

Parcours d'une BMR : du prélèvement au signalement

Exemple d'un prélèvement urinaire

Journée Prévention du Risque Infectieux en Etablissements de Santé

Vendredi 14 octobre 2022

Saint-Amant-Tallende

Eugénie MAURIN - Camille PETILLON

Pharmaciens Biologistes - Service de Bactériologie

CHU Clermont-Ferrand

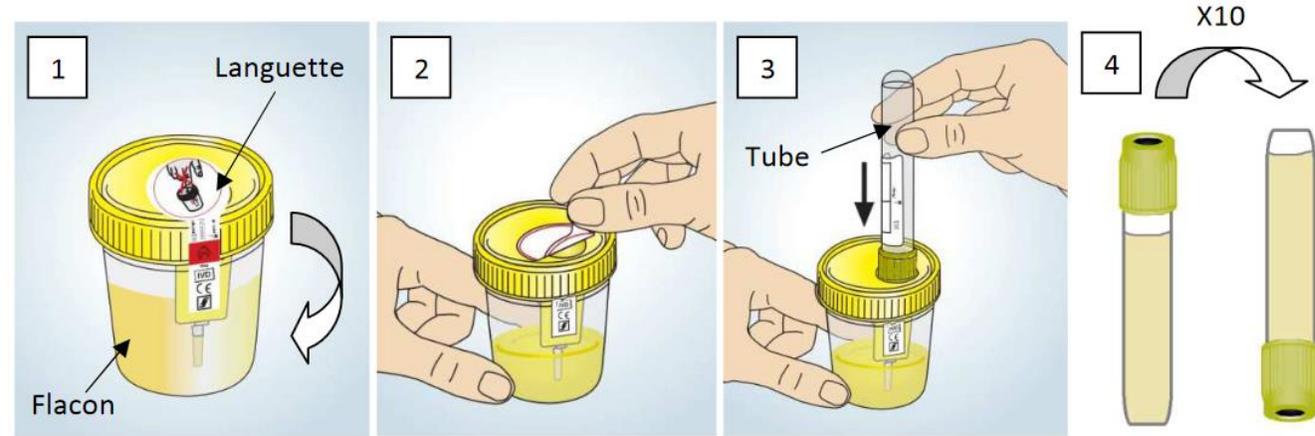
Cheminement et traitement au laboratoire d'un prélèvement urinaire



J₀

Réalisation du prélèvement (ECBU)

- ✓ Avant toute antibiothérapie
- ✓ De préférence urines du matin
- ✓ Toilette soignée région vulvaire/méat urinaire
- ✓ Milieu de jet



Conservation des urines sur tube boraté (15-25°C)

48h maximum



Conservation des urines sur pot sec (15-25°C)

2h maximum



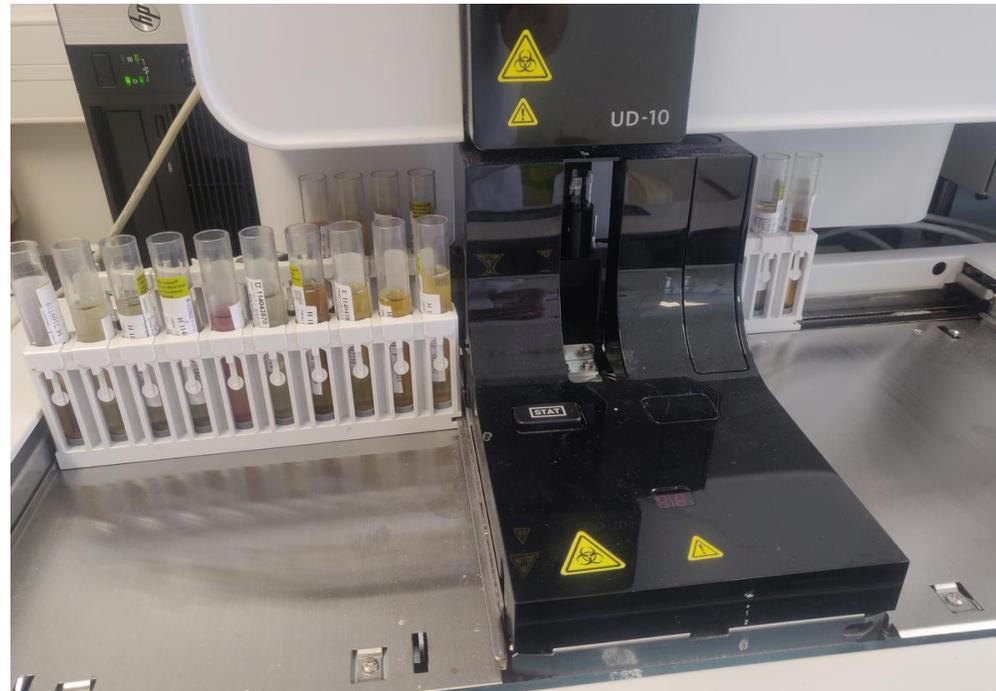
Acide borique

- bloque la multiplication bactérienne et réduit la cytolysse
- ⚠ quantité de remplissage : risque de FN de la culture (acide borique bactéricide en concentration importante)

J₀

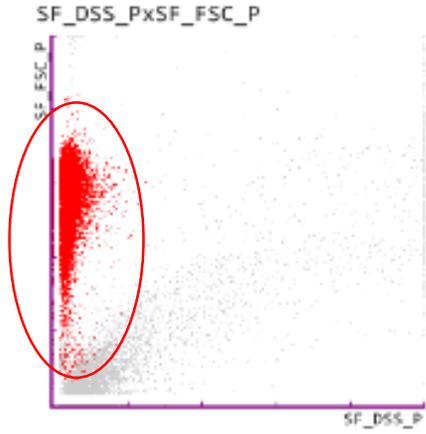
Ensemencement : cytologie automatisée

- ✓ 1 module de cytométrie en flux → Hématies/leucocytes
- ✓ 1 module d'analyse d'images numériques
→ Cellules épithéliales, cylindres, cristaux, levures,...

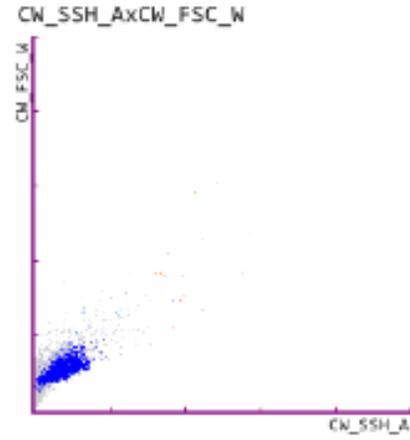


J₀

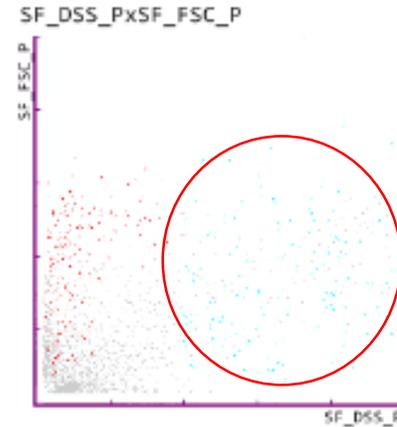
Ensemencement : cytologie automatisée



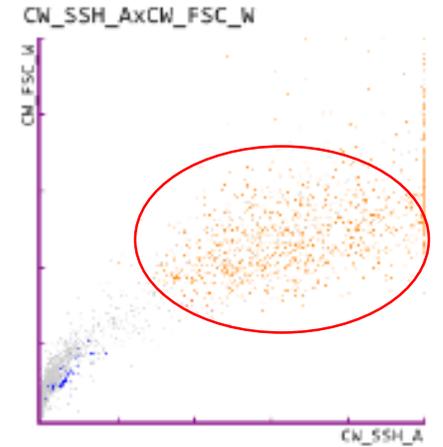
Hématies



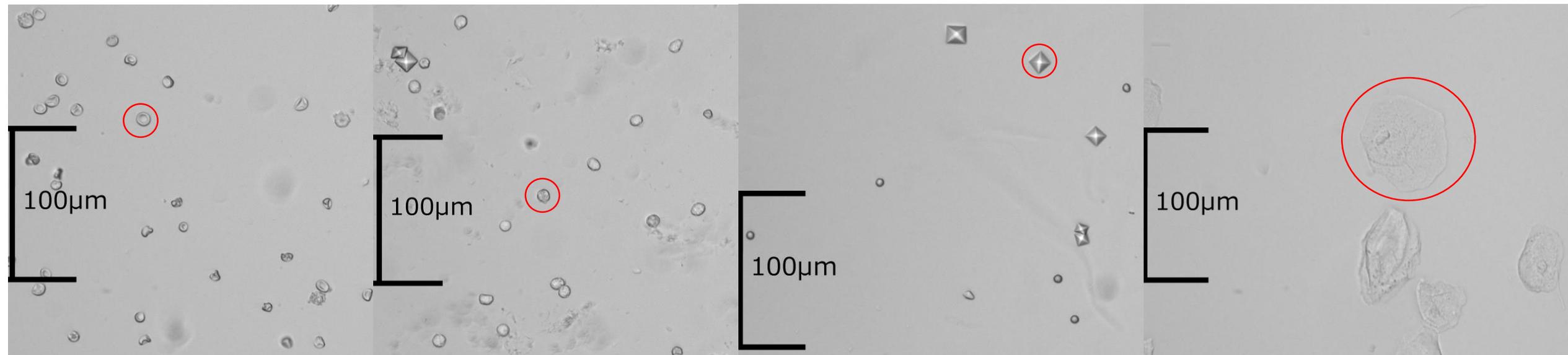
Leucocytes



Cristaux

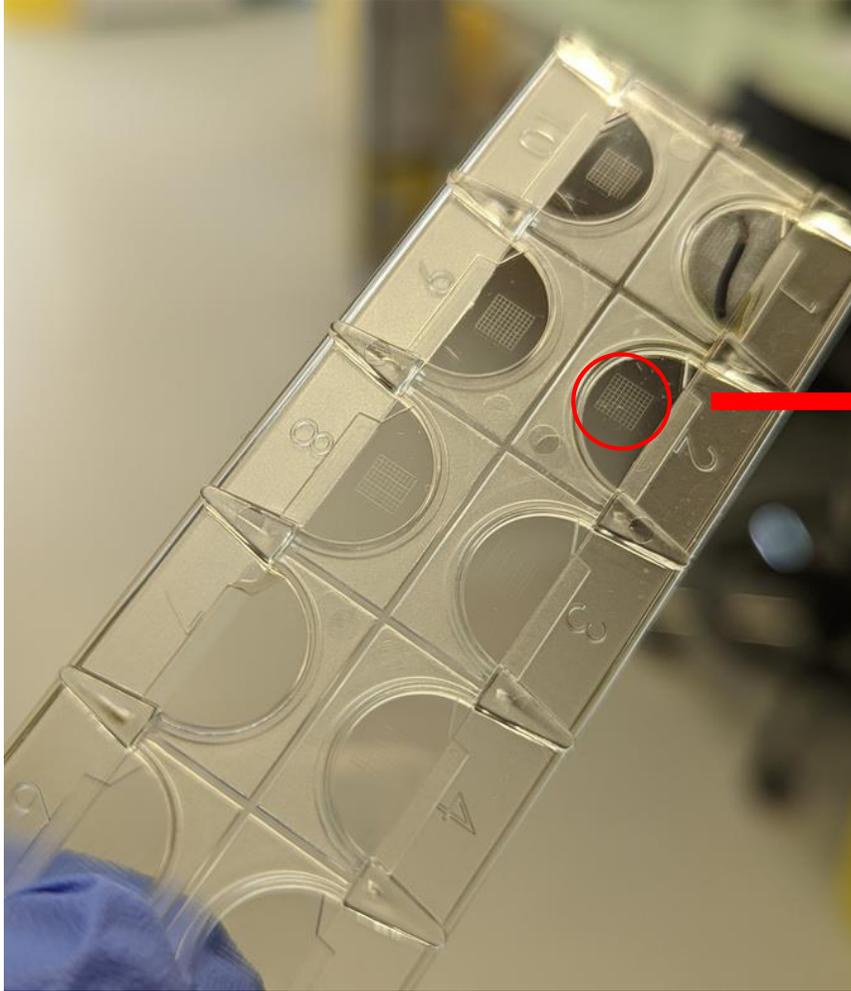


Cellules épithéliales



J₀

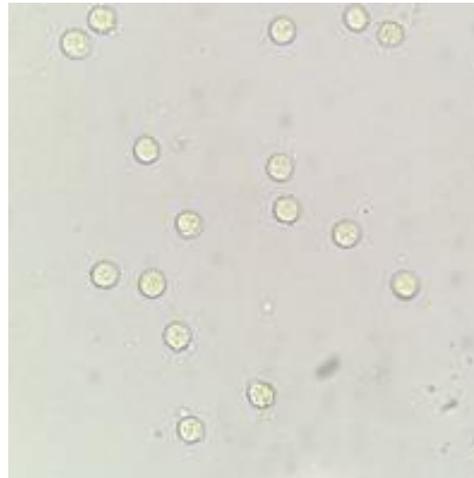
Ensemencement : cytologie manuelle



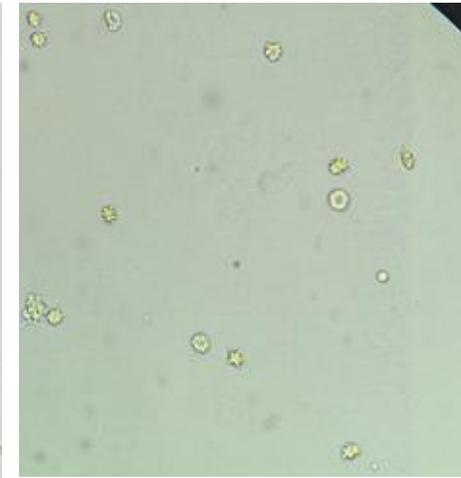
Cellule de numération Kova Slide

1 grille quadrillée par cellule

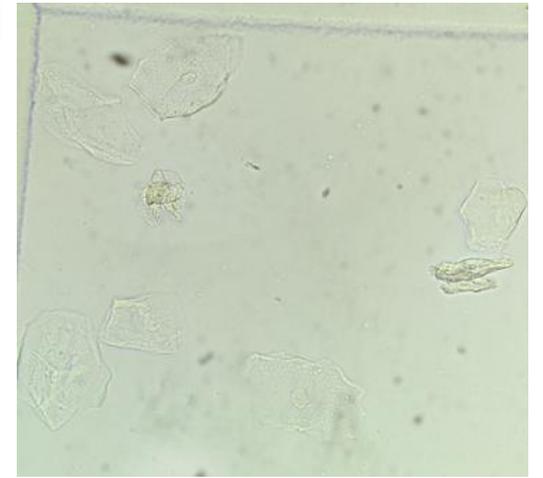
Leucocytes



Hématies



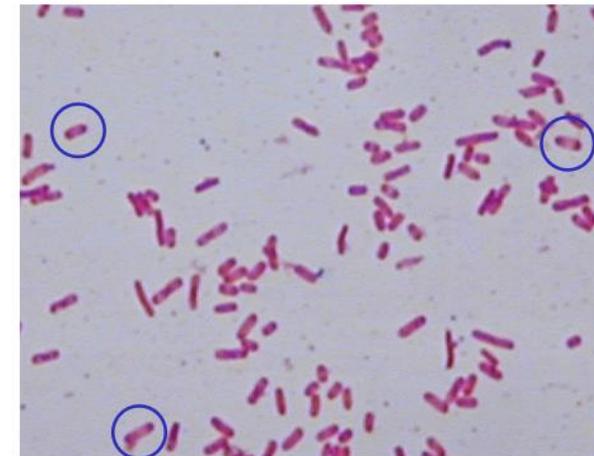
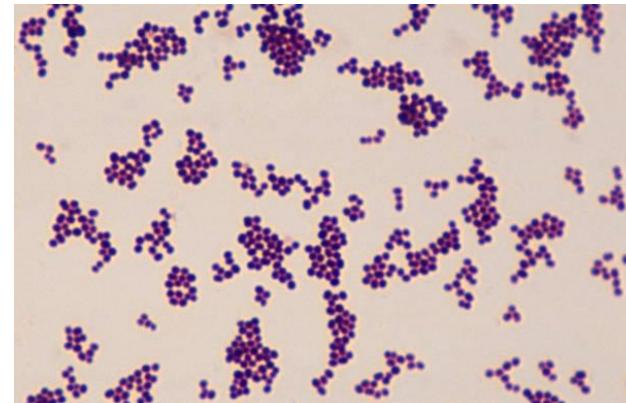
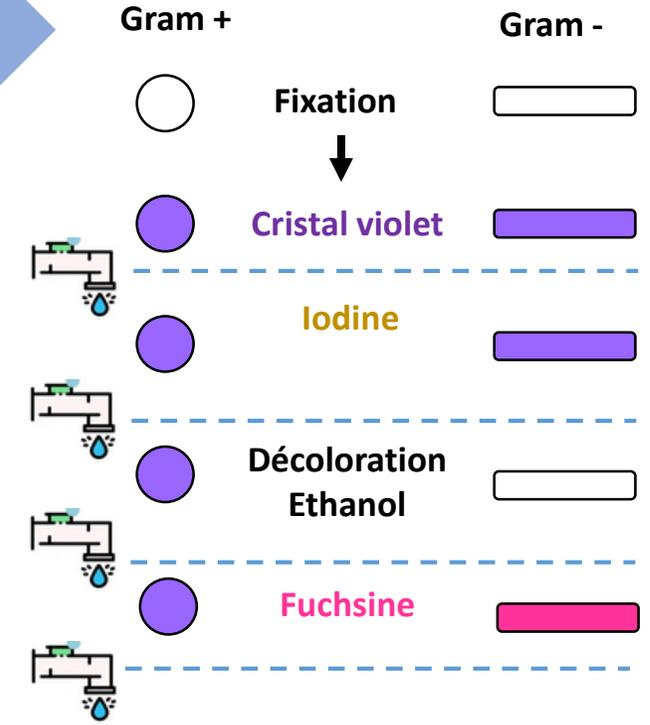
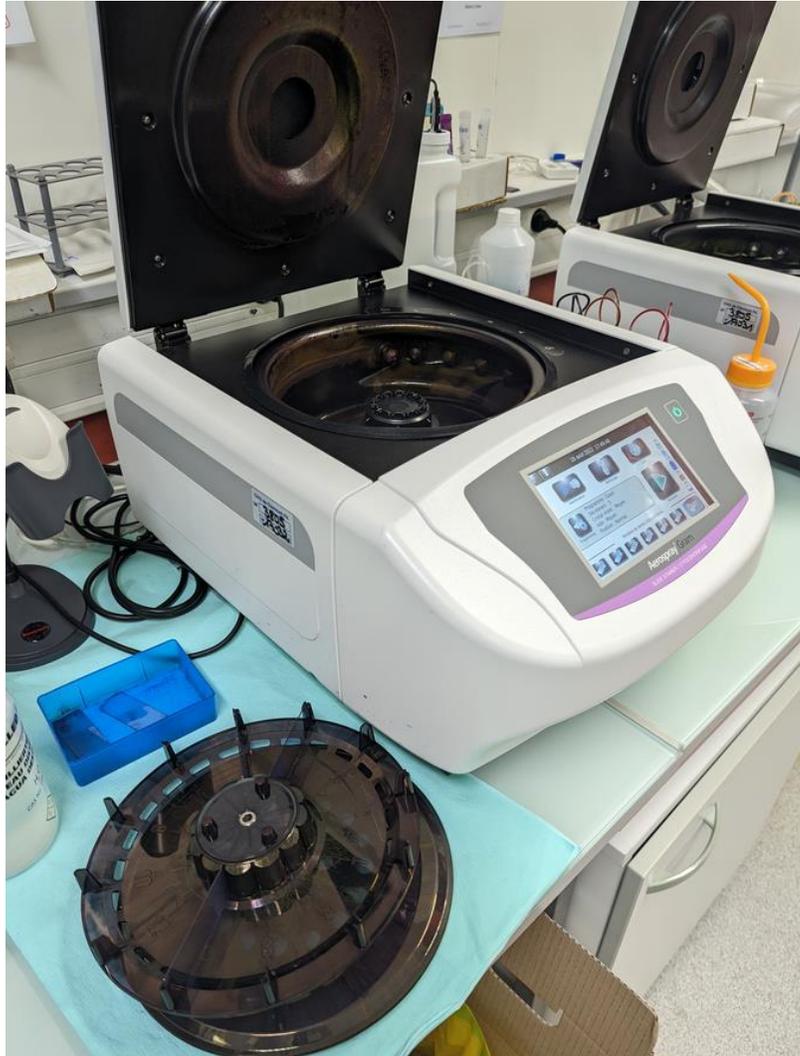
Cellules épithéliales



Grossissement x400

J₀

Ensemencement : coloration de Gram automatisée

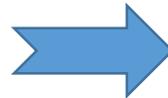
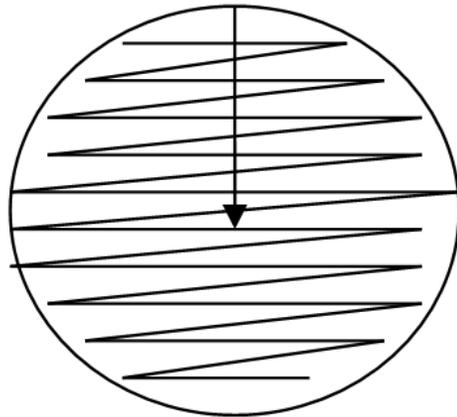


Grossissement x1000

J₀

Ensemencement : milieu de culture

Ensemencement à l'öse calibrée de 10 μ L



Géloses incubées à l'étuve à 35 °C en aérobie 24h

J₁

Tri des géloses à la paillasse : **quantification**

10 colonies



10^3 UFC/ml

100 colonies



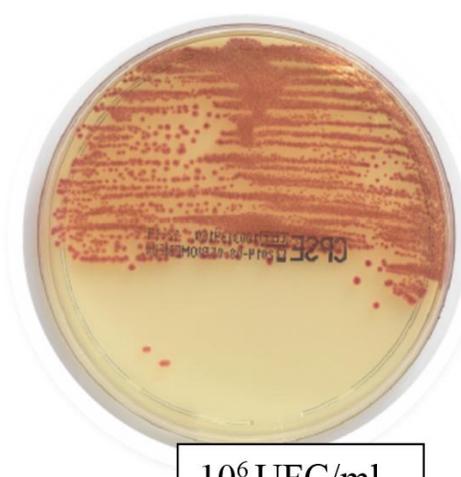
10^4 UFC/ml

1 000 colonies



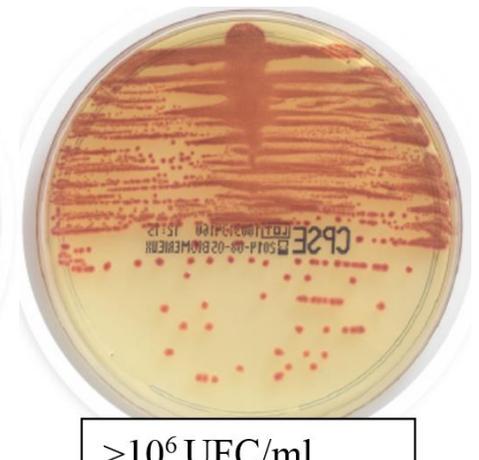
10^5 UFC/ml

10 000 colonies



10^6 UFC/ml

> 10 000 colonies



$>10^6$ UFC/ml

J₁

Tri des géloses à la paille : **quantification**

Gélose chromogène : hydrolyse de substrats par les enzymes bactériennes

→ Orientation du germe en fonction de la couleur

→ Différenciation des colonies (urines polymicrobiennes +++)



Monomicrobien + bactériurie au seuil

Escherichia coli 10⁶ UFC/mL

→ **Identification + ATB**



2 germes au seuil

Escherichia coli 10⁴ UFC/mL
Enterococcus faecalis 10⁴ UFC/mL

→ **Ré-isolément pour identification + ATB (+24h)**



≥3 germes

Polymicrobien 10⁶ UFC/mL

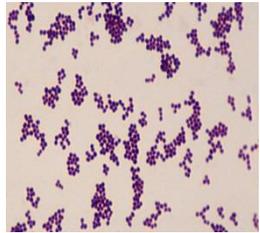
→ **Pas d'identification ni d'ATB**

J₁

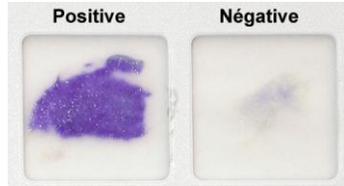
Tri des géloses à la paillasse : **identification**

Délai résultats : 10-15 min

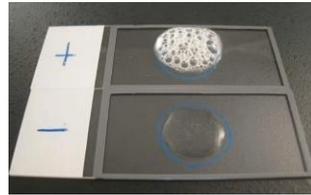
Coloration de Gram



Tests rapides Enzymes bactériennes



Oxydase



Catalase

Historique des techniques

Spectrométrie de masse



< années 2000

2000

2010

TESTS NÉGATIFS



TESTS POSITIFS



Galleries biochimiques

Délai résultats : 24h

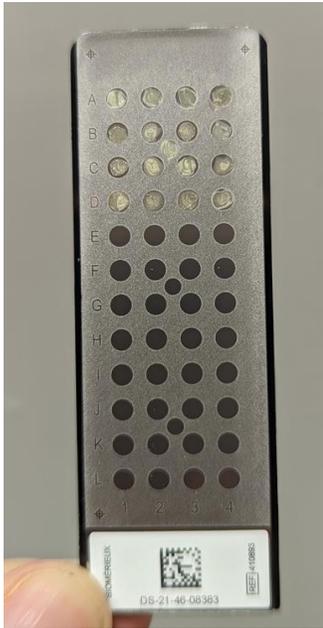


Galleries biochimiques miniatures automatisées

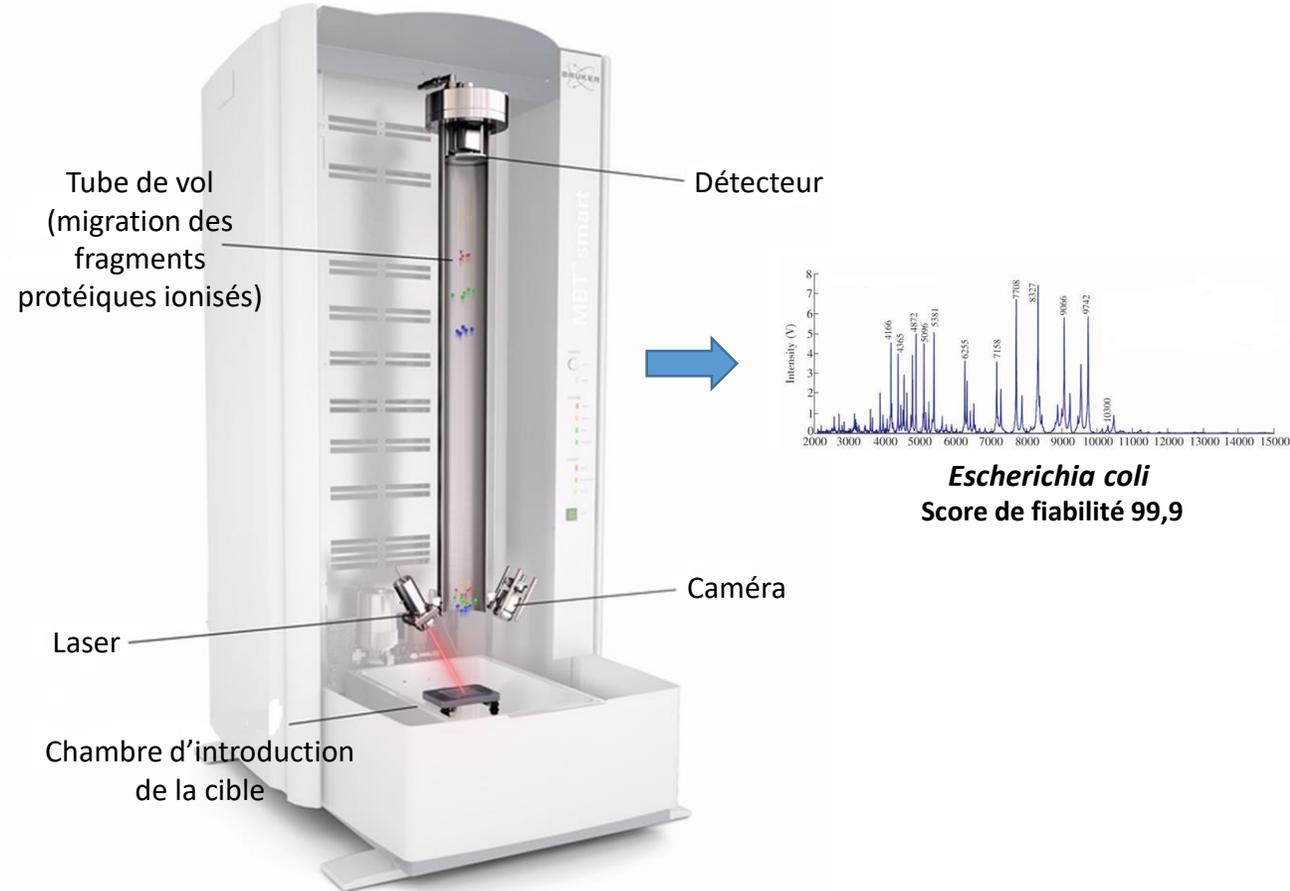
J₁

Tri des géloses à la paillasse : **identification**

Spectrométrie de masse = MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*)



1 puit = 1 colonie déposée recouverte d'une matrice



Rapide 10-15 min

J₁

Tri des géloses à la paillasse : réalisation de l'antibiogramme

En diffusion (milieu gélosé)

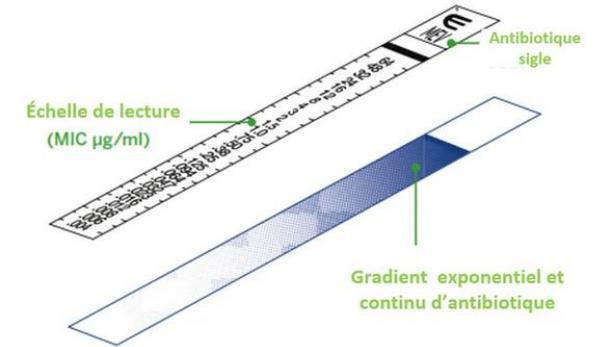


Disques d'antibiotiques



Pénicilline G (1 µg)

Bandelette Etest
(CMI = Concentration Minimale Inhibitrice)



Incubation 24h à l'étuve

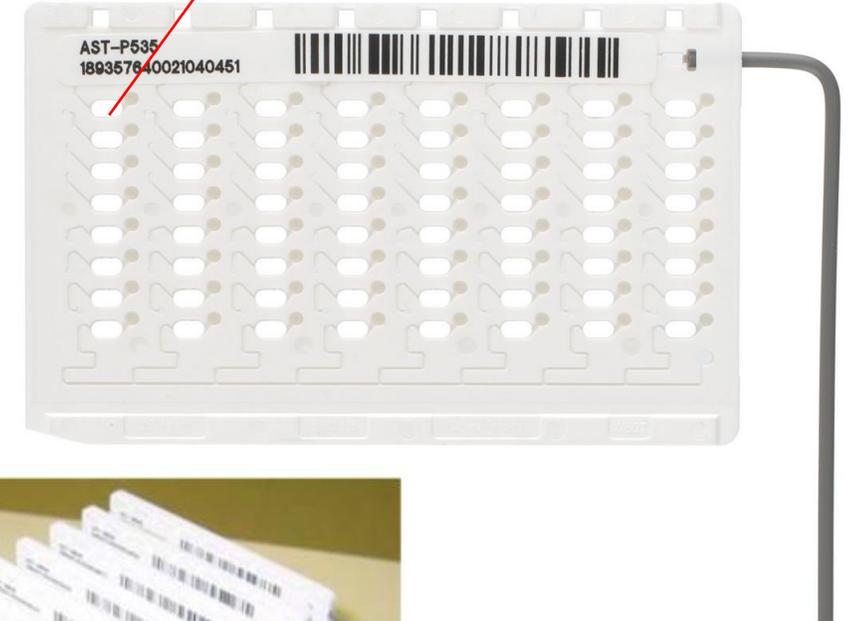
→ ≠ distributeurs avec panel d'antibiotiques définis en fonction du germe (bacille à Gram négatif, staphylocoque, entérocoque/streptocoque, anaérobies,...)

J₁

Tri des géloses à la pailleuse : réalisation de l'antibiogramme

Concentration croissante d'antibiotique
1 cupule = 1 antibiotique à une
concentration donnée lyophilisé

Automatisé en milieu liquide



CMI calculée

Incubation 12 à 18h

→ ≠ cartes avec panel d'antibiotiques définis en fonction du germe

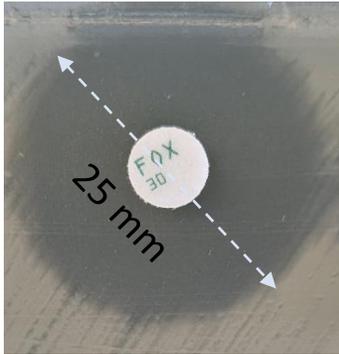
J₂

Lecture et interprétation des antibiogrammes

En diffusion (milieu gélosé) → diamètres mesurés

Lecture automatisée des diamètres d'inhibition autour des disques

S

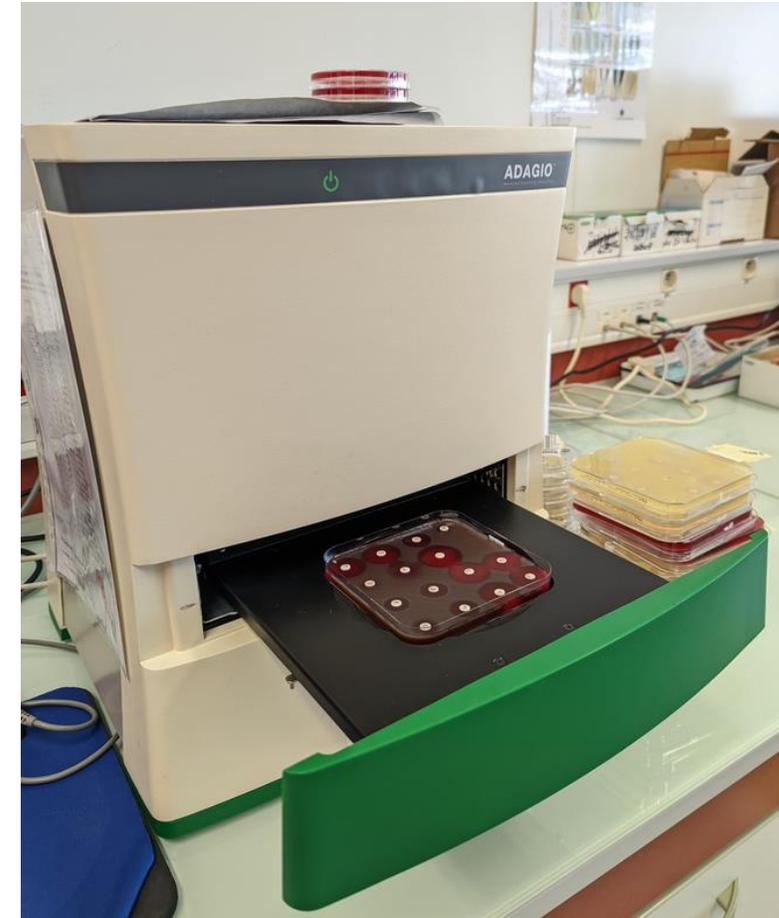
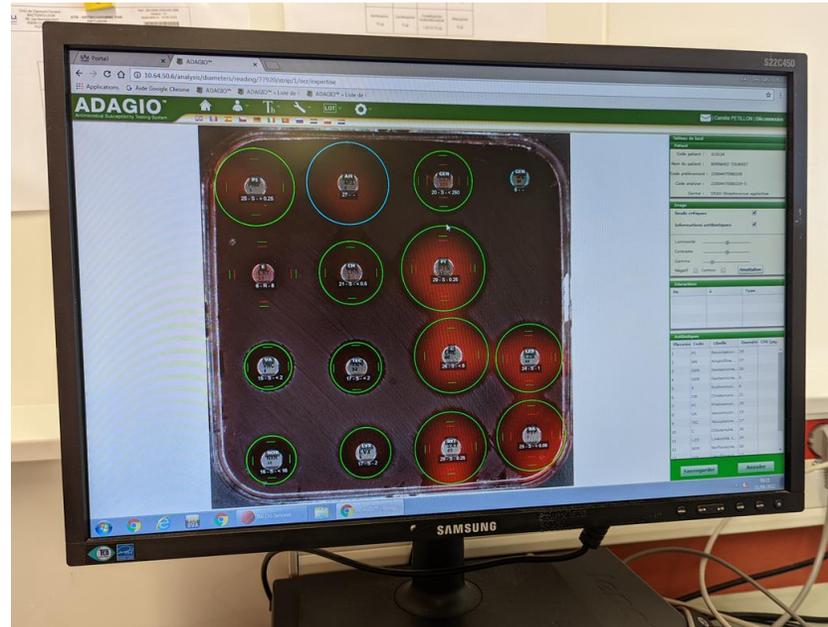


Escherichia coli

R



Enterobacter cloacae



Référentiel pour les valeurs de référence en fonction du germe

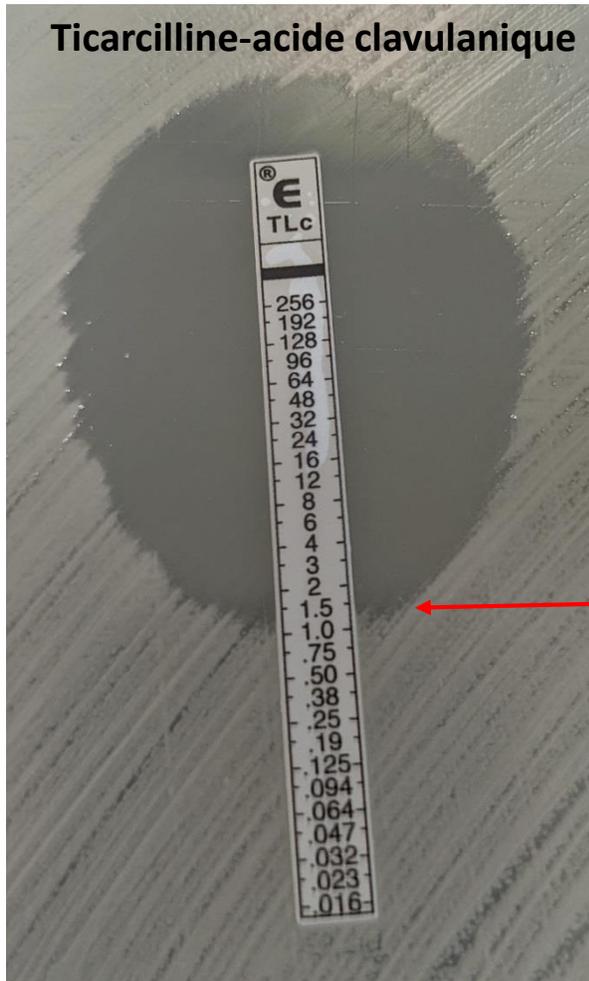
J₂

Lecture et interprétation des antibiogrammes

En diffusion (milieu gélosé) → CMI (bandelette Etest)

S

Ticarcilline-acide clavulanique



CMI = 1,5 mg/L

Sensible ≤ 16 mg/L

Stenotrophomonas maltophilia

Référentiel pour les valeurs de référence
en fonction du germe



Automatisé en milieu liquide → CMI calculée

Référentiel pour les valeurs de référence
en fonction du germe

1 De 164

Validé

ID d'échantillon: 22004427630102 2

Origine du germe: MYLA®

Germe: K.pneumoniae

Résultats AES: Concordant

Phénotypes sélectionnés pour vérification: Aucun élément détecté

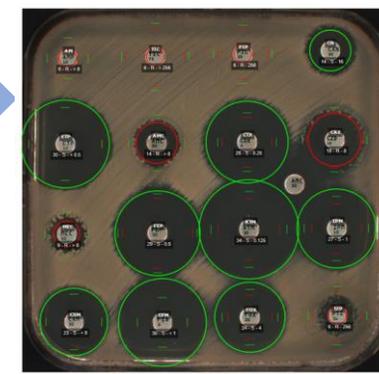
Commentaires sur la carte:

AST-N372!

<input checked="" type="checkbox"/>	Antibiotique	CMI	INT	<input checked="" type="checkbox"/>	Antibiotique	CMI	INT	<input checked="" type="checkbox"/>	Antibiotique	CMI	INT
<input type="checkbox"/>	Méциллин			<input type="checkbox"/>	Céfoxitine	≤4	S	<input type="checkbox"/>	Gentamicine	≤1	S
<input type="checkbox"/>	Témocilline	≤4	S	<input type="checkbox"/>	Céfixime	≤0,25	S	<input type="checkbox"/>	Acide nalidixique	≤2	S
<input type="checkbox"/>	Ampicilline	>16	R	<input type="checkbox"/>	Ceftazidime	≤1	S	<input type="checkbox"/>	Ofloxacine	≤0,25	S
<input type="checkbox"/>	Amoxicilline/ acide clavulanique	>16	R	<input type="checkbox"/>	Ceftriaxone	≤1	S	<input type="checkbox"/>	Fosfomycine		
<input type="checkbox"/>	Ticarcilline	>64	R	<input type="checkbox"/>	Ertapénème	≤0,12	S	<input checked="" type="checkbox"/>	Nitrofurantoïne	64	S
<input type="checkbox"/>	Pipéracilline/ tazobactam	≤4	S	<input type="checkbox"/>	Amikacine	≤2	S	<input type="checkbox"/>	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole	>160	R

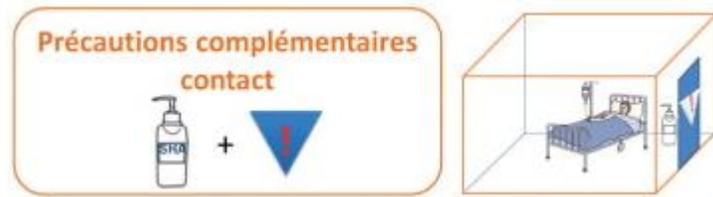
J₂

Lecture et interprétation des antibiogrammes



Résistances à l'antibiogramme à surveiller

BMR = Bactérie multirésistante

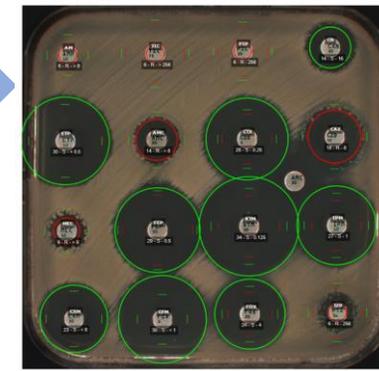


BHRe = Bactérie hautement résistante émergente



- ✓ **SARM** = *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
- ✓ **BLSE** = **Entérobactérie** productrice de β -lactamase à spectre étendu

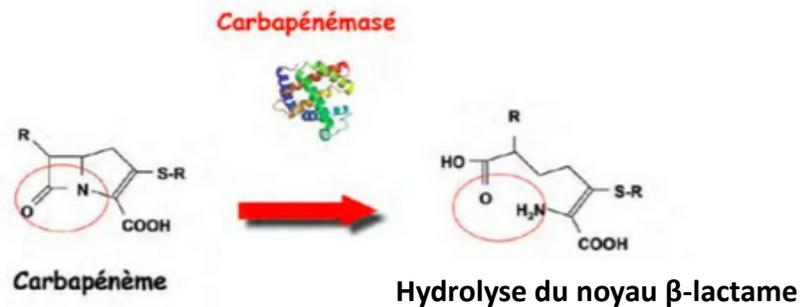
- ✓ **ERG** = Entérocoque résistant aux glycopeptides
- ✓ **ERV** = Entérocoque résistant à la vancomycine
- ✓ **EPC** = **Entérobactérie** productrice de carbapénémase



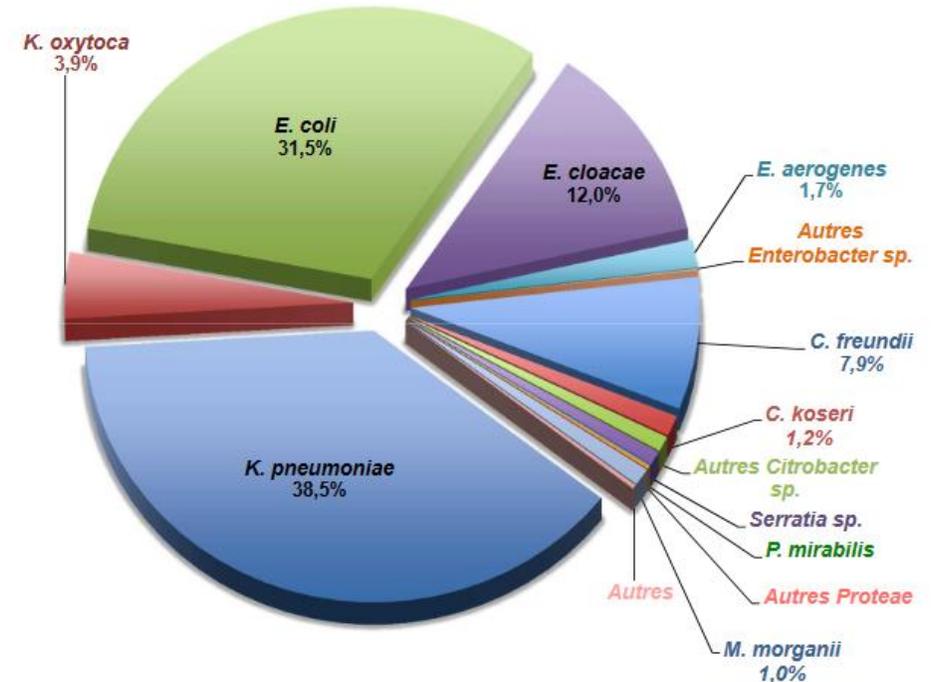
Résistances à l'antibiogramme à surveiller

Enquête nationale de prévalence des infections associées aux soins en ES (2017),
pour les **entérobactéries** isolées d'infections nosocomiales :

- ✓ 22,5 % de résistance aux céphalosporines de 3e génération (C3G)
- ✓ **15,3 %** de souches productrices de BLSE
- ✓ **0,6 %** de souches productrices de carbapénémase



Distribution des EPC en France (2016)



- Caractérisation d'une BLSE (β -lactamase à spectre étendu) au laboratoire

Association β -lactamine + **inhibiteur de β -lactamase** Amoxicilline – acide clavulanique

Céphalosporine de 3^{ème} génération



Céphalosporine de 4^{ème} génération (Céfépime)

Aztréonam

Escherichia coli



Images de synergie « en bouchon de champagne »



- Caractérisation d'une carbapénémase au laboratoire

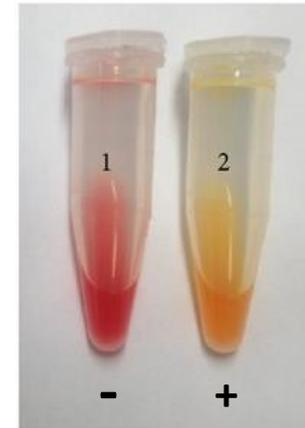
Entérobactérie avec résistance à au moins un carbapénème
= Suspicion de carbapénémase



Tests phénotypiques
(Recherche de la protéine)



NG-Test CARBA 5
CE Q1 2018



Carba NP (Biomérieux)

Tests rapides immunochromatographiques
ou colorimétriques

15-30 min



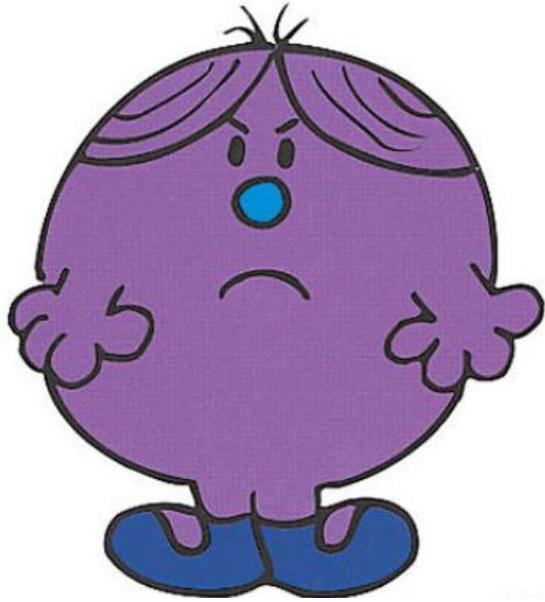
Tests génotypiques
(Recherche du gène)



GeneXpert (Cepheid)

PCR rapide «prête à l'emploi »

50 min



Madame Mallodau, 34 ans

Service de rhumatologie

- Contexte d'IU récidivantes
- Pas de symptômes urinaires

→ ECBU envoyé au laboratoire de Bactériologie



J₀

Cytologie automatisée



Hématies	Val	10.5 10.3/mL
Leucocytes	Val	146.8 10.3/mL
Cell épithéliales	X Val	A
Petit cell rondes	X Val	A
Amas Leucocytes	X Val	A
Cyl patho	X Val	A
-- Levures	X Val	A
Cristaux	X Val	A
-- Bactéries	X Val	48.4
-- Spermatozoïdes	X Val	A
-- Mucus	X Val	A

Leucocyturie significative

$\geq 10.10^3/\text{mL}$

J₁

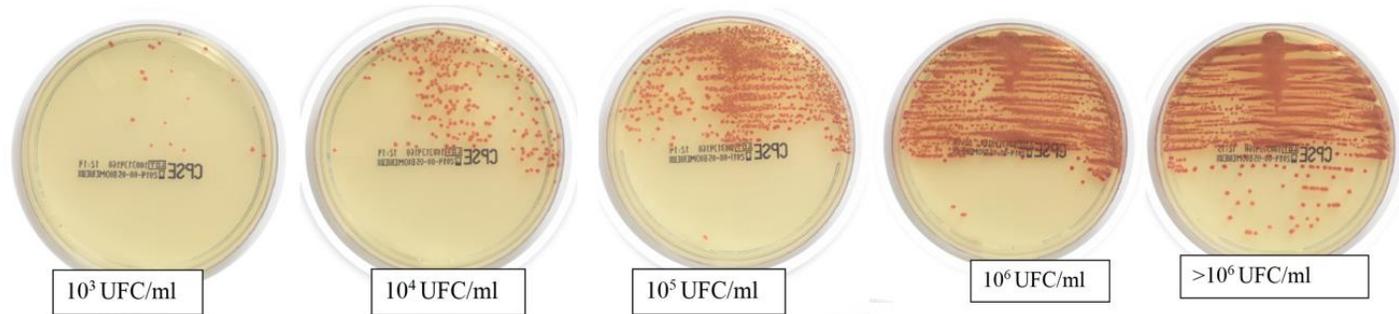
Lecture de la culture et identification



Escherichia coli 10³ UFC/mL

Bactériurie significative

≥ 10³ UFC/mL



Seuils de significativité de la bactériurie en fonction du groupe d'uropathogènes (Rémic, 2018)

Groupes	Espèces bactériennes	Seuil de significativité	Sexe
1	<i>E. coli</i> , <i>S. saprophyticus</i>	10 ³ UFC/ml	Homme ou femme
2	Entérobactéries autres que <i>E. coli</i> , entérocoques, <i>Corynebacterium urealyticum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	10 ³ UFC/ml	Homme
		10 ⁴ UFC/ml	Femme
3	Bactéries à Gram positif (<i>Streptococcus agalactiae</i> , staphylocoques à coagulase négative autres que <i>S. saprophyticus</i>), Bacilles à Gram négatif (<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , autres <i>Pseudomonaceae</i>) <i>Candida</i> spp.	10 ⁵ UFC/ml	Homme ou femme
4	Lactobacilles, streptocoques alpha-hémolytiques, <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., bacilles diptérimorphes (sauf <i>Corynebacterium urealyticum</i> ou <i>seminalis</i>)	Pas de seuil, contaminants probables A recontrôler	Homme ou femme

J₂

Antibiogramme automatisé en milieu liquide

Carte panel urinaire

AST-N372											
<input checked="" type="checkbox"/>	Antibiotique	CMI	INT	<input checked="" type="checkbox"/>	Antibiotique	CMI	INT	<input checked="" type="checkbox"/>	Antibiotique	CMI	INT
<input type="checkbox"/>	Mécillinam	8	S	<input type="checkbox"/>	Céfoxitine	>32	R	<input type="checkbox"/>	Gentamicine	≤1	S
<input type="checkbox"/>	Témocilline	>16	R	<input type="checkbox"/>	Céfixime	>2	R	<input type="checkbox"/>	Acide nalidixique	>16	R
<input type="checkbox"/>	Ampicilline	>16	R	<input type="checkbox"/>	Ceftazidime	>32	R	<input type="checkbox"/>	Ofloxacine	>4	R
<input type="checkbox"/>	Amoxicilline/ acide clavulanique	>16	R	<input type="checkbox"/>	Ceftriaxone	>32	R	<input type="checkbox"/>	Fosfomycine	≤16	S
<input type="checkbox"/>	Ticarcilline	>64	R	<input type="checkbox"/>	Ertapénème	>4	R	<input type="checkbox"/>	Nitrofurantoïne	64	S
<input type="checkbox"/>	Pipéracilline/ tazobactam	>64	R	<input type="checkbox"/>	Amikacine	≤2	S	<input type="checkbox"/>	Triméthoprim/ sulfaméthoxazole	>160	R

Résistance aux C3G

+

Résistance aux carbapénèmes

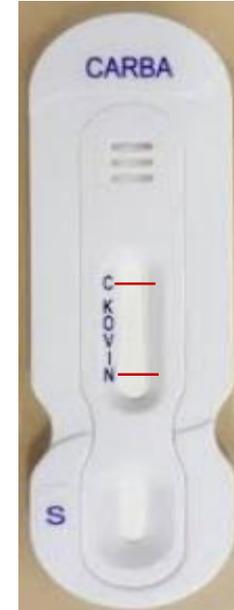
→ Suspicion d'entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC)

J₂

Réalisation du tests rapide pour confirmer/écarter une EPC

Test rapide phénotypique

- Détecte la production d'une carbapénémase
- Différencie les 5 carbapénémases majeures (KPC, OXA-48, VIM, IMP, NDM)



NG-Test CARBA 5

Test rapide +

NDM
« *New Delhi metallo- β -lactamase* »

➔ *Escherichia coli* avec carbapénémase de type NDM

BHRe = Bactérie hautement résistante émergente

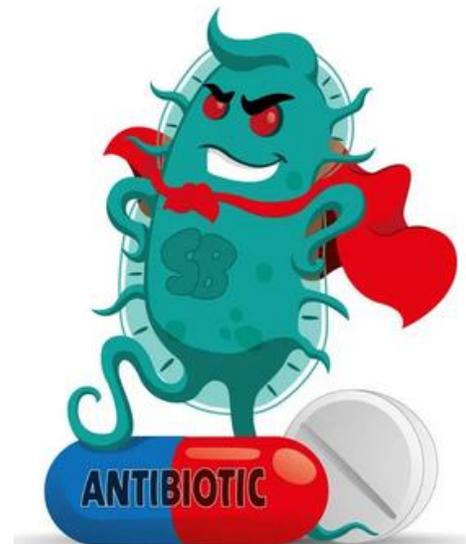




Service de rhumatologie + Equipe Opérationnelle d'Hygiène



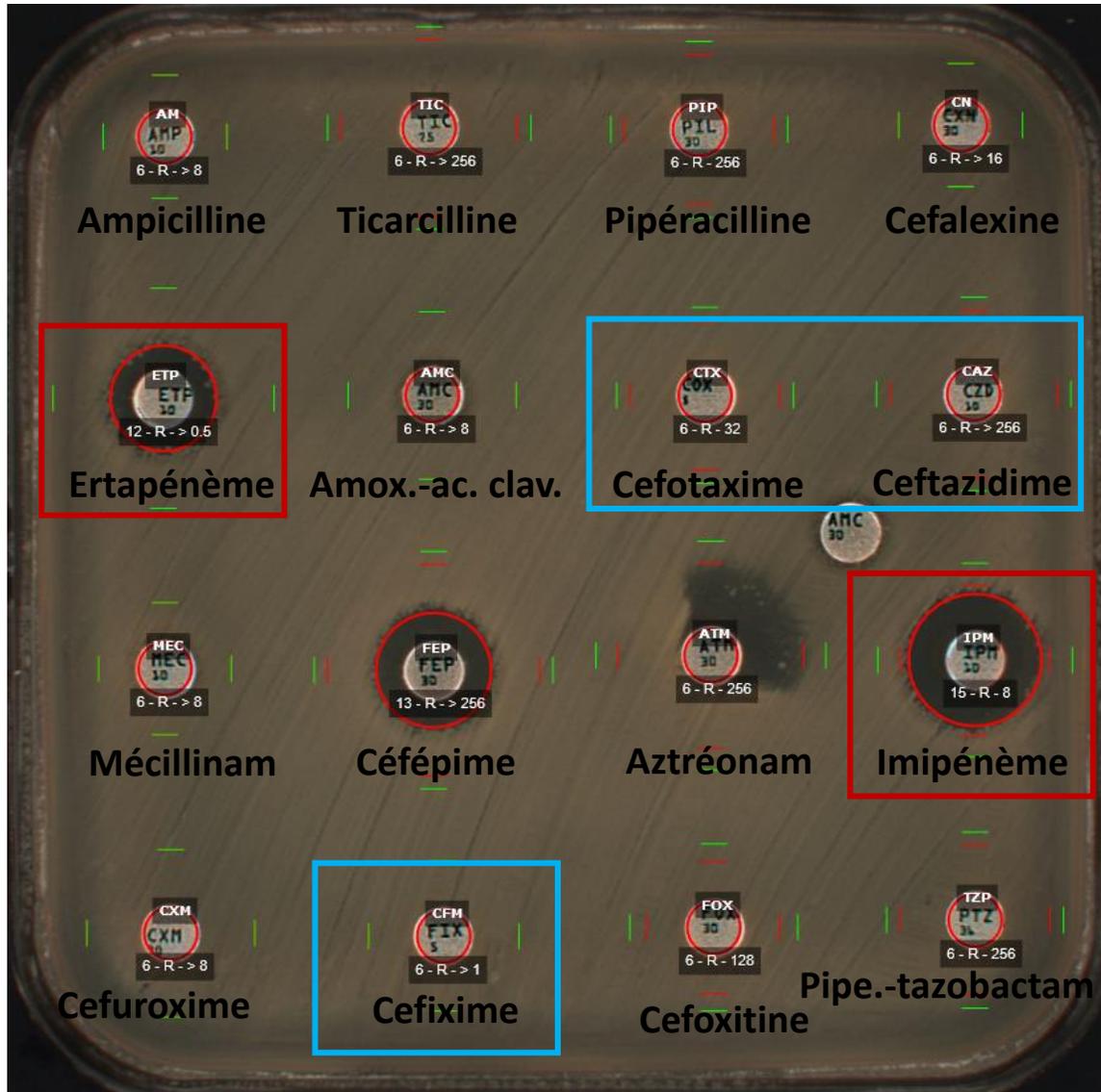
« Superbactérie »



J₃

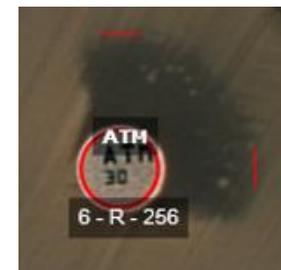
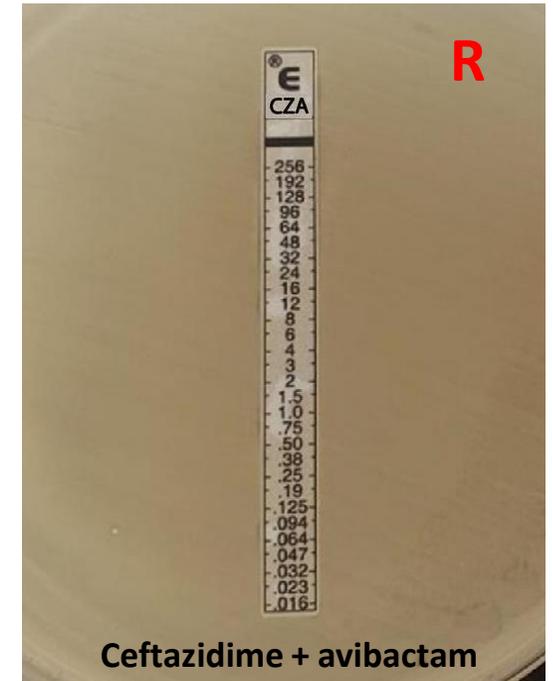
Tests complémentaires

- ATB en diffusion : visualisation des mécanismes de résistance
- Rajouts de CMI (antibiotiques de 2nde intention)



Résistance aux C3G

Résistance aux carbapénèmes



Images de synergie

BLSE + carbapénémase

J₀

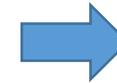
Dépistage des cas contacts

BHRe (EPC)



Ecouvillon rectal

- ✓ Recherche d'Entérobactérie productrice de carbapénémase (EPC)



Ensemencement au laboratoire de milieux sélectifs contenant un carbapénème



- ✓ Géloses incubées à l'étuve à 35°C en aérobie
- ✓ Lecture à J1 et J2

J₁

Dépistage des cas contacts

BHRe (EPC)



Escherichia coli NDM



Escherichia coli KPC
Klebsiella pneumoniae KPC

✓ **Identification** ≠ colonies en spectrométrie de masse

✓ Si entérobactérie → **Antibiogramme**

J₂

Dépistage des cas contacts

BHRe (EPC)



Diminution de sensibilité à au moins un carbapénème
= **Suspicion d'EPC**



Tests rapides <1h

Confirmation + classe d'EPC

