléments en suspension. La première étape du travail a donc été d'identifier des conditions de dilution des flacons positifs permettant de reproduire de manière fiable et reproductible la densité bactérienne d'une suspension de 0,5 McF. Pour cela, nous avons vérifié la densité bactérienne de suspensions de 0,5 McF pour les différentes familles de germes. Nous avons obtenu des densités de 10^8 UFC/ml pour les entérobactéries, les staphylocoques, les streptocoques et 10^7 UFC/ml pour les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Nous avons ensuite construit un abaque de géloses ensemencées avec 10 μ l de suspensions bactériennes de densité connues, dans le but de contrôler l'inoculum bactérien obtenu lors de la dilution de flacons d'hémoculture positifs. Des essais de dilutions effectués sur les flacons d'hémoculture nous ont permis de définir les dilutions permettant d'obtenir le plus fréquemment des suspensions de densités bactériennes compatibles avec la réalisation d'antibiogrammes. Elles étaient de 5 gouttes dans 2 ml de sérum physiologique pour les entérobactéries, les staphylocoques et les bacilles à Gram négatif non fermentaires, et 15 gouttes dans 2 ml pour les streptocoques autres que *S. pneumoniae*. Il n'a pas été mis en évidence d'influence des facteurs : délai de positivité, type de flacon, richesse de l'examen direct et indice de fluorescence à la détection de la positivité par l'automate sur les inocula obtenus. Ceci est en accord avec les résultats de l'étude de Noussair L. et Nicolas-Chanoine M-H, dans laquelle les concentrations bactériennes au sein des flacons détectés positifs étaient toujours sensiblement les mêmes, quelle que soit l'espèce bactérienne et le temps passé par le flacon dans l'automate au-delà de la détection de sa positivité (42). Nos essais de dilution n'ont toutefois permis d'obtenir des inocula satisfaisants que pour 67% des staphylocoques, 71% des entérobactéries, 44% des BGN non fermentaires et 74% des streptocoques testés. Ceci rend nécessaire un ensemencement de 10 μ l des suspensions en parallèle de chaque antibiogramme obtenu selon cette méthode, afin que les antibiogrammes puissent être validés si la densité bactérienne évaluée visuellement grâce à l'abaque correspond à celle d'une suspension de 0.5 McF. A contrario, les densités bactériennes relevées lors des essais de comparaison de méthode étaient parfois différentes de celles exigées sans que cela ne se traduise par des diamètres d'inhibition différents de ceux relevés avec la méthode conventionnelle. Ceci laisse à penser que la méthode de l'antibiogramme par diffusion en

milieu gélosé est suffisamment robuste pour ne pas conduire à des résultats discordants lorsque la densité bactérienne des suspensions diffère de celle attendue de plus ou moins un log 10.

Les essais infructueux effectués sur les fioles positives à pneumocoque laissent à penser que ce germe est plus sensible que les autres aux conditions environnementales, notamment au type de flacon ou au temps passé à température ambiante après détection de la positivité. L'expérience que nous avons réalisée confirme l'hypothèse d'une lyse plus rapide de ce germe au sein des flacons aérobies, alors que le temps passé par les flacons à température ambiante après détection de positivité ne semble pas avoir d'impact sur la richesse des subcultures pour la souche *S. pneumoniae* ATCC 49619. La portée de ce résultat est toutefois limitée à cette souche, néanmoins des difficultés à subcultiver des pneumocoques issus de flacons d'hémoculture positifs de type « anaérobie » ont aussi été observées lors des essais de dilution. Cela indique que le facteur « type de flacon » n'est pas le seul incriminé dans la lyse rapide de ce germe. En l'absence de moyen d'identification rapide du pneumocoque dans les fioles positives, il existe un risque d'échec de l'antibiogramme. Ceci constitue une limite de notre méthode.

Concernant les diamètres d'inhibition des antibiotiques pour les souches de référence, les résultats obtenus lors des essais de répétabilité sont satisfaisants avec des CV compris entre 1,2 et 5,4% et des écarts types de l'ordre du millimètre pour les couples germes/antibiotiques testés. Nous observons seulement deux discordances avec les valeurs cibles données par le CA-SFM. Elles concernaient :

- Le couple aztréonam/*P. aeruginosa* ATCC 27853, pour lequel nous trouvons un diamètre moyen de 30 mm, et un intervalle [moyenne +/- un écart type] de [29,1-30,9 mm]. Ces valeurs sont supérieures à celles fournies par le CA-SFM pour cette souche (diamètre cible=26 mm, diamètres limites [23-29 mm]). Les diamètres critiques de catégorisation donnés par la CA-SFM pour cette espèce vis-à-vis de l'aztréonam ont des valeurs extrêmes [16 mm (R)-51 mm (S)], ainsi les souches isolées en pratique quotidienne sont dans la très grande majorité des cas catégorisées I. De ce fait, cette surestimation de sensibilité obtenue pour la souche *P. aeruginosa* ATCC ne saurait porter à conséquence quant à l'interprétation de l'antibiogramme de souches cliniques.

- Nous trouvons pour le couple gentamicine/*E. faecalis* ATCC 29212 un diamètre d'inhibition moyen de 22 mm et un intervalle [moyenne +/- un écart type] de [21-23mm]. Ces valeurs diffèrent également de celles fournies par le CA-SFM pour cette souche (diamètre cible=15 mm, diamètres limites [12 mm-18 mm]). Nous supposons que cette discordance était liée au fait que les essais ont été faits sur gélose MH+sang en présence de 5% de CO₂ alors que le CA-SFM préconise la réalisation de l'antibiogramme sur gélose MH en aérobiose pour les germes de ce genre. Ces conditions avaient été choisies afin que tous les flacons d'hémoculture positifs avec des diplocoques, en l'absence d'identification, puissent faire l'objet d'un antibiogramme dans des conditions similaires. Hormis pour la gentamicine, la réalisation de l'antibiogramme de la souche *E. faecalis* ATCC 29212 sur gélose MH+sang en présence de 5% de CO₂ a donné des résultats conformes à ceux attendus pour toutes les molécules testées. L'essai que nous avons réalisé concernant l'impact du type de gélose et de l'atmosphère d'incubation sur les diamètres d'inhibition de la croissance de *E. faecalis* ATCC 29212 autour du disque de gentamicine a montré que seules les conditions préconisées par le CA-SFM/EUCAST aboutissaient à un diamètre conforme à celui attendu pour ce couple souche/antibiotique. Nous proposons donc que l'antibiogramme des souches d'entérocoque isolées de flacons d'hémocultures positifs puisse être réalisé sur gélose MH+sang en atmosphère aérobie à 5% de CO₂, excepté pour la détermination du niveau de résistance à la gentamicine qui doit être faite dans les conditions préconisées, c'est-à-dire sur gélose MH en aérobiose.

Au vu de ces résultats, la méthode est validée pour la répétabilité, et nous proposons que chaque flacon positif dont l'examen direct évoquera un diplocoque fasse l'objet d'un antibiogramme sur gélose MH+sang incubé en atmosphère aérobie à 5% de CO₂ et d'une gélose MH avec une pastille de gentamicine 30 µg incubée en aérobiose qui servira à déterminer le niveau de résistance à la gentamicine si la souche isolée s'avère être un entérocoque.

Les résultats obtenus lors de l'essai de variabilité inter-opérateur évaluant la fidélité intermédiaire sont satisfaisants avec des CV de reproductibilité compris entre 2,7 et 7% et des écarts types de l'ordre du millimètre pour les couples germe/antibiotiques testés. Nous observons une discordance avec les valeurs cibles données par le CA-SFM concernant le

couple *S. aureus* ATCC 29213/acide fusidique. Nous trouvons un diamètre d'inhibition moyen de $35 \pm 2,3$ mm (cible=29 mm, limites [26-32mm]). Nous mettons cette discordance sur le compte d'un biais de lecture. En effet, le diamètre d'inhibition autour de l'acide fusidique est particulièrement difficile à mesurer du fait de sa grande taille, de sa limite généralement floue et de la localisation de la pastille en bordure de notre boîte.

Au vu de ces résultats, la reproductibilité de la méthode est vérifiée par cet essai, mais une attention particulière devra être portée sur la lecture du diamètre d'inhibition de l'acide fusidique. Nous proposons par ailleurs que les souches catégorisées S avec un diamètre proche du diamètre critique unique de 24 mm soient contrôlées par la méthode de référence. Nous avons choisi de n'évaluer la variabilité inter-opérateur pour l'antibiogramme direct que pour une seule des souches de référence. Ce choix a été fait parce que le programme de contrôle interne de qualité hebdomadaire de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé ne montre de variabilité inter-opérateur notable pour aucun des couples souche/antibiotique testés au sein du laboratoire. Il s'agissait donc essentiellement de vérifier la reproductibilité d'un inoculum bactérien compatible avec l'antibiogramme, et cela pouvait être évalué en ne testant qu'une seule souche.

Le seul résultat d'EEQ récolté jusqu'alors va dans le sens de l'exactitude de la méthode pour les deux souches isolées dans cet essai (un *S. aureus* et un *P. aeruginosa*, tous deux de phénotype sauvage). Ce résultat devra être complété d'autres essais au fil des programmes d'EEQ afin de prouver l'exactitude de la méthode et son maintien dans le temps.

Les essais de comparaison des méthodes antibiogramme direct/antibiogramme à partir de colonies montrent une corrélation de 100% pour l'ensemble des couples germe/antibiotique testés en ce qui concerne les staphylocoques et les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Les résultats sont satisfaisants pour les entérobactéries et les streptocoques, avec des taux de corrélation supérieurs au seuil fixé de 80% pour tous les couples germe/antibiotique. Nous mettons toutefois en évidence des discordances pour certaines molécules.

Concernant les entérobactéries :

- Il s'agit pour le mécillinam d'une erreur très majeure (souche R répondue S) et d'une erreur majeure (souche S répondue R) chez deux souches de *E. coli*. Ces discordances peuvent s'expliquer par le petit diamètre critique unique de cette molécule (15 mm). L'écart type observé lors des essais de répétabilité pour le couple mecillinam/*E. coli*

ATCC 25922 étant proche du millimètre (0,8 mm), ceci explique que la catégorisation puisse être erronée lorsque le diamètre d'inhibition est proche du diamètre critique. Cette molécule n'étant recommandée que dans le traitement des cystites, elle ne saurait être employée dans le traitement de bactériémies néanmoins et pourrait ne pas être répondue.

- Pour la pipéracilline, une erreur mineure a été observée (souche I répondue S) concernant une souche de *P. mirabilis* productrice de pénicillinase. Cette discordance pourrait s'expliquer par un niveau d'expression moindre de ce mécanisme de résistance, qui serait lié aux conditions de culture (milieu liquide versus colonie) ou bien à l'utilisation de colonies issues de clones exprimant une quantité plus importante de cette enzyme. Dans tous les cas cette erreur aurait été rectifiée par l'interprétation phénotypique, et n'aurait donc pas porté à conséquence.
- Concernant la nétilmicine, une erreur mineure a été relevée (souche I répondue S). Il s'agissait d'une souche de *E. coli* résistante par ailleurs à la gentamicine et à la tobramycine (sensible à l'amikacine). Là encore cette erreur peut être liée à un niveau d'expression différent du mécanisme de résistance. Cette erreur n'est probablement pas due à un inoculum inadapté étant donné l'absence d'effet inoculum pour cette famille d'antibiotiques. Cette discordance aurait pu conduire à une interprétation erronée, mais aurait pu être corrigée ou vérifiée en sachant que le phénotype de résistance ANT(2'')-I, qui confère une résistance à la gentamicine, à la nétilmicine et à la kanamycine est plus fréquemment rencontré chez les entérobactéries que le phénotype AAC(3)-IV, qui touche la gentamicine mais épargne la nétilmicine (46).
- Concernant l'association ticarcilline-acide clavulanique, une erreur majeure a été relevée (souche S répondue R). Il s'agissait d'une souche de *E. coli* productrice de pénicillinase qui présentait un diamètre de 21 mm pour la méthode évaluée versus 23 mm pour la méthode de référence. Cette souche présentait par ailleurs un grand diamètre et une sensibilité sans ambiguïté à l'association amoxicilline-acide clavulanique. En pratique courante, nous constatons régulièrement des profils de sensibilité discordants entre ces deux molécules, ce qui suggère que le diamètre critique de sensibilité à l'association ticarcilline-acide clavulanique est peut-être inadapté. Ce type d'erreur pourrait être évité en contrôlant la sensibilité à l'association ticarcilline-acide clavulanique lorsque l'amoxicilline-acide clavulanique apparaît sensible

- La discordance observée pour le céfépime (erreur mineure, souche S répondue I) concernait une souche de *E. coli* qui exprimait sa céphalosporinase à bas niveau et dont le diamètre d'inhibition mesuré autour de cette molécule correspondait au diamètre critique de sensibilité (24 mm). Le diamètre d'inhibition mesuré lorsque l'antibiogramme avait été réalisé directement à partir du flacon positif était de 23 mm. Un tel résultat aurait en pratique conduit à un contrôle car le phénotype « céphalosporinase » épargne cette molécule. Ce type d'erreur pourrait être lié à l'incertitude de mesure inhérente au pied à coulisse, même si nous constatons lors des essais de répétabilité un écart type de 0,4 mm. Ceci met en lumière l'importance de l'identification et de l'interprétation du phénotype de résistance par le biologiste.

Concernant les streptocoques, nous avons mis en évidence une erreur mineure qui concernait la détermination de la sensibilité à l'érythromycine d'une souche de *E. faecalis* (souche R répondue I). Le diamètre d'inhibition relevé sur l'antibiogramme réalisé selon la méthode de référence correspondait au diamètre critique de résistance (18mm), alors que le diamètre relevé sur l'antibiogramme réalisé directement à partir du flacon était de 19 mm. Là encore il s'agit d'une erreur de ± 1 mm probablement liée à une incertitude de mesure.

Au total, ces essais montrent une corrélation satisfaisante des antibiogrammes obtenus directement à partir des flacons d'hémoculture avec la méthode de référence. Hormis les erreurs inévitables liées aux incertitudes de mesures, les discordances observées concernaient soit des antibiotiques non utilisés dans le contexte bactériémie, soit des molécules pour lesquelles la reconnaissance du phénotype par le biologiste aurait permis le déclenchement d'un contrôle. Une vigilance particulière devra être apportée quant à la détection de la résistance aux aminosides des entérobactéries. Par ailleurs, le nombre de souches fixé pour les essais de comparaison de méthodes n'a pas été atteint en ce qui concerne les bacilles à Gram négatif non fermentaires (6 souches récoltées sur les 10 attendues par centre). Cette étude devra donc être complétée avant de tirer des conclusions définitives pour ce type de germes.

Une autre partie de notre travail concernait l'évaluation du bénéfice potentiel conféré par le rendu de l'antibiogramme 24 heures plus tôt avec cette méthode sur la prise en charge thérapeutique des patients bactériémiques. Pour cela, nous avons étudié de manière rétrospective les flacons d'hémoculture détectés positifs durant 41 jours, entre le 21/07/2016 et le 31/08/2016. Si nous retrouvons une prédominance de *E. coli*, présent dans une proportion concordante avec les données françaises récentes (33%), nous observons toutefois

une proportion de flacons positifs à staphylocoques à coagulase négative (14%) plus importante que dans l'étude SPA-BACT 2014 (10%) (18) ou bien dans celle d'Alfandari *et al.* (7,7%) (19). Cette différence peut s'expliquer par le fait que ces études multicentriques étaient menées dans différents types d'hôpitaux, notamment certains non pourvus de services de réanimations et de soins intensifs. Les études épidémiologiques concernant des patients de réanimation rapportent des proportions d'infections à staphylocoques à coagulase négative nettement supérieures : l'étude de Diego Delle Rose *et al.* qui portait sur une cohorte de patients de réanimation, rapporte 376 bactériémies parmi lesquelles 137 étaient dues à des staphylocoques à coagulase négative, soit un ratio de 36,4% (22).

Nous avons relevé 98 flacons considérés comme contaminés sur la période étudiée, pour la très grande majorité (n=92, 94%) avec des staphylocoques à coagulase négative. Le laboratoire ayant reçu 6789 flacons sur la période, ceci représente un taux de contamination de 1,44% des flacons prélevés. Ce chiffre se situe dans la fourchette basse de ceux rapportés dans la littérature, notamment dans la revue de Garcia *et al.* (47).

Les traitements probabilistes relevés dans notre étude faisaient le plus souvent appel à une C3G, principalement de la ceftriaxone. Ceci paraît adapté du fait de la prédominance des bactériémies à BGN. Toutefois, l'emploi en premier lieu de cette molécule va à l'encontre des recommandations de l'ANSM, qui préconisent parmi cette classe l'utilisation préférentielle du céfotaxime en raison d'un effet moins marqué sur la flore digestive (48). La proportion de patients recevant des associations d'antibiotiques à visée synergique incluant des aminosides était de 27%. Les autres associations de molécules (n=29, 20,6%) avaient pour objectif l'élargissement du spectre antibactérien, et parmi ces associations environ la moitié (n=14, 48,3%) comportaient de plus de deux molécules. Ces chiffres auraient été à mettre en regard de la gravité des tableaux cliniques, que nous n'avons pas relevée dans cette étude ne s'appuyant que sur des critères microbiologiques.

La proportion globale de germes multi-résistants relevée est moins élevée que dans l'étude d'Alfandari *et al.* (5,4% vs 8,7%). La proportion de SARM relevée relativement à l'ensemble des *S. aureus* isolés de flacons constituant des diagnostics (n=2, 10,5%) est inférieure à celle retrouvée dans l'étude précitée (18.9%), mais il s'agit d'une étude sur 1 mois, et en 2015 la proportion de SARM dans les bactériémies était de 21% au CHU de Rouen. Parmi les 97 entérobactéries isolées de flacons constituant des diagnostics, 6 étaient productrices de BLSE, soit une proportion de 6,2%. Ces chiffres corroborent ceux retrouvés dans l'étude d'Alfandari

et al., qui retrouvait 17 entérobactéries présentant ce mécanisme de résistance parmi les 265 souches d'entérobactéries responsables de cas de bactériémies, soit une proportion de 6.4% (19).

Nous avons confronté les résultats des antibiogrammes aux traitements probabilistes reçus par les patients au moment du rendu de l'antibiogramme. Parmi les 25 patients pour lesquels le traitement probabiliste était inadapté, nous constatons qu'il était possible de corriger le traitement :

- Au regard de l'identification bactérienne pour 8 patients (4 présentant des hémocultures à diplocoques qui se sont avérés être des entérocoques traités par C3G, 1 *E. faecium* traité par imipénème, 1 *P. aeruginosa* traité par céfixime, 1 *P. aeruginosa* traité par ceftriaxone et 1 *Egghertella lenta* traitée par C3G).
- Au regard des données de l'antibiogramme pour 17 patients (2 patients avec des hémocultures à entérobactéries qui se sont avérés résistants l'association amoxicilline/clavulanate traités par cette association, 5 entérobactéries avec des résistances acquises aux C3G, 5 entérobactéries avec des résistances acquises à l'association pipéracilline/tazobactam, 3 staphylocoques méti-R traités par bêta-lactamines, 1 staphylocoque résistant à la daptomycine et 1 streptocoque SDBL traité par amoxicilline/clavulanate).

Ceci souligne l'importance de disposer des données de l'antibiogramme le plus rapidement possible pour réévaluer un traitement probabiliste inefficace.

La proportion de patients dont le traitement pouvait être réévalué vers des molécules à spectre plus étroit au vu des données de l'antibiogramme est importante (72,4%). Ce chiffre est toutefois à considérer avec prudence étant donné que seules les données de l'antibiogramme ont été prises en compte pour évaluer la possibilité d'une réévaluation, et que certaines situations cliniques imposent le maintien d'une antibiothérapie probabiliste (traitement d'autres infections concomitantes, paramètres pharmacocinétiques/ pharmacodynamiques etc.).

L'obtention d'un antibiogramme plus précocement n'offre un bénéfice pour la prise en charge des patients que si l'information transmise peut permettre un changement d'attitude thérapeutique. En faisant l'hypothèse que les traitements ne sont pas réévalués après 17 heures dans la plupart des services cliniques, il serait nécessaire que les antibiogrammes

soient lus et interprétés par un biologiste jusqu'à 16 heures. Le délai d'incubation minimum des antibiogrammes en milieu gélosé préconisé par le CA-SFM étant de 16 heures, cela autorise la réalisation d'antibiogrammes directs jusqu'à minuit. Par ailleurs, les flacons détectés positifs avant midi au CHU de Rouen font l'objet d'une culture rapide permettant la réalisation de l'antibiogramme par la méthode conventionnelle dès l'après midi. Nous en déduisons qu'il est intéressant de faire des antibiogrammes directs pour les flacons détectés positifs entre midi et minuit, afin de disposer d'un résultat 24h plus tôt. Dans cette étude, nous observons sur cette plage horaire une répartition entre les flacons considérés comme diagnostics, ceux correspondant à des bactériémies connues et ceux contaminés équivalente à celle observée pour les flacons ouverts avant midi. En considérant que tous les flacons de patients sans antécédent de bactériémie auraient pu faire l'objet d'un antibiogramme direct, nous estimons que la mise en œuvre de cette méthode sur la période étudiée aurait conduit à la réalisation de 143 antibiogrammes, qui auraient pu servir à :

- Réévaluer un traitement inefficace 24 heures plus tôt pour 9% d'entre eux (n=13). Il s'agissait de flacons de 9 patient ayant des bactériémies à entérobactéries résistantes aux molécules administrées (5 aux C3G, 2 à l'amoxicilline/clavulanate et 2 à la pipéracilline/tazobactam), 2 patients traités par C3G infectés par des entérocoques, 1 patient traité par daptomycine infecté par une souche de *S. epidermidis* résistante à cette molécule et 1 patient traité par amoxicilline-acide clavulanique infecté par un streptocoque SDBL,.
- Réévaluer des traitements probabilistes efficaces pour des molécules à spectre plus étroit 24 heures plus tôt pour 33% d'entre eux (n=47). Une proportion de 47% des patients concernés (n=22) recevait des associations d'antibiotiques, dont 5 comprenant plus de deux molécules. Ils étaient traités par des C3G pour 49% d'entre eux (n=23), l'association pipéracilline/tazobactam pour 21% (n=10), 19% (n=9) recevaient des glycopeptides, 13% (n=6) l'association amoxicilline/acide clavulanique et 4% (n=2) des fluoroquinolones.
- Mettre en place des mesures d'isolement contact 24 heures plus tôt pour 4 patients infectés par des BMR (4 *E. coli* BLSE).

Le service rendu par la mise en œuvre de cette méthode d'antibiogramme direct paraît donc intéressant. Elle demande toutefois un effort important de la part du laboratoire en termes de ressources humaines et d'organisation technique. Cela nécessite par ailleurs que les

résultats obtenus fassent l'objet d'une communication téléphonique aux cliniciens, afin de s'assurer que la mise à disposition des données de l'antibiogramme à des horaires variés puisse permettre la mise en route ou la réévaluation des traitements antibiotiques. Enfin, il serait intéressant d'associer à ce travail une étude médico-économique pour évaluer l'impact en termes de coût, mais aussi de médicaments prescrits, de diminution de morbidité et de mortalité.

5 Conclusion

Nous avons mis au point une méthode permettant la réalisation des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé directement à partir des flacons d'hémoculture positifs. La diversité des germes en cause dans les bactériémies et la multiplicité des facteurs susceptibles d'influencer in fine les résultats, tout particulièrement le caractère vivant de « l'analyte », ont nécessité de nombreux essais.

Le mode opératoire pour lequel nous avons opté consiste à diluer, dans un volume défini de sérum physiologique, un nombre de gouttes de milieu de culture qui est fonction de la morphologie bactérienne observée à l'examen direct après coloration de Gram. Ce mode opératoire demande peu de manipulations, et se distingue de ceux retrouvés dans la littérature par la relative simplicité de sa mise en œuvre. La principale difficulté est de maîtriser l'inoculum bactérienensemencé, aussi il est nécessaire de le contrôler grâce à l'abaque que nous avons construit.

Nous sommes parvenus à définir des conditions de dilution permettant d'aboutir à des inocula compatibles avec l'antibiogramme pour les principales familles de germes responsables de bactériémies, exception faite du pneumocoque.

Au regard des résultats relevés lors des différents essais effectués, les critères évalués pour cette méthode validée en portée B montrent des performances acceptables. En particulier, les résultats de la comparaison avec la méthode de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé réalisé à partir de colonies montrent une bonne concordance.

La mise en œuvre d'une telle méthode au CHU de Rouen permettrait de réduire de 24 heures le délai de rendu de l'antibiogramme pour les flacons détectés positifs entre midi et minuit. L'étude rétrospective des dossiers de patients bactériémiques sur une période de 41 jours montre de potentiels bénéfiques conférés par la mise en production de cette méthode, et notamment sur la prise en charge thérapeutique des patients, ce qui souligne l'intérêt d'une mise en route rapide.

6 Bibliographie

1. Renaud B, Brun-Buisson C, ICU-Bacteremia Study Group. Outcomes of primary and catheter-related bacteremia. A cohort and case-control study in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jun;163(7):1584–90.
2. Bearman GML, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res*. 2005 Dec;36(6):646–59.
3. Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med*. 1998 Nov;244(5):379–86.
4. Davey PG, Marwick C. Appropriate vs. inappropriate antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Apr;14 Suppl 3:15–21.
5. CA-SFM / EUCAST. Recommandations 2015 [Internet]. 2015 [cited 2016 Mar 16]. Available from: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_EUCAST_V1_2015.pdf
6. Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins. Définition des infections associées aux soins. Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports; 2007.
7. Michel Vaubourdolle. Infectiologie. 1995. (Le moniteur, Internat).
8. François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin. Bactériologie Médicale, Techniques usuelles, 2ème édition. Elsevier Masson; 2011.
9. Schaechter, Medoff, Eisenstein. Microbiologie et pathologie infectieuse. DeBoeck Université; 1993.
10. Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801–10.
11. COLLEGE NATIONAL DES ENSEIGNANTS DE REANIMATION. Réanimation, urgences et défaillances viscérales aiguës. ELSEVIER / MASSON; 2015. (Les référentiels des Collèges).
12. Collège des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales (CMIT). ECN.PILLY 2016. <http://www.infectiologie.com/>.
13. Haug JB, Harthug S, Kalager T, Digranes A, Solberg CO. Bloodstream infections at a Norwegian university hospital, 1974-1979 and 1988-1989: changing etiology, clinical features, and outcome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1994 Aug;19(2):246–56.
14. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003 Apr 17;348(16):1546–54.

15. Martin C, Brun-Buisson C. [Initial management of severe sepsis in adults and children]. *Ann Fr Anesthésie Réanimation*. 2007 Jan;26(1):53–73.
16. Rodríguez-Baño J, López-Prieto MD, Portillo MM, Retamar P, Natera C, Nuño E, et al. Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Sep;16(9):1408–13.
17. Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012. 2013.
18. Alfandari S. SPA-BACT : prise en charge des bactériémies. Résultats préliminaires de l'enquête SPA (SPILF-ONERBA) 2014. 16èmes journées nationales d'infectiologie; 2015 06; Nancy.
19. Alfandari S, Cabaret P, Nguyen S, Descamps D, Vachée A, Cattoen C, et al. Evaluating the management of 493 patients presenting with bacteremia in 23 northern French hospitals. *Médecine Mal Infect*. 2016 Jun;46(4):194–9.
20. Brady M, Cunney R, Murchan S, Oza A, Burns K. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection, antimicrobial resistance and consumption trends in Ireland: 2008 to 2013. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2016 Aug 4;
21. Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Morel KA, Munson E, Doern GV. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3655–60.
22. Delle Rose D, Sordillo P, Gini S, Cerva C, Boros S, Rezza G, et al. Microbiologic characteristics and predictors of mortality in bloodstream infections in intensive care unit patients: A 1-year, large, prospective surveillance study in 5 Italian hospitals. *Am J Infect Control*. 2015 Nov;43(11):1178–83.
23. Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, Iosifidis E, Karapanagiotou A, Giasnetsova T, et al. Bloodstream infections caused by metallo- β -lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010 Dec;31(12):1250–6.
24. Stewardson AJ, Allignol A, Beyersmann J, Graves N, Schumacher M, Meyer R, et al. The health and economic burden of bloodstream infections caused by antimicrobial-susceptible and non-susceptible Enterobacteriaceae and *Staphylococcus aureus* in European hospitals, 2010 and 2011: a multicentre retrospective cohort study. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2016 Aug 18;21(33).
25. Brunelli SM, Turenne W, Sibbel S, Hunt A, Pfaffle A. Clinical and economic burden of bloodstream infections in critical care patients with central venous catheters. *J Crit Care*. 2016 May 14;35:69–74.
26. Lee C-C, Lee C-H, Chuang M-C, Hong M-Y, Hsu H-C, Ko W-C. Impact of inappropriate empirical antibiotic therapy on outcome of bacteremic adults visiting the ED. *Am J Emerg Med*. 2012 Oct;30(8):1447–56.

27. Abraham K, Dolman HS, Zimmerman LH, Faris J, Edelman DA, Baylor A, et al. Impact of inappropriate initial antibiotics in critically ill surgical patients with bacteremia. *Am J Surg*. 2016 Mar;211(3):593–8.
28. Nagel JL, Huang AM, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Lassiter J, et al. Impact of antimicrobial stewardship intervention on coagulase-negative Staphylococcus blood cultures in conjunction with rapid diagnostic testing. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2849–54.
29. Paul M, Dickstein Y, Raz-Pasteur A. Antibiotic de-escalation for bloodstream infections and pneumonia: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Jun 6;
30. Lee C-C, Lee N-Y, Chen P-L, Hong M-Y, Chan T-Y, Chi C-H, et al. Impact of antimicrobial strategies on clinical outcomes of adults with septic shock and community-onset Enterobacteriaceae bacteremia: de-escalation is beneficial. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Jun;82(2):158–64.
31. Lobo LA, Benjamim CF, Oliveira AC. The interplay between microbiota and inflammation: lessons from peritonitis and sepsis. *Clin Transl Immunol*. 2016 Jul;5(7):e90.
32. Bassetti M, Merelli M, Temperoni C, Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2013;12:22.
33. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL, Cernoch PL, Davis JR, Land GA, et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Sep;137(9):1247–54.
34. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2013 Nov;57(9):1237–45.
35. Bretonnière C, Leone M, Milési C, Allaouchiche B, Armand-Lefevre L, Baldesi O, et al. Strategies to reduce curative antibiotic therapy in intensive care units (adult and paediatric). *Intensive Care Med*. 2015 Jul;41(7):1181–96.
36. Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti J-J, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art. *Front Microbiol*. 2016;7:697.
37. Société Française de Microbiologie. Rémic, Référentiel en microbiologie médicale. 5ème édition 2015.
38. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE Document SH GTA 04 Révision 01.
39. BiostaTGV, [Internet]. Available from: <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>

40. COFRAC. EXPRESSION ET EVALUATION DES PORTEES D'ACCREDITATION (SH-REF 08), Révision 3.
41. COMITE QUALITE (QUAMIC)DE LA SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE. Recommandations 2014.
42. Noussair L, Nicolas-Chanoine M-H. [Obtention of bacterial antibiotic susceptibility following standard conditions directly from infected biological fluids and positive blood cultures]. *Pathol Biol (Paris)*. 2007 May;55(3-4):143-8.
43. Barnini S, Brucculeri V, Morici P, Ghelardi E, Florio W, Lupetti A. A new rapid method for direct antimicrobial susceptibility testing of bacteria from positive blood cultures. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016 Aug 12 [cited 2016 Sep 11];16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982226/>
44. Kerremans JJ, Goessens WHF, Verbrugh HA, Vos MC. Accuracy of identification and susceptibility results by direct inoculation of Vitek 2 cards from positive BACTEC cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 2004 Dec;23(12):892-8.
45. Verroken A, Defourny L, le Polain de Waroux O, Belkhir L, Laterre P-F, Delmée M, et al. Clinical Impact of MALDI-TOF MS Identification and Rapid Susceptibility Testing on Adequate Antimicrobial Treatment in Sepsis with Positive Blood Cultures. *PloS One*. 2016;11(5):e0156299.
46. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jul;16(3):430-50.
47. Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, et al. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-associated bloodstream infections. *Am J Infect Control*. 2015 Nov 1;43(11):1222-37.
48. Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM). Caractérisation des antibiotiques considérés comme « critiques ». 2013 Nov.
49. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. Réseau BMR-Raisin - Résultats 2013. 2015 p. 104.

7 Annexes

Tableau 15 Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Staphylocoques.

Staphylocoques (toutes espèces confondues)							
Dilutions testées		Nombre d'essais	Inoculum moyen	Min	Max	Nombre d'obtentions de l'inoculum souhaité	Proportion
Gouttes/ Volume	Facteur de dilution						
1/2ml	0,01	7	6,01E+06	1,00E+05	1,00E+07	0	0%
5/10ml	0,025	13	2,18E+06	1,00E+05	1,00E+07	0	0%
10/10ml	0,05	6	2,35E+07	1,00E+06	1,00E+08	1	17%
5/2ml	0,125	51	1,67E+08	1,00E+05	1,00E+09	34	67%

Tableau 16 Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>							
Dilutions testées		Nombre d'essais	Inoculum moyen	Min	Max	Nombre d'obtentions de l'inoculum souhaité	Proportion
Gouttes/ Volume	Facteur de dilution						
5/10ml	0,025	3	7,00E+05	1,00E+05	1,00E+06	0	0%
10/10ml	0,05	3	7,00E+06	1,00E+06	1,00E+07	0	0%
5/2ml	0,125	26	1,86E+08	1,00E+06	1,00E+09	18	62%

Tableau 17 Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Staphylocoques à coagulase négative.

Staphylocoques à coagulase négative							
Dilutions testées		Nombre d'essais	Inoculum moyen	Min	Max	Nombre d'obtentions de l'inoculum souhaité	Proportion
Gouttes/ Volume	Facteur de dilution						
1/2ml	0,01	7	6,01E+06	1,00E+05	1,00E+07	0	0%
5/10ml	0,025	10	2,62E+06	1,00E+05	1,00E+07	0	0%
10/10ml	0,05	3	4,00E+07	1,00E+07	1,00E+08	1	33%
5/2ml	0,125	25	1,48E+08	1,00E+05	1,00E+09	16	64%

Tableau 18 Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Entérobactéries.

Entérobactéries							
Dilutions testées		Nombre d'essais	Inoculum moyen	Min	Max	Nombre d'obtentions de l'inoculum souhaité	Proportion
Gouttes/ Volume	Facteur de dilution						
1/2ml	0,01	5	4,60E+07	1,00E+07	1,00E+08	2	40%
5/10ml	0,025	9	1,50E+07	1,00E+06	1,00E+08	1	11%
10/10ml	0,05	4	5,03E+08	1,00E+06	1,00E+09	0	0%
5/2ml	0,125	52	3,02E+08	1,00E+06	1,00E+09	37	71%

Tableau 19 Résumé des inoculas obtenus en fonction des dilutions testées : Streptocoques (autres que pneumocoque).

Streptocoques autres que <i>S.pneumoniae</i>							
Dilutions testées		Nombre d'essais	Inoculum moyen	Min	Max	Nombre d'obtentions de l'inoculum souhaité	Proportion
Gouttes/Vol olome	Facteur de dilution						
5/2ml	0,125	3	3,70E+07	1,00E+06	1,00E+08	1	33%
10/2ml	0,25	23	8,75E+07	1,00E+06	1,00E+09	9	39%
15/2ml	0,376	23	2,05E+08	1,00E+06	1,00E+09	17	74%

Tableau 20 Résumé des inocula obtenus en fonction des dilutions testées : Bacilles Gram négatif non fermentaires.

Bacilles Gram négatifs non fermentaires							
Dilutions testées		Nombre d'essais	Inoculum moyen	Min	Max	Nombre d'obtentions de l'inoculum souhaité	Proportion
Gouttes/ Volume	Facteur de dilution						
1/2ml	0,01	5	2,44E+06	1,00E+05	1,00E+07	1	20%
5/10ml	0,025	8	1,90E+05	1,00E+04	1,00E+06	0	0%
10/10ml	0,05	3	4,00E+04	1,00E+04	1,00E+05	0	0%
5/2ml	0,125	9	1,60E+07	1,00E+06	1,00E+08	4	44%

Tableau 21 Comparaison de méthode - Entérobactéries

Entérobactéries	Concordance de catégorie (S, I ou R)				
	Antibiotique	Concordance essentielle	Nombre d'erreurs		
			Nombre de VME	Nombre de ME	Nombre de mE
		%			
Acide nalidixique		100	-	-	-
Amikacine		100	-	-	-
Amox + ac clav		100	-	-	-
Ampicilline		100	-	-	-
Aztréonam		100	-	-	-
Céfalexine		100	-	-	-
Céfépime		100	-	-	1
Céfixime		100	-	-	-
Céfotaxime		100	-	-	-
Céfoxitine		100	-	-	-
Ceftazidime		100	-	-	-
Céfotaxime		100	-	-	-
Ciprofloxacine		100	-	-	-
Ertapénème		100	-	-	-
Fosfomycine		100	-	-	-
Gentamicine		100	-	-	-
Imipénème		100	-	-	-
Méccillinam		90	1	1	-
Méropénème		100	-	-	-
Nétilmicine		95	-	-	1
Furanes		100	-	-	-
Ofloxacine		100	-	-	-
Pipéracilline		95	-	-	1
Pipé + tazobactam		100	-	-	-
Témocilline		100	-	-	-
Ticarcilline		100	-	-	-
Ticar+ac clav		95	-	1	-
Tobramycine		100	-	-	-
Triméthoprime		100	-	-	-
Cotrimoxazole		100	-	-	-

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



PAQUIN Cédric

Antibiogramme direct sur flacon d'hémoculture positif : mise au point et intérêt en thérapeutique

Th. D. Pharm., Rouen, 2016, 81 p.

RESUME

Les bactériémies ont des conséquences importantes en termes de morbidité et de mortalité. L'hémoculture en permet le diagnostic. L'adaptation précoce du traitement antibiotique aux données de l'antibiogramme, pour réévaluer un traitement inefficace ou pour réduire le spectre de l'antibiothérapie, améliore de manière significative le pronostic des patients : il est donc important que le laboratoire mette les données de l'antibiogramme à disposition du clinicien le plus précocement possible.

Les recommandations actuelles préconisent la réalisation de l'antibiogramme à partir de colonies isolées, ce qui en pratique courante ne permet un rendu que 48h après détection de positivité des flacons.

Notre travail a consisté à mettre au point une méthode permettant la réalisation de l'antibiogramme directement à partir de flacons d'hémoculture positifs, dans le but de réduire de 24h ce délai.

Nous avons opté pour la méthode par diffusion en milieu gélosé à partir de dilution de gouttes de bouillon des flacons dans du sérum physiologique. La principale difficulté était la maîtrise de l'inoculum bactérien. Nous sommes parvenus à définir des conditions de dilution appropriées pour les principales familles de germes, exception faite de *S. pneumoniae*. La vérification des performances de cette méthode selon les préconisations du COFRAC en portée B montre des résultats satisfaisants, notamment une excellente corrélation avec la méthode conventionnelle.

Enfin, nous avons mesuré le bénéfice potentiel de cette méthode en menant une étude rétrospective sur les flacons détectés positifs durant une période de 41 jours au CHU de Rouen. Cette étude montre de potentiels bénéfices conférés par la mise en production de cette méthode, et notamment sur la prise en charge thérapeutique des patients, ce qui souligne l'intérêt d'une mise en route rapide.

MOTS CLES : Bactériémies-Hémocultures-Résistance aux antibiotiques-Antibiogrammes-Antibiothérapie

JURY

Président : Mme PESTEL CARON Martine, Professeur

Membres : Mme BOYER Sophie, Docteur en pharmacie

M. CARON François, Professeur

M. MISSET Benoît, Professeur

M. CATTOEN Christian, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE : 10 octobre 2016