

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة سعد دحلب - البليدة 1 -

Université Saad Dahleb - Blida 1 -

كلية الطب - دائرة الصيدلة

Faculté de Médecine - Département de Pharmacie



Optimisation de l'hémoculture

Thèse de fin d'études
Présentée en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en Pharmacie
Session : Juillet 2022

Présentée par :

ACHOUR Said

BENCHIKH Hamza Soufiane

Devant le jury :

Pr OUKID S.	Professeur en microbiologie-Université de Blida	Présidente
Dr BEROUAKEN S.	Maitre assistante en microbiologie-Université de Blida	Examinatrice
Dr BENAMARA M.	Maitre assistante en microbiologie-Université de Blida	Promotrice

2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة سعد دحلب - البليدة 1 -

Université Saad Dahleb - Blida 1 -

كلية الطب - دائرة الصيدلة

Faculté de Médecine - Département de Pharmacie



Optimisation de l'hémoculture

Thèse de fin d'études
Présentée en vue de l'obtention du diplôme d'état de docteur en Pharmacie
Session : Juillet 2022

Présentée par :

ACHOUR Said

BENCHIKH Hamza Soufiane

Devant le jury :

Pr OUKID S.

Professeur en microbiologie-Université de Blida

Présidente

Dr BEROUAKEN S.

Maitre assistante en microbiologie-Université de Blida

Examinatrice

Dr BENAMARA M.

Maitre assistante en microbiologie-Université de Blida

Promotrice

2021/2022

Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu notre **Allah**, qui nous a donné la santé, la force et les moyens pour continuer et accomplir nos études et qui a mis dans notre chemin les bonnes personnes et nous a confié aux bonnes mains.*

*Notre promotrice et encadreur **Dr BENAMARA M.**, qui a bien voulu nous encadrer et a veillé au grain au bon suivi de notre travail par son expertise, ses précieux conseils et ses orientations. Merci pour votre motivation, votre grande gentillesse, vos encouragements très précieux et votre soutien sans faille. Vous êtes une personne exceptionnelle de qui on a beaucoup appris, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. On tient à exprimer toute notre reconnaissance, que Dieu vous apporte bonheur et santé.*

*Au **Pr OUKID S.**, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant la présidence du jury, veuillez croire professeur à notre respectueuse considération.*

*Au membre du jury **Dr BEROUAKEN S.**, d'avoir bien voulu évaluer et examiner notre travail, veuillez croire en l'expression de notre vive reconnaissance et de notre respectueuse gratitude.*

Nous remercions également :

***Madame Pr ABDI S.**, chef de service du laboratoire central CHU Frantz Fanon Blida, qui nous a permis de travailler dans de très bonnes conditions au sein du service.*

***Monsieur le Professeur BELOUNI R.**, Vous nous avez toujours reçus avec une immense sympathie. Recevez ici, l'expression de notre reconnaissance et notre profond respect.*

***Dr MAHFOUD M.** pour votre soutien et vos conseils.*

Merci à vous tous

Dédicace

Ce travail est dédié à nos parents et nos amis.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures	III
Liste des tableaux.....	IV
Table des abréviations.....	V
Glossaire.....	VIII
Résumé	
Introduction / Problématique	
Chapitre I : Généralités sur les hémocultures.....	1
I.1. Historique sur les hémocultures	2
I.2. Définitions liées au processus d'hémoculture.....	3
I.3. Indications	3
I.4. Techniques et procédés	4
4.1. Prélèvement de sang pour hémoculture	4
4.2. Type de bouillon et additifs pour favoriser la croissance	5
4.2.1. Bouillon d'hémoculture.....	5
4.2.2. Résines et charbon.....	8
I.5. Incubation et traitement des flacons inoculés	9
Chapitre II : Causes de fausse négativité des hémocultures et solutions possibles ..	10
II.1. Volume de sang à prélever.....	11
1.1. Recommandations pour les adultes.....	12
1.2. Recommandations pour les enfants	13
II.2. Impact de l'administration des antibiotiques sur la positivité des hémocultures	14
II.3. Impact des délais d'incubation et de la température de stockage sur les résultats des hémocultures	16
II.4. Durée d'incubation	18
II.5. Détection de la croissance.....	19
5.1. Utilité du repiquage à l'aveugle.....	19

5.2. Repiquages terminaux.....	20
5.3. Signal sans croissance sur le repiquage	21
II.6. Agitation des flacons manuels et réduction de délai de détection des micro-organismes	22
II.7. Recommandation pour augmenter la sensibilité des hémocultures	23

Chapitre III : Causes de la contamination des hémocultures et recommandations

preventive 25

III.1. Sources de contamination des hémocultures	26
III.2. Apport de l'hémoculture.....	26
III.3. Méthodes de classification des contaminants.....	27
3.1. Identité du micro-organisme	28
3.2. Nombre de paires d'hémoculture positives	29
3.3. Nombre des flacons d'hémocultures positives dans une série	30
3.4. Temps de positivité.....	30
3.5. Phénotypage, profil de génotypage.....	31
III.4. Recommandations pour la prévention de la contamination des hémocultures.....	35

Chapitre IV : Optimisation de la recherche des streptocoques déficients (NVS)

dans les hémocultures 37

IV.1. Généralité sur l'endocardite infectieuse.....	38
IV.2. Rôle de l'hémoculture dans le diagnostic de l'endocardite infectieuse.....	38
IV.3. Implication de streptocoques nutritionnellement déficients dans l'endocardite infectieuse.....	42
IV.4. Diagnostic microbiologiques des NVS	43
IV.5. Recommandations pour optimiser la recherche de NVS dans les hémocultures	47

Conclusion

Annexes..... IX

Bibliographie

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Formule chimique du polyanéthol sulfonate de sodium (SPS).....	7
Figure 2 : Flacon d'hémoculture BACTEC aérobie, présentant les résines adsorbantes et échangeuses de cations au fond.....	8
Figure 3 : Influence du volume de sang prélevé sur la sensibilité de l'hémoculture	12
Figure 4 : Impact de l'administration d'antibiotiques sur la positivité de l'hémoculture au début de la bactériémie.....	15
Figure 5 : Délai de positivité à partir du moment de l'inoculation pour les hémocultures automatisées	18
Figure 6 : Temps de positivité (TTP) pour les flacons d'hémoculture positifs avec le système automatisé « BacT/Alert Virtuo »	19
Figure 7 : Traitement en laboratoire des flacons d'hémoculture manuels.....	21
Figure 8 : Schéma et fonction des dispositifs de déviation de l'échantillon initial	36
Figure 9 : Vue d'ensemble de la croissance phénotypique d' <i>Abiotrophia defectiva</i>	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition du milieu des flacons d'hémoculture manuels	6
Tableau 2 : Volumes de sang recommandés pour la culture chez les enfants	14
Tableau 3 : Probabilité de représenter une contamination	29
Tableau 4 : Exemples d'interprétation des résultats d'hémocultures avec le prélèvement multiple.....	32
Tableau 5 : Exemples d'interprétation des résultats d'hémocultures avec le prélèvement unique	33
Tableau 6 : Revue de la littérature sur le délai de positivité des hémocultures de patients atteints d'endocardite infectieuse causée par NVS	41
Tableau 7 : Schémas de croissance, de réaction biochimiques et de sensibilité des bactéries de type <i>Streptococcus</i> fréquemment isolées	46

TABLE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHA : American Heart Association

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ASM : American Society of Microbiology

BC : Blood culture (Hémoculture)

BHI : Brain heart infusion (Bouillon cœur-cerveille)

BSAC : British Society for Antimicrobial Chemotherapy

Cha : Choline acetyltransferase

CLIN : Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CO₂ : Dioxyde de carbone

COVID-19 : Coronavirus disease 2019

CRO : Ceftriaxone

ECM : Extracellular matrix (Matrice extracellulaire)

EI : Endocardite infectieuse

GSC : Gélose au sang cuit

GSF : Gélose au sang frais

HACEK : *Haemophilus spp.*, *Aggregatibacter spp.*, *Cardiobacterium spp.*, *Eikenella spp.* et *Kingella spp.*

HCV : Hepatitis C Virus (Virus de l'hépatite C)

HIC : High-income countries (pays à revenu élevé)

HIV : Human immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience humaine)

IC : Intervalle de confiance

IDSA : Infectious Disease Society of America

IgG : Immunoglobuline G

IVU : Infection des voies urinaires

LAP : Leucine aminopeptidase

MALDI-TOF MS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry (spectrométrie de masse via désorption et ionisation par source d'ionisation laser assistée par une matrice, couplée à un analyseur à temps de vol)

MSS : Multi-sampling strategy (Stratégie de multi-échantillonnage)

NaCl : Chlorure de sodium

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NVS : Nutritionally Variant Streptococci

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCN : Pénicilline

PCR : Polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase)

PRFI : Pays à revenu faible et intermédiaire

PSM : Poste de sécurité microbiologique

PYR : Pyrrolidonyl aminopeptidase

R : Résistant

S : Sensible

SCN : *Staphylococcus* à coagulase négative

SPS : Sodium polyanéthole sulfonate (Polyanéthole sulfonate de sodium)

SSS : Single-sampling strategy (Stratégie d'échantillonnage unique)

TSB : Tryptic soy broth

TTP : Time to positivity (Temps de positivité)

UFC : Unité formant colonie

V : Variable

VAN : Vancomycine

VPP : Valeur prédictive positive

GLOSSAIRE

Abcès : Est une accumulation douloureuse de pus, généralement causée par une infection bactérienne. Les abcès peuvent se développer n'importe où dans le corps.

Anémie iatrogène : Également connue sous le nom " Anémie nosocomiale ", est une affection dans laquelle une personne développe une anémie due à des interventions médicales, le plus souvent des prélèvements sanguins répétés.

Antibiothérapie : Un traitement par antibiotique.

Antibiotype : Ensemble des caractères résistant aux antibiotiques.

Arthrite septique : Est une infection douloureuse d'une articulation qui peut provenir de germes qui voyagent dans la circulation sanguine à partir d'une autre partie du corps. L'arthrite septique peut également survenir lorsqu'une blessure pénétrante, telle qu'une morsure d'animal ou un traumatisme, libère des germes directement dans l'articulation.

Bactérie commensale : Une bactérie est dite commensale lorsqu'elle vit au contact de l'organisme sans provoquer de troubles. Ces bactéries peuvent provenir de l'environnement ou d'autres organismes.

Bactériémie intermittente : Épisode de bactériémie dû au même micro-organisme qui est détecté par intermittence chez le même patient en raison d'un cycle de clairance et de récurrence.

Bactériémie persistante : Bactériémie qui accompagne l'endocardite ou d'autres infections endovasculaires telles que la thrombophlébite suppurée ou d'autres infections provenant d'un cathéter intravasculaire infecté.

Bactériémie transitoire : Est souvent asymptomatique, mais peut déclencher de la fièvre. L'apparition d'autres signes cliniques suggère habituellement une infection plus grave, comme un sepsis ou un choc septique

Cellulite : Est une infection grave qui se propage sous la peau, s'attaquant aux tissus mous comme la peau et à la graisse sous-jacente.

Choc septique : La dernière forme de septicémie, est une complication grave qui peut inclure une pression artérielle très basse, un état mental altéré et un dysfonctionnement des organes.

Cholangite : Est une inflammation du système des voies biliaires. Le système des voies biliaires transporte la bile de votre foie et de votre vésicule biliaire dans la première partie de l'intestin grêle (le duodénum). Dans la plupart des cas, la cholangite est causée par une infection bactérienne et survient souvent soudainement.

Diplocoque : Les diplocoques sont des bactéries que l'on retrouve sous forme de petits grains de café identiques accolées deux à deux à l'observation au microscope.

Électrophorèse sur gel en champ pulsé : Est une technique de génotypage puissante utilisée pour la séparation de grosses molécules d'ADN (ADN génomique entier) après digestion avec des enzymes de restriction uniques et application à une matrice de gel sous le champ électrique qui change périodiquement de direction.

Endocardite : Infection de la couche interne du cœur, l'endocarde, impliquant souvent les valves cardiaques.

Endothélium du cœur : Une fine membrane qui tapisse l'intérieur du cœur et des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales libèrent des substances qui contrôlent la relaxation et la contraction vasculaires ainsi que des enzymes qui contrôlent la coagulation du sang, la fonction immunitaire et l'adhérence des plaquettes.

Épisode de bactériémie : Un épisode de bactériémie est défini comme : (1) la récupération initiale d'un agent pathogène dans une hémoculture, (2) la récupération d'un agent pathogène différent de l'agent pathogène initial ≥ 48 h après la récupération de l'agent pathogène initial, ou (3) la récupération du même pathogène après un intervalle d'au moins 14 jours depuis la culture précédente avec ce pathogène.

Fibronectine : Classe de glycoprotéines présente dans la matrice extracellulaire et qui joue un rôle clé dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire.

Fongémie : Présence de champignons viables dans le sang.

Histopathologie : Est le diagnostic et l'étude des maladies des tissus et consiste à examiner les tissus et/ou les cellules au microscope.

Infection nosocomiale : Infection associée aux soins. Elle se manifeste au cours ou au décours d'une hospitalisation. Elle doit donc impérativement être absente à l'admission du patient dans l'établissement et se déclarer au minimum 48 h après l'admission.

Méningite : Est une infection grave des méninges, les membranes qui recouvrent le cerveau et la moelle épinière. La maladie peut être causée par de nombreux agents pathogènes différents, notamment des bactéries, des champignons ou des virus, mais la charge mondiale la plus élevée est observée avec la méningite bactérienne.

Organismes exigeants : Organismes nécessitant des conditions nutritionnelles et d'incubation spéciales pour la culture (par exemple, ajout de certains nutriments, incubation dans une atmosphère de dioxyde de carbone).

Ostéomyélite : Est une infection osseuse causée par des bactéries ou des champignons. Il provoque un gonflement douloureux de la moelle osseuse, le tissu mou à l'intérieur de vos os.

Phénomène de satellitisme : Croissance améliorée au contact de colonies de certaines bactéries produisant un facteur de croissance.

Pléomorphisme : Est la capacité de certains micro-organismes à modifier leur morphologie, leurs fonctions biologiques ou leurs modes de reproduction en réponse aux conditions environnementales.

Pneumonie : Est une forme d'infection respiratoire aiguë qui affecte les poumons. Les poumons sont constitués de petits sacs appelés alvéoles, qui se remplissent d'air lorsqu'une personne en bonne santé respire. Lorsqu'un individu souffre de pneumonie, les alvéoles sont remplies de pus et de liquide, ce qui rend la respiration douloureuse et limite l'apport d'oxygène.

Poste de sécurité microbiologique : Une enceinte de sécurité biologique créer un flux d'air entrant et descendant qui assure la protection de l'opérateur. Principalement utilisée pour la manipulation d'échantillons biologiques pathogènes ou pour des applications nécessitant une zone de travail stérile.

Pyélonéphrite : Est un type d'infection des voies urinaires (IVU) qui commence généralement dans l'urètre ou la vessie et se propage à l'un ou aux deux reins. Une infection rénale nécessite une attention médicale rapide.

Taxonomie : Science de la catégorisation ou de la classification.

Traitement empirique : Un traitement médical ou une thérapie basée sur l'expérience et, plus spécifiquement, une thérapie commencée sur la base d'une « supposition éclairée » clinique, avant les résultats de laboratoire.

Végétation cardiaque : Une excroissance pathologique qui se développe sur une valvule cardiaque à l'occasion de certaines pathologies comme l'endocardite infectieuse.

Valve cardiaque : Une valve cardiaque est un élément du cœur séparant les différentes cavités cardiaques et assurant la bonne circulation du sang entre les différentes cavités cardiaques.

RÉSUMÉ

La bactériémie est une affection grave et redoutée, du fait d'une mortalité associée élevée. Les hémocultures sont considérées comme la méthode de référence pour le diagnostic de la bactériémie et font partie des fonctions les plus importantes du laboratoire de microbiologie clinique.

Des hémocultures négatives signent dans la plupart des cas l'absence de bactéries dans le sang. Toutefois, devant un contexte clinique évocateur de syndrome infectieux, il faut toujours garder à l'esprit que l'hémoculture peut être faussement négative, du fait d'un prélèvement effectué au moment non optimal ou sous antibiothérapie, quantité de sang ensemencée insuffisante, longue durée de stockage avant l'incubation, ... Cette thèse fait le point sur les données récentes pour éviter les faux négatifs, et améliorer le temps et le rendement des hémocultures.

Dans cette thèse, nous présentons aussi une discussion approfondie des questions liées au problème de la contamination des hémocultures. Les questions abordées comprennent la portée et l'ampleur du problème, les bactéries les plus souvent reconnues comme des contaminants, l'impact de la contamination des hémocultures sur le fonctionnement du laboratoire de microbiologie clinique, et, peut-être le plus important, une discussion systématique des solutions au problème.

Mots clés : hémoculture, sang, bactériémie, contamination de l'hémoculture.

ABSTRACT

Bacteremia is a serious and dreaded condition, due to the high associated mortality. Blood cultures are regarded as the gold standard for diagnosis of bacteremia and are among the most important functions of the clinical microbiology laboratory.

Negative blood cultures sign in most cases the absence of bacteria in the blood. However, faced with a clinical context suggestive of an infectious syndrome, it should always be borne in mind that the blood culture may be falsely negative, due to a sample taken at the non-optimal time or under antibiotic therapy, insufficient quantity of blood inoculated, long storage time before incubation, ... This thesis reviews recent data to avoid false negatives, and improve the time and yield of blood cultures.

In this thesis, we also present a comprehensive discussion of matters related to the problem of blood culture contamination. Issues addressed include the scope and magnitude of the problem, the bacteria most often recognized as contaminants, the impact of blood culture contamination on clinical microbiology laboratory function, and, perhaps most importantly, a systematic discussion of solutions to the problem.

Keywords : blood culture, blood, bacteraemia, blood culture contamination.

INTRODUCTION / PROBLÉMATIQUE

Dans des conditions normales, le sang est stérile. Des infections sévères localisées ou systémiques peuvent entraîner la pénétration de micro-organismes dans la circulation sanguine. Cette présence de bactéries dans le sang est appelée « bactériémie » [1]. La plupart du temps, ces bactéries sont rapidement éliminées par le système immunitaire. Dans le cas d'infections massives ou de foyers d'infection intravasculaires, le système immunitaire peut être incapable d'éliminer les bactéries du sang, ce qui entraîne une infection du sang ou bactériémie [2].

La bactériémie est une cause majeure de morbidité, de réadmission à l'hôpital et de mortalité [3]. Les hémocultures sont le principal outil de diagnostic pour identifier les agents responsables de la bactériémie. Cependant, 28 % à 49 % des patients atteints de sepsis sévère sont négatifs pour un agent pathogène bactérien [4]. Une évaluation de plus de 6 millions de cas de bactériémie sévère a révélé que les résultats négatifs à la culture étaient en corrélation avec un nombre accru de comorbidités, un dysfonctionnement des organes et un taux de mortalité plus élevé [5].

Les micro-organismes responsables de cette infection peuvent être identifiés par hémoculture. Une hémoculture consiste en un échantillon de sang d'un patient, suspecté d'avoir une infection du sang, qui est inoculé dans un flacon d'hémoculture spécialisé contenant un bouillon qui favorise la croissance optimale des bactéries. La concentration de bactéries dans le sang des patients atteints d'une bactériémie est très faible [2], la culture directe de sang sur gélose ne permet donc pas de détecter la présence de bactéries. Une fois que le sang est inoculé dans le flacon d'hémoculture, une amplification supplémentaire des bactéries peut avoir lieu, conduisant finalement à une croissance bactérienne visible [6].

Néanmoins, dans certains cas, les hémocultures sont faussement négatives ou faussement positives, et ce pour plusieurs raisons, engendrant des conséquences cliniques et économiques fâcheuses.

C'est dans ce contexte, et dans un but d'optimisation de la méthode de l'hémoculture que nous avons choisi ce thème, relatant dans une revue de littérature, les causes de fausses positivité et de fausses négativité de la dite méthode, et une proposition de recommandations afin d'améliorer le diagnostic étiologique des bactériémies, ce qui peut être salutaire pour bon nombre de patients.

Chapitre I :

Généralités sur les hémocultures

1. Historique sur les hémocultures :

On ne sait pas exactement quand les hémocultures ont commencé à être exécutées. Avant 1880, l'hémoculture était limitée à une goutte de sang prélevée au bout du doigt et était principalement utilisée dans la fièvre puerpérale et l'endocardite [7].

Dès 1880, il était reconnu que la quantité de bactéries dans le sang était faible et que la collecte d'un volume suffisant était critique, ce qui suggérait d'augmenter le nombre de piqûres. Lorsque la seringue stérilisable a été inventée (vers 1886), les médecins ont pu prélever de manière aseptique de plus grands volumes de sang et la technique de l'hémoculture a progressé [7].

Au début du XXe siècle, le processus d'hémoculture était une pratique répandue chez les patients septiques, et des recommandations détaillées sur la préparation de la peau du patient, le volume de sang à prélever, les milieux et le nombre de flacons à inoculer ont été publiées. Jusqu'aux années 1970, aucun changement majeur au-dessus de la technique classique de l'hémoculture n'a été apporté [7].

Basée sur le principe de détection radiospirométrique des bactéries développé par la National Aeronautics and Space Administration (NASA) pour identifier la vie microbienne dans le sol martien, la première technologie d'hémoculture automatisée, le détecteur de croissance Bactec™ (Becton Dickinson) a été inventé.

Basé sur la détection colorimétrique des changements de pH secondaires à la croissance microbienne et introduit en 1990, le BacT/Alert (Organon Teknika Corporation) a été le premier système d'hémoculture entièrement automatisé et surveillé en continu [8]. Le système ESP BC (Difco) [9] lancé en 1994 surveillait l'évolution de la pression de l'espace de tête du flacon secondaire au métabolisme microbien via un capteur de pression électronique relié au septum du flacon par un événement stérile, et le système VITAL introduit par bioMérieux, a incorporé une molécule fluorescente dont la conformation s'est altérée en raison des changements de pH, des variations du potentiel redox et de la production de CO₂ [10]. Ainsi, le début de l'ère de la surveillance continue de l'hémoculture a été marqué conjointement par BacT/Alert, BACTEC série 9000, ESP et VITAL.

2. Définitions liées au processus d'hémoculture :

Hémoculture : Échantillon de sang prélevé par une ponction veineuse (éventuellement divisé en plusieurs flacons d'hémoculture) pour la culture de micro-organismes, inoculé dans un bouillon nutritif qui favorise la croissance optimale des bactéries.

Système d'hémoculture manuel : Les systèmes d'hémoculture dits « manuels » reposent sur l'utilisation de flacons d'hémoculture appropriés, sans utiliser d'équipement automatisé, qui sont placés dans un incubateur statique conventionnel et sont inspectés quotidiennement pour détecter visuellement les signes de croissance de micro-organismes.

Système d'hémoculture biphasique : Système d'hémoculture dans lequel un seul flacon se compose d'une phase de bouillon liquide et d'une phase de gélose solide; conçu pour que la gélose puisse être irriguée (et inoculée) avec le milieu de bouillon (Annexe 1.).

Système d'hémoculture automatisé : Système d'hémoculture qui utilise un équipement (un incubateur automatisé) pour l'incubation, l'agitation et la surveillance des flacons d'hémoculture pour la croissance microbienne.

3. Indications :

Les hémocultures sont indiquées chaque fois qu'il y a une suspicion clinique de bactériémie, endocardite infectieuse, paludisme ou infection localisée avec une évolution systémique, par exemple : ostéomyélite, méningite, arthrite septique, pneumonie chez les patients hospitalisés, infections des voies urinaires (p.ex., pyélonéphrite compliquée), abcès, infections de cathéter, infections gastro-intestinales (p.ex., cholangite), cellulite sévère [6].

Dans une tentative d'améliorer la sensibilité, Shapiro et al. ont développé une règle de décision clinique complexe qui combinait des variables de l'histoire du patient, des signes vitaux et des tests de laboratoire de base pour classer les patients dans des groupes à faible ou à haut risque. Leurs critères de faible risque se sont révélés être respectivement de 98 % et 97 % de sensibilité dans la dérivation et la validation d'origine [11].

Critères de Shapiro, Bas risque : 0-1 point. Risque intermédiaire : 2-5 points.

Haut risque : 6 points ou plus [12] :

✚ Critères majeurs :

- ✓ Suspicion d'endocardite (3 points) ;
- ✓ Température > 39,4 °C (3 points) ;
- ✓ Cathéter à demeure (2 points).

✚ Critères mineurs (1 point chacun) :

- ✓ Température 38,3 °C - 39,3 °C ;
- ✓ Âge > 65 ans ;
- ✓ Des frissons ;
- ✓ Vomissement ;
- ✓ Pression artérielle systolique < 90 mmHg ;
- ✓ Nombre de globules blancs > 18 000/ μ L ;
- ✓ Créatinine > 2 mg/dL ;
- ✓ Numération plaquettaire < 150 000/ μ L ;
- ✓ Neutrophiles > 80 % ;
- ✓ Formes de bandes > 5 %.

En fonction de critères majeurs et mineurs, le score de Shapiro permet de classer les patients à risque de bactériémie en trois catégories : ceux à bas risque (0,6 %), ceux à moyen risque (6,8 %) et ceux à haut risque (25,6 %). Les auteurs proposent de prélever une hémoculture chez les patients ayant 2 points ou plus et de s'abstenir chez les patients à bas risque [13].

Des études récentes montrent que l'adoption du score de Shapiro pour prédire la bactériémie a une sensibilité élevée [11,12].

4. Techniques et procédés :

4.1. Prélèvement de sang pour hémoculture :

Le processus de collecte de sang pour l'hémoculture est très important pour la qualité des résultats [14]. Pour les établissements de santé, le protocole de prélèvement des hémocultures doit être validé par le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN), après concertation avec le personnel de santé [15].

La ponction veineuse est la seule méthode valable pour prélever le sang en vue d'une culture bactériologique ou mycologique. Les autres sites de prélèvement, notamment à travers un dispositif intra-vasculaire, augmentent significativement la fréquence des contaminants et ne permettent pas d'établir un diagnostic de bactériémie ou de fungémie (distinction impossible entre infection et colonisation du dispositif). Ils sont déconseillés [15,16].

Il est impératif de réduire au minimum aussi bien le risque de contamination de l'échantillon de sang que le risque d'exposition au sang du préleveur (HCV, HIV) [17-19]. Les principales étapes sont les suivantes [15] :

- ✓ Porte de la chambre fermée ;
- ✓ Respect des précautions standards ;
- ✓ Lavage ou désinfection des mains du préleveur ;
- ✓ Port de gants non stériles ;
- ✓ Désinfection de l'opercule des flacons d'hémoculture et du point de ponction (de manière centrifuge) avec un produit approprié ;
- ✓ Ne plus palper la veine après cette étape ;
- ✓ Prélèvement du sang en contrôlant le bon remplissage des flacons, et en commençant par le remplissage du flacon aérobie afin d'évacuer l'air présent dans la tubulure avant d'ensemencer le flacon anaérobie [30] ;
- ✓ Identification correcte de l'ensemble des flacons.

Il est conseillé d'utiliser des antiseptiques alcooliques (chlorhexidine alcoolique de préférence) d'efficacité équivalente ou supérieure à celle des antiseptiques non-alcooliques [20-22]. L'étape du séchage de l'antiseptique est l'étape critique à respecter (voir [Annexe 2.](#)) [15,22].

Il est recommandé de réaliser les prélèvements de sang avant ou à distance de l'administration d'antibiotique ou d'antifongique [23,24].

4.2. Type de bouillon et additifs pour favoriser la croissance :

4.2.1. Bouillon d'hémoculture :

La caractéristique la plus importante d'un flacon d'hémoculture est qu'il doit soutenir de manière adéquate la croissance bactérienne. À cet effet, une variété de bouillons de peptides et d'additifs sont disponibles ([Tableau 1.](#)). Il n'existe pas de milieu de bouillon « optimal » unique; la plupart des bouillons contiennent du dextrose et des molécules peptidiques complexes d'origine

animale. Les bouillons d'hémoculture qui favorisent la croissance d'un large éventail d'espèces bactériennes comprennent le bouillon de soja trypsique, également connu sous le nom de bouillon de digestion de caséine de soja, le bouillon de peptone supplémenté et le bouillon d'infusion cœur-cervele. D'autres bouillons couramment utilisés tels que le bouillon au thioglycolate, le bouillon au thiol, le bouillon Columbia et Brucella (hypertonique) sont également adéquats pour la récupération bactérienne [25]. Pour les bactéries anaérobies, le bouillon Columbia, les bouillons peptonés pré-réduits, les bouillons au thioglycolate et les bouillons au thiol sont avantageux, supposément basés sur leur faible potentiel redox [26].

Tableau 1. Composition du milieu des flacons d'hémoculture manuels [6] :

Milieu ou composant/additifs	Commentaire
MILIEU DE CULTURE	
Thioglycolate	Favorise la croissance des anaérobies
Bouillon Tryptic Soja (TSB)	Milieu à usage général, favorise les espèces de <i>Pseudomonas</i>
Bouillon au thiol	Favorise la croissance des espèces de <i>Streptococcus</i>
Infusion cœur-cervele (BHI)	Milieu à usage général, facilite la récupération des levures et des organismes Gram-positif
Bouillon Columbia	Milieu à usage général, favorise la croissance des anaérobies
Bouillon peptoné supplémenté	Support à usage général; supérieur au TSB pour la plupart des agents pathogènes courants en hémoculture
Milieu hypertonique (bouillon Brucella)	Soi-disant améliore la stabilité cellulaire et augmente les taux de récupération de certaines bactéries, y compris <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , espèces de <i>Candida</i> ; les preuves concernant son efficacité sont mitigées
ADDITIFS	
Polyanéthol sulfonate de sodium (SPS)	Anticoagulant; Le SPS (Figure 1.) inhibe également le lysozyme, inactive les concentrations cliniquement réalisables de certains antibiotiques aminosides et polymyxines, inhibe des parties de la cascade du complément et inhibe la phagocytose. Des concentrations plus élevées de SPS, tout en favorisant la récupération des cocci Gram-positif, diminuent la récupération des bactéries Gram-négative. Certaines espèces de bactéries sont inhibées par le SPS, telles que les espèces

Neisseria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Moraxella catarrhalis* et *Gardnerella vaginalis*

Gélatine	Contrecarre l'inhibition de la croissance des espèces bactériennes par le SPS <i>in vitro</i> . Les preuves de son efficacité clinique ne sont cependant pas solides
Extrait de levure	Favorise la croissance bactérienne
Saponine	Agent lytique (utilisé dans le système de lyse-centrifugation); améliore la récupération des espèces de <i>Streptococcus</i>
Hémine (facteur X)	Favorise la croissance d'organismes exigeants tels que les espèces <i>Haemophilus influenzae</i> et <i>Neisseria</i>
NAD (facteur V)	Favorise la croissance d'organismes exigeants tels que les espèces <i>Haemophilus influenzae</i> et <i>Neisseria</i>
Pyridoxine	Favorise la croissance des organismes dépendants de la pyridoxine tels que certaines espèces de <i>Streptococcus</i>
Acide para-aminobenzoïque	Inhibe l'effet des antibiotiques sulfamides
Cystéine	Agent réducteur; améliore la récupération des bactéries anaérobies et <i>Streptococcus pneumoniae</i>

Concernant le volume de bouillon, un rapport sang-bouillon de 1:5 à 1:10 doit être respecté pour optimiser la croissance. Chez les enfants, des rapports sang-bouillon plus élevés (par exemple, 1:50 à 1:100) sont acceptables [6].

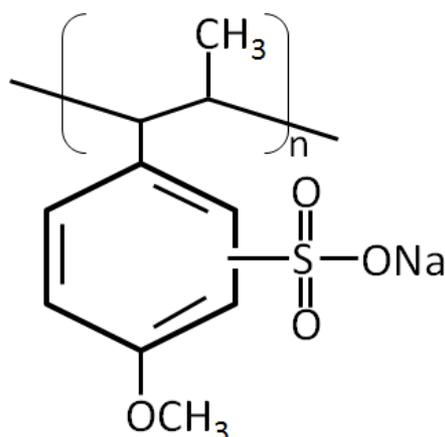


Figure 1. Formule chimique du polyanéthol sulfonate de sodium (SPS), anticoagulant présent dans le milieu BACTEC [27].

4.2.2. Résines et charbon :

Toutes les lignes directrices sur la prise en charge du sepsis soulignent l'importance de prélever du sang pour l'hémoculture avant l'administration d'antibiotiques [23,24]. L'impact négatif de l'utilisation d'antibiotiques avant le prélèvement sur le rendement des hémocultures est important, car la présence d'antibiotiques dans le sérum peut inhiber la croissance des bactéries [24]. Les résines sont utilisées pour contrer l'effet des antibiotiques sur la croissance des bactéries dans le bouillon (Figure 2.).



Figure 2. Flacon d'hémoculture BACTEC aérobie, présentant les résines adsorbantes et échangeuses de cations au fond [28].

Les résines et le charbon de bois sont efficaces pour augmenter les taux de récupération microbienne. Plus de micro-organismes, en particulier les staphylocoques et les levures, sont récupérés à partir des formulations avec ces additifs, par rapport aux formulations non supplémentées [6]. La plupart des résines sont formulées sous forme de polyvinyle et de benzène hautement poreux dans une perle sphérique; il existe des résines échangeuses d'ions cationiques et des résines adsorbantes polymères [25]. En plus de la liaison des agents antibiotiques, les billes de résine fournissent une surface supplémentaire pour la croissance bactérienne et aident à filtrer et à lier les composants de la cascade du complément. Les formulations exactes et l'équilibre entre les ratios de nutriments et de résines sont souvent exclusifs et donc inconnus [6].

Dans les systèmes automatisés, les bouillons additionnés de résine sont supérieurs aux bouillons généraux et aux bouillons contenant du charbon de bois. Il est important de noter que les résines n'interfèrent pas autant avec la coloration et la lecture de Gram que le charbon de bois [6].

5. Incubation et traitement des flacons inoculés :

Une incubation à 35 °C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. La lecture est visuelle et doit être réalisée deux fois par jour au cours des 72 premières heures, puis seulement une fois par jour pour les 4 jours suivants [29]. L'observateur va rechercher la présence d'un trouble du milieu provoqué par la croissance bactérienne (bacilles à Gram négatif aérobies, *Staphylococcus spp.* et *Bacteroides spp.*), d'une hémolyse (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.* et *Bacillus spp.*), d'un coagulum (*Staphylococcus aureus*), de colonies au fond du flacon (*Streptococcus spp.* et *Nocardia spp.*), de production de gaz (bactéries aéro-anaérobies facultatives et anaérobies strictes). Certains genres bactériens comme *Brucella*, *Haemophilus*, *Neisseria* et *Campylobacter* troublent peu ou pas le bouillon de culture (voir [Annexe 3.](#)) [30].

En revanche, pour les systèmes automatisés, une incubation de 5 jours suffit. Au-delà de ce délai, les bactéries détectées sont généralement des contaminants qui étaient en très faible quantité [30].

Les systèmes automatisés actuels affichent de meilleures performances que les systèmes manuels en termes de rendement et surtout de vitesse de croissance [31,32].

La prolongation de l'incubation autrefois recommandée pour des micro-organismes particuliers comme les bactéries du groupe HACEK (*Haemophilus aphrophilus/paraphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et le genre *Kingella*) et *Brucella spp.* ou lorsqu'une endocardite est soupçonnée, n'est plus d'actualité du fait de la sensibilité actuelle des systèmes automatisés [30].

La lecture par réflectométrie, par fluorescence ou par détecteur de variation de pression toutes les 10 minutes à la recherche du CO₂ produit dans les flacons permet d'obtenir une représentation graphique au cours du temps. Un flacon sera alors détecté positif si sa production de CO₂ augmente au cours du temps de façon exponentielle [6].

Devant toute suspicion de positivité (système manuel ou automatique), un examen microscopique (état frais et coloration de Gram) et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Tout flacon considéré comme positif doit impérativement être manipulé sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) (voir [Annexe 4.](#)) [30].

Chapitre II :

**Causes de fausse négativité des
hémocultures et solutions possibles**

La capacité limitée à prédire une bactériémie en fonction de l'appréciation clinique et la crainte d'omettre ce diagnostic génèrent une large prescription des hémocultures et un faible rendement, avec 92 à 96 % des prélèvements qui reviennent négatifs [33]. Ce taux élevé de cultures stériles reflète le plus souvent l'absence de bactériémie. Cependant, il ne faut pas méconnaître le risque de faux négatif.

Devant un contexte clinique évocateur de sepsis ou d'endocardite infectieuse, il faut toujours penser à une fausse négativité. Les causes d'échec de cultures sont nombreuses : prélèvement effectué au moment non optimal, trop tardivement au cours de la maladie, prélèvement pratiqué sous antibiothérapie, quantité insuffisante de sang cultivé, ou une incubation retardée [30].

1. Volume de sang à prélever :

La variable diagnostique la plus importante affectant la sensibilité des hémocultures est la collecte de quantités suffisantes de sang [4,34]. Des volumes de sang plus élevés entraînent une plus grande récupération de l'organisme (Figure 3.) [13], et certaines études suggèrent que chaque millilitre de sang supplémentaire prélevé peut entraîner une augmentation de 2 à 4 % du taux de positivité [35]. Pour atteindre une sensibilité > 95 %, jusqu'à 60 mL de sang doivent être prélevés [36,37].

La concentration de micro-organismes dans le sang des patients atteints de bactériémie varie entre < 1 unité formant colonie (UFC)/mL à 10 UFC/mL de sang chez les adultes [6]. Pour éviter les cultures bactériennes faussement négatives à cause d'une faible charge bactérienne, il est recommandé d'échantillonner un volume aussi important que possible pour la culture. Plusieurs études ont déjà montré que des volumes plus élevés de sang en culture entraînaient des taux de détection plus élevés [35,36]. Par conséquent, le volume de sang prélevé est un indicateur de qualité important pour les hémocultures et doit être surveillé [38].

Cependant, le prélèvement de grands volumes de sang n'est pas sans risque d'anémie iatrogène chez les enfants [39].

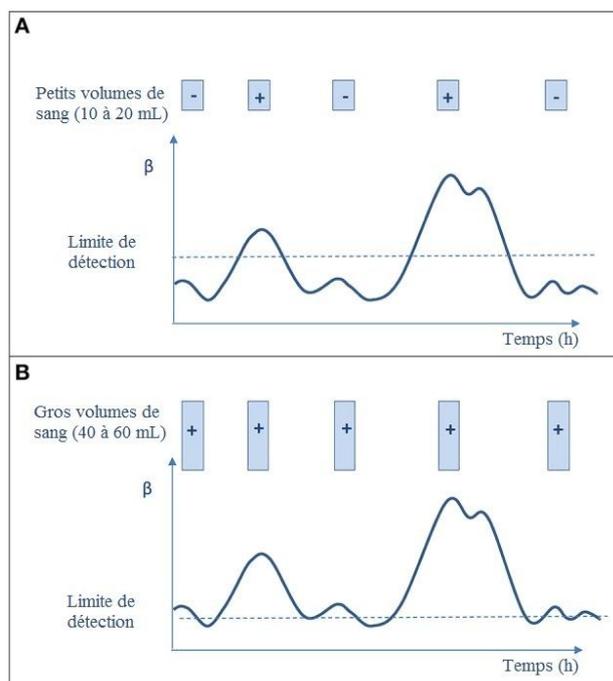


Figure 3. Influence du volume de sang prélevé sur la sensibilité de l'hémoculture [14]. « β » représente la charge bactérienne sanguine, qui varie au cours du temps mais n'est jamais nulle. (A) En cas de prélèvement d'un faible volume de sang (10 à 20 mL), la probabilité d'introduire dans les flacons d'hémoculture un nombre de micro-organismes inférieur à la limite de détection (matérialisée par la ligne pointillée) est plus élevée qu'en cas de prélèvement d'un volume plus conséquent (cas B), (40 à 60 mL).

1.1. Recommandations pour les adultes :

Pour les adultes, les directives actuelles de prise en charge de la bactériémie recommandent le prélèvement d'au moins 2 à 4 séries d'hémocultures (40 à 80 mL de sang), chaque série étant généralement constituée d'un flacon aérobie de 10 mL et d'un flacon anaérobie de 10 mL pour identifier les organismes responsables de la bactériémie [40,41]. Une hémoculture est définie dans ces directives, et dans la plupart des autres, comme le volume de sang prélevé par une ponction veineuse [42]. Une étude récente a confirmé la nécessité de prélever au moins trois hémocultures (ou 60 mL), car ils ont constaté que 7,5 % des épisodes des infections du sang auraient été manqués sans une troisième hémoculture [37].

Une situation particulière en termes de nombre des hémocultures à prélever est la suspicion d'endocardite. Dans ce cas, il est généralement recommandé de prélever trois hémocultures de 20 mL, car cela a permis de détecter 96 à 98 % des bactériémies dans le cadre d'une endocardite [43].

La variable clé est le volume total de sang qui est cultivé, quel que soit du temps et de la fréquence d'échantillonnage. Par exemple, s'il est recommandé de prélever 60 mL de sang pour la

culture, cela peut ne pas faire beaucoup de différence si ces 60 mL sont cultivés en deux hémocultures de 30 mL ou en trois hémocultures de 20 mL [14,36].

1.2. Recommandations pour les enfants :

Chez les enfants, la situation est plus complexe. Le volume de sang qui peut être prélevé en toute sécurité et confortablement chez les enfants est lié à l'âge et au poids de l'enfant (voir Annexe 6.). On a longtemps cru que de très petits volumes de sang étaient suffisants pour l'hémoculture chez les enfants, car les concentrations bactériennes (charge bactérienne) chez les enfants atteints de la bactériémie étaient considérées beaucoup plus élevées que chez les adultes [45,46]. Cependant, certaines études ont montré des proportions de bactériémie de bas niveau (< 10 UFC/mL) chez 23 à 69 % des nourrissons et des enfants [47,48]. Dans cette optique, il a été démontré que l'échantillonnage de volumes plus élevés augmente la sensibilité des hémocultures chez les enfants.

Les dernières directives de l'Infectious Disease Society of America (IDSA) et de l'American Society of Microbiology (ASM) recommandent de prélever 2,5 à 4 % du volume sanguin total des enfants (Tableau 2.) [40]. Cependant, une étude de 2011 suggère que seulement 3,8 % du volume sanguin total peuvent être prélevés en toute sécurité (pour toutes les analyses de laboratoire combinées sur une période de 24 h) chez les enfants au-delà de la période néonatale, et cette valeur de sécurité est encore remise en question par des taux plus élevés de l'anémie chez les enfants [49-51]. Étant donné que de nombreux enfants gravement malades doivent également prélever du sang pour d'autres analyses, le prélèvement de 4 % du volume sanguin total pour l'hémoculture seule ne peut donc pas être recommandé. Plus en accord avec ces préoccupations, le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommande un prélèvement d'un maximum de 1 % du volume sanguin total (pour les nourrissons et les jeunes enfants) [25].

Tableau 2. Volumes de sang recommandés pour la culture chez les enfants [40] :

Poids du patient (kg)	Volume patient total (mL)	Volume de sang recommandé pour l'hémoculture (mL)		Volume total pour la culture (mL)	Pourcentage du volume sanguin total du patient
		Série 1	Série 2		
≤ 1	50–99	2	-	2	4
1,1–2	100–200	2	2	4	4
2,1–12,7	>200	4	2	6	3
12,8–36,3	>800	10	10	20	2,5
>36,3	> 2200	20 – 30	20 – 30	40 – 60	1,8 – 2,7

2. Impact de l'administration des antibiotiques sur la positivité des hémocultures :

Un des principaux facteurs et le plus fréquent associé aux hémocultures négatives est la réception d'antibiotiques au cours des 48 heures qui précèdent le prélèvement [52].

Toutes les lignes directrices sur la prise en charge de la bactériémie soulignent l'importance de prélever du sang pour l'hémoculture avant l'administration d'antibiotiques [23]. L'impact négatif de l'utilisation des antibiotiques avant le prélèvement sur le rendement des hémocultures est important, car la présence d'antibiotiques dans le sérum peut inhiber la croissance des bactéries [24].

Les études portant sur l'impact de l'administration d'antibiotiques sur la positivité de l'hémoculture au début de la bactériémie font défaut [53].

Dans une étude récente, la positivité de l'hémoculture a été réduite de 20 % parmi les hémocultures obtenues au cours de l'antibiothérapie (Figure 4.) [24]. Les données actuelles quantifient la perte d'informations avec le prélèvement d'hémoculture pendant l'antibiothérapie et, par conséquent, la perte potentielle d'informations nécessaires pour effectuer une antibiothérapie sur mesure. Cela implique des problèmes majeurs car l'optimisation des antibiotiques et la désescalade de l'antibiothérapie sont importantes sur la base de l'identification des agents pathogènes. Les résultats de l'analyse non appariée (patients avec des prélèvements effectués avant ou pendant l'antibiothérapie) ont également été confirmés par l'analyse appariée (patients avec des

prélèvements effectués à la fois avant et pendant l'antibiothérapie). Une perte de détection des agents pathogènes (faux négatifs) de 30 % dans ce sous-groupe [24].

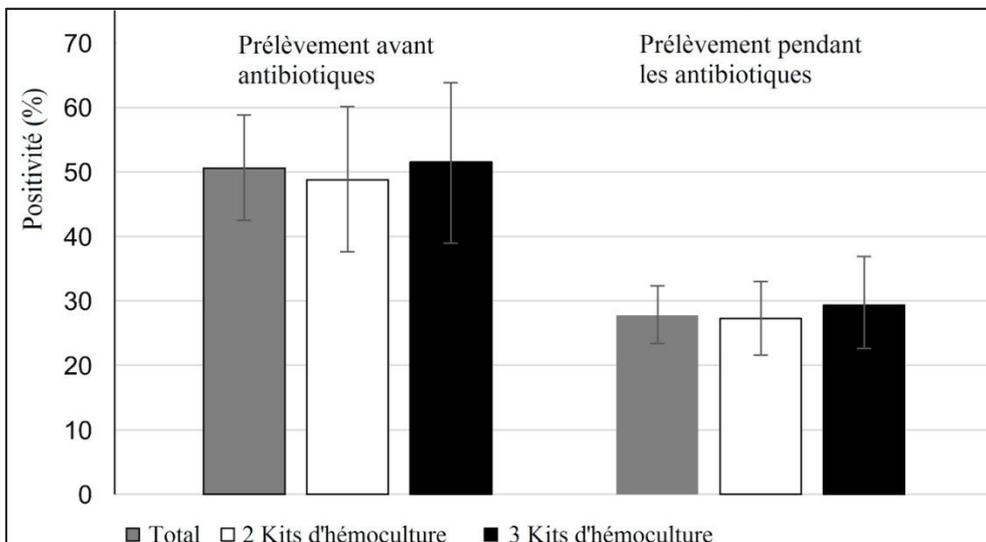


Figure 4. Impact de l'administration d'antibiotiques sur la positivité de l'hémoculture au début de la bactériémie [24]. Les patients dont les échantillons ont été prélevés avant l'administration d'antibiotiques ont été comparés aux patients dont les échantillons ont été prélevés pendant l'antibiothérapie. Découverte d'agents pathogènes au début de la bactériémie tracée sous forme de barres avec un intervalle de confiance (IC) à 95 %.

L'importance d'une antibiothérapie ciblée et ses effets sur la survie ont été démontrés dans de nombreux essais [54,55]. De plus, cette mesure neutralise une sélection de pathogènes résistants [56-58], qui représente également un sérieux problème en réanimation actuelle [59].

Plusieurs lignes directrices recommandent largement l'application empirique d'antibiotiques, démontrant qu'un traitement antibiotique précoces à large spectre associé à la réduction de la mortalité [60-62] et la prévention des chocs [63] chez les patients atteints de bactériémie.

Le désir d'obtenir des cultures avant d'initier un traitement antibiotique doit être mis en balance avec le risque de mortalité lié au retard d'un traitement clé chez les patients gravement malades suspectés de septicémie ou de choc septique qui présentent un risque important de décès [53].

Idéalement, les hémocultures doivent être prélevées avant de commencer les antibiotiques. Cependant, le plus souvent, des antibiotiques ont déjà été administrés aux patients hospitalisés au moment où les hémocultures sont obtenues [64], 28 à 63 % des patients reçoivent déjà une

antibiothérapie lors du prélèvement [65]. Des flacons d'hémoculture contenant des résines fixatrices d'antibiotiques ont été développés pour résoudre ce problème.

Les résines peuvent neutraliser certains agents antibiotiques (y compris les antibiotiques couramment utilisés de manière empirique tels que la pipéracilline-tazobactam, la vancomycine et certaines céphalosporines), mais ont une capacité faible ou nulle à neutraliser d'autres agents (par exemple, les carbapénèmes et les fluoroquinolones) [64,66].

Des études ont conclu que les résines peuvent ne pas éliminer complètement les risques de stérilisation artificielle [64,67], soutenant ainsi la pratique consistant à obtenir des hémocultures lorsque la plus faible concentration d'antibiotique reste dans le système du patient ou juste avant une dose à venir.

3. Impact des délais d'incubation et de la température de stockage sur les résultats des hémocultures :

Une manière relativement simple d'améliorer la vitesse de détection consiste à s'assurer que les flacons arrivent au laboratoire en temps voulu. Il a été démontré qu'une incubation retardée prolonge considérablement le temps de détection et peut conduire à des résultats faussement négatifs dans les systèmes automatisés [14,68], mais le temps critique exact n'a pas été formellement établi. Les lignes directrices recommandent un temps maximal entre l'aiguille et l'incubateur de 2 h [25] à 4 h [42], Le UK Standard for Microbiology Investigations for BCs recommande que les flacons soient placés dans des incubateurs au plus tard 4 h après l'inoculation [69]. Ce n'est pas toujours possible, de nombreux centres ont effectivement observé des temps de transport moyens beaucoup plus longs. Les longues distances et le transport irrégulier des échantillons de laboratoire du site de prélèvement au laboratoire sont fréquents, ce qui entraîne des temps de transport encore plus longs.

Les flacons d'hémoculture doivent être transportés au laboratoire à température ambiante [25,41] ou dans un support thermostable et ne doivent jamais être réfrigérés ou congelés, car de nombreux organismes exigeants sont vulnérables au froid [25,70]. La pré-incubation des flacons d'hémoculture à 35 °C, par exemple dans un petit incubateur du service des urgences, peut accélérer la détection de la croissance dans les systèmes d'hémoculture manuels [71], mais n'est pas conseillée pour les systèmes automatisés car elle peut entraîner des résultats faux négatifs [14]. Cependant, les « températures ambiantes » élevées sont courantes dans les pays à revenu

faible ou intermédiaire (PRFI), ce qui garantit des temps de transport courts lors de l'utilisation de systèmes d'hémoculture automatisés pour éviter les résultats faussement négatifs [72].

Selon Ling CL et al. 2021 [72] : Il n'y avait pas de perte significative de rendement lorsque les hémocultures étaient stockées < 24 h à 25 °C, cependant, un stockage pendant 24 h à 40 °C a diminué les rendements, et des temps de stockage plus longs ont augmenté les temps de détection (Figure 5.). Les hémocultures doivent être incubées avec un délai minimal pour maximiser la récupération des agents pathogènes et la communication des résultats en temps opportun, cependant, les retards inévitables peuvent être gérés pour minimiser les impacts négatifs. Si des retards d'incubation ≥ 12 h sont inévitables, un transport à une température ne dépassant pas 25 °C et des repiquages à l'aveugle avant l'incubation doivent être envisagés.

Pour fournir un environnement relativement protégé à des températures ambiantes, l'utilisation de glacières sans packs de glace offre une option rentable, et de manière prometteuse, Les taux de positivité étaient plus élevés pour les échantillons stockés dans des glacières que pour ceux stockés à 40 °C [72]. Néanmoins, une certaine prudence s'impose dans cette approche, par exemple lors de périodes de température ambiante très élevée ou lorsque l'exposition directe des boîtiers aux rayons du soleil ne peut être évitée. Des températures à l'intérieur des glacières > 40 °C ont été enregistrées précédemment [73].

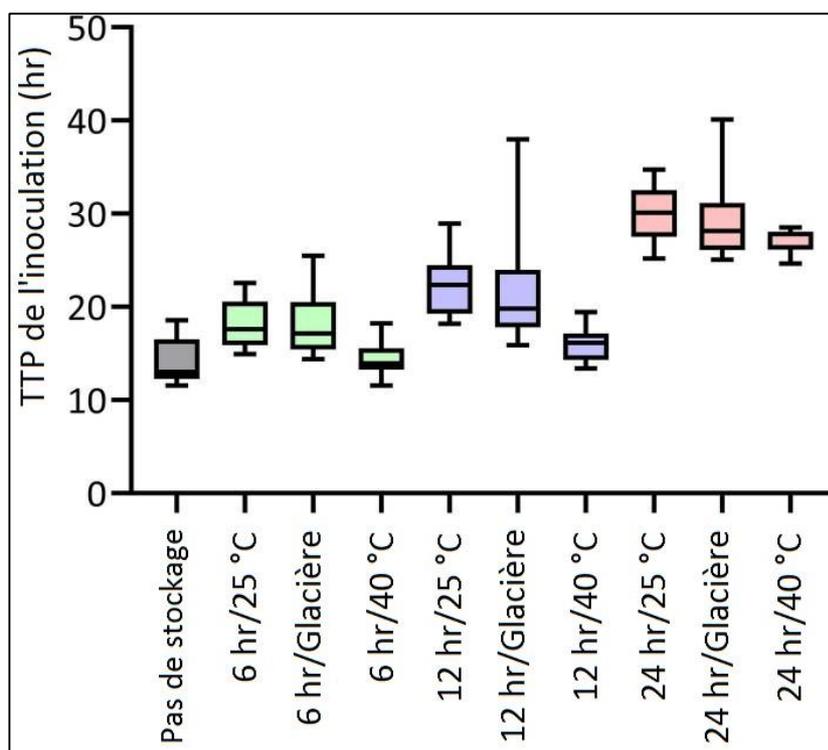


Figure 5. Délai de positivité à partir du moment de l'inoculation pour les hémocultures automatisées [72]. Le graphique en boîte montre le temps de positivité (TTP) pour les hémocultures automatisées pour différentes conditions de stockage.

4. Durée d'incubation :

L'optimisation du temps d'incubation des hémocultures pour minimiser la récupération des hémocultures cliniquement insignifiantes est attrayante, car les contaminants des hémocultures peuvent entraîner une augmentation des coûts des soins de santé, une durée de séjour prolongée et des déchets de laboratoire [74,75].

Les hémocultures sont systématiquement incubées pendant 4 à 7 jours. Des études indiquent que 98 % à 99 % des véritables agents pathogènes sont détectés dans les 5 jours suivant l'incubation par rapport à des temps d'incubation plus longs [76]. Cinq jours d'incubation semblent être optimaux pour équilibrer une récupération accrue par rapport à l'occupation inutile de l'espace de l'incubateur et retarder le rapport final pour les cultures négatives. Il peut être raisonnable, cependant, de raccourcir les temps d'incubation à 4 jours ou même 3 jours si une panne d'équipement ou une augmentation de la demande d'hémocultures (par exemple, pendant la pandémie de COVID-19) entraîne une demande soudaine de plus d'espace que l'infrastructure de laboratoire peut accueillir. Plusieurs études n'ont démontré que de modestes réductions de la véritable récupération des agents pathogènes avec 3 à 4 jours d'incubation par rapport à des durées

plus longues (Figure 6.). Bien qu'une incubation de routine au-delà de 5 jours ne soit pas nécessaire avec le système automatisé à surveillance continue, même pour les organismes HACEK. Il peut être justifié de conserver les hémocultures plus longtemps sur demande dans certains cas [77-79].

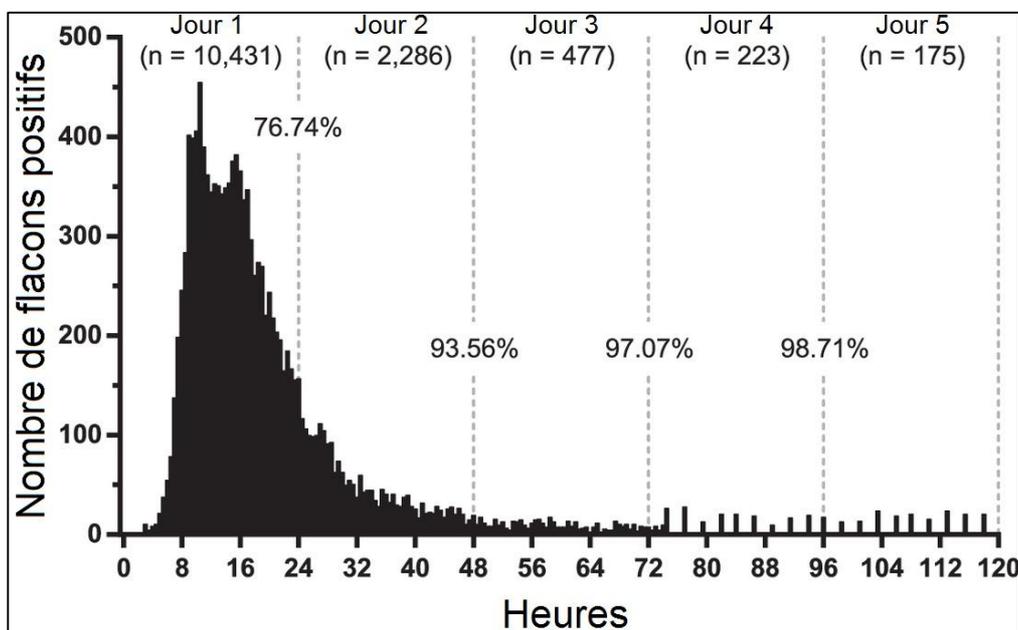


Figure 6. Temps de positivité (TTP) pour les flacons d'hémoculture positifs avec le système automatisé « BacT/Alert Virtuo » [77].

5. Détection de la croissance :

5.1. Utilité du repiquage à l'aveugle :

En raison des défis liés à la détection visuelle de la croissance, d'autres stratégies ont été employées avant l'utilisation généralisée de la surveillance automatisée des flacons d'hémoculture. Pour les systèmes manuels, des « repiquages en aveugle » sont souvent recommandés [6]. Il s'agit de sous-cultures à partir du bouillon d'hémoculture sur les milieux solides, en l'absence de signes visuels de croissance. Le moment optimal du repiquage varie selon la source consultée. Selon le moment du repiquage à l'aveugle pendant l'incubation [par exemple tôt au jour 1 vs au jour 7 à la fin de la période d'incubation (repiquage terminal)], Un repiquage précoce (dans les 12 à 24 heures suivant l'incubation) réduit le temps de détection, tandis qu'un repiquage tardif sert de contrôle final de la croissance, pour s'assurer qu'aucun agent pathogène n'est oublié [78]. Le repiquage peut être utilisé soit comme moyen de raccourcir le délai de détection ou comme contrôle final de la croissance.

Le CLSI recommande par exemple le repiquage après 24 à 48 h d'incubation pour faciliter la détection précoce des micro-organismes [25]. Le « Manuel des procédures de microbiologie clinique » de l'American Society of Microbiology de Leber et al. [40] recommande un repiquage à 72 h. Cumitech conseille des repiquages à l'aveugle de routine après 12 à 18 h d'incubation pour les flacons aérobies [6,42]. Les repiquages à l'aveugle de routine ne sont pas conseillés pour les flacons anaérobies [6].

Les résultats d'une étude récente, y compris le temps de positivité retardé, l'échec des flacons positives du système manuel à signaler le positif dans le système automatisé, et le manque de fiabilité des contrôles visuels de la croissance pour les systèmes manuels, indiquent qu'un repiquage à l'aveugle avant l'incubation peut aider à réduire les faux résultats négatifs et à diminuer le temps de positivité de l'inoculation si les flacons sont inévitablement stockés pendant de longues périodes [72].

Même avec le repiquage précoce, le temps de détection de nombreux agents pathogènes, notamment les non-fermentaires tels que *Burkholderia pseudomallei*, reste plus long que dans les systèmes automatisés [31,80]. Une explication possible de cette observation est une détection plus rapide de la croissance par les algorithmes du logiciel automatisé que l'évaluation visuelle de l'indicateur. Cependant, un meilleur délai de détection peut également être lié à une croissance plus rapide. Les automates d'hémoculture agitent les hémocultures en continu pendant l'incubation, ce qui s'est avéré augmenter la récupération des agents pathogènes, probablement en raison d'une oxygénation accrue [81]. De plus, la température dans les incubateurs automatisés est vraisemblablement plus stable que celle dans un incubateur conventionnel, qui doit être ouvert dans son intégralité chaque fois qu'un flacon est ajouté ou retiré.

5.2. Repiquages terminaux :

Les repiquages terminaux (repiquages en aveugle de flacons d'hémoculture à la fin de la période d'incubation) sont considérés comme inutiles par beaucoup et peuvent augmenter les taux de contamination et les blessures par piqûre d'aiguille [6]. Cependant, ils peuvent toujours être envisagés dans les systèmes qui n'effectuent pas de repiquage de routine à un moment antérieur ou dans des situations d'incubation prolongée [29]. Ils sont également utiles lors de la phase de validation d'un système d'hémoculture nouvellement introduit. Dans les milieux comptant de nombreux patients immunodéprimés, où un nombre plus élevé de *Pseudomonas aeruginosa* et des

levures sont anticipées, le repiquage terminal pourrait également être utile, car ces organismes ont tendance à montrer une croissance plus lente et des signes visuels de croissance plus subtils, probablement en raison de concentrations initiales plus faibles de bactéries (Figure 7.) [6].

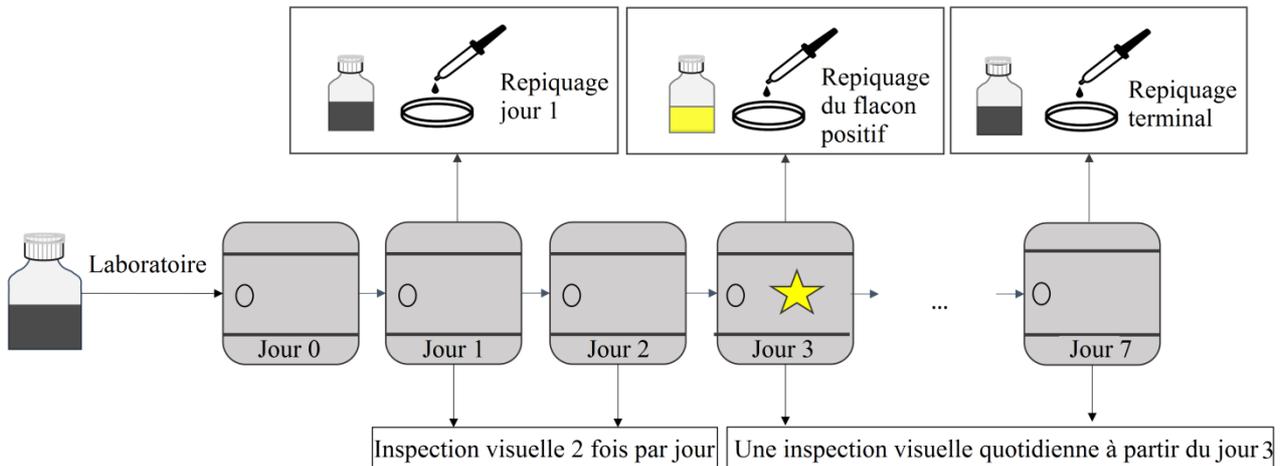


Figure 7. Traitement en laboratoire des flacons d'hémoculture manuels [29]. Les flacons sont incubés au jour 0. Un repiquage est réalisé au jour 1, quels que soient les signes de croissance. Si le repiquage est négatif, un autre repiquage est effectué lorsque la croissance est détectée visuellement (dans cet exemple, le jour 3). Si aucun des repiquages ne montre de croissance, un repiquage terminal est effectué au jour 7.

5.3. Signal sans croissance sur le repiquage :

Dans certains cas, les flacons d'hémoculture apparaissent « positifs » (détection de croissance bactérienne) par un signe visuel de croissance tel que la turbidité ou le changement de couleur d'un indicateur de dioxyde de carbone (CO₂), mais le repiquage sur des milieux solides ne confirme pas la présence des bactéries. Ce phénomène a été principalement étudié pour les systèmes d'hémoculture automatisés, où il peut être causé par un remplissage excessif des flacons d'hémoculture, une numération leucocytaire élevée ou la consommation d'antibiotiques par les patients avant le prélèvement d'hémoculture [6]. Les causes microbiologiques sont la croissance de *Plasmodium falciparum* dans le flacon d'hémoculture [82], ou la croissance de bactéries exigeantes telles que *Streptococcus pneumoniae*, qui peut présenter une autolyse rapide (c'est-à-dire une autodestruction) en cas de croissance stationnaire, ce qui la rend indétectable à la coloration de Gram et au repiquage. D'autres organismes exigeants, tels que *Campylobacter spp.* et *Mycoplasma spp.*, peuvent provoquer une turbidité sans croissance, car ils sont difficiles à colorer et ne se développent pas bien sur les milieux solides dans des conditions normales [70].

6. Agitation des flacons manuels et réduction de délai de détection des micro-organismes :

Il peut être impossible d'augmenter la vitesse de détection des systèmes manuels jusqu'à la performance des systèmes automatisés, car la surveillance continue pilotée par algorithme s'avérera difficile à imiter dans un système manuel sans équipement. Cependant, une autre caractéristique des systèmes automatisés est l'agitation continue pendant l'incubation. On pense que l'agitation améliore la récupération microbienne en augmentant la concentration d'oxygène dans le bouillon et accélère donc la détection des bactéries aérobies. Le "Clinical Microbiology Procedures Handbook" recommande également une agitation continue des systèmes manuels [42]. L'agitation continue, cependant, a un impact sur la facilité de détection visuelle de la croissance, car la turbidité augmentera en raison du mélange avec les globules rouges.

7. Recommandation pour augmenter la sensibilité des hémocultures :

Volume de sang cultivé :

- ✓ Chez l'adulte, il est recommandé de prélever au moins 2 hémocultures de 20 mL chacune, pour obtenir une sensibilité suffisante. Si possible, il est recommandé de prélever 2 hémocultures de 20 mL supplémentaires. Il n'est pas nécessaire de prélever plus de 80 mL de sang, car > 99 % des agents pathogènes seront détectés à ce stade [6] ;
- ✓ En cas de suspicion d'endocardite, 3 hémocultures de 20 mL doivent être prélevées [43] ;
- ✓ Pour les enfants, les recommandations sont moins simples. En raison de préoccupations concernant l'anémie iatrogène. Il est recommandé de prélever 2,5 à 4 % du volume sanguin total [40].

Effet de la prise d'antibiotiques sur les résultats d'hémoculture :

- ✓ Des hémocultures doivent être obtenues avant l'administration d'antibiotiques. Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique peut être réalisée. Si cela est impossible, le prélèvement doit être fait juste avant une nouvelle administration de l'antibiotique, au moment où sa concentration sanguine est la plus faible [24] ;
- ✓ Dans tous les cas, dans la mesure du possible, un traitement empirique sera initié après le prélèvement d'hémoculture [60-63] ;
- ✓ Il est conseillé d'utiliser des flacons contenant des résines pour neutraliser les antibiotiques et réduire les faux négatifs [64].

Impact des délais d'incubation et de température de stockage :

- ✓ Le temps de stockage du flacon doit être minimisé dans la mesure du possible (de préférence pas plus de 12 h) [72] ;
- ✓ Si un stockage supérieur à 12 h est inévitable, les flacons doivent être protégés des températures élevées, par exemple, en les stockant dans une glacière (maintenir une température d'environ 25 °C) à l'écart de lumière du soleil [41,72] ;
- ✓ Un repiquage à l'aveugle avant incubation sur tous les flacons ayant subi un stockage prolongé doit être réalisée (de préférence sur tous les flacons stockés \geq 12 h) [72].

Utilité des repiquages :

- ✓ Pour les systèmes manuels, l'inspection visuelle seule ne doit pas être invoquée, et au moins un repiquage après 24 h d'incubation doit être effectué [6] ;
- ✓ Un repiquage terminal est recommandé pour s'assurer qu'aucun agent pathogène n'est oublié, et comme un contrôle final de la croissance [78].

Raccourcir les temps d'incubation pour le système automatisé :

- ✓ Un seuil d'incubation de 4 jours pour détecter la grande majorité des micro-organismes, et minimiser la récupération des hémocultures cliniquement insignifiantes [77-79].

Utilité de l'agitation des flacons manuels :

- ✓ Adopter l'agitation des flacons manuels pour améliorer la récupération microbienne [42].

Chapitre III :

**Causes de la contamination des
hémocultures et recommandations
préventives**

1. Sources de contamination des hémocultures :

Les sources potentielles de contamination des hémocultures sont nombreuses et variées [83]. La mauvaise technique de prélèvement est un facteur majeur [20,84]. Il en va de même pour la désinfection insuffisante de la peau, la principale source de contaminants étant les bactéries commensales qui colonisent la peau [85-87]. La collecte de sang par des cathéters vasculaires à demeure est également problématique. Peut-être lié à la difficulté d'obtenir une antisepsie adéquate dans la zone de l'orifice (c'est-à-dire l'accès) du dispositif intraveineux sur le site où le sang est prélevé pour la culture, les hémocultures obtenues par ponction veineuse périphérique ont généralement été signalées comme étant associées à une contamination plus faible taux que ceux obtenus à partir de cathéters intraveineux à demeure [88,89].

2. Apport de l'hémoculture :

Le laboratoire de microbiologie clinique joue un rôle essentiel dans l'information des soignants lors de la récupération des isolats d'hémocultures susceptibles de représenter une contamination. Plusieurs algorithmes ont été décrits qui fournissent des critères qui peuvent être utilisés en laboratoire pour déterminer si les isolats de bactéries contaminant fréquemment les hémocultures, sont susceptibles d'être des contaminants lorsqu'ils sont récupérés dans les hémocultures [89,90]. Pour faire cette évaluation, en plus de la bactérie spécifique récupérée, le nombre des hémocultures obtenues et le nombre des positifs sont tous les deux importants. (Aux fins de cette revue, une hémoculture est définie comme une culture de sang obtenue par une ponction veineuse ou un tirage au trait consistant généralement en deux flacons, un flacon aérobique et un flacon anaérobique) Une consultation avec les prestataires de soins peut être nécessaire pour déterminer l'importance d'un isolat d'hémoculture lorsqu'un seul kit d'hémoculture est soumis. Lorsque plusieurs hémocultures produisent le même micro-organisme, la valeur prédictive positive de la vraie bactériémie augmente [20]. Après avoir déterminé qu'un isolat d'hémoculture est susceptible d'être un contaminant, il incombe au laboratoire de fournir cette information aux prestataires de soins à la fois dans des rapports de culture écrits et, le cas échéant, dans des communications directes. Par exemple, le rapport pourrait indiquer :

« *Staphylococcus* à coagulase négative, contaminant probable. Pas de bilan supplémentaire. Veuillez appeler le laboratoire dans les 2 jours si un test de sensibilité est nécessaire » [20].

Une considération connexe est la durée d'incubation des flacons d'hémoculture. Il existe au moins des informations anecdotiques qui suggèrent que la durée de la positivité est d'une certaine valeur pour discerner la probabilité qu'un isolat d'hémoculture individuel soit un contaminant ou d'importance clinique [20]. L'hypothèse sous-jacente est que la croissance d'agents pathogènes, qui sont susceptibles d'être présents à des concentrations plus élevées dans le sang de patients atteints de bactériémie, sera détectée plus tôt que les contaminants, auquel cas l'ampleur de la bactériémie est généralement plus faible. Ce concept peut avoir une certaine validité, du moins avec les systèmes d'hémoculture caractérisés par des périodes d'incubation prolongées. Cependant, aujourd'hui, avec l'utilisation généralisée des systèmes d'hémoculture à surveillance continue et leurs périodes d'incubation concomitantes de seulement 4 à 5 jours, cette notion peut ne pas être valide. De plus, étant donné le chevauchement important des temps de détection entre les isolats significatifs et les contaminants, la durée de détection ne peut pas, en elle-même, être invoquée pour prédire avec précision la signification clinique des isolats d'hémoculture individuels [20].

3. Méthodes de classification des contaminants :

Un contaminant est défini comme un micro-organisme censé être introduit dans l'hémoculture pendant le prélèvement ou le traitement des échantillons et qui n'est pas pathogène pour le patient. Les micro-organismes les plus fréquemment isolés sont les staphylocoques à coagulase négative (SCN) dans 75 % à 88 % des flacons contaminés, suivis de *Bacillus spp.*, streptocoques du groupe viridans, *Corynebacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Micrococcus spp.* et *Clostridium perfringens* [86].

Différencier un contaminant d'un véritable agent pathogène est difficile, car certains de ces micro-organismes sont une source croissante de véritable bactériémie, en particulier chez les patients porteurs de prothèses ou de cathéters. Sur la base des données de prévalence, il a été recommandé que les taux de contamination ne dépassent pas 3 % des hémocultures effectués, ce qui est considéré comme la référence standard [86]. Ce seuil de 3 % est arbitraire et, comme décrit dans une revue récente, il est possible de réduire encore le taux de contamination, notamment en mettant en place des procédures de prélèvement sanguin adaptées [16].

Ci-dessous, nous présentons plusieurs indices qui peuvent aider à différencier la contamination de la véritable bactériémie, ainsi que leur fiabilité dans l'interprétation de la signification clinique du micro-organisme.

3.1. Identité du micro-organisme :

Des modèles multivariés prédictifs ont montré que l'identité du micro-organisme était le prédicteur le plus important [86]. Certains micro-organismes devraient presque toujours représenter de véritables agents pathogènes lorsqu'ils sont isolés, tandis que d'autres micro-organismes se sont avérés représenter des contaminants. Staphylocoques à coagulase négative, *Micrococcus spp.*, streptocoques du groupe viridans, *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*), *Corynebacterium spp.*, *Clostridium perfringens* et *Bacillus spp.* sont les organismes les plus couramment décrits comme contaminants. De manière plus anecdotique, *Enterococcus spp.*, *Abiotrophia/Granulicatella spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Enterobacter spp.* et d'autres bactéries Gram-négatives ont été signalées comme contaminants [91]. Le SCN ainsi que *Corynebacterium jeikeium* et *Cutibacterium acnes* sont devenus des agents pathogènes d'infections nosocomiales [92]. Ils sont une source croissante d'infection associée au cathéter veineux central [92,93], infection de prothèse articulaire [94], d'endocardite infectieuse impliquant une prothèse valvulaire ou des stimulateurs cardiaques implantables [95] et d'autres dispositifs étrangers implantés [92]. L'identité du micro-organisme est probablement le premier et le plus important facteur qui influence la décision du médecin. Néanmoins, il n'est pas possible de diagnostiquer la contamination uniquement sur la base de l'identité du micro-organisme, en particulier lorsqu'un SCN est isolé [86].

Tableau 3. Probabilité de représenter une contamination (à moins qu'elle ne soit récupérée à partir de plusieurs hémocultures) [86] :

Représente rarement la contamination	Signification clinique variable	Représente probablement une contamination
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptocoque β -hémolytique <i>Listeria monocytogenes</i> <i>E. coli</i> Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Bacilles à Gram négatif anaérobies (<i>Bacteroides spp.</i> , <i>Fusobacterium spp.</i>) <i>Candida spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> Streptocoques groupe viridans	Staphylocoque à coagulase négative <i>Bacillus spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Cutibacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>

3.2. Nombre de paires d'hémoculture positives :

Lorsqu'une paire initiale de deux flacons (par exemple un flacon aérobie et un flacon anaérobie) était contaminé, la probabilité que les paires suivantes soient positifs était très faible [86]. Le nombre de paires d'hémocultures positifs au cours d'une période de 24 heures s'est avéré être une aide utile pour interpréter la signification clinique du micro-organisme isolé. Une telle règle doit être utilisée avec prudence lorsque les conditions appropriées sont respectées (désinfection de la peau, volume adéquat pour chaque flacon, au moins deux à quatre paires d'hémoculture comprenant des flacons aérobies et anaérobies) [14]. Malheureusement, les hémocultures solitaires sont fréquentes (allant de 10 % à 30 % des hémocultures réalisées), ce qui rend cette application difficile en cas de micro-organismes dont les preuves sont discutables [96,97]. L'interprétation d'un solitaire positif comme contaminé est facilitée dans quelques situations (par exemple, ils ont été pris lors d'un épisode fébrile de résolution spontanée, le patient avait des symptômes qui étaient en relation avec une infection focale due à d'autres micro-organismes ou un diagnostic non infectieux a été établie), mais dans le cas de patients porteurs de dispositifs étrangers (par exemple cathéter veineux central, implant articulaire ou prothèse

valvulaire cardiaque), la tâche est difficile. Avant d'exclure une véritable bactériémie chez ces patients avec une hémoculture solitaire positive, une attention particulière doit être portée aux facteurs pouvant faire douter de la qualité du prélèvement de l'hémoculture (par exemple antibiothérapie antérieure, volume sanguin insuffisant dans le flacon) [86].

3.3. Nombre des flacons d'hémocultures positives dans une série :

L'augmentation du nombre des flacons positifs dans une série permet de prédire la probabilité d'une véritable bactériémie, en particulier lorsqu'un SCN est isolé [86]. Dans une étude prospective de la stratégie d'échantillonnage unique ou single-sampling strategy (SSS), une association entre le nombre de flacons positifs dans une série de six flacons et la signification clinique de l'organisme a été démontrée [98]. Le plus souvent, les contaminants ont été isolés à partir du premier (> 90 %) ou du deuxième flacon. En ce qui concerne le SCN, la valeur prédictive positive (VPP) pour une véritable bactériémie était de 3,5 %, 61 %, 78,9 % et 100 % lorsqu'un, deux, trois et quatre flacons ou plus étaient respectivement positifs. Les cas les plus difficiles à interpréter étaient ceux avec deux ou trois flacons positifs, qui ne représentaient que 5 % des patients. Le nombre de flacons d'hémocultures positifs peut être utile pour interpréter la signification clinique des micro-organismes dans les établissements où la stratégie d'échantillonnage unique est mise en œuvre. Ainsi, lorsqu'un SCN ou un autre contaminant possible est isolé d'un ou deux flacons dans une série de quatre ou six flacons, il est probable qu'il doive être considéré comme un contaminant. Comme la stratégie de multi-échantillonnage ou multi-sampling strategy (MSS), la sensibilité de cette technique dépend du volume de sang cultivé [14].

3.4. Temps de positivité :

Il est logique de penser que l'inoculum bactérien dans une vraie bactériémie est plus élevé que dans une hémoculture contaminée et se développe plus rapidement. Lorsqu'un SCN est isolé, un temps de croissance supérieur à 20 heures est généralement considéré en faveur d'un contaminant [99]. L'administration préalable d'antibiotiques, le volume de l'échantillon de sang, le délai de transfert de l'échantillon et l'intervalle d'examen de l'hémoculture sont des facteurs qui réduisent la fiabilité de ce paramètre. De plus, les temps de croissance entre les contaminants et les véritables agents pathogènes se chevauchent [99]. De nos jours, même s'il peut être affecté par le volume de sang inoculé dans le flacon, les performances croissantes des systèmes d'incubateur réduisent le temps de détection. Bien que le délai de détection du SCN soit encore plus long que

celui des autres micro-organismes (ex. *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, streptocoques du groupe viridans), le seuil de 20 heures pour considérer un SCN comme un contaminant devrait être révisé [100]. De plus, le développement de nouvelles technologies de détection des micro-organismes dans le sang total rend cet indice obsolète.

3.5. Phénotypage, profil de géotypage :

La comparaison des tests de sensibilité du SCN isolé de différentes hémocultures s'est avérée hautement prédictive de la parenté des souches; à l'inverse, les micro-organismes sont souvent génétiquement non apparentés dans les contaminations [86]. L'électrophorèse en champ pulsé est un outil puissant pour distinguer les contaminants des agents pathogènes du SCN, et la diversité des géotypages a été décrite dans l'hémoculture contaminée. Malgré cela, le typage moléculaire était mal corrélé aux critères cliniques de la bactériémie et cette technique n'est pas réaliste en pratique courante. L'identification des marqueurs de virulence de *Staphylococcus epidermidis* isolés des hémocultures pour prédire sa signification clinique n'a pas réussi [101]. Plus récemment, il a été montré que malgré le même antibiotype il existait différents géotypes du SCN, indiquant que seules les méthodes moléculaires rapides peuvent apporter la preuve [102]. Bien que très efficace pour distinguer les souches de SCN isolées des hémocultures, cette méthode reste coûteuse et prend du temps.

En fonction de ces éléments, le microbiologiste décide de la conduite à tenir (réalisation ou non d'un antibiogramme) et des éventuels commentaires à mentionner dans le compte-rendu d'analyse bactériologique afin de faciliter l'interprétation du résultat par le clinicien (Tableau 4. et Tableau 5.) [15].

Tableau 4. Exemples d'interprétation des résultats d'hémocultures avec le prélèvement multiple. À nuancer en fonction des données locales (taux de contamination, recrutement des patients, protocoles en vigueur, etc.). Dans tous les cas, une évaluation bactério-clinique est recommandée [15] :

SIGNIFICATION D'UN OU PLUSIEURS FLACON(S) POSITIF(S)				
Nature du micro-organisme isolé ou identifié	Nombre de flacon(s) positif(s)	Nombre total d'hémocultures réalisées	Renseignements cliniques	Conduite à tenir
Staphylocoque à coagulase négative <i>Cutibacterium</i> (<i>Propionibacterium</i>) <i>acnes</i> Streptococcus α -hémolytique <i>Bacillus spp.</i>	1 ou 2 d'une même paire	≥ 2	Pas d'orientation clinique Service d'onco-hématologie, réanimation, cathéter central, infection associée aux soins	Contamination probable Réaliser identification et antibiogramme avec la mention : « À interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie du prélèvement »
		1	Services de néonatalogie	Réaliser identification et antibiogramme
		1	Quel que soit le contexte	Réaliser identification \pm antibiogramme avec la mention : « Valeur prédictive positive faible. À interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie du prélèvement »
	> 2 de deux paires différentes	≥ 2	Quel que soit le contexte	Réaliser identification et antibiogramme sans restriction
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptocoque β -hémolytique <i>Enterococcus spp.</i> Enterobacteries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida spp.</i> Anaérobies <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus spp.</i> Groupe HACEK <i>Brucella spp.</i> <i>Pasteurella spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i>	≥ 1	Quel que soit le nombre total	Quel que soit le contexte	Réaliser identification et antibiogramme/antifongogramme sans restriction

Tableau 5. Exemples d'interprétation des résultats d'hémocultures avec le prélèvement unique. À nuancer en fonction des données locales (taux de contamination, recrutement des patients, protocoles en vigueur, etc.). Dans tous les cas, une évaluation bactériologique-clinique est recommandée [15] :

SIGNIFICATION D'UN OU PLUSIEURS FLACON(S) POSITIF(S)				
Nature du micro-organisme isolé ou identifié	Nombre de flacon(s) positif(s)	Nombre total de flacons prélevés	Renseignements cliniques	Conduite à tenir
Staphylocoque à coagulase négative <i>Cutibacterium</i> <i>(Propionibacterium)</i> <i>acnes</i> <i>Streptococcus</i> α-hémolytique <i>Bacillus spp.</i>	1	4 à 6	Pas d'orientation clinique	Contamination probable
			Service d'onco-hématologie, réanimation, cathéter central, infection associée aux soins	Réaliser l'identification avec la mention : « Valeur prédictive positive faible. AntibioGramme sur demande. À interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie du prélèvement »
		1 ou 2	Services de néonatalogie	Réaliser l'identification et l'antibiogramme
	2 à 3	2	Quel que soit le contexte	Réaliser l'identification ± l'antibiogramme avec la mention : « Une seule hémoculture réalisée ; valeur prédictive positive faible. À interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie du prélèvement »
				Réaliser l'identification sur tous les flacons et l'antibiogramme sur un flacon (sur deux flacons distincts en cas de staphylocoque à coagulase négative) avec la mention : « À interpréter en fonction de la clinique et de l'antisepsie du prélèvement »
		> 3	4 à 6	Quel que soit le contexte

Chapitre III : Causes de la contamination des hémocultures et recommandations préventives

<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> Streptocoque β -hémolytique <i>Enterococcus spp.</i> Enterobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Candida spp.</i> Anaérobies <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Haemophilus spp.</i> Groupe HACEK <i>Brucella spp.</i> <i>Pasteurella spp.</i> <i>Campylobacter spp.</i>	≥ 1	6	Quel que soit le contexte	Réaliser identification et antibiogramme/antifongogramme sans restriction
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------	---	---------------------------	---------------------------------------------------------------------------

4. Recommandations pour la prévention de la contamination des hémocultures :

Sélection des patients :

- ✓ Des hémocultures doivent être réalisées chez les patients présentant une probabilité raisonnable de bactériémie [20].

Désinfection de la peau :

- ✓ L'utilisation d'un désinfectant contenant de l'alcool est recommandée [6,15,22] ;
- ✓ Frottement vigoureux ;
- ✓ Laisser l'antiseptique cutané sécher complètement [15,22].

Désinfection des bouchons de flacons d'hémoculture :

- ✓ Le dessus des flacons d'hémoculture doit être désinfecté avant l'inoculation du sang [20].

Site de phlébotomie (cathéter intravasculaire vs veine périphérique) :

- ✓ Les hémocultures ne doivent pas être obtenues via des cathéters intravasculaires, sauf si l'on pense que le cathéter est à l'origine de la bactériémie [15,16,20].

Gants stériles/hygiène des mains :

- ✓ Données limitées pour soutenir l'utilisation de gants stériles [20]; ils doivent être utilisés chaque fois qu'il est nécessaire de repalper un site de ponction veineuse après qu'il a été désinfecté [148].

Volume sanguin approprié :

- ✓ Contamination et résultats faussement positifs associés au sous-remplissage et au sur-remplissage des flacons d'hémoculture [149] ;
- ✓ Un minimum de deux tirages distincts; généralement un flacon aérobie et un flacon anaérobie par tirage [20] ;
- ✓ La pratique consistant à obtenir plusieurs échantillons de sang au cours d'une seule phlébotomie est déconseillée [20].

Champs stériles :

- ✓ Non étudié en tant qu'intervention isolée; parfois inclus dans les kits d'hémoculture [150].

Équipe de phlébotomie/éducation :

- ✓ Efficacité prouvée pour réduire la contamination des hémocultures dans de nombreuses études [151,152].

Détournement de la première portion de sang :

- ✓ Un dispositif disponible dans le commerce (Figure 8.) semble prometteur en tant que moyen rentable de réduire la contamination [34,103]. (L'annexe 7. montre une méthode peu coûteuse pour le détournement de la première portion de sang).

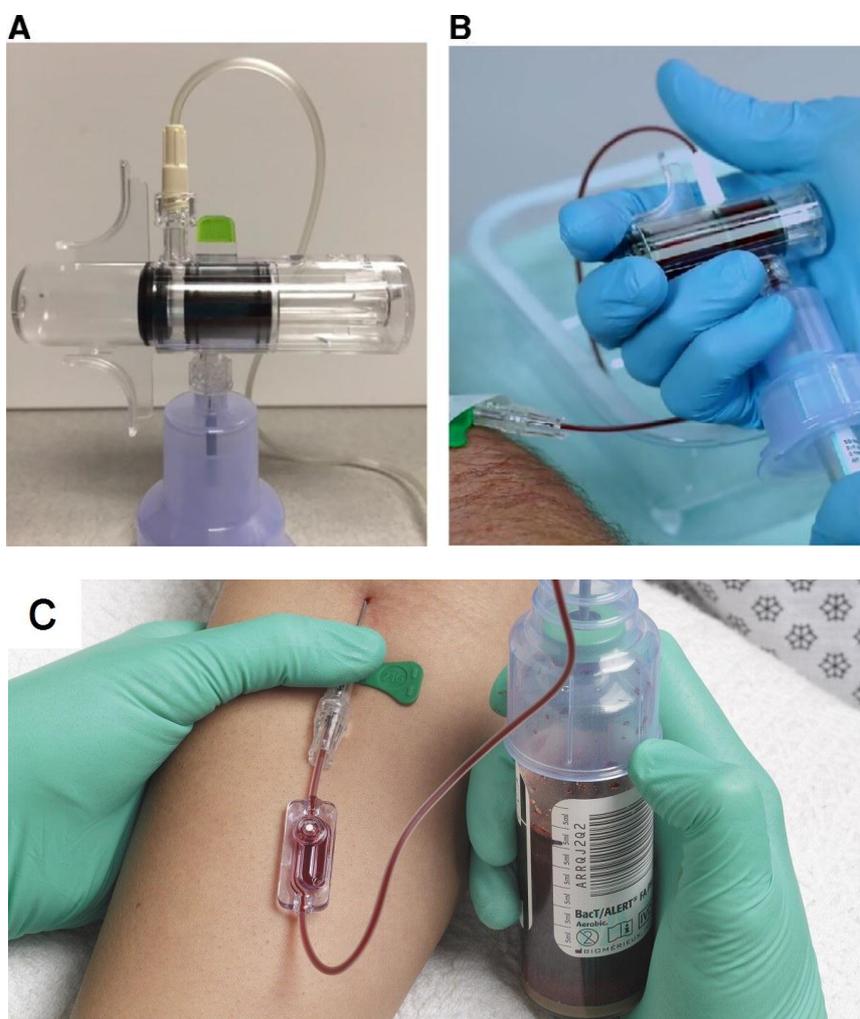


Figure 8. Schéma et fonction des dispositifs de déviation de l'échantillon initial [103]. (A) Affiche l'appareil Steripath® Gen2 avant utilisation. (B) Affiche l'appareil Steripath® Gen2 en cours d'utilisation. Le phlébotomiste serre le dispositif pour faire entrer le sang dans la chambre de dérivation. Une fois la chambre remplie, le sang continue vers le flacon de culture (en bas à droite). (C) Dispositif Kurin Lock® : Environ 0,15 mL du flux sanguin initial est capturé dans le Kurin Lock ® en forme de U.

Chapitre IV :

Optimisation de la recherche des streptocoques déficients (NVS) dans les hémocultures

1. Généralité sur l'endocardite infectieuse :

L'endocardite infectieuse (EI) est une infection de l'endothélium du cœur. Elle a une incidence annuelle de 3 à 10/100 000 de la population avec une mortalité allant jusqu'à 30 % à 30 jours [104]. Les hémocultures restent le test standard pour le diagnostic microbiologique, avec des tests sérologiques dirigés [105-108].

Malgré les progrès récents des stratégies diagnostiques et thérapeutiques, la mortalité de l'endocardite infectieuse reste élevée, plus d'un tiers des patients touchés décédant dans l'année suivant le diagnostic [109]. Les retards dans le diagnostic microbiologique peuvent contribuer à l'initiation tardive d'un traitement antibiotique efficace, influençant la morbidité et la mortalité [108].

Staphylococcus aureus est la cause la plus fréquente d'EI dans la plupart des études à environ 26,6 % de tous les cas, suivi des streptocoques du groupe viridans à 18,7 %, des autres streptocoques à 17,5 % et des entérocoques à 10,5 % [110].

Le streptocoque nutritionnellement variant (NVS), est une cause rare mais grave de 6 % des endocardites infectieuses (EI) liées au streptocoque, et de 1 à 2 % de tous les cas d'EI [111].

2. Rôle de l'hémoculture dans le diagnostic de l'endocardite infectieuse :

L'endocardite est une infection endovasculaire associée à la présence persistante de micro-organismes infectieux dans le sang. Pour cette raison, les hémocultures sont le test standard pour déterminer l'étiologie microbiologique de l'endocardite infectieuse [112]. Les hémocultures de routine incubées sur des systèmes d'hémoculture modernes automatisés et à surveillance continue permettent la récupération de presque tous les agents d'endocardite facilement cultivables sans tests spécialisés supplémentaires [108,112], tels qu'une incubation prolongée ou un repiquage terminal. Les recommandations concernant le nombre et le moment des hémocultures diffèrent selon les lignes directrices. L'American Heart Association (AHA) et la Société européenne de cardiologie recommandent au moins trois séries d'hémocultures prélevées sur différents sites de ponction veineuse, avec au moins une heure entre le premier et le dernier prélèvement [109,113]. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) recommande le prélèvement de deux séries d'hémocultures à moins de 30 min à une heure d'intervalle chez les patients suspects

d'endocardite et de septicémie aiguë et de trois séries d'hémocultures espacées de ≥ 6 h en cas de suspicion d'endocardite subaiguë ou chronique [14,108,113]. Classiquement, trois séries d'hémocultures, chaque série comprenant un flacon aérobie et un flacon anaérobie, sont collectés. Alternativement, deux séries peuvent être prélevées, avec deux flacons aérobies et un flacon anaérobie par série (c'est-à-dire un total de six flacons d'hémoculture) [108]. Le rendement des hémocultures est directement lié au volume de sang cultivé, les flacons d'hémoculture correctement remplis (c'est-à-dire 10 mL de sang par flacon Bactec ou BacT/Alert) étant essentiels. La plupart, sinon la totalité, des hémocultures de patients atteints d'endocardite causée par des micro-organismes capables de se développer dans les systèmes d'hémoculture doivent être positives, à condition que les hémocultures soient correctement prélevées, et prélevées avant l'administration d'un traitement antibiotique [114]; une seule hémoculture positive ne représente généralement pas un pathogène d'endocardite [110]. Bien que le concept d'espacement des prélèvements d'hémoculture pour détecter une bactériémie continue soit promulgué dans les directives susmentionnées, la séparation des prélèvements d'hémoculture au fil du temps n'est pas la norme pour les prélèvements d'hémoculture de routine [108].

Des durées d'incubation standard de 5 jours pour les hémocultures sont adéquates pour la guérison de presque toutes les causes cultivables d'endocardite, y compris les espèces de *Candida spp.* [108]. Les organismes HACEK étaient classiquement considérés comme difficiles à détecter dans les hémocultures en raison de leur nature exigeante; par conséquent, dans le passé, des temps d'incubation prolongés étaient conseillés [112]. Avec les systèmes d'hémoculture actuels, une incubation prolongée (et un repiquage aveugle terminal) n'est pas nécessaire pour la récupération de ces micro-organismes, car ils sont cultivés et détectés au cours de la période d'incubation standard de 5 jours [112]. Les systèmes d'hémoculture actuels contiennent également suffisamment de suppléments pour soutenir la croissance d'*Abiotrophia spp.* et de *Granulicatella spp.* (Streptocoques nutritionnellement variant). Les espèces de *Brucella spp.* sont des causes peu fréquentes d'endocardite aux États-Unis, et la détection dans les hémocultures de routine est généralement réalisée dans la période d'incubation standard de 5 jours [115]; notamment, les tests sérologiques peuvent être utiles si les expositions suggèrent une endocardite à *Brucella*. Cependant, *Cutibacterium* (anciennement *Propionibacterium*) *acnes* mérite une attention particulière, car certaines souches de cette espèce peuvent nécessiter une incubation prolongée de l'hémoculture (p. ex., 15 jours) [112]. Les directives du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommandent un repiquage terminal sur gélose au chocolat (GSC) si les hémocultures sont négatives à 5 jours et qu'un diagnostic d'endocardite est à l'étude [108].

Cependant, les preuves actuelles ne soutiennent pas l'utilité du repiquage aveugle, et cette pratique n'est pas recommandée dans les directives du BSAC [108]. L'endocardite fongique est le plus souvent causée par des espèces de *Candida spp.*, qui devraient se développer dans les hémocultures de routine. Les causes fongiques non candidales d'endocardite (p. ex., *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus spp.*) sont rares, nécessitent des tests spécialisés (p. ex., détection d'antigènes, hémocultures fongiques spécialisées) et ne doivent être envisagés que chez les patients présentant des risques spécifiques pour ces types d'endocardite (p. ex., tumeur maligne, utilisation de drogues injectables, exposition prolongée aux soins de santé, présence d'une prothèse valvulaire cardiaque) après exclusion des étiologies les plus courantes [108].

Une revue précédente sur l'EI due à des bactéries rares et exigeantes a rapporté qu'une incubation de 8 jours est nécessaire pour détecter l'EI due à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et de 21 jours pour l'EI due à *Brucella spp.* [112]. La dernière version des recommandations européennes pour les laboratoires de microbiologie clinique préconisait une durée d'incubation de 7 à 15 jours, alors qu'une étude multicentrique a montré qu'une incubation au-delà de cinq jours n'était pas nécessaire pour la documentation bactérienne de l'endocardite due à HACEK [112].

Après la consultation de 13 articles décrivant un total de 16 patients atteints d'endocardite infectieuse causée par des streptocoques déficients, nous avons constaté que la durée d'incubation dans le système automatisé, en général, varie de 14 à 72 heures (Tableau 6.). Cela prend en charge les durées d'incubation standard de 5 jours pour les bactéries exigeantes comme les streptocoques déficients.

Tableau 6. Revue de la littérature sur le délai de positivité des hémocultures de patients atteints d'endocardite infectieuse causée par NVS :

Étude	Année	Type d'étude	Résultats obtenus
Dumm et al. [116]	2021	À propos d'un cas	Quatre flacons (tous les flacons) se sont révélés positifs pour <i>A. defectiva</i> , après 16 à 18 heures d'incubation.
Fihman et al. [112]	2021	Étude rétrospective	4 patients ont une EI à NVS, avec un temps de positivité < 2 jours [Flacon aérobic : 20,6 h (17,9 h – 32,4 h) / Flacon anaérobic : 31,8 h (23,4 h – 38,4 h)].
Patil et al. [117]	2019	À propos d'un cas	Quatre flacons (tous les flacons) se sont révélés positifs pour <i>G. adiacens</i> , pendant une durée d'incubation maximale de 3 jours.
Forde et al. [118]	2021	À propos d'un cas	Tous les flacons (aérobies et anaérobies) ont été signalés positifs pour <i>A. defectiva</i> , après 14 heures d'incubation.
Puzzolante et al. [119]	2019	À propos d'un cas	<i>A. defectiva</i> , s'est développée à la fois à partir de flacons aérobies et anaérobies après 27 et 28 heures dans la première série, et après 70 et 34 heures dans la deuxième série, respectivement.
Gupta et al. [120]	2020	À propos d'un cas	<i>A. defectiva</i> , après 3 jours d'incubation.
Chowdhury et al. [121]	2018	À propos d'un cas	<i>A. defectiva</i> , après 3 jours d'incubation.
Chitneni et al. [122]	2022	À propos d'un cas	Les hémocultures ont produit <i>G. adiacens</i> , après 3 jours d'incubation.
Park et al. [123]	2016	À propos d'un cas	Trois séries d'hémocultures positives pour <i>A. defectiva</i> , avec un temps de positivité < 3 jours.
Baroz et al. [124]	2016	À propos d'un cas	Tous les flacons ont été signalés positifs pour <i>A. defectiva</i> , après 48 heures d'incubation.
Farid et al. [125]	2019	À propos d'un cas	Deux séries d'hémocultures positives pour <i>G. elegans</i> , après 16 heures d'incubation.
Tong et al. [126]	2017	À propos d'un cas	Deux séries d'hémocultures positives pour <i>G. adiacens</i> , après 24 heures d'incubation.
Li et al. [127]	2022	À propos d'un cas	Trois séries d'hémocultures positives pour <i>A. defectiva</i> , pendant une durée d'incubation maximale de 31 heures.

3. Implication de streptocoques nutritionnellement déficients dans l'endocardite infectieuse :

L'endocardite causée par les espèces *Abiotrophia spp.* et *Granulicatella spp.*, anciennement connues sous le nom de streptocoques variant (déficients) sur le plan nutritionnel (NVS – Nutritionally Variant Streptococci) est rare. Elle est associée à une augmentation des complications telles que l'insuffisance cardiaque, les embolies systémiques, la chirurgie de remplacement valvulaire, les échecs de traitement et la mortalité, les végétations ont tendance à être plus petites et l'embolisation plus importante [128]. Le diagnostic de ces infections est difficile en raison d'exigences nutritionnelles spécifiques en matière de croissance [128].

Les streptocoques déficients sur le plan nutritionnel (NVS) ont été décrits pour la première fois par Frankel et Hirsch en 1961 [129]. Ces bactéries gram positive ressemblaient à des streptocoques mais avaient des besoins nutritionnels spécifiques en matière de croissance. Depuis leur première identification, au fil des années, la nomenclature des NVS a changé plusieurs fois en fonction des études d'hybridation ADN-ADN et de l'analyse de séquençage du gène de l'ARN ribosomiaux 16S, ce groupe a été reclassé pour inclure quatre espèces qui couvrent deux genres, *Abiotrophia defectiva*, *Granulicatella adiacens*, *Granulicatella elegans* et *Granulicatella balaenopterae* [130].

Le streptocoque déficient sur le plan nutritionnel (NVS) est une cause rare mais grave de 6 % des endocardites infectieuses (EI) liées au streptocoque [131], et de 1 à 2 % de tous les cas d'EI [130,132]. Le NVS réside généralement dans la cavité buccale, le tractus intestinal ou le tractus génito-urinaire. Il est associé à un risque élevé de complications et de mortalité. En raison de la nature exigeante de ces organismes et des difficultés de diagnostic, il est possible que l'endocardite causée par le NVS soit sous-reconnue. Les NVS font partie des organismes responsables de l'endocardite à culture négative. Le principal réservoir de l'endocardite infectieuse induisant un NVS est la cavité buccale comme dans le cas des autres streptocoques viridans [133].

Les NVS sont généralement difficiles à isoler par culture en raison de leur nature pléomorphe, des caractéristiques spécifiques des milieux de culture, des besoins nutritionnels et du taux de croissance lent. Avec taux d'échec thérapeutique de 41 %, un taux de récurrence élevé de 17 % et une mortalité de plus de 17 % [134,135].

L'attachement bactérien aux valves cardiaques endommagées est le facteur clé de l'endocardite infectieuse. L'endothélium vasculaire intact peut résister au développement de l'endocardite [109]. La physiopathologie de l'endocardite infectieuse commence généralement par la dénudation des cellules endothéliales, suivie de l'exposition de la matrice extracellulaire sous-jacente (ECM) et enfin de la liaison de la fibrine et des plaquettes [109]. *Abiotrophia defectiva* et *Granulicatella spp.* ont la capacité de se lier à la fibronectine et à d'autres protéines de la matrice extracellulaire. La capacité à se lier aux protéines de la matrice extracellulaire semble être en corrélation avec le degré d'infectiosité des NVS.

La virulence est attribuée à des caractéristiques spécifiques de NVS portant le gène Cha responsable de la production de la protéine Cha qui se lie à la fibronectine. La protéine Cha a une activité de liaison à la fibronectine dans la zone répétitive et unique avec une affinité plus élevée de la région unique. Les souches *Abiotrophia defectiva* ont une plus grande affinité pour se lier à l'ECM (matrice extracellulaire) riche en laminine [117]. La diminution de la capacité de liaison de *Granulicatella adiacens* aux composants de l'ECM explique les taux inférieurs d'endocardite infectieuse par rapport à *Abiotrophia defectiva*. L'infectivité endovasculaire de *Granulicatella adiacens* est liée à sa capacité de liaison à la fibronectine, un processus essentiel pour l'adhérence bactérienne, l'initiation et le maintien de l'adhésion bactérienne endovasculaire dans l'endocardite infectieuse et la dissémination de l'infection [117]. En raison de la limitation de la nutrition dans les végétations cardiaques, les NVS se développent lentement, entraînant des anomalies structurelles telles que des parois cellulaires épaisses, la formation de filaments et une production accrue d'exopolysaccharides [117]. Cela conduit à des difficultés de traitement nécessitant une antibiothérapie prolongée pour une guérison complète.

4. Diagnostic microbiologiques des NVS :

Le diagnostic en laboratoire de l'endocardite infectieuse repose sur une approche à plusieurs volets, y compris les cultures, la sérologie, l'histopathologie et les méthodes moléculaires, les hémocultures étant la pierre angulaire [108].

Abiotrophia defectiva et *Granulicatella spp.* se développent bien dans les flacons d'hémoculture modernes, sont systématiquement récupérés avec une incubation standard sur milieu solide (35 à 37 °C dans 5 à 10 % de CO₂ pendant 18 à 24 heures) et fournissent souvent la première preuve d'endocardite infectieuse [116]. Si une intervention chirurgicale est poursuivie,

une analyse histopathologique et une culture de la valve cardiaque explantée sont recommandées, ce qui peut confirmer l'implication de la valve et aider à informer la durée des antibiotiques [109].

Abiotrophia defectiva et *Granulicatella spp.* peuvent également provoquer une endocardite « à culture négative » lorsqu'un traitement antibiotique est administré pendant ou avant le prélèvement d'hémocultures. L'endocardite à culture négative induite par le traitement est plus fréquente que l'implication d'un agent pathogène incultivable [108]. Dans de tels cas, la PCR du gène de l'ARNr 16S avec séquençage à partir du tissu valvulaire peut être un outil utile pour identifier l'agent causal [108].

La croissance de streptocoques variant sur le plan nutritionnel (NVS) dans une hémoculture standard dépend de la supplémentation en chlorhydrate de pyridoxal (vitamine B₆) et en L-cystéine [136]. Les cas d'endocardite infectieuse (EI) à hémoculture négative maintiennent les principaux problèmes cliniques puisque les NVS sont à croissance lente, inhabituelles et nécessitent des milieux supplémentaires pour être identifiés [137]. Ils peuvent être détectés par des systèmes d'hémoculture automatisés mais ne se développent pas dans les repiquages, à moins que la gélose au chocolat ne soit enrichie en chlorhydrate de pyridoxal ou en L-cystéine. Ils apparaissent sous forme de colonies non hémolytiques gris-blanc de 0,2 à 0,5 mm de diamètre (Figure 9.B.) [134,138].

Les NVS sont des cocci Gram-positifs, aéro-anaérobies facultatifs, catalase-négatifs et oxydase-négatifs, non mobiles, non sporulés, présentent à la fois une activité pyrrolidonyl aminopeptidase (PYR) et leucine aminopeptidase (LAP) [130]. Ils se présentent sous la forme de cocci ou de cocobacilles à Gram positif en diplocoques ou en chaînettes dans des conditions nutritionnelles optimales, et pléomorphes (Figure 9.A.) avec une forme globuleuse et filamenteuse, ou se colorer en tant que variable de Gram dans de mauvaises conditions nutritionnelles [130]. Ils se développent sous forme de colonies satellites autour de micro-organismes auxiliaires, comme autour d'une strie staphylococcique (Figure 9.C.) [130,139].

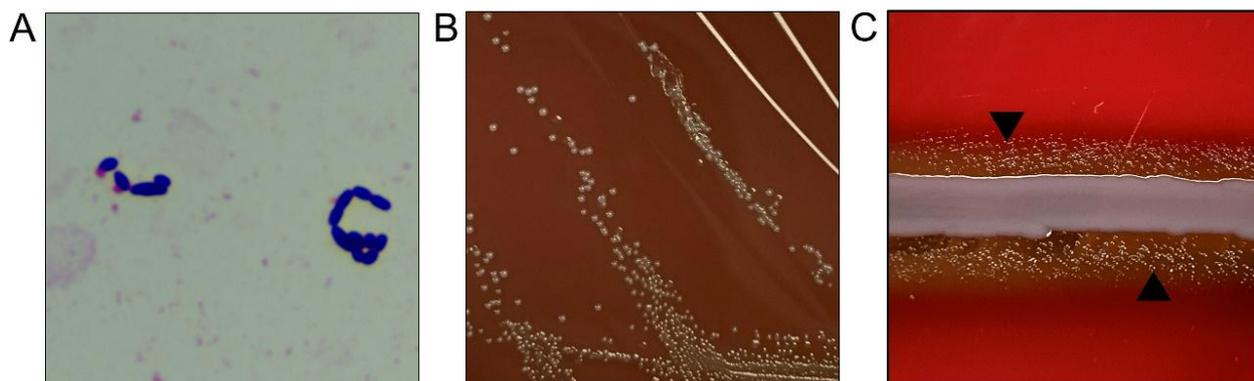


Figure 9. Vue d'ensemble de la croissance phénotypique d'*Abiotrophia defectiva* [116]. (A) Tache de Gram du flacon d'hémoculture aérobie montrant des cocci à Gram positif légèrement allongés. Grossissement, $\times 1000$. (B) Croissance de colonies d'*A. defectiva* sur gélose au chocolat. (C) Croissance satellite d'*A. defectiva* (têtes de flèches) à proximité de la strie staphylococcique hémolytique.

Le NVS doit être suspecté lorsque la coloration de Gram montre des cellules microbiennes mais que les cultures sont négatives. Une fois que leurs besoins nutritionnels de croissance sont complétés dans les milieux, les NVS se convertissent en cellules de type streptocoque et en gram positive, ce qui les rend plus faciles à identifier, bien qu'il ait également été démontré que la correction d'une carence nutritionnelle peut ne pas convertir toutes les anomalies. Pour *G. elegans*, l'ajout de L-cystéine au milieu de croissance aurait pour effet d'inverser la morphologie pléomorphe, mais pas l'ajout de chlorhydrate de pyridoxal. La difficulté à identifier ces organismes entraîne des retards dans le diagnostic et donc l'initiation en temps opportun d'un traitement antibiotique approprié [133].

Pour le repiquage, les milieux solides tels que la gélose au sang de mouton doivent être complétés par 0,001 % (vol/vol) (ou 10 $\mu\text{g/mL}$) de chlorhydrate de pyridoxal ou 0,01 % (vol/vol) de L-cystéine pour soutenir la croissance [136]. Alternativement, le milieu de repiquage peut être strié de bactérie auxiliaire telle que *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis* pour fournir ces facteurs et permettre la croissance sous forme de colonies satellites [130,139]. Certaines études ont suggéré que les hémocultures suspectées d'héberger des NVS doivent être repiquées dans les 48 heures, car la viabilité des organismes peut décliner avec une incubation continue [138].

Les panels moléculaires d'identification rapide d'hémocultures sont de plus en plus intégrés dans le bilan des hémocultures positives. Cependant, les panels les plus courants disponibles dans le commerce, qui incluent des cibles pan-streptococciques, ne détectent pas de manière fiable les espèces *Abiotrophia spp.* et *Granulicatella spp.* en raison de leur distinction génétique des espèces

Streptococcus spp.. Bien que l'analyse de la séquence des cibles pour ces essais moléculaires ne permette pas de prédire la réactivité croisée d'*Abiotrophia spp.* ou de *Granulicatella spp.*, de rares cas de réactivité croisée avec des cibles staphylococciques ou streptococciques sont rapportés dans les notices du produit [116]. Les colorations de Gram compatibles avec une morphologie de type streptococcique qui ne sont pas détectées par ces panels devraient faire suspecter *Abiotrophia spp.* ou *Granulicatella spp.*, entre autres organismes [116,130,139]. Les espèces *Abiotrophia spp.* et *Granulicatella spp.* se distinguent des autres organismes Gram-positif de type streptococcique par leurs schémas de croissance et leurs réactions biochimiques (Tableau 7.) [130,139].

Tableau 7. Schémas de croissance, de réaction biochimiques et de sensibilité des bactéries de type *Streptococcus* fréquemment isolées ¹ [116] :

Bactéries	Croissance sur:				Réaction à biochimique:		Sensibilité ² à:		
	GSF	GSC	Série satellite staphylocoque	NaCl	PYR	LAP	PCN	CRO	VAN
<i>A. defective</i>	–	+	+	–	+	+	R	S	S
<i>G. adiacens</i>	–	+	+	–	+	+	V	V	S
<i>G. elegans</i>	–	+	+	–	+	+	S	S	S
Aérocoque	+	+	–	+	+/- ³	+/- ³	S	S	S
<i>Gemella</i>	+	+	–	–	+	+/- ³	S	S	S
<i>Globicatelle</i>	+	+	–	+	+	–	V ⁴	V ⁴	S ³
<i>Leuconostoc</i>	+	+	–	+/-	–	–	S	V ⁴	R
Pédiocoque	+	+	–	+/-	–	+	S	S ⁴	R
Streptocoque viridans	+	+	–	–	+/- ³	+	V	V	S

¹ Abréviations : GSF, gélose au sang; GSC, gélose au chocolat; NaCl, bouillon NaCl 6,5 %; PYR, activité pyrrolidonyl arylamidase; LAP, activité leucine aminopeptidase; PCN, pénicilline; CRO, ceftriaxone; VAN, vancomycine; S, sensible; V, variable; R, résistant; +, positif; –, pas de croissance ou de réaction.

² Profils de sensibilité généralisés. Reportez-vous aux ressources spécifiques à l'organisme ou aux antibiogrammes pour des informations plus spécifiques.

³ Variabilité dépendante des espèces.

⁴ Aucun critère d'interprétation du CLSI.

5. Recommandations pour optimiser la recherche de NVS dans les hémocultures :

- ✓ L'utilisation de flacons d'hémoculture spécifiques n'est plus recommandée, car les systèmes d'hémoculture actuels contiennent les suppléments nécessaires pour soutenir la croissance des NVS [108,116].
- ✓ Une incubation de plus de 5 jours n'est pas nécessaire lorsque des systèmes et des milieux d'hémoculture modernes et automatisés à surveillance continue sont utilisés. à condition que les volumesensemencés respectent les recommandations du fabricant (idéalement 10 mL par flacon) [112].
- ✓ Si les hémocultures ne montrent aucune croissance et que la suspicion clinique d'EI à NVS reste élevée, en particulier s'il n'y a pas eu d'exposition antérieure aux antibiotiques, une prolongation de l'incubation du flacon d'hémoculture est conseillée [112].
- ✓ Pour le repiquage, les milieux solides tels que la gélose au sang (GSF) doivent être complétés par du chlorhydrate de pyridoxal ou de la L-cystéine, pour soutenir la croissance [136]. Alternativement, le milieu de repiquage peut être strié de bactérie auxiliaire telle que *Staphylococcus aureus*, pour fournir ces facteurs et permettre la croissance sous forme de colonies satellites [130,139].
- ✓ Un repiquage aveugle après 48 h d'incubation est recommandé, car la viabilité des NVS peut décliner avec une incubation continue [138].

CONCLUSION

La qualité du prélèvement des hémocultures conditionne de façon importante la sensibilité, la significativité et la valeur diagnostique de l'examen.

Certaines bonnes pratiques aident à limiter les faux négatifs de l'hémoculture. Tout d'abord, un volume adéquat de sang permet d'augmenter la détection de pathogènes faiblement concentrés à un instant donné dans la circulation sanguine.

De plus, un traitement antibiotique en cours baisse significativement la sensibilité des hémocultures. Il est donc nécessaire de prélever du sang avant tout traitement antibiotique. Si le patient bénéficie déjà d'un traitement antibiotique, la récupération des micro-organismes peut être augmentée en prélevant l'échantillon de sang juste avant d'administrer la dose suivante, et en inoculant du sang dans des flacons contenant des résines qui neutralisent l'activité des antibiotiques.

Le risque de faux négatifs est fortement lié au temps écoulé avant la mise en incubation. Idéalement, les flacons doivent être acheminés au laboratoire directement après le prélèvement afin d'y être placés en incubation.

Pour le système manuel, il est recommandé d'agiter les flacons pour améliorer la récupération des micro-organismes.

Pour le système automatisé, une durée d'incubation de 4 jours est suffisante pour détecter la grande majorité des micro-organismes, et minimiser la récupération des contaminants.

Il existe un consensus universel sur le fait que les hémocultures contaminées sont coûteuses et entraînent d'importantes conséquences imprévues pour les patients. Ces conséquences involontaires sont diverses et complexes, mais la plupart sont directement ou indirectement liées à une exposition inutile et prolongée aux antibiotiques, à une augmentation des tests de diagnostic et à des périodes d'hospitalisation prolongées. En général, dans le passé, des taux de contamination globaux des hémocultures en établissement de 3 % étaient considérés comme acceptables.

Cependant, nous avons maintenant une compréhension globale de la manière dont la contamination des hémocultures se produit et, ce qui est tout aussi important, une compréhension claire de la manière de réduire l'étendue et l'ampleur du problème. La fréquence de la

contamination et les dommages secondaires qui en résultent, ainsi que les surcoûts liés à la contamination peuvent être réduits par une sélection rigoureuse des patients qui ont vraiment besoin d'hémocultures, une antisepsie cutanée méticuleuse et appropriée, l'utilisation d'équipes de phlébotomie dédiées pour obtenir des échantillons de sang et/ou une formation adéquate du personnel sur la façon d'obtenir correctement des échantillons de sang. Dans la mesure du possible, le sang pour culture ne doit pas provenir de cathéters vasculaires. Plus loin, l'utilisation de dispositifs de dérivation d'échantillons initiaux comme alternative aux méthodes standard de prélèvement d'échantillons sanguins représente une nouvelle avancée passionnante qui a le potentiel de réduire les taux de contamination globaux à des niveaux qui n'étaient pas auparavant considérés comme atteignables.

ANNEXES

Annexe 1. Flacons d'hémoculture manuels biphasiques :

Les flacons biphasiques peuvent être une option pour faciliter la détection de la croissance. Ils sont constitués d'une phase liquide (le bouillon) et d'une phase solide sous forme de pente de gélose.

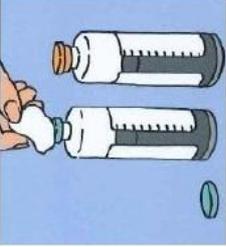


Flacons d'hémoculture manuels biphasiques [28]

Annexe 2. Affiche concernant les modalités de prélèvement des hémocultures :

Hémoculture :

Bien prélever pour moins de contaminations et une meilleure détection des bactériémies !

<p>✦ POURQUOI ?</p> <p>Identifier la bactérie responsable du sepsis</p> 	<p>✦ OÙ ?</p> <p>Préférer la ponction veineuse directe au prélèvement par cathéter</p> 	<p>✦ COMMENT ? (cf GEDI N°6237)</p> <p>1 Lavage des mains ou désinfection SHA</p> 	<p>2 Désinfection de l'opercule du flacon</p>  <p>3 Antiseptie rigoureuse du point de ponction</p> 
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>✦ COMBIEN ?</p> <p>VOLUME DE SANG MIS EN CULTURE : PARAMETRE PRIMORDIAL POUR LA SENSIBILITE DE L'EXAMEN</p> <p>N°1 : flacon aérobie N°2 : flacon anaérobie</p> <p>✓ 4 à 6 flacons / 24 h Correctement remplis ⇕ 8 –10 mL sang / flacon</p> <p>< 8 mL / flacon ⇒ perte de chance diagnostique !</p>	<p>✓ <u>Prélèvement unique</u> : 4 à 6 flacons en une seule prise</p> <p style="text-align: center;">ou</p> <p>✓ <u>Prélèvement multiple</u> : 2 à 3 paires prélevées sur 24 h</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px; margin-top: 20px;"> <p style="text-align: center;">Respect des règles de prélèvements :</p> <ul style="list-style-type: none"> ✦ Moins de contaminations ✦ Plus de bactériémies détectées </div>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Contrôler le remplissage des flacons lors des prélèvements ! 

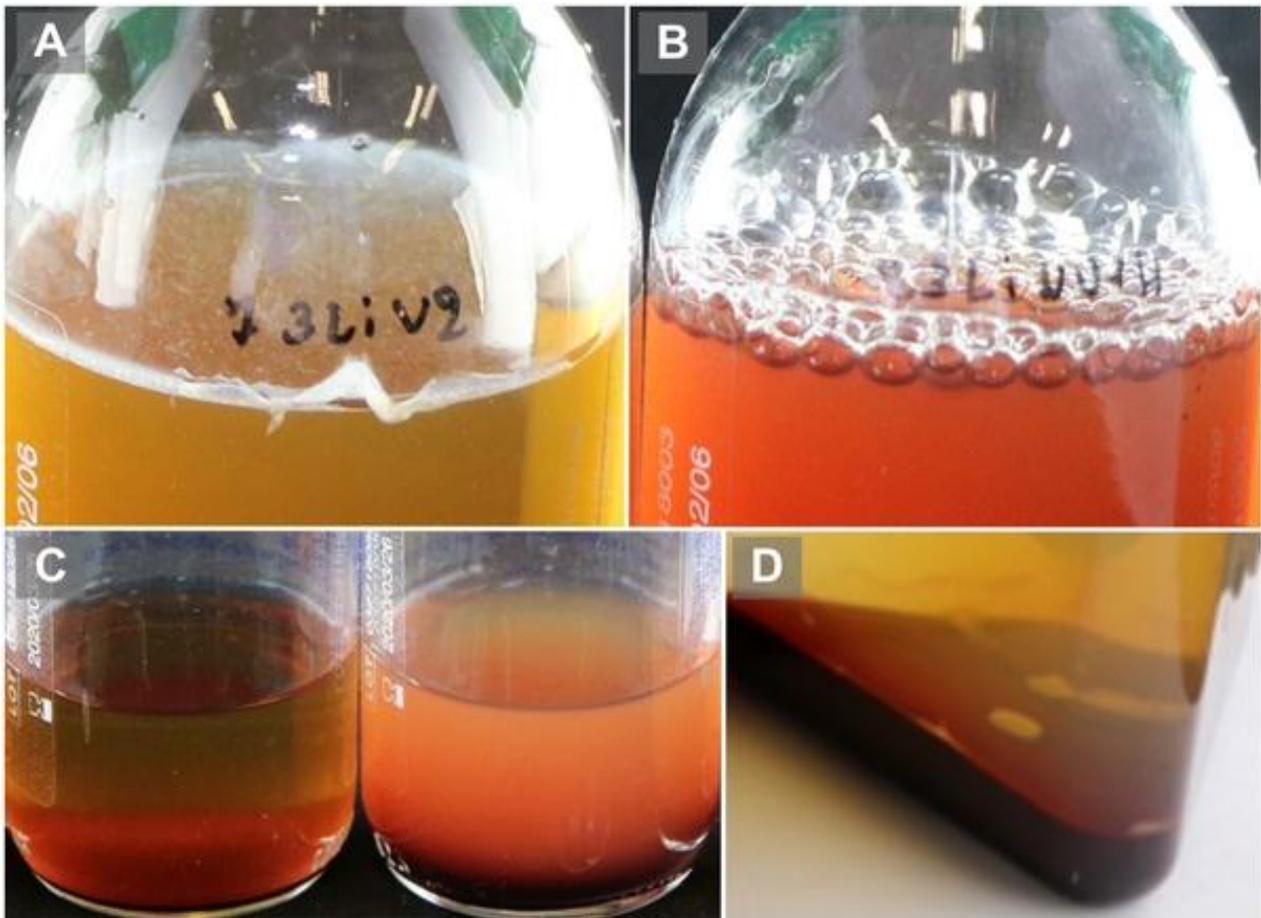
Annexe 3. Signes de croissance dans les flacons d'hémoculture manuels :

(A) formation de pellicule à la surface ;

(B) production de gaz ;

(C) turbidité (flacon de gauche : pas de croissance; flacon de droite : turbidité) ;

(D) boules feuilletées.



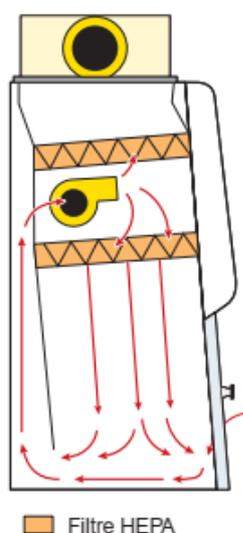
Signes de croissance dans les flacons d'hémoculture manuels [6]

Annexe 4. Postes de sécurité microbiologique (PSM) :

Les postes de sécurité microbiologique (PSM) sont des enceintes offrent une sécurité maximale à l'utilisateur, au produit et à l'environnement, pour manipuler les micro-organismes dès le niveau 2. Conviennent à toutes les applications dans les domaines de la biologie moléculaire, des biotechnologies, des produits pharmaceutiques et de la recherche médicale [30].

La technologie du traitement de l'air en écoulement laminaire permet d'obtenir un empoussièrément rigoureusement contrôlé :

- ✓ En apportant sur le plan de travail de l'air filtré ;
- ✓ En évitant la sédimentation des particules émises par le manipulateur et ses activités.

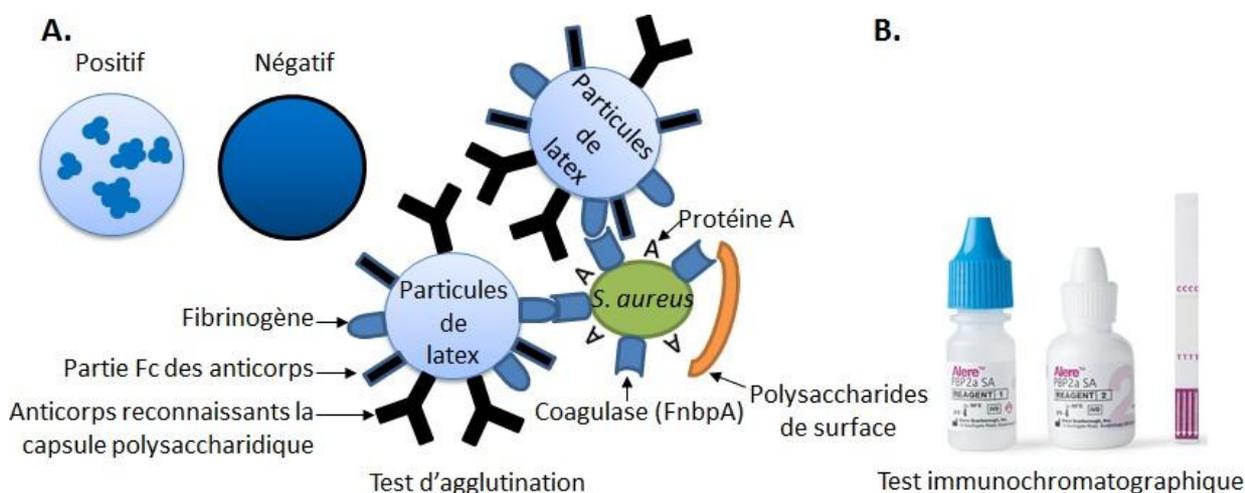


PSM II. Le flux d'air filtré est orienté vers le produit manipulé. L'air, puisé dans l'ambiance de travail (veine de garde), est acheminé vers le plenum soit directement (PSM II A), soit après passage au travers d'un filtre HEPA (PSM II B).

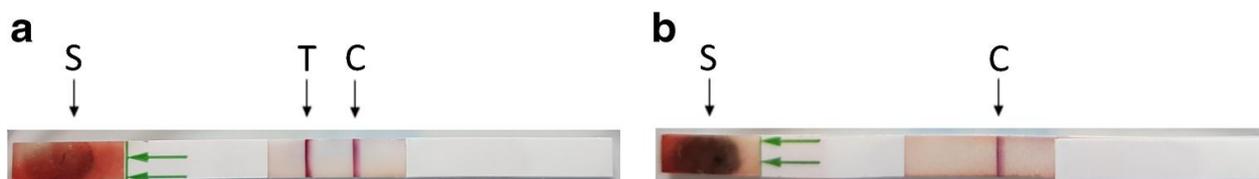
Armoires de sécurité microbiologique, classe II.

Annexe 5. Test direct sur bouillon d'hémoculture :

L'exécution d'un test d'identification directe et/ou de sensibilité aux antibiotiques sur un bouillon d'hémoculture peut également accélérer le diagnostic et la prise de décision. Les dosages moléculaires et les méthodes de spectrométrie de masse à temps de vol avec ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF) sont actuellement hors de portée pour la plupart des pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI), mais les dosages immunologiques à flux latéral et d'autres méthodes de test simples peuvent fournir une solution pratique. Un certain nombre de tests directs simples ont été décrits. Les exemples sont la détection de *Staphylococcus aureus* par test direct de coagulase en tube [140], les tests d'agglutination au latex [141] et les tests immunochromatographiques [142], et le développement récent d'essais de flux latéral pour *Burkholderia pseudomallei* [143] et les espèces de *Salmonella spp.* [144].



(A) Principe des tests d'agglutination pour la détection de *S. aureus* : ils se basent sur 3 caractéristiques propres à *S. aureus* qui sont la présence de protéine A, d'une coagulase membranaire et éventuellement de polysaccharides de surface, recherchés respectivement par l'intermédiaire de fibrinogène, de la fraction Fc d'IgG et d'anticorps reconnaissant les polysaccharides capsulaires fixés aux particules de latex. La présence de *S. aureus* rapproche les particules qui forment des agrégats visibles à l'œil nu. (B) Test immunochromatographique Alere™ PBP2a4 et ses réactifs.



Définition d'une lecture positive et négative de l'InBiOS AMD RDT [142]. (a) InBiOS AMD RDT positif pour *B. pseudomallei* et (b) InBiOS AMD RDT négatif pour *B. pseudomallei*. Les flèches noires indiquent le tampon d'échantillon (S), la ligne de test (T) et la ligne de contrôle (C).

Annexe 6. Résumé des recommandations pour un volume sanguin optimal en fonction des classes d'âge ou de poids auto-définies [39] :

Poids du patient (kg)	Volume sanguin total (mL)
≤ 2,0	1,0–4,5
> 2,0–5,0	1,0–6,0
> 5,0–10,0	1,5–10,0
> 10,0–20,0	6,0–23,0
> 20,0–30,0	≥ 10,0
Âge du patient	Volume sanguin total (mL)
< 1 an	> 0,5–3,0
≥ 1–3 ans	1,0–4,0
> 3–10 ans	3,0– 8,0
≥ 10 ans	20,0

Annexe 7. Une méthode, peu coûteuse, pour le détournement de la première portion de sang:

La contamination des hémocultures a été réduite sans utiliser de dispositifs de détournement commerciaux coûteux, en détournant une petite quantité de sang à l'aide de tube Vacutainer® stérile, en modifiant l'ordre de tirage du test, ce qui pourrait également être accompli pour les hémocultures seules en jetant simplement la partie détournée [74,145].

Ce concept a été repris par Binkhamis et al. [146] et Rupp et al. [147]; les deux études ont trouvé des résultats significatifs avec une réduction des taux de contamination de 3,4 à 2,4 % et de 1,78 à 0,22 %, respectivement.



Tube Vacutainer®

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., ... & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810.
- [2] Egi, M., Ogura, H., Yatabe, T., Atagi, K., Inoue, S., Iba, T., ... & Kimura, S. (2021). The Japanese clinical practice guidelines for management of sepsis and septic shock 2020 (J-SSCG 2020). *Journal of intensive care*, 9(1), 1-144.
- [3] Mayr, F. B., Talisa, V. B., Balakumar, V., Chang, C. C. H., Fine, M., & Yende, S. (2017). Proportion and cost of unplanned 30-day readmissions after sepsis compared with other medical conditions. *Jama*, 317(5), 530-531.
- [4] Phua, J., Ngerng, W. J., See, K. C., Tay, C. K., Kiong, T., Lim, H. F., ... & Mukhopadhyay, A. (2013). Characteristics and outcomes of culture-negative versus culture-positive severe sepsis. *Critical care*, 17(5), 1-12.
- [5] Gupta, S., Sakhuja, A., Kumar, G., McGrath, E., Nanchal, R. S., & Kashani, K. B. (2016). Culture-negative severe sepsis: nationwide trends and outcomes. *Chest*, 150(6), 1251-1259.
- [6] Ombelet, S., Barbé, B., Affolabi, D., Ronat, J. B., Lompo, P., Lunguya, O., ... & Hardy, L. (2019). Best practices of blood cultures in low-and middle-income countries. *Frontiers in medicine*, 6, 131.
- [7] Allerberger, F., & Kern, W. V. (2020). Bacterial bloodstream infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(2), 140-141.
- [8] Thorpe, T. C., Wilson, M. L., Turner, J. E., DiGuseppi, J. L., Willert, M., Mirrett, S., & Reller, L. (1990). BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *Journal of clinical microbiology*, 28(7), 1608-1612.
- [9] Morello, J. A., Leitch, C., Nitz, S., Dyke, J. W., Andruszewski, M., Maier, G., ... & Beard, M. A. (1994). Detection of bacteremia by Difco ESP blood culture system. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(3), 811-818.
- [10] Giménez, M., Prat, C., Vallés, X., Matas, L., Arnal, J., & Ausina, V. (2002). Evaluation of the VITAL (bioMérieux) automated blood culture system using blind subculture. *Clinical microbiology and infection*, 8(4), 222-228.

- [11] Pawlowicz, A., Holland, C., Zou, B., Payton, T., Tyndall, J. A., & Allen, B. (2016). Implementation of an evidence-based algorithm reduces blood culture overuse in an adult emergency department. *Gen Int Med Clin Innov*, 1(10.15761).
- [12] Otani, T., Ichiba, T., Seo, K., & Naito, H. (2021). Clinical prediction rule is more useful than qSOFA and the Sepsis-3 definition of sepsis for screening bacteremia. *The American Journal of Emergency Medicine*, 46, 84-89.
- [13] Sciotto, L., Abbas, M., & Serratrice, J. (2017). Détection d'une bactériémie par des hémocultures: qui en bénéficie?. *Revue médicale suisse*, 13(579), 1774-1778.
- [14] Lamy, B., Dargère, S., Arendrup, M. C., Parienti, J. J., & Tattevin, P. (2016). How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. *Frontiers in microbiology*, 7, 697.
- [15] Accoceberry, I., Cornet, M., & Lamy, B. (2018). Hémoculture. REMIC, Référentiel en Microbiologie Médicale, 6th Edn., eds T. Bourlet, R. Courcol, P. Laudat, JL Herrmann, L. Lachaud, B. Lamy, H. Peigue-Lafeuille, and B. Pangon (Paris: Société française de Microbiologie), 137-151.
- [16] Dawson, S. (2014). Blood culture contaminants. *Journal of Hospital Infection*, 87(1), 1-10.
- [17] Park, W. B., Myung, S. J., Lee, J., Kim, N. J., Kim, E. C., & Park, J. S. (2015). Educational intervention as an effective step for reducing blood culture contamination: a prospective cohort study. *Journal of Hospital Infection*, 91(2), 111-116.
- [18] Nair, A., Elliott, S. P., & Al Mohajer, M. (2017). Knowledge, attitude, and practice of blood culture contamination: a multicenter study. *American Journal of Infection Control*, 45(5), 547-548.
- [19] Moeller, D. (2017). Eliminating blood culture false positives: harnessing the power of nursing shared governance. *Journal of Emergency Nursing*, 43(2), 126-132.
- [20] Doern, G. V., Carroll, K. C., Diekema, D. J., Garey, K. W., Rupp, M. E., Weinstein, M. P., & Sexton, D. J. (2019). Practical guidance for clinical microbiology laboratories: a comprehensive update on the problem of blood culture contamination and a discussion of methods for addressing the problem. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00009-19.
- [21] Martínez, J., Macías, J. H., Arreguín, V., Álvarez, J. A., Macías, A. E., & Mosqueda-Gómez, J. L. (2017). Isopropyl alcohol is as efficient as chlorhexidine to prevent contamination of blood cultures. *American journal of infection control*, 45(4), 350-353.
- [22] Emergency Nurses Association. (2016). Clinical practice guideline: prevention of blood culture contamination.

https://www.ena.org/docs/default-source/resource-library/practice-resources/cpg/bcccp2c37f1815b664d2fa8d7e9fd0f475a41.pdf?sfvrsn=6d1899fb_12.

- [23] Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., ... & Moreno, R. (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive care medicine*, 39(2), 165-228.
- [24] Scheer C, Fuchs C, Gründling M, Volmer M, Bast J, Bohnert J, et al. . Impact of antibiotic administration on blood culture positivity at the beginning of sepsis: a prospective clinical cohort study. *Clin Microbiol Infect.* (2019) 25:326–31. 10.1016/j.cmi.2018.05.016.
- [25] Wilson, M. L., Mitchell, M., Morris, A. J., Murray, P. R., Reimer, L. G., Reller, L. B., ... & Welch, D. F. (2007). Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document M47-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Available online at : http://shop.clsi.org/c.1253739/site/Sample_pdf/M47A_sample.pdf%5Cnhttp://www2.eduh.org.tw/cp/study/04_1020308CLSIM47.pdf.
- [26] Hansen, G. T. (2016). Laboratory blood cultures: past, present, and future. *Clinical Microbiology Newsletter*, 38(15), 119-128.
- [27] Dijksteel, G. S., Nibbering, P. H., Ulrich, M. M., Middelkoop, E., & Boekema, B. K. (2019). SPS-neutralization in tissue samples for efficacy testing of antimicrobial peptides. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-7.
- [28] Khara, R., & Lakhani, S. J. (2018). Bacteriological Profile of Blood Culture from Adult Sepsis Patients from a Rural Based Tertiary Care and Teaching Hospital, Piparia, Vadodara, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 7(05): 3173-3182.
- [29] Ombelet, S., Natale, A., Ronat, J. B., Vandenberg, O., Jacobs, J., & Hardy, L. (2022). Considerations in evaluating equipment-free blood culture bottles: A short protocol for use in low-resource settings. *PloS one*, 17(4), e0267491.
- [30] Cattoir, V., Denis, F., Martin, C., Ploy, M. C., & Poyart, C. (2016). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*. Elsevier Health Sciences.
- [31] Elantamilan, D., Lyngdoh, V. W., Khyriem, A. B., Rajbongshi, J., Bora, I., Devi, S. T., ... & Barman, H. (2016). Comparative evaluation of the role of single and multiple blood specimens in the outcome of blood cultures using BacT/ALERT 3D (automated) blood culture system in a tertiary care hospital. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 20(9), 530.

- [32] Ahmad, A., Iram, S., Hussain, S., & Yusuf, N. W. (2017). Diagnosis of paediatric sepsis by automated blood culture system and conventional blood culture. *J Pak Med Assoc*, 67(2), 192-195.
- [33] Coburn, B., Morris, A. M., Tomlinson, G., & Detsky, A. S. (2012). Does this adult patient with suspected bacteremia require blood cultures?. *Jama*, 308(5), 502-511.
- [34] O'SULLIVAN, D. M., & STEERE, L. (2019). Reducing False-Positive Blood Cultures: Using a Blood Diversion Device. *Connecticut Medicine*, 83(2).
- [35] Bouza, E., Sousa, D., Rodríguez-Créixems, M., Lechuz, J. G., & Munoz, P. (2007). Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections?. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2765-2769.
- [36] Patel, R., Vetter, E. A., Harmsen, W. S., Schleck, C. D., Fadel, H. J., & Cockerill III, F. R. (2011). Optimized pathogen detection with 30-compared to 20-milliliter blood culture draws. *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4047-4051.
- [37] Collazos-Blanco, A., Perez-Garcia, F., Sanchez-Carrillo, C., de Egea, V., Munoz, P., & Bouza, E. (2019). Estimation of missed bloodstream infections without the third blood culture set: a retrospective observational single-centre study. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(4), 469-473.
- [38] Shoji, K., Tsuboi, N., Arakawa, R., Ide, K., Mikami, M., Kato, A., & Miyairi, I. (2019). Continuous monitoring and feedback optimizes blood volume inoculated into culture bottles in the pediatric intensive care unit. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8(2), 166-169.
- [39] Huber, S., Hetzer, B., Crazzolaro, R., & Orth-Höller, D. (2020). The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum?. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(2), 168-173.
- [40] Miller, J. M., Binnicker, M. J., Campbell, S., Carroll, K. C., Chapin, K. C., Gilligan, P. H., ... & Yao, J. D. (2018). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, 67(6), e1-e94.
- [41] Baron, E. J., Miller, J. M., Weinstein, M. P., Richter, S. S., Gilligan, P. H., Thomson Jr, R. B., ... & Pritt, B. S. (2013). A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM) a. *Clinical infectious diseases*, 57(4), e22-e121.

- [42] Leber, A. L. (2016). Clinical microbiology procedures handbook, ASM Press. Washington, DC.
- [43] TJ, C. (2016). Prendergast BD. Infective endocarditis. *Lancet*, 27(387), 10021.
- [44] Weiss, S. L., Fitzgerald, J. C., Pappachan, J., Wheeler, D., Jaramillo-Bustamante, J. C., Salloo, A., ... & Thomas, N. J. (2015). Global epidemiology of pediatric severe sepsis: the sepsis prevalence, outcomes, and therapies study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(10), 1147-1157.
- [45] Schlapbach, L. J., Straney, L., Alexander, J., MacLaren, G., Festa, M., Schibler, A., ... & ANZICS Paediatric Study Group. (2015). Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002–13: a multicentre retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 15(1), 46-54.
- [46] Bryan, C. S. (1989). Clinical implications of positive blood cultures. *Clinical microbiology reviews*, 2(4), 329-353.
- [47] Revell, P., & Doern, C. (2017). Pediatric blood cultures. *The dark art of blood cultures*, 151-162.
- [48] Stoll, B. J., Hansen, N. I., Sánchez, P. J., Faix, R. G., Poindexter, B. B., Van Meurs, K. P., ... & Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. (2011). Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*, 127(5), 817-826.
- [49] Church, J., & Maitland, K. (2014). Invasive bacterial co-infection in African children with *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review. *BMC medicine*, 12(1), 1-17.
- [50] Howie, S. R. (2011). Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bulletin of the World Health Organization*, 89, 46-53.
- [51] Kuijpers, L. M. F., Maltha, J., Guiraud, I., Kaboré, B., Lompo, P., Devlieger, H., ... & Jacobs, J. (2016). Severe anaemia associated with *Plasmodium falciparum* infection in children: consequences for additional blood sampling for research. *Malaria Journal*, 15(1), 1-6.
- [52] Sigakis, M. J., Jewell, E., Maile, M. D., Cinti, S. K., Bateman, B. T., & Engoren, M. (2019). Culture negative and culture positive sepsis: a comparison of characteristics and outcomes. *Anesthesia and analgesia*, 129(5), 1300.
- [53] Rhodes, A., Evans, L. E., Alhazzani, W., Levy, M. M., Antonelli, M., Ferrer, R., ... & Dellinger, R. P. (2017). Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive care medicine*, 43(3), 304-377.

- [54] Kumar, A., Ellis, P., Arabi, Y., Roberts, D., Light, B., Parrillo, J. E., ... & Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. (2009). Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136(5), 1237-1248.
- [55] Garnacho-Montero, J., Gutiérrez-Pizarra, A., Escoreca-Ortega, A., Fernández-Delgado, E., & López-Sánchez, J. M. (2015). Adequate antibiotic therapy prior to ICU admission in patients with severe sepsis and septic shock reduces hospital mortality. *Critical care*, 19(1), 1-8.
- [56] Hagel, S., Pletz, M. W., Brunkhorst, F. M., Seifert, H., & Kern, W. V. (2013). Bakteriämie und Sepsis. *Der Internist*, 54(4), 399-407.
- [57] Kollef, M. H. (2014). What can be expected from antimicrobial de-escalation in the critically ill?. *Intensive care medicine*, 40(1), 92-95.
- [58] Bassetti, M., De Waele, J. J., Eggimann, P., Garnacho-Montero, J., Kahlmeter, G., Menichetti, F., ... & Poulakou, G. (2015). Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. *Intensive care medicine*, 41(5), 776-795.
- [59] Kollef, M. H., Bassetti, M., Francois, B., Burnham, J., Dimopoulos, G., Garnacho-Montero, J., ... & Wunderink, R. G. (2017). The intensive care medicine research agenda on multidrug-resistant bacteria, antibiotics, and stewardship. *Intensive care medicine*, 43(9), 1187-1197.
- [60] Scheer, C. S., Fuchs, C., Kuhn, S. O., Vollmer, M., Rehberg, S., Friesecke, S., ... & Gründling, M. (2017). Quality improvement initiative for severe sepsis and septic shock reduces 90-day mortality: a 7.5-year observational study. *Critical care medicine*, 45(2), 241-252.
- [61] Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T. M., Townsend, S., Dellinger, R. P., ... & Levy, M. M. (2014). Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Critical care medicine*, 42(8), 1749-1755.
- [62] Weiss, S. L., Fitzgerald, J. C., Balamuth, F., Alpern, E. R., Lavelle, J., Chilutti, M., ... & Thomas, N. J. (2014). Delayed antimicrobial therapy increases mortality and organ dysfunction duration in pediatric sepsis. *Critical care medicine*, 42(11), 2409.
- [63] Whiles, B. B., Deis, A. S., & Simpson, S. Q. (2017). Increased time to initial antimicrobial administration is associated with progression to septic shock in severe sepsis patients. *Critical care medicine*, 45(4), 623.

- [64] Chen, I. H., Nicolau, D. P., & Kuti, J. L. (2019). Effect of clinically meaningful antibiotic concentrations on recovery of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from anaerobic blood culture bottles with and without antibiotic binding resins. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(12), e01344-19.
- [65] Ruiz-Giardín, J. M., Martín-Díaz, R. M., Jaqueti-Aroca, J., García-Arata, I., San Martín-López, J. V., & Buitrago, M. S. S. (2015). Diagnosis of bacteraemia and growth times. *International Journal of Infectious Diseases*, 41, 6-10.
- [66] Chen, I. H., Nicolau, D. P., & Kuti, J. L. (2019). Recovery of Gram-negative bacteria from aerobic blood culture bottles containing antibiotic binding resins after exposure to β -lactam and fluoroquinolone concentrations. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(10), e00849-19.
- [67] Lovern, D., Katzin, B., Johnson, K., Broadwell, D., Miller, E., Gates, A., ... & Dunne, W. M. (2016). Antimicrobial binding and growth kinetics in BacT/ALERT® FA Plus and BACTEC® Aerobic/F Plus blood culture media. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(12), 2033-2036.
- [68] Venturelli, C., Righi, E., Borsari, L., Aggazzotti, G., Busani, S., Mussini, C., ... & Girardis, M. (2017). Impact of pre-analytical time on the recovery of pathogens from blood cultures: results from a large retrospective survey. *PLoS One*, 12(1), e0169466.
- [69] Public Health England Investigation of blood cultures (for organisms other than *Mycobacterium* species) UK Stand Microbiol Investig. 2019;37:8.2.
- [70] Kirn, T. J., & Weinstein, M. P. (2013). Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6), 513-520.
- [71] van der Velden, L. B., Vos, F. J., Mouton, J. W., & Sturm, P. D. (2011). Clinical impact of preincubation of blood cultures at 37 C. *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 275-280.
- [72] Ling, C. L., Roberts, T., Soeng, S., Cusack, T. P., Dance, D. A., Lee, S. J., ... & Ashley, E. A. (2021). Impact of delays to incubation and storage temperature on blood culture results: a multi-centre study. *BMC infectious diseases*, 21(1), 1-8.
- [73] Mayxay, M., Castonguay-Vanier, J., Chansamouth, V., Dubot-Pérès, A., Paris, D. H., Phetsouvanh, R., ... & Newton, P. N. (2013). Causes of non-malarial fever in Laos: a prospective study. *The Lancet Global Health*, 1(1), e46-e54.
- [74] Lalezari, A., Cohen, M. J., Svinik, O., Tel-Zur, O., Sinvani, S., Al-Dayem, Y. A., ... & Strahilevitz, J. (2020). A simplified blood culture sampling protocol for reducing

- contamination and costs: a randomized controlled trial. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(4), 470-474.
- [75] Dempsey, C., Skoglund, E., Muldrew, K. L., & Garey, K. W. (2019). Economic health care costs of blood culture contamination: a systematic review. *American Journal of Infection Control*, 47(8), 963-967.
- [76] Gonzalez, M. D., Chao, T., & Pettengill, M. A. (2020). Modern blood culture: management decisions and method options. *Clinics in Laboratory Medicine*, 40(4), 379-392.
- [77] Ransom, E. M., Alipour, Z., Wallace, M. A., & Burnham, C. A. D. (2021). Evaluation of optimal blood culture incubation time to maximize clinically relevant results from a contemporary blood culture instrument and media system. *Journal of clinical microbiology*, 59(3), e02459-20.
- [78] Sepulveda, J., Westblade, L. F., Whittier, S., Satlin, M. J., Greendyke, W. G., Aaron, J. G., ... & Green, D. A. (2020). Bacteremia and blood culture utilization during COVID-19 surge in New York City. *Journal of clinical microbiology*, 58(8), e00875-20.
- [79] de Ponfilly, G. P., Lourtet-Hascoet, J., Porcheret, H., Cambau, E., Le Monnier, A., Jacquier, H., ... & Farfour, E. (2021). Seasonal variations in blood culture numbers and time to positivity and potential impact of reducing incubation periods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(10), 2087-2093.
- [80] Lambregts, M. M., Bernards, A. T., van der Beek, M. T., Visser, L. G., & de Boer, M. G. (2019). Time to positivity of blood cultures supports early re-evaluation of empiric broad-spectrum antimicrobial therapy. *PLoS One*, 14(1), e0208819.
- [81] Ombelet, S., Peeters, M., Phe, C., Tsoumanis, A., Kham, C., Teav, S., ... & Jacobs, J. (2021). Nonautomated blood cultures in a low-resource setting: optimizing the timing of blind subculture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(2), 612.
- [82] Aesif, S. W., Swierzbinski, M. J., & Keiser, J. F. (2014). Positive blood culture results after *Plasmodium falciparum* diagnosis. *Laboratory Medicine*, 45(2), e89-e91.
- [83] Christenson, R. H., Snyder, S. R., Shaw, C. S., Derzon, J. H., Black, R. S., Mass, D., ... & Liebow, E. B. (2011). Laboratory medicine best practices: systematic evidence review and evaluation methods for quality improvement. *Clinical chemistry*, 57(6), 816-825.
- [84] Gander, R. M., Byrd, L., DeCrescenzo, M., Hirany, S., Bowen, M., & Baughman, J. (2009). Impact of blood cultures drawn by phlebotomy on contamination rates and health care costs in a hospital emergency department. *Journal of clinical microbiology*, 47(4), 1021-1024.

- [85] Washer, L. L., Chenoweth, C., Kim, H. W., Rogers, M. A., Malani, A. N., Riddell, J., ... & Flanders, S. A. (2013). Blood culture contamination: a randomized trial evaluating the comparative effectiveness of 3 skin antiseptic interventions. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 15-21.
- [86] Dargère, S., Cormier, H., & Verdon, R. (2018). Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clinical microbiology and infection*, 24(9), 964-969.
- [87] Snyder, S. R., Favoretto, A. M., Baetz, R. A., Derzon, J. H., Madison, B. M., Mass, D., ... & Liebow, E. B. (2012). Effectiveness of practices to reduce blood culture contamination: a Laboratory Medicine Best Practices systematic review and meta-analysis. *Clinical biochemistry*, 45(13-14), 999-1011.
- [88] Boyce, J. M., Nadeau, J., Dumigan, D., Miller, D., Dubowsky, C., Reilly, L., & Hannon, C. V. (2013). Obtaining Blood Cultures by Venipuncture versus from Central Lines Impact on Blood Culture Contamination Rates and Potential Effect on Central Line-Associated Bloodstream Infection Reporting. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(10), 1042-1047.
- [89] Garcia, R. A., Spitzer, E. D., Beaudry, J., Beck, C., Diblasi, R., Gilleeny-Blabac, M., ... & Torregrosa, E. (2015). 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. *American journal of infection control*, 43(11), 1222-1237.
- [90] Riedel, S., & Carroll, K. C. (2010). Blood cultures: key elements for best practices and future directions. *Journal of infection and chemotherapy*, 16(5), 301-316.
- [91] Halverson, S., Malani, P. N., Newton, D. W., Habicht, A., Vander Have, K., & Younger, J. G. (2013). Impact of hourly emergency department patient volume on blood culture contamination and diagnostic yield. *Journal of clinical microbiology*, 51(6), 1721-1726.
- [92] Hitzenbichler, F., Simon, M., Salzberger, B., & Hanses, F. (2017). Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. *Infection*, 45(2), 179-186.
- [93] Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., ... & Fridkin, S. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the National Healthcare Safety

- Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 34(1), 1-14.
- [94] Tsaras, G., Osmon, D. R., Mabry, T., Lahr, B., Sauveur, J. S., Yawn, B., ... & Berbari, E. F. (2012). Incidence, secular trends, and outcomes of prosthetic joint infection: a population-based study, Olmsted County, Minnesota, 1969–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 33(12), 1207-1212.
- [95] Athan, E., Chu, V. H., Tattevin, P., Selton-Suty, C., Jones, P., Naber, C., ... & ICE-PCS Investigators. (2012). Clinical characteristics and outcome of infective endocarditis involving implantable cardiac devices. *Jama*, 307(16), 1727-1735.
- [96] Neves, L., Marra, A. R., Camargo, T. Z. S., dos Santos, M. C., Zulin, F., da Silva, P. C., ... & Martino, M. D. V. (2015). Correlation between mass and volume of collected blood with positivity of blood cultures. *BMC research notes*, 8(1), 1-7.
- [97] Choi, J., Ensafi, S., Chartier, L. B., & Van Praet, O. (2017). A quality improvement initiative to decrease the rate of solitary blood cultures in the emergency department. *Academic Emergency Medicine*, 24(9), 1080-1087.
- [98] Leyssene, D., Gardes, S., Vilquin, P., Flandrois, J. P., Carret, G., & Lamy, B. (2011). Species-driven interpretation guidelines in case of a single-sampling strategy for blood culture. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(12), 1537-1541.
- [99] Ruiz-Giardín, J. M., Martín-Díaz, R. M., Jaqueti-Aroca, J., García-Arata, I., San Martín-López, J. V., & Buitrago, M. S. S. (2015). Diagnosis of bacteraemia and growth times. *International Journal of Infectious Diseases*, 41, 6-10.
- [100] Congestrì, F., Pedna, M. F., Fantini, M., Samuelli, M., Schiavone, P., Torri, A., ... & Sambri, V. (2017). Comparison of 'time to detection' values between BacT/ALERT VIRTUO and BacT/ALERT 3D instruments for clinical blood culture samples. *International Journal of Infectious Diseases*, 62, 1-5.
- [101] Papadimitriou-Olivgeri, I., Giormezis, N., Papadimitriou-Olivgeris, M., Zotou, A., Kolonitsiou, F., Koutsileou, K., ... & Spiliopoulou, I. (2016). Number of positive blood cultures, biofilm formation, and adhesin genes in differentiating true coagulase-negative staphylococci bacteremia from contamination. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(1), 57-66.
- [102] Karakullukçu, A., Kuşkuçcu, M. A., Ergin, S., Aygün, G., Midilli, K., & Küçükbasmacı, Ö. (2017). Determination of clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(3), 291-294.

- [103] Zimmerman, F. S., Assous, M. V., Zevin, S., & Wiener-Well, Y. (2019). Reducing blood culture contamination using an initial specimen diversion device. *American Journal of Infection Control*, 47(7), 822-826.
- [104] Mostaghim, A. S., Lo, H. Y. A., & Khardori, N. (2017). A retrospective epidemiologic study to define risk factors, microbiology, and clinical outcomes of infective endocarditis in a large tertiary-care teaching hospital. *SAGE Open Medicine*, 5, 2050312117741772.
- [105] Şimşek-Yavuz, S., Şensoy, A., Kaşıkçıoğlu, H., Ceken, S., Deniz, D., Yavuz, A., ... & Yekeler, I. (2015). Infective endocarditis in Turkey: aetiology, clinical features, and analysis of risk factors for mortality in 325 cases. *International Journal of Infectious Diseases*, 30, 106-114.
- [106] Subedi, S., Jennings, Z., & Chen, S. A. (2017). Laboratory approach to the diagnosis of culture-negative infective endocarditis. *Heart, Lung and Circulation*, 26(8), 763-771.
- [107] Nawrot, U., Kowalska-Krochmal, B., Sulik-Tyszk, B., Kozak, M., Świątek, K., Pajączkowska, M., ... & Swoboda-Kopeć, E. (2015). Evaluation of blood culture media for the detection of fungi. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(1), 161-167.
- [108] Liesman, R. M., Pritt, B. S., Maleszewski, J. J., & Patel, R. (2017). Laboratory diagnosis of infective endocarditis. *Journal of clinical microbiology*, 55(9), 2599-2608.
- [109] Baddour, L. M., Wilson, W. R., Bayer, A. S., Fowler Jr, V. G., Tleyjeh, I. M., Rybak, M. J., ... & American Heart Association Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Stroke Council. (2015). Infective endocarditis in adults: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 132(15), 1435-1486.
- [110] Rajani, R., & Klein, J. L. (2020). Infective endocarditis: A contemporary update. *Clinical medicine*, 20(1), 31.
- [111] Ahmad, A., Banbury, Z., Baez, E., Agadi, S., & Chokshi, A. (2022). Pyridoxine-Deficient *Streptococcus*: An Uncommon Virulent Cause of Subacute Destructive Aortic Valve Endocarditis. *Cureus*, 14(3).
- [112] Fihman, V., Faury, H., Moussafeur, A., Huguet, R., Galy, A., Gallien, S., ... & Woerther, P. L. (2021). Blood Cultures for the Diagnosis of Infective Endocarditis: What Is the Benefit of Prolonged Incubation?. *Journal of Clinical Medicine*, 10(24), 5824.

- [113] Habib, G., Lancellotti, P., Antunes, M. J., Bongiorni, M. G., Casalta, J. P., Del Zotti, F., ... & Zamorano, J. L. (2015). 2015 ESC guidelines for the management of infective endocarditis: the task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC) endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *European heart journal*, 36(44), 3075-3128.
- [114] Şimşek-Yavuz, S., Akar, A. R., Aydoğdu, S., Berzeg-Deniz, D., Demir, H., Hazırolan, T., ... & Yılmaz-Karadağ, F. (2020). Consensus Report on Diagnosis, Treatment and Prevention of Infective Endocarditis by Turkish Society of Cardiovascular Surgery (TSCVS), Turkish Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (KLİMİK), Turkish Society of Cardiology (TSC), Turkish Society of Nuclear Medicine (TSNM), Turkish Society of Radiology (TSR), Turkish Dental Association (TDA) and Federation of Turkish Pathology Societies (TURKPATH) Cardiovascular System Study Group. *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 28(1), 2.
- [115] Sagi, M., Neshet, L., & Yagupsky, P. (2017). The Bactec FX blood culture system detects *Brucella melitensis* bacteremia in adult patients within the routine 1-week incubation period. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(3), 942-946.
- [116] Dumm, R. E., Wing, A., Richterman, A., Jacob, J., Glaser, L. J., & Rodino, K. G. (2021). The Brief Case: A Variant on a Classic—*Abiotrophia defectiva* Endocarditis with Discitis. *Journal of clinical microbiology*, 59(10), e03093-20.
- [117] Patil, S. M., Arora, N., Nilsson, P., Yasar, S. J., Dandachi, D., & Salzer, W. L. (2019). Native valve infective endocarditis with osteomyelitis and brain abscess caused by *Granulicatella adiacens* with literature review. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2019.
- [118] Forde, G., Lucey, M., O'Shea, P. M., Okiro, J., Shatwan, R., & Mulkerrin, E. C. (2021). Atypical presentation of *Abiotrophia defectiva* infective endocarditis in an octogenarian. *Clinical Case Reports*, 9(2), 891-897.
- [119] Puzzolante, C., Cuomo, G., Meschiari, M., Bedini, A., Bonazza, A., Venturelli, C., ... & Mussini, C. (2019). *Granulicatella adiacens* and *Abiotrophia defectiva* native vertebral osteomyelitis: three cases and literature review of clinical characteristics and treatment approach. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2019.
- [120] Gupta, P., Agstam, S., Angrup, A., Manoj, R. K., Kanaujia, R., & Ray, P. (2020). Infective endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* presenting as anterior mitral

- leaflet perforation mimicking cleft anterior mitral leaflet. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(2), 1229.
- [121] Chowdhury, S., & German, M. L. (2018). Rare but not infrequent: infective endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva*. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2018.
- [122] Chitneni, A., Giannuzzi, A., Manthani, K., & Gandhi, S. A. (2022). Infective endocarditis secondary to *Granulicatella adiacens*. *Consultant*.
- [123] Park, S., Ann, H. W., Ahn, J. Y., Ku, N. S., Han, S. H., Hong, G. R., ... & Kim, J. M. (2016). A Case of Infective Endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* in Korea. *Infection & Chemotherapy*, 48(3), 229-233.
- [124] Baroz, F., Clément, P., Levy, M., & Duplain, H. (2016). *Abiotrophia defectiva*: an unusual cause of endocarditis. *Revue medicale suisse*, 12(524), 1242-1244.
- [125] Farid, S., Garrigos, Z. E., & Sohail, M. R. (2019). Infective endocarditis due to *Granulicatella elegans* presenting with musculoskeletal symptoms. *BMJ Case Reports CP*, 12(8), e229294.
- [126] Tong, Y. L., Qu, T. T., Xu, J., Chen, N. Y., & Yang, M. F. (2017). Successful treatment of an acute infective endocarditis secondary to fish bone penetrating into left atrium caused by *Granulicatella adiacens* and *Candida albicans*: a case report. *Medicine*, 96(51).
- [127] Li, J., Zhou, L., Gong, X., Wang, Y., Yao, D., & Li, H. (2022). *Abiotrophia Defectiva* as a Rare Cause of Mitral Valve Infective Endocarditis With Mesenteric Arterial Branch Pseudoaneurysm, Splenic Infarction, and Renal Infarction: A Case Report. *Frontiers in Medicine*, 9, 780828.
- [128] Opperman, C. J., & Hitzeroth, J. (2020). A rare cause of infective endocarditis and stroke: Filamentous vegetation due to *Granulicatella adiacens*. *International Journal of Infectious Diseases*, 97, 143-144.
- [129] Frenkel, A., & Hirsch, W. (1961). Spontaneous development of L forms of streptococci requiring secretions of other bacteria or sulphhydryl compounds for normal growth. *Nature*, 191(4789), 728-730.
- [130] Christensen, J. J. E., Nielsen, X. C., & Ruoff, K. L. (2019). *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and other aerobic catalase-negative, Gram-positive cocci. In K. C. Carroll, M. A. Pfaller, M. L. Landry, A. J. McAdam, R. Patel, S. S. Richter, & D. W. Warnock (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (12 ed., Vol. 1, pp. 436-450).
- [131] Patel, S. N., Marchand-Austin, A., Siebert, H., Siddiqi, F., Soares, D., & Kus, J. V. (2017). Susceptibility profiles of nutritionally variant streptococci (NVS) recovered from

- invasive cases in Ontario, Canada. Official Journal of The Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada, 2(2), 11-15.
- [132] Téllez, A., Ambrosioni, J., Llopis, J., Pericàs, J. M., Falces, C., Almela, M., ... & Miro, J. M. (2018). Epidemiology, clinical features, and outcome of infective endocarditis due to *Abiotrophia* species and *Granulicatella* species: report of 76 cases, 2000–2015. *Clinical Infectious Diseases*, 66(1), 104-111.
- [133] Madison, G., Golamari, R., & Bhattacharya, P. (2018). Endocarditis caused by *Abiotrophia* and *Granulicatella* species. *IntechOpen*.
- [134] Rudrappa, M., & Kokatnur, L. (2017). Infective endocarditis due to *Abiotrophia defectiva* and its feared complications in an immunocompetent person: rare, but real. *Journal of Global Infectious Diseases*, 9(2), 79.
- [135] Foley, E. D., Ben Omran, M., Bora, V., & Castresana, M. R. (2018). Cardiogenic and septic shock associated with aortic and mitral valve infective endocarditis caused by *Abiotrophia defectiva* from a urinary tract infection. *SAGE Open Medical Case Reports*, 6, 2050313X18787700.
- [136] Cañas, M. A., Téllez, A., García de la Mària, C., Dahl, A., García-González, J., Hernández-Meneses, M., ... & Miró, J. M. (2021). Development of High-Level Daptomycin Resistance in *Abiotrophia* and *Granulicatella* Species Isolates from Patients with Infective Endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(10), e02522-20.
- [137] Podgórska, A., Kordybach-Prokopiuk, M., Jaworska-Wilczyńska, M., Hoffman, P., Biernacka, K., Kuśmierski, K., ... & Lutyńska, A. (2022). The First Case of *Granulicatella adiacens* Identified from a Resected Heart Valve by Next Generation Sequencing (NGS) in Poland. *Pathogens*, 11(3), 295.
- [138] Sinner, S. W., & Tunkel, A. R. (2015). Viridans streptococci, nutritionally variant streptococci, groups C and G streptococci, and other related organisms. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (pp. 2349-2361). WB Saunders.
- [139] Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Publishers.
- [140] Thirunavukkarasu, S., & Rathish, K. C. (2014). Evaluation of direct tube coagulase test in diagnosing staphylococcal bacteremia. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(5), DC19.

- [141] Andriesse, G. I., Elberts, S., Vrolijk, A., Verhulst, C., & Kluytmans, J. A. J. W. (2011). Evaluation of a fourth-generation latex agglutination test for the identification of *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(2), 259-264.
- [142] Dhiman, N., Trienski, T. L., DiPersio, L. P., & DiPersio, J. R. (2013). Evaluation of the BinaxNOW *Staphylococcus aureus* test for rapid identification of Gram-positive cocci from VersaTREK blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 2939-2942.
- [143] Peeters, M., Chung, P., Lin, H., Mortelmans, K., Phe, C., San, C., ... & Jacobs, J. (2018). Diagnostic accuracy of the InBiOS AMD rapid diagnostic test for the detection of *Burkholderia pseudomallei* antigen in grown blood culture broth. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(6), 1169-1177.
- [144] Kuijpers, L. M., Chung, P., Peeters, M., Phoba, M. F., Kham, C., Barbé, B., ... & Jacobs, J. (2018). Diagnostic accuracy of antigen-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for the detection of *Salmonella* in blood culture broth. *PLoS One*, 13(3), e0194024.
- [145] Zimmerman, F. S., Karamah, H., Ben-Chetrit, E., Zalut, T., Assous, M., & Levin, P. D. (2020). Modification of blood test draw order to reduce blood culture contamination: a randomized clinical trial. *Clinical Infectious Diseases*, 71(5), 1215-1220.
- [146] Binkhamis, K., & Forward, K. (2014). Effect of the initial specimen diversion technique on blood culture contamination rates. *Journal of clinical microbiology*, 52(3), 980-981.
- [147] Rupp, M. E., Cavalieri, R. J., Marolf, C., & Lyden, E. (2017). Reduction in blood culture contamination through use of initial specimen diversion device. *Clinical Infectious Diseases*, 65(2), 201-205.
- [148] Bowen, C. M., Coleman, T., & Cunningham, D. (2016). Reducing blood culture contaminations in the emergency department: it takes a team. *Journal of Emergency Nursing*, 42(4), 306-311.
- [149] Chappell-Campbell, L., Schwenk, H. T., Capdarest-Arest, N., & Schroeder, A. R. (2020). Reporting and categorization of blood culture contaminants in infants and young children: a scoping review. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 9(2), 110-117.
- [150] Self, W. H., Mickanin, J., Grijalva, C. G., Grant, F. H., Henderson, M. C., Corley, G., ... & Paul, B. R. (2014). Reducing blood culture contamination in community hospital

- emergency departments: a multicenter evaluation of a quality improvement intervention. *Academic Emergency Medicine*, 21(3), 274-282.
- [151] Ramirez, P., Gordón, M., Cortes, C., Villarreal, E., Perez-Belles, C., Robles, C., ... & Bonastre, J. (2015). Blood culture contamination rate in an intensive care setting: effectiveness of an education-based intervention. *American journal of infection control*, 43(8), 844-847.
- [152] Snyder, S. R., Favoretto, A. M., Baetz, R. A., Derzon, J. H., Madison, B. M., Mass, D., ... & Liebow, E. B. (2012). Effectiveness of practices to reduce blood culture contamination: a Laboratory Medicine Best Practices systematic review and metaanalysis. *Clinical biochemistry*, 45(13-14), 999-1011.

Rédigée par :

ACHOUR Said, Email : saidachour7991@gmail.com

BENCHIKH Hamza Soufiane, Email : Hammezak@gmail.com

RÉSUMÉ

La bactériémie est une affection grave et redoutée, du fait d'une mortalité associée élevée. Les hémocultures sont considérées comme la méthode de référence pour le diagnostic de la bactériémie et font partie des fonctions les plus importantes du laboratoire de microbiologie clinique.

Des hémocultures négatives signent dans la plupart des cas l'absence de bactéries dans le sang. Toutefois, devant un contexte clinique évocateur de syndrome infectieux, il faut toujours garder à l'esprit que l'hémoculture peut être faussement négative, du fait d'un prélèvement effectué au moment non optimal ou sous antibiothérapie, quantité de sangensemencée insuffisante, longue durée de stockage avant l'incubation, ... Cette thèse fait le point sur les données récentes pour éviter les faux négatifs, et améliorer le temps et le rendement des hémocultures.

Dans cette thèse, nous présentons aussi une discussion approfondie des questions liées au problème de la contamination des hémocultures. Les questions abordées comprennent la portée et l'ampleur du problème, les bactéries les plus souvent reconnues comme des contaminants, l'impact de la contamination des hémocultures sur le fonctionnement du laboratoire de microbiologie clinique, et, peut-être le plus important, une discussion systématique des solutions au problème.

Mots clés : hémoculture, sang, bactériémie, contamination de l'hémoculture.

ABSTRACT

Bacteremia is a serious and dreaded condition, due to the high associated mortality. Blood cultures are regarded as the gold standard for diagnosis of bacteremia and are among the most important functions of the clinical microbiology laboratory.

Negative blood cultures sign in most cases the absence of bacteria in the blood. However, faced with a clinical context suggestive of an infectious syndrome, it should always be borne in mind that the blood culture may be falsely negative, due to a sample taken at the non-optimal time or under antibiotic therapy, insufficient quantity of blood inoculated, long storage time before incubation, ... This thesis reviews recent data to avoid false negatives, and improve the time and yield of blood cultures.

In this thesis, we also present a comprehensive discussion of matters related to the problem of blood culture contamination. Issues addressed include the scope and magnitude of the problem, the bacteria most often recognized as contaminants, the impact of blood culture contamination on clinical microbiology laboratory function, and, perhaps most importantly, a systematic discussion of solutions to the problem.

Keywords : blood culture, blood, bacteraemia, blood culture contamination.

