

**ANNÉE 2015**

**N° 011**

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE**  
**BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 09 Avril 2015

Par Jean THOMIN

**Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février**

**THÈSE**  
**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Comparaison de quatre protocoles d'identification bactérienne  
par spectrométrie de masse directement à partir d'hémocultures positives**

-----  
**Président : Mme Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie**

**Membres du jury : Mr D. Bouteille, Professeur de Maladies infectieuses et Tropicales**  
**Mr E. Batard, Professeur de Thérapeutique**  
**Mr C. Bretonnière, Praticien Hospitalier de Réanimation**  
**Mr S. Corvec, Maître de Conférences de Bactériologie**  
**Mr G. Aubin, Assistant Hospitalo-Universitaire de Bactériologie**  
**Mme F. Le Gallou, Praticien Hospitalier de Bactériologie - Hygiène**

# Remerciements

---

A Monsieur le Docteur S. Corvec, mon directeur de thèse,

Ma profonde reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, ainsi que pour votre disponibilité, votre accompagnement et vos encouragements tout au long de ce travail.

A Madame le Professeur N. Caroff,

Pour me faire l'honneur de présider ce jury et pour l'ensemble de vos enseignements tout au long de mon cursus universitaire. Soyez assurée de ma sincère gratitude.

A Monsieur le Docteur G. Aubin,

Tous mes remerciements pour ton concours dans ce projet, ainsi que tes enseignements pendant mon stage dans le service de Bactériologie.

A Madame Le Docteur F. Le Gallou,

Mes sincères remerciements pour vous être rendue disponible pour faire partie de ce jury.

A Monsieur le Docteur C. Bretonniere,

Pour votre contribution à l'élaboration de ce mémoire, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

A Messieurs les Professeurs E. Batard et D. Boutoille,

Pour avoir accepté d'être membres de mon jury, veuillez recevoir ma sincère reconnaissance.

Aux services de Bactériologie du CHU de Nantes et de Microbiologie du CH du Mans, qui m'ont laissé du temps pour élaborer ce mémoire. Merci notamment au Dr Ramanantsoa pour son aide et ses encouragements lors de l'élaboration de ce manuscrit.

A tous mes co-internes, rencontrés durant mon internat, pour tous les bons moments partagés au cours de mes différents stages. Une pensée particulière aux biochimistes pour cet unique début dans la biologie.

A Cécile, d'être à mes côtés, et de ne pas avoir fui dans les moments où la folie me guettait.

A mes parents, merci de m'avoir accompagné tout au long de ces études. Merci particulièrement à toi, maman, pour ton soutien sans faille.

# Sommaire

---

<b><u>TABLE DES ABREVIATIONS</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>LISTE DES TABLEAUX</u></b> .....	<b>7</b>
<b><u>LISTE DES FIGURES</u></b> .....	<b>8</b>
<b><u>LISTE DES ANNEXES</u></b> .....	<b>10</b>
<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	<b>11</b>
<b><u>PARTIE I : LES BACTERIEMIES- REVUE DE LA LITTERATURE</u></b> .....	<b>13</b>
<b>I- Définitions</b> .....	<b>14</b>
1- Définition des différents états infectieux .....	14
2- Différents types de bactériémies .....	15
<b>II- Epidémiologie des bactériémies</b> .....	<b>15</b>
1- Impact des bactériémies en France .....	15
2- Epidémiologie des bactériémies .....	15
3- Les différentes catégories de bactériémies.....	19
<b>III- Physiopathologie des bactériémies et sepsis</b> .....	<b>21</b>
1- Foyer primaire et facteurs de risque de développer une bactériémie.....	21
1-1 Facteurs de risque de développer une bactériémie.....	21
1-2 Foyer primaire.....	21
2- Virulence bactérienne et pathogénèse lors d'une bactériémie.....	23
3- Interaction hôte-pathogène.....	25
3-1 Phase d'initiation .....	25
3-2 Phase d'amplification.....	26
3-3 Conséquences de l'orage cytokinique et mécanisme de la défaillance organique.....	27
<b>IV- Antibiothérapie chez les patients septiques</b> .....	<b>29</b>
1- Antibiothérapie probabiliste.....	29
2- Adaptation de l'antibiothérapie.....	31
3- Association d'antibiotiques.....	31
4- Posologie et durée de traitement .....	32
5- Facteurs influençant l'efficacité de l'antibiothérapie .....	32
<b>V- Méthodes diagnostiques des bactériémies au laboratoire</b> .....	<b>34</b>
1- Réalisation d'une hémoculture .....	34

1-1 Le prélèvement.....	34
1-1-1 Mode de prélèvement et précautions .....	34
1-1-2 Conditions et quantité de sang à prélever .....	34
1-1-3 A quel moment prélever ?.....	35
1-1-4 Transport du prélèvement .....	36
1-2 L'examen bactériologique .....	36
1-2-1 Détection de la croissance bactérienne .....	36
1-2-1-1 Historique .....	36
1-2-1-2 Systèmes automatisés .....	36
1-2-2 Traitement des flacons positifs .....	38
1-3 Interprétation.....	38
1-3-1 La contamination .....	38
1-3-2 Cas des dispositifs intra-vasculaires (cathéter, chambre implantable).....	39
1-4 Impact de l'hémoculture dans la prise en charge du patient bactériémique .....	39
1-4-1 Résumé de la prise en charge traditionnelle des hémocultures .....	39
1-4-2 Limites de l'hémoculture.....	40
1-4-3 Optimisation de la prise en charge des hémocultures.....	40
2- Les nouvelles techniques moléculaires .....	42
2-1 Les technologies moléculaires, basées sur la détection des acides nucléiques.....	42
2-1-1 Hybridation .....	42
2-1-2 Techniques d'amplification .....	43
2-1-2-1 Principe de la PCR .....	43
2-1-2-2 Exemples de tests commercialisés à partir des hémocultures positives ....	45
2-1-2-3 Evolution des tests moléculaires utilisés à partir des hémocultures positives.....	46
2-1-2-4 Exemples de tests d'identification bactérienne directement à partir du sang du patient .....	47
2-1-3 Limites des techniques de biologie moléculaire.....	48
2-2 La technologie MALDI-TOF MS .....	49
2-2-1 Principe de la technique MALDI-TOF MS.....	49
2-2-2 Systèmes et bases de données disponibles .....	51
2-2-3 Application en bactériologie.....	51

2-2-3-1 Utilisation en routine : exemple du spectromètre VitekMS® .....	52
2-2-3-2 Intérêt de la spectrométrie de masse.....	52
2-2-4 Identification directement à partir des flacons d'hémoculture positifs .....	53
2-2-4-1 Principes des protocoles .....	54
2-2-4-2 Performance des protocoles .....	55
2-2-5 Autres applications potentielles des systèmes MALDI-TOF .....	56
<b><u>PARTIE II : MATERIELS ET METHODES</u></b> .....	<b>59</b>
<b>I- Objectifs de notre étude</b> .....	<b>60</b>
1- Objectif principal .....	60
2- Objectif secondaire .....	60
<b>II- Sélection des échantillons</b> .....	<b>60</b>
<b>III- Protocoles d'identification rapide</b> .....	<b>61</b>
1- Protocole inspiré de l'étude de Prod'hom <i>et al</i> (155) (Protocole 1).....	61
2- Optimisation du protocole avec centrifugation rapide (Protocole 2).....	62
3- Protocole avec centrifugation rapide et utilisation de saponine (Protocole 3).....	63
4- Protocole avec centrifugation rapide et utilisation d'acide formique (Protocole 4) .....	63
<b>IV- Protocole d'identification classique en routine</b> .....	<b>65</b>
<b>VI- Analyse des résultats</b> .....	<b>66</b>
<b><u>PARTIE III : RESULTATS</u></b> .....	<b>67</b>
<b>I- Répartition des familles bactériennes dans les divers protocoles</b> .....	<b>68</b>
<b>II- Résultats de l'identification bactérienne</b> .....	<b>69</b>
2-1 Protocole 1, inspiré de Prod'hom <i>et al</i> , 2009 (155).....	69
2-2 Protocole 2, avec utilisation de centrifugation rapide.....	71
2-3 Protocole 3, avec utilisation de centrifugation rapide et de saponine .....	73
2-4 Protocole 4, avec utilisation de centrifugation rapide et acide formique.....	75
<b>III- Performance comparative des différents protocoles</b> .....	<b>77</b>
<b>IV- Influence des différents paramètres étudiés</b> .....	<b>78</b>
<b>V- Durée des différents protocoles</b> .....	<b>79</b>
<b>VI- Coût des protocoles</b> .....	<b>80</b>
<b><u>PARTIE IV : DISCUSSION</u></b> .....	<b>81</b>
<b><u>CONCLUSION</u></b> .....	<b>91</b>
<b><u>ANNEXES</u></b> .....	<b>92</b>

**BIBLIOGRAPHIE.....102**

# Table des abréviations

---

**CHCA**  $\alpha$ -Cyano-4-HydroxyCinnamic Acid

**DS** Disposable Slides

**ELISA** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

**ESI** ElectroSpray Ionization

**FISH** Fluorescence *In Situ* Hybridization

**LPS** LipoPolySaccharide

**MALDI-TOF MS** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation- Time-Of-flight Mass Spectrometry

**PAMPs** Pathogen-Associated Molecular Patterns

**PCR** Polymerase Chain Reaction

**PNA** Peptide Nucleic Acid

**PRR** Pattern Recognition Receptors

**SARM** *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

**SCN** Staphylocoques à Coagulase Négative

**SFAR** Société Française d'Anesthésie et Réanimation

**SRIS** Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique

**TLR** Toll-Like Receptors

# Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Les différents états septiques.....	14
<b>Tableau 2</b> : Fréquences des micro-organismes isolés dans les bactériémies.....	17
<b>Tableau 3</b> : Epidémiologie des bactériémies au C.H.U de Nantes entre 2009 et 2013.....	18
<b>Tableau 4</b> : Principaux micro-organismes isolés dans les bactériémies selon leur mode d'acquisition.....	20
<b>Tableau 5</b> : Fréquence (%) des différentes portes entrées à l'origine de bactériémie.....	23
<b>Tableau 6</b> : Exemples des facteurs de virulence de <i>Streptococcus pneumoniae</i> (d'après Moine <i>et al</i> , 2004).....	24
<b>Tableau 7</b> : Proposition d'antibiothérapie probabiliste selon la porte d'entrée suspectée (adaptée de La Société Française d'Anesthésie et de Réanimation, 2004).....	30
<b>Tableau 8</b> : Association entre antibiothérapie inadaptée et mortalité .....	32
<b>Tableau 9</b> : Caractéristiques des automates commercialisés en France (d'après La Société Française de Microbiologie, REMIC, 2004).....	37
<b>Tableau 10</b> : Taux de contamination rapporté au nombre d'hémocultures positives.....	38
<b>Tableau 11</b> : Performances des techniques commercialisées pour l'identification bactérienne directement à partir du sang.....	48
<b>Tableau 12</b> : Caractéristiques et performances des protocoles d'identification par MALDI-TOF à partir de flacons d'hémocultures monomicrobiens .....	57
<b>Tableau 13</b> : Synthèse des quatre protocoles mis au point et évalués dans notre étude.....	64
<b>Tableau 14</b> : Résultats d'identification par le Protocole 1 (n=194).....	69
<b>Tableau 15</b> : Résultats d'identification par le Protocole 2 (n=367).....	71
<b>Tableau 16</b> : Résultats d'identification par le Protocole 3 (n=168).....	73
<b>Tableau 17</b> : Résultats d'identification par le Protocole 4 (n=200).....	75
<b>Tableau 18</b> : Caractéristiques des paramètres étudiés selon les divers protocoles et résultats obtenus.....	79

# Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Exemple de l'adhérence de <i>E. coli</i> à l'épithélium vésical (d'après Bidet <i>et al</i> , 2012).....	21
<b>Figure 2</b> : Facteurs moléculaires associés aux agents pathogènes et TLRs correspondant (d'après Van der Poll <i>et al</i> , 2008).....	25
<b>Figure 3</b> : Interaction entre l'hôte et le pathogène - Réponse inflammatoire déséquilibrée et conséquences (d'après Angus <i>et al</i> , 2013).....	28
<b>Figure 4</b> : Prédiction de mortalité en fonction du délai avant la première administration d'antibiotiques (d'après Ferrer <i>et al</i> , 2014).....	33
<b>Figure 5</b> : Schéma d'une hémoculture manuelle.....	36
<b>Figure 6</b> : Délai classiquement retrouvé avant obtention des résultats de l'hémoculture par les méthodes phénotypiques .....	39
<b>Figure 7</b> : Exemples représentatifs d'échantillons positifs à <i>S. aureus</i> (vert), à staphylocoques coagulase négative (rouge), avec le test QuickFISH BC® (AdvanDx, USA).....	43
<b>Figure 8</b> : Exemple d'un résultat MRSA positif / <i>S. aureus</i> positif, avec le test Xpert™ MRSA/SA (Cepheid, Maurens-Scopont, France) sur GeneXpert® BC (Cepheid).....	46
<b>Figure 9</b> : Schéma du spectromètre de masse et principe de la technologie MALDI-TOF (d'après Gravet <i>et al</i> , 2013).....	50
<b>Figure 10</b> : Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières de cinq espèces bactériennes différentes (d'après Carbonnelle <i>et al</i> , 2011).....	51
<b>Figure 11</b> : Délai classiquement retrouvé avant obtention des résultats de l'hémoculture avec l'apport de la technologie MALDI-TOF MS.....	53
<b>Figure 12</b> : Délai classiquement retrouvé avant obtention des résultats de l'hémoculture avec l'apport de l'identification rapide à partir des flacons positifs.....	54
<b>Figure 13</b> : Pics liés aux composants dans sang dans les spectres de masse (d'après Drancourt <i>et al</i> , 2010).....	54

<b>Figure 14</b> : Protocole 1 d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémocultures positifs.....	62
<b>Figure 15</b> : Répartition des familles bactériennes isolées dans les protocoles (hémocultures monomicrobiennes).....	68
<b>Figure 16</b> : Pourcentage d'identification correcte à l'espèce des différentes catégories bactériennes selon les quatre protocoles .....	77

# Liste des annexes

---

<b>Annexe 1</b> : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 1.....	93
<b>Annexe 2</b> : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 2.....	95
<b>Annexe 3</b> : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 3.....	97
<b>Annexe 4</b> : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 4.....	99
<b>Annexe 5</b> : Algorithme de diagnostic des bactériémies avec utilisation du protocole d'identification rapide des bactéries directement à partir des flacons d'hémocultures.....	101

# Introduction

---

Les bactériémies constituent aujourd'hui encore un important problème de Santé Publique, en raison de la mortalité et du surcoût qu'elles engendrent.

Le diagnostic des bactériémies repose sur la réalisation d'hémocultures chez un patient présentant un ou des signes de sepsis. La prise en charge de ces hémocultures au laboratoire de Bactériologie nécessite une incubation préalable des flacons d'hémocultures prélevés. En cas de positivité, une identification de la bactérie en cause, ainsi qu'une étude de sa sensibilité aux antibiotiques sont alors engagées.

La précocité de l'instauration d'une antibiothérapie probabiliste puis adaptée en cas de sepsis sévère apparaît comme particulièrement importante pour le pronostic des patients. Dans ce contexte, l'optimisation de la prise en charge des hémocultures au laboratoire de Bactériologie est essentielle. En effet, après la mise en place d'un traitement antibiotique probabiliste, les résultats microbiologiques, notamment l'identification, sont tout particulièrement importants pour l'adaptation de l'antibiothérapie.

En 2013, l'arrivée dans le service de Bactériologie-Hygiène hospitalière du C.H.U. de Nantes de la technologie innovante de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight Mass Spectrometry) pour l'identification bactérienne a révolutionné l'identification en routine des micro-organismes les plus souvent rencontrés en microbiologie médicale. Elle a désormais supplanté les tests phénotypiques. Son application à l'identification des micro-organismes directement à partir des prélèvements a ouvert de nouvelles perspectives. Dans le cadre des bactériémies, cette technologie permet l'identification rapide des bactéries, directement à partir des flacons d'hémocultures détectés positifs, après un pré-traitement permettant l'obtention d'un culot bactérien. Cette identification rapide s'affranchit de l'étape de subculture utilisée jusqu'alors au C.H.U. de Nantes, permettant un gain de temps d'une journée dans le rendu de l'identification microbiologique au clinicien.

L'objectif de ce travail a été de comparer l'efficacité, la durée et le coût de différents protocoles d'identification rapide des bactéries, directement à partir des flacons d'hémocultures détectés positifs, avec le système MALDI-TOF MS VitekMS<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy-l'étoile, France). Dans le but d'une intégration potentielle dans le cadre des activités de

diagnostic de routine des bactériémies dans le service, les protocoles testés sont caractérisés par leur simplicité et leur rapidité.

Après un rappel sur les bactériémies et les techniques de diagnostic actuellement disponibles, les divers protocoles développés et testés seront détaillés. Les résultats d'identification obtenus à partir de ces derniers seront ensuite analysés et discutés.

# **PARTIE I : LES BACTERIEMIES - REVUE DE LA LITTERATURE**

---

## I- Définitions

Le sang circulant est un milieu normalement stérile. Anciennement dénommée septicémie, la bactériémie est une définition biologique qui correspond à la présence de bactéries dans le sang. La bactériémie peut être symptomatique ou asymptomatique. Dans le premier cas, trois degrés de gravité croissante sont schématiquement décrits : le sepsis, le sepsis sévère ou grave et le choc septique (1).

### 1- Définition des différents états infectieux

Il est important de distinguer les divers états infectieux, qui sont associés à des pronostics et des prises en charge différentes. Leur définition est résumée dans le Tableau 1.

Le Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (S.R.I.S.) représente un état inflammatoire généralisé et s'observe dans toute pathologie à composante inflammatoire (maladies de système, ischémies, pancréatites...). Lorsque le S.R.I.S. est lié à une infection, le terme «sepsis» est utilisé. Il est important de ne pas confondre les termes sepsis et bactériémie. Le sepsis est considéré comme sévère lorsqu'il est accompagné de dysfonction organique, d'une hypoperfusion ou d'une hypotension artérielle. Enfin, le choc septique est le stade ultime d'un sepsis (1). Toutefois, les définitions des différents états septiques, établies en 1991, restent soumises à débat (2,3).

**Tableau 1 : Les différents états septiques.**

<b>Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Température &lt; 36°C ou &gt; 38°C</li><li>- Fréquence cardiaque &gt; 90/min</li><li>- Fréquence respiratoire &gt; 20/min ou PaCO<sub>2</sub> &lt; 32 mm de Hg</li><li>- Leucocytose &gt; 12.000/mm<sup>3</sup>, &lt; 4.000/mm<sup>3</sup> ou présence de formes immatures circulantes (&gt; 10 % des cellules)</li></ul>
<b>Sepsis</b>	Critère du S.R.I.S., avec infection documentée
<b>Sepsis sévère/grave</b>	Sepsis avec dysfonction organique, hypoperfusion (acidose lactique, oligurie, troubles de conscience,...) ou hypotension artérielle (TAs < 90 mm de Hg ou chute > 40 mm de Hg de la valeur de base sans autre raison connue)
<b>Choc septique</b>	Sepsis sévère avec hypotension réfractaire au remplissage vasculaire

## **2- Différents types de bactériémies**

Classiquement, trois types de bactériémies sont définies (4) :

- les bactériémies transitoires, fréquentes, peuvent s'observer après extractions dentaires, endoscopies et manipulations de sites variés mais également après un simple brossage des dents. Elles sont, dans la majorité des cas, spontanément résolutive et sans conséquences physiopathologiques.
- Les bactériémies intermittentes se caractérisent par la présence répétée de bactéries dans le sang, sur des périodes plus ou moins prolongées. Elles sont secondaires à des collections fermées, notamment des abcès ou des infections focales, comme les pneumonies, les infections urinaires ou les infections ostéo-articulaires.
- Les bactériémies continues sont liées à la présence d'un foyer infectieux intra-vasculaire. Elles sont observées lors des endocardites infectieuses, des infections liées à un cathéter, des brucelloses ou fièvres typhoïdes.

## **II- Epidémiologie des bactériémies**

### **1- Impact des bactériémies en France**

Les bactériémies demeurent une cause importante de morbidité et mortalité dans le monde, notamment lorsqu'elles sont à l'origine de sepsis sévère et de choc septique (5,6). En France, l'étude Episepsis, menée en 2001, dénombrait environ 75000 cas de sepsis sévères par an (incluant les chocs septiques) dans les services de Réanimation (7). Le pronostic restait péjoratif, avec une mortalité de l'ordre de 30 % à 28 jours dans cette étude. En cas de choc septique, la mortalité était significativement plus élevée.

Les bactériémies ont aussi un impact socio-économique. Elles justifient un surcoût, en raison de l'allongement de la durée moyenne de séjour et de la prise en charge médicale supplémentaire nécessaire (8,9).

### **2- Epidémiologie des bactériémies**

En général, les bactériémies apparaissent comme monomicrobiennes, dans plus de 90 % des cas (10–13). En dehors des contaminations, les bactériémies polymicrobiennes sont

habituellement retrouvées en cas de foyer polymicrobien, notamment digestif, chez les patients immunodéprimés ou en phase agonique (10,14).

Classiquement, les deux pathogènes les plus fréquemment isolés sont *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. *S. aureus* apparaît comme la bactérie majoritairement isolée dans les études américaines, alors que les études européennes montrent une prédominance de *E. coli* (Tableau 2, page 17).

Une évolution de l'épidémiologie des bactériémies dans le temps a été observée. Martin *et al* ont montré ainsi une forte augmentation des sepsis aux USA, de 164000 à 660000 cas par an, entre 1979 et 2000 (11). Une étude européenne norvégienne de Haug *et al* a confirmé cette observation, soulignant un doublement de l'incidence des bactériémies entre les périodes 1974-1979 et 1988-1989 (15). L'écologie des bactériémies se trouve également modifiée au cours du temps. Martin *et al* ont constaté une augmentation des bactériémies liées à des bactéries à Gram positif à partir de la fin des années 1980, pour finalement dépasser le nombre de celles à bactéries à Gram négatif en 2000. Haug *et al* ont aussi noté l'émergence des bactéries à Gram positif, notamment des staphylocoques, dont l'incidence s'est accrue de 6,5 % à 16,9 % en dix ans. Cette évolution est notamment corrélée à l'utilisation accrue des dispositifs intra-vasculaires et l'apparition de nouveaux antibiotiques actifs contre les bactéries à Gram négatif.

**Tableau 2 : Fréquences des micro-organismes isolés dans les bactériémies.**

	Références	Fréquence des micro-organismes isolés
<b>Etudes européennes</b>	Vallés <i>et al</i> , 2007 (10) (1157 épisodes de bactériémies et fongémies)	<i>E. coli</i> (40,8 %), <i>S. aureus</i> (9 %), SCN (5,3 %), <i>S. pneumoniae</i> (6,9 %), <i>P. aeruginosa</i> (5,4 %), <i>K. pneumoniae</i> (3,5 %)
	Bouza <i>et al</i> , 2010 (16) (298 épisodes de bactériémies et fongémies)	<i>E. coli</i> (18,6 %), <i>S. aureus</i> (17,5 %), SCN (13,8 %), <i>Enterococcus</i> sp. (8,8 %), <i>S. pneumoniae</i> (7,6 %), <i>K. pneumoniae</i> (5,6 %), <i>P. aeruginosa</i> (3,7 %)
<b>Etudes américaines</b>	Riedel <i>et al</i> , 2008 (17) (1436 épisodes de bactériémies et fongémies)	<i>S. aureus</i> (26,5 %), <i>E. coli</i> (13,5 %), SCN (11%), <i>Enterococcus</i> sp. (9,5 %), <i>K. pneumoniae</i> (7,5 %), <i>P. aeruginosa</i> (4,5 %)
	Pien <i>et al</i> , 2010 (12) (1364 épisodes de bactériémies et fongémies)	<i>S. aureus</i> (23 %), <i>E. coli</i> (12 %), <i>Enterococcus</i> sp. (9 %), SCN (8 %), <i>P. aeruginosa</i> (4 %)

*E. coli* : *Escherichia coli* ; *K. pneumoniae* : *Klebsiella pneumoniae* ; *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *S. aureus* : *Staphylococcus aureus* ; *S. pneumoniae* : *Streptococcus pneumoniae* ; SCN : *Staphylocoques à Coagulase Négative*

L'écologie bactérienne du C.H.U. de Nantes entre 2009 et 2013 est recensée dans le Tableau 3. La distribution des espèces retrouvées correspond aux données de la littérature.

**Tableau 3 : Epidémiologie des bactériémies au C.H.U. de Nantes entre 2009 et 2013.**

Année	Nombre d'hémocultures prélevées	Nombre (pourcentage) d'hémocultures positives	Fréquence des micro-organismes isolés
2013	39902	4111 (10,3 %) correspondant à 2424 épisodes bactériémiques	SCN (33,5 %), <i>E. coli</i> (17,6 %), <i>S. aureus</i> (10,6 %), <i>P. aeruginosa</i> (3,7 %), <i>E. faecalis</i> (3,3 %), <i>E. cloacae</i> (2,3 %), <i>K. pneumoniae</i> (2,2 %), <i>S. pneumoniae</i> (2,0 %)
2012	38434	3906 (10,1 %) correspondant à 2119 épisodes bactériémiques	SCN (31,6 %), <i>E. coli</i> (15,2 %), <i>S. aureus</i> (9,6 %), <i>E. faecalis</i> (3,7 %), <i>S. pneumoniae</i> (3,3 %), <i>P. aeruginosa</i> (3,0 %), <i>E. cloacae</i> (1,8 %), <i>S. agalactiae</i> (1,5 %)
2011	38220	3919 (10,3 %) correspondant à 2197 épisodes bactériémiques	SCN (33,5 %), <i>E. coli</i> (17,7 %), <i>S. aureus</i> (10,5 %), <i>E. faecalis</i> (3,8 %), <i>S. pneumoniae</i> (2,8 %), <i>P. aeruginosa</i> (2,5 %), <i>E. cloacae</i> (2,4 %), <i>K. pneumoniae</i> (1,8 %)
2010	36709	3368 (9,2 %) correspondant à 2006 épisodes bactériémiques	SCN (31,2 %), <i>E. coli</i> (17,2 %), <i>S. aureus</i> (11 %), <i>S. pneumoniae</i> (3,9 %), <i>P. aeruginosa</i> (3,4 %), <i>E. faecalis</i> (2,5 %), <i>E. cloacae</i> (2,2 %), <i>K. pneumoniae</i> (2,1 %)
2009	37762	3613 (9,6 %) correspondant à 2230 épisodes bactériémiques	SCN (32,7 %), <i>E. coli</i> (15,7 %), <i>S. aureus</i> (10,9 %), <i>E. faecalis</i> (3,4 %), <i>S. pneumoniae</i> (3,4 %), <i>P. aeruginosa</i> (3,1 %), <i>K. pneumoniae</i> (2 %), <i>E. cloacae</i> (1,8 %),

### **3- Les différentes catégories de bactériémies.**

Classiquement, les bactériémies communautaires se distinguent des bactériémies nosocomiales, celles-ci apparaissant chez les patients hospitalisés depuis plus de 48 heures (18). Plus récemment, une nouvelle catégorie, les bactériémies associées aux soins, a été définie (19). Elles correspondent aux bactériémies survenant au moment de l'hospitalisation ou dans les 48 premières heures (comme les bactériémies communautaires donc), mais chez des patients ayant eu un contact récent avec le système médical (chimiothérapie parentérale, dialyse dans les 90 jours précédents, traitement I.V. ou nutrition parentérale dans les 30 jours précédents, hospitalisation de plus de 48 heures dans les 90 jours précédents...).

L'écologie de ces différentes catégories diffère (Tableau 4, page 20). *E. coli* apparaît ainsi comme le micro-organisme majoritairement isolé lors des bactériémies communautaires, suivi par *S. aureus* et *S. pneumoniae*. Dans les bactériémies nosocomiales, les staphylocoques à coagulase négative sont fortement représentés contrairement aux bactériémies communautaires. Ils constituent, avec *E. coli* et *S. aureus*, les micro-organismes majoritairement isolés dans ce type de bactériémie. L'étude espagnole de Vallès *et al* a montré que les bactériémies nosocomiales étaient associées à une mortalité significativement supérieure (10,4 % de mortalité pour les bactériémies communautaires et 27,3 % pour les bactériémies nosocomiales) (10). L'étude de Diekema *et al* a constaté cette même différence (14 % de mortalité pour les bactériémies communautaires *versus* 34 % pour les bactériémies nosocomiales) (20).

L'étude espagnole de Vallès *et al* a également révélé des différences importantes entre les bactériémies associées aux soins, récemment définies, et les bactériémies communautaires (10). En effet, les bactériémies associées aux soins touchent des patients plus âgés et sont associées à une mortalité plus importante (27,5 % contre 10,4 %), proche des chiffres observés pour les bactériémies nosocomiales. Les sources d'infection de ces bactériémies, et donc l'écologie qui en résulte, possèdent des similitudes d'une part, avec les bactériémies communautaires (importance des portes d'entrées respiratoire et urinaire) et, d'autre part, avec les bactériémies nosocomiales (importance des cathéters intravasculaires et de dialyse comme portes d'entrée). Enfin, une plus forte incidence des *S. aureus* méticillino-résistants (S.A.R.M.) est observée dans ces bactériémies que dans celles d'origine communautaire (5 % contre 0,2 %), ainsi qu'une plus grande importance des traitements empiriques inadaptés (15,8 % contre 8,3 %).

**Tableau 4 : Principaux micro-organismes isolés dans les bactériémies selon leur mode d'acquisition.**

Références	Fréquence des divers modes d'acquisition	Fréquence des micro-organismes isolés dans un cadre non nosocomial	Fréquence des micro-organismes isolés dans un cadre nosocomial
Bouneton <i>et al</i> , 2007 (22) (368 épisodes de bactériémies et fongémies)	HCBSI : 6,0 % CBSI : 38,9 % HBSI : 55,1 %	<u>CBSI</u> <i>E. coli</i> 30,4 %, <i>S. aureus</i> 11,2 %, SCN 5,5 %, <i>S. pneumoniae</i> 11,9 %, <i>Enterococcus</i> sp. 3,7 %	SCN 35 %, <i>S. aureus</i> 14,1 %, <i>E. coli</i> 11,8 % <i>Streptococcus</i> sp. 6 %, <i>E. faecalis</i> 3,6 %
Vallés <i>et al</i> , 2007 (10) (1157 épisodes de bactériémies et fongémies)	HCBSI : 24,3 % CBSI : 50,2 % HBSI : 25,5 %	<u>HCBSI</u> <i>E. coli</i> 36,7 %, <i>S. aureus</i> 15,6 %, <i>P. aeruginosa</i> 9,6 %, <i>S. pneumoniae</i> 3,9 %, SCN 3,2 % <u>CBSI</u> <i>E. coli</i> 53 %, <i>S. pneumoniae</i> 11 %, <i>S. aureus</i> 4,5 %, <i>K. pneumoniae</i> 3,5 %, SCN 0,7 %	<i>E. coli</i> 20,7 %, SCN 16,6 %, <i>S. aureus</i> 11,2 %, <i>P. aeruginosa</i> 9,2 %
Pien <i>et al</i> , 2010 (12) (1364 épisodes de bactériémies et fongémies)	HCBSI : 33 % CBSI : 19 % HBSI : 48 %	<u>HCBSI</u> <i>S. aureus</i> 31 %, <i>E. coli</i> 19,2 %, autres entérobactéries 17 %, SCN 8,4 %, <i>Enterococcus</i> sp. 8 % <u>CBSI</u> <i>E. coli</i> 25 %, <i>S. aureus</i> 18 %, autres entérobactéries 16 %, <i>S. pneumoniae</i> 8 %, SCN 0,7 %	Entérobactéries hors <i>E. coli</i> 23 %, <i>S. aureus</i> 21 %, <i>Enterococcus</i> sp. 11 %, SCN 9 %, <i>E. coli</i> , 6,9 %, <i>P. aeruginosa</i> 5 %
Porchelet <i>et al</i> , 2007 (21) (2013 épisodes de bactériémies et fongémies)	HCBSI + CBSI : 58,3 % HBSI : 41,7 %	<u>HCBSI+CBSI</u> <i>E. coli</i> 40,7 %, <i>S. pneumoniae</i> 11,7 %, <i>S. aureus</i> 11,3 %, autres <i>Streptococcus</i> sp. 11,5 %	<i>E. coli</i> 23,1 %, <i>S. aureus</i> 18,2 %, autres <i>Staphylococcus</i> sp. 11,4 %, <i>P. aeruginosa</i> 8,8 %
Réseau BN-Raisin, 2004 (13) (4548 épisodes de bactériémies et fongémies)	HBSI : 100 %	Non disponible	<i>E. coli</i> 20,5 %, <i>S. aureus</i> 18,1 %, SCN 14,5 %, <i>P. aeruginosa</i> 6 %, <i>Klebsiella</i> sp. 5,9 %

CBSI: community-acquired bloodstream infection, HBSI: hospital-acquired bloodstream infection, HCBSI: healthcare-associated bloodstream infection

### III- Physiopathologie des bactériémies et sepsis

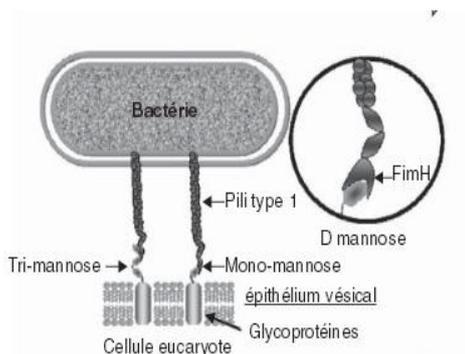
#### 1- Foyer primaire et facteurs de risque de développer une bactériémie

##### 1-1 Facteurs de risque de développer une bactériémie

Les études de Vallés *et al* et Angus *et al* montrent que certains facteurs prédisposent au développement d'une bactériémie (9,10). Parmi eux, des facteurs de comorbidités (diabète, cancer solide, insuffisance rénale, bronchopneumopathie chronique obstructive) et des facteurs associés au traitement ou à la prise en charge du patient (cathéter urinaire, cathéter veineux périphérique et central, traitement immunosuppresseur) sont généralement rapportés. D'autres études montrent que les bactériémies touchent majoritairement les hommes, avec un âge médian d'environ 60 ans (12,17,21).

##### 1-2 Foyer primaire

L'infection bactérienne débute communément par une phase d'adhérence et de multiplication au sein de la porte d'entrée (23). L'adhérence s'effectue notamment grâce à l'expression d'adhésines, protéines membranaires bactériennes dont la structure stéréochimique permet la reconnaissance spécifique de récepteurs saccharidiques, généralement des glycolipides, présents à la surface des cellules eucaryotes. Ces adhésines peuvent prendre la forme de filaments, dénommées usuellement *pili* ou *fimbriae* (24,25) (Figure 1). Cette adhérence permet aux bactéries de se maintenir au site infectieux.



**Figure 1 : Exemple de l'adhérence de *E. coli* à l'épithélium vésical (d'après Bidet *et al*, 2012).**

Certaines bactéries peuvent secondairement se structurer en biofilm après contact avec les muqueuses ou sur une surface inerte. Le biofilm constitue une forme de vie très fréquente lors des infections, avec développement d'une communauté de bactéries établissant des relations entre elles et avec la muqueuse ou la surface sur laquelle elles sont adsorbées. Ce biofilm protège les bactéries des agressions du micro-environnement dans lequel elles évoluent, avec des conséquences importantes notamment lors des infections sur dispositifs invasifs (cathéter ou prothèse) (26).

D'après Pien *et al*, les portes d'entrées les plus fréquemment rencontrées étaient les dispositifs intra-vasculaires, le tractus génito-urinaire, l'appareil digestif ou respiratoire (Tableau 5, page 23) (12). Il faut noter que dans un nombre important de cas (29 %), la porte d'entrée n'était pas retrouvée. Selon Porcheret *et al*, le foyer urinaire était majoritaire, suivi des foyers digestif et pleuro-pulmonaire, puis des dispositifs intra-vasculaires (21). L'incidence de ces portes d'entrée varie selon le type de bactériémie. Ainsi, l'étude française de Bourneton *et al* montre que la majorité des bactériémies communautaires présentaient une origine urinaire (28 %), suivi par ordre d'importance des foyers pulmonaire, digestif et cutané (22). Dans cette étude, ainsi que dans celle du Réseau BN-Raisin de 2004, les dispositifs intra-vasculaires étaient le foyer le plus souvent retrouvé dans les bactériémies non communautaires (13). L'étude espagnole de Vallès *et al* détaille les portes d'entrée des bactériémies associées aux soins, qui apparaissent comme une combinaison des portes d'entrées des bactériémies nosocomiales et communautaires (10). Le foyer urinaire était majoritaire (38%). Les dispositifs intravasculaires et les appareils respiratoires et digestifs y étaient rencontrés dans des pourcentages quasi similaires (entre 11 et 12 %).

**Tableau 5 : Fréquence (%) des différentes portes entrées à l'origine de bactériémie.**

Principales portes d'entrée	Réseau BN-Raisin, 2004 (13) 4548 épisodes de bactériémies/fongémies nosocomiales	Porcheret <i>et al</i> , 2007 (21) 2013 épisodes de bactériémies / fongémies	Bourneton <i>et al</i> , 2007 (22) 368 épisodes de bactériémies/fongémies		Vallés <i>et al</i> , 2007 (10) 1157 épisodes de bactériémies /fongémies			Pien <i>et al</i> , 2010 (12) 1225 épisodes de bactériémies /fongémies
			CBSI	HBSI	CBSI	HCBSI	HBSI	
Géno-urinaire	20,8	28,3	25,2	9,6	44,9	38,1	19,7	12
Digestif	12,6	19,6	15,4	10,7	20,1	11,7	13,5	12
Pulmonaire	9,5	13,1	23,1	13,4	13,4	11	7,1	8
Dispositif intra-vasculaire	20,8	9,8	/	19,8	/	12,8	36,3	23
Cutané	6,7	6	14	/	6,4	7,1	4,4	4
Inconnu	18,7	11,3	/	/	7,4	12,1	15,6	29
Autres	10,8	11,9	22,3	46,5	7,7	7,1	3,4	12

*CBSI: community-acquired bloodstream infection, HBSI: hospital-acquired bloodstream infection, HCBSI: healthcare-associated bloodstream infection*

## **2- Virulence bactérienne et pathogénèse lors d'une bactériémie**

Après l'étape d'adhérence, les souches bactériennes pathogènes ont la capacité d'échapper au système immunitaire, de se multiplier et d'envahir l'hôte. Pour cela, elles synthétisent divers facteurs de virulence (capsules, lipopolysaccharides, exotoxines,...) leur permettant d'échapper aux défenses de l'organisme (complément, phagocytose...) (23,26–29). Ces facteurs de virulence peuvent être codés au niveau d'îlots de pathogénicité, et leur

nombre varie selon le genre, l'espèce et la souche bactérienne (26). De même, la densité bactérienne et le site infectieux peuvent moduler, qualitativement ou quantitativement, la virulence bactérienne (29). Le Tableau 6 récapitule, pour exemple, les différents facteurs de virulence potentiellement détectés et exprimés chez une espèce bactérienne : *Streptococcus pneumoniae*.

**Tableau 6 : Exemples des facteurs de virulence de *Streptococcus pneumoniae* (d'après Moine *et al*, 2004).**

TABLE 1. Major pneumococcal virulence factors*	
Virulence factors	Proposed mechanisms of virulence
Polysaccharide capsule	Antiphagocytic properties, acting to prevent activation of the alternative complement pathway, and interaction between any C3b bound to surface proteins and receptors on phagocytic cells
Cell wall: lipoteichoic acid and/or peptidoglycan	Activation of the alternative complement pathway Binding to complement Binding to C-reactive protein Binding to CD14 Proinflammatory activities (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12) Induction of NF- $\kappa$ B Binding to platelet activation factor receptor Adhesion and colonization Chemotactic for leukocytes
Pneumococcal surface protein A (PspA)	Inhibition of the classical pathway of complement activation Binding to the complement protein C3 Prevents activation of C3b
Pneumolysin (Ply)	Cytolytic activity Apoptosis (neutrophils, macrophages, neuronal cells) Binds to Fc region of IgG Activation of the classical complement pathway, complement-depleting activity Proinflammatory activities (TNF- $\alpha$ , IL-8, NO, superoxide, elastase, $\beta_2$ integrins, prostaglandin E <sub>2</sub> , leukotriene B <sub>4</sub> )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Apoptosis Cytotoxic effects on ciliated epithelial cells: ciliary slowing and epithelial damage Kills or inhibits the growth of other respiratory tract flora
IgA1 protease	Degrades host IgA1
Hyaluronate lyase	Contributes to bacterial spreading within the host by catalyzing the degradation of hyaluronan, an important constituent of the extracellular matrix of connective tissues
Autolysin (LytA)	Cell wall degradation Cellular autolysis Autolysin activity generates cell-wall breakdown products, which are highly inflammatory
Neuraminidases (NanA and NanB)	Cleaves N-acetylneuraminic acid from mucin, glycolipids, glycoproteins and oligosaccharides, and therefore can enhance colonization by decreasing the viscosity of the mucus or by exposing cell-surface receptors for the pneumococcus
Pneumococcal surface adhesin A (PsaA)	Adhesion and colonization Resistance to oxidative stress Penicillin tolerance, autolysis
Pneumococcal surface protein C (PspC) (other name: choline-binding protein A CbpA)	Adhesion and colonization Binds to PAF receptor Binding to the secretory component of secretory IgA, the complement protein C3, and human factor H
Zinc metalloprotease ZmpB	Upregulate chemokine production Proinflammatory activities (TNF- $\alpha$ )

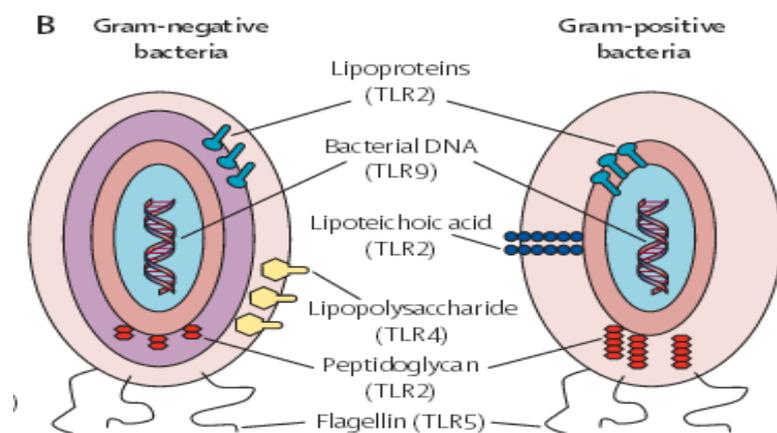
Dans le cadre des bactériémies, secondairement à l'infection de la porte d'entrée, les souches bactériennes pathogènes ont la capacité, grâce à l'expression de facteurs de virulence, de traverser les muqueuses pour atteindre la circulation sanguine et/ou lymphatique et ensuite diffuser dans tout l'organisme (23,27).

### 3- Interaction hôte-pathogène

Le degré de gravité de la bactériémie est dépendant à la fois de la virulence de la souche bactérienne en cause, mais aussi du degré de compétence du système immunitaire de l'hôte (30). Le polymorphisme génétique, touchant notamment les récepteurs et médiateurs de l'immunité, est également impliqué dans la prédisposition au développement d'un sepsis (26,31,32).

#### 3-1 Phase d'initiation

La présence de la bactérie dans le sang et surtout de certains de ses composants, appelés motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Patterns – P.A.M.P.s) (Figure 2), provoque la mise en jeu d'une réponse immune (33). Une endotoxine, le lipopolysaccharide (L.P.S.), joue un rôle majeur chez les bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif ne possèdent pas de L.P.S., mais sont constituées d'autres P.A.M.P.s, notamment l'acide lipoteichoïque et le peptidoglycane. Elles secrètent aussi des exotoxines interagissant avec le système immunitaire, comme la toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique (T.S.S.T.) ou l'exotoxine pyrogénique streptococcique (S.P.E.) (34).



**Figure 2 : Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (P.A.M.P.s) et T.L.R.s correspondants (d'après Van der Poll *et al*, 2008)**

Les P.A.M.P.s sont des motifs caractéristiques des bactéries, qui sont reconnus spécifiquement par le système immunitaire grâce aux « Pattern Recognition Receptors » (P.R.R.). Les principaux P.R.R. sont les Toll-Like Receptors (T.L.R.), récepteurs transmembranaires, et les nucleotide-binding oligomerisation domain (Nod), protéines de reconnaissance intra-cytoplasmiques, plus récemment identifiés (31). Ces molécules sont

exprimées par les cellules immunitaires, telles que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles, ou encore les cellules dendritiques. Suite à cette reconnaissance, elles initient une cascade enzymatique aboutissant à l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B (31,35). Celui-ci va se lier à des sites de transcription et induire l'activation de nombreux gènes. Cette reconnaissance est ainsi à l'origine de l'activation de l'immunité innée.

Les exotoxines de *S. aureus* et *S. pyogenes* agissent comme des superantigènes (36). Les principales cellules-cibles sont les lymphocytes T, les cellules présentatrices de l'antigène et les hépatocytes. Elles provoquent notamment une stimulation lymphocytaire polyclonale.

### **3-2 Phase d'amplification**

Cette reconnaissance du pathogène par l'hôte est la première étape d'activation de l'immunité innée. Elle va permettre notamment la sécrétion de cytokines par les cellules immunitaires. Deux types de cytokines se distinguent : les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

Lors du sepsis, une synthèse accrue de cytokines, particulièrement de cytokines pro-inflammatoires, est observée (31,34,37). Il s'agit de l'orage cytokinique (38). L'idée ancienne que la sévérité du sepsis était liée à une réaction inflammatoire excessive a été reconsidérée : la réponse de l'hôte à la bactériémie comprend à la fois une exagération de l'inflammation mais aussi la présence d'une certaine immunosuppression (39).

Parmi les cytokines pro-inflammatoires, le Tumor Necrosis Factor (TNF-alpha) et l'interleukin 1 (IL-1) apparaissent comme les plus importantes. Les cytokines pro-inflammatoires amplifient la réponse inflammatoire en accentuant la synthèse ou l'activité d'autres médiateurs de l'inflammation comme le monoxyde d'azote (NO), les métabolites de l'acide arachidonique, les systèmes du complément et de la coagulation, ou les radicaux libres (31). Elles vont réguler la coagulation en augmentant le taux de facteur tissulaire, en diminuant l'action de la protéine C ou encore en inhibant la fibrinolyse (40,41). Certaines cytokines, appelées chemokines, favorisent le chimiotactisme, permettant la migration des cellules immunitaires vers le foyer septique (42). Elles ont aussi un rôle propre, provoquant des manifestations telles que la fièvre ou des perturbations hémodynamiques.

A l'inverse, les cytokines anti-inflammatoires (IL-10 en particulier) sont à l'origine d'une anergie immunitaire (31). Elles permettent ainsi de contrôler la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et restaurer l'homéostasie.

### **3-3 Conséquences de l'orage cytokinique et mécanisme de la défaillance organique**

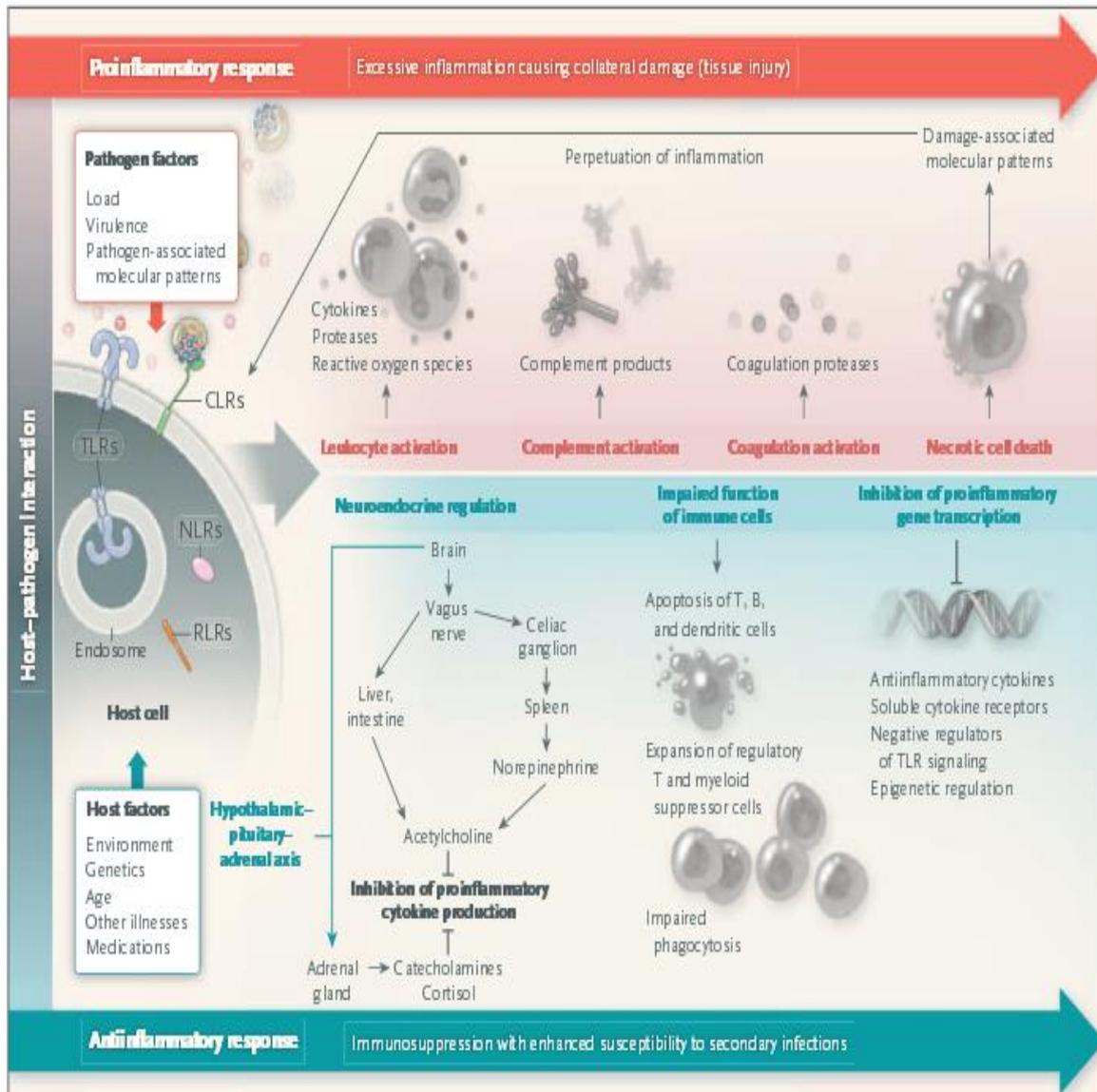
Une réponse intégrant un déséquilibre entre les systèmes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires contribue à une rupture de l'homéostasie et à l'aggravation du sepsis, pouvant conduire à la défaillance organique (Figure 3, page 28) (26).

Une dysoxie tissulaire est ainsi rencontrée lors du sepsis sévère. Il coexiste une vasoplégie et des troubles de l'utilisation cellulaire de l'oxygène. Le métabolisme cellulaire, notamment mitochondrial, est en effet touché, avec pour conséquence une augmentation du métabolisme anaérobie et la production de lactates (43). La vasoplégie est reliée à une synthèse excessive de monoxyde d'azote (NO) et une déplétion en vasopressine (44,45). De plus, lors du sepsis sévère, l'activation de la coagulation et du système du complément, associée à la diminution des systèmes anticoagulant et fibrinolytique, sont à l'origine d'un état pro-coagulant. Des microthrombi peuvent alors apparaître et contribuer à la diminution de la quantité d'oxygène tissulaire (46).

Le système neuroendocrinien est également touché. Il existe lors du sepsis une apoptose des neurones et cellules gliales des centres cardiovasculaires du système nerveux autonome (47). Cette atteinte pourrait aussi jouer un rôle dans la défaillance circulatoire existant lors du sepsis sévère. Divers systèmes endocriniens sont perturbés, avec pour conséquence une hypercortisolémie ou encore une hyperglycémie et une baisse de la concentration plasmatique en T4 qui est corrélée à la mortalité (31).

De plus, chez les patients septiques, des anomalies des leucocytes peuvent être observés : monocytes hypo-répondeurs, apoptose accrue des lymphocytes et des cellules dendritiques (48,49). Cette immunomodulation est à l'origine d'une inefficacité à éradiquer les bactéries et d'un risque potentiel de développement d'infections nosocomiales secondaires chez les patients septiques (50).

Dans ce contexte, une détection rapide de l'agent pathogène et son élimination prennent ainsi toute leur importance, afin d'éviter l'aggravation du sepsis.



**Figure 3 : Interaction entre l'hôte et le pathogène - Réponse inflammatoire déséquilibrée et conséquences (d'après Angus *et al*, 2013).**

## **IV- Antibiothérapie chez les patients septiques**

Le traitement d'un épisode septique repose sur deux aspects : la prise en charge symptomatique du patient et sa prise en charge infectieuse, c'est-à-dire son antibiothérapie.

### **1- Antibiothérapie probabiliste**

Dans un premier temps, une antibiothérapie probabiliste est généralement prescrite devant la survenue d'une fièvre inexplicée mal tolérée. Celle-ci correspond à une prescription d'antibiotique réalisée avant que ne soit connu la nature et/ou la sensibilité du ou des micro-organismes responsables de l'infection. Préalablement, des prélèvements bactériologiques à visée diagnostique doivent être pratiqués, si possible.

Le choix des antibiotiques est principalement déterminé en fonction de la porte d'entrée infectieuse, des données fournies par l'examen direct des prélèvements bactériologiques effectués, du terrain du patient (notamment l'existence d'une immunodépression), du mode d'acquisition de l'infection (statut communautaire ou non), de l'écologie microbienne locale, ainsi que de l'exposition récente à des antibiotiques (51,52).

Le Tableau 7 (page 30) récapitule les recommandations d'antibiothérapie probabiliste selon la porte d'entrée suspectée en Réanimation Médicale au C.H.U. de Nantes en 2014.

**Tableau 7 : Exemples de proposition d'antibiothérapie probabiliste selon la porte d'entrée suspectée au C.H.U. de Nantes en 2014.**

Foyer primaire	Contexte	Antibiotiques
<b>Pyélonéphrite Prostatite</b>	Communautaire et Nosocomiale	Ceftriaxone Association à Amikacine si signes de gravité
	ATB préalable	Pipéracilline/Tazobactam + Amikacine
<b>Pneumopathie</b>	Communautaire	Ceftriaxone + Spiramycine Association à Métronidazole si âgé et/ou comorbidités
	Communautaires avec D.D.B., mucoviscidose, ATB récente, ATCD d'infection à <i>P. aeruginosa</i>	Pipéracilline/Tazobactam ou Céfépime + Spiramycine + Amikacine
	Pneumopathies d'inhalation	Amoxicilline/Acide clavulanique
	Pneumopathies nécrosantes	Ceftriaxone+ Linezolide ou Clindamycine
	Pneumopathies nosocomiales sans ATB préalable ni hospitalisation de plus de 7 jours en Réanimation	Ceftriaxone
	Pneumopathies nosocomiales avec ATB préalable ou hospitalisation de plus de 7 jours en Réanimation	Ticarcilline/Acide clavulanique + Aminosides
<b>Infection intra-abdominales</b>	Péritonites communautaires	Ceftriaxone + Metronidazole Association à Aminosides si signes de gravité
	Péritonites communautaires avec ATB préalable, cirrhose ou péritonite biliaire	Pipéracilline/Tazobactam
	Péritonites nosocomiales	Pipéracilline/Tazobactam + Amikacine
	Péritonites nosocomiales avec infection/colonisation à S.A.R.M. ou <i>E. faecium</i>	Pipéracilline/Tazobactam + Amikacine + Vancomycine

ATB: Antibiothérapie, ATCD: Antécédents, D.D.B. : Dilatation des bronches.

## **2- Adaptation de l'antibiothérapie**

Suite à l'obtention des résultats microbiologiques, les recommandations de la Surviving Sepsis Campaign et de la S.F.A.R. préconisent de réduire le nombre ou le spectre antibiotique si possible : il s'agit de la désescalade thérapeutique (52,53). Cette recommandation peut également comprendre un arrêt précoce du traitement antibiotique. Une ré-évaluation de l'antibiothérapie entre le deuxième et le troisième jour doit ainsi être effectuée. L'intérêt de cette stratégie est de prévenir l'émergence de la résistance aux antibiotiques. Une étude française a montré que cette stratégie permet la réduction à long terme des infections nosocomiales dues à des micro-organismes multi-résistants, ainsi que le coût lié à l'utilisation des antibiotiques (54). Une autre étude plus récente, menée dans les unités de soins intensifs, a aussi montré que le principe de désescalade était associé à une réduction significative du nombre d'infections chroniques (55). De plus, elle montre que la mortalité n'apparaît pas comme plus élevée en cas d'utilisation de cette stratégie.

## **3- Association d'antibiotiques**

L'intérêt d'une bithérapie sur une même cible bactérienne reste débattu. En effet, malgré un avantage théorique dans l'accélération de la bactéricidie et la réduction du risque de sélection de bactéries résistantes, différentes études posent la question de son utilité (56,57).

Cependant, il est habituel de recommander une association d'antibiotiques dans certains contextes. Ainsi, la S.F.A.R. estime justifiée l'utilisation d'une association d'antibiotiques en cas de risque d'infections plurimicrobiennes, notamment dans un contexte nosocomial, ou s'il existe une suspicion d'infection par des micro-organismes multi-résistants (*Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, entérobactéries). Il en est de même en cas de choc septique ou chez des sujets ayant certaines comorbidités. La S.F.A.R. et la Surviving Sepsis Campaign préconisent de n'utiliser cette association d'antibiotiques que sur une durée limitée (trois à cinq jours).

#### **4- Posologie et durée de traitement**

Afin d'obtenir rapidement des concentrations tissulaires et plasmatiques adéquates, les antibiotiques sont généralement administrés par voie parentérale à doses maximales au cours des états septiques sévères (52).

La Surviving Sepsis Campaign estime qu'en général, une antibiothérapie de sept à dix jours est suffisante (53). Cependant, cette durée peut être modifiée en raison de différents facteurs tels que l'immunodépression ou la rapidité de la réponse clinique. La S.F.A.R. préconise une réévaluation du traitement antibiotique au dixième jour (52).

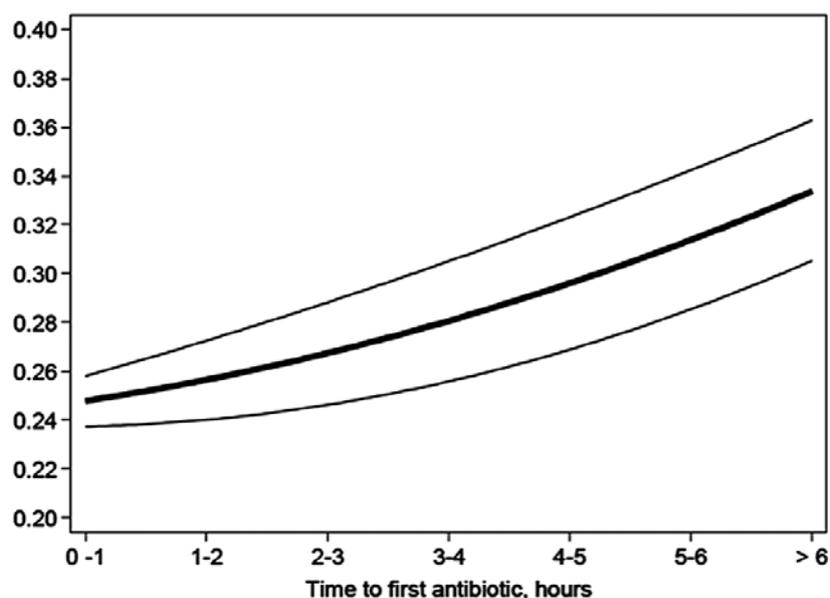
#### **5- Facteurs influençant l'efficacité de l'antibiothérapie**

La précocité et la qualité de l'antibiothérapie apparaissent comme des éléments majeurs dans le pronostic des états septiques sévères. Diverses études ont montré qu'un traitement antibiotique inefficace s'avérait associé significativement à une mortalité accrue en cas de sepsis (Tableau 8).

**Tableau 8 : Association entre antibiothérapie inadaptée et mortalité.**

	<b>Leibovici <i>et al</i>, 1998 (58) 3440 sepsis sévères</b>	<b>Ibrahim <i>et al</i>, 2000 (59) 492 sepsis sévères</b>	<b>Harbarth <i>et al</i>, 2003 (60) 904 sepsis sévères</b>
<b>Pourcentage d'antibiothérapie inadaptée (et définition selon les études)</b>	37 % (antibiothérapie efficace non débutée dans les 48 heures après réception des résultats microbiologiques)	30 % (antibiothérapie efficace non débutée après réception des résultats microbiologiques)	23 % (antibiothérapie efficace non débutée dans les 24 heures après réception des résultats microbiologiques)
<b>Mortalité en cas de traitement inadapté</b>	37 %	61,9 %	39 %
<b>Mortalité en cas de traitement adapté</b>	20 %	28,4 %	24 %

La Surviving Sepsis Campaign recommande de traiter les patients, si possible, dès la première heure et, dans tous les cas, dans les trois heures suivant le diagnostic de sepsis sévère ou de choc septique (53). En effet, l'étude de Kumar *et al* a montré, sur une cohorte de 2154 patients, une association forte entre retard dans l'initiation de l'antibiothérapie efficace et mortalité due au choc septique (61). L'administration d'une antibiothérapie efficace lors de la première heure d'hypotension était associée à une survie de 79,9 %. En revanche, chaque heure de retard dans l'administration des antibiotiques, dans les six heures suivantes, était associée à une diminution moyenne de survie de 7,6 %. De même, l'étude de Garnacho *et al* a montré, sur une cohorte de 224 patients, que le délai d'initiation d'une antibiothérapie adaptée était associé indépendamment à la mortalité des patients atteints de sepsis, avec une augmentation 9 % de la mortalité par heure de délai d'administration (62). Plus récemment, Ferrer *et al* ont constaté aussi, sur une cohorte de 17990 patients, l'importance en termes de survie d'une antibiothérapie précoce, lors des chocs septiques et sepsis sévères (Figure 4) (63).



**Figure 4 : Prédiction de mortalité en fonction du délai avant la première administration d'antibiotiques (d'après Ferrer et al, 2014).**

## **V- Méthodes diagnostiques des bactériémies au laboratoire**

L'hémoculture constitue l'examen de choix à réaliser lors d'une suspicion de bactériémie. Cet examen permet de mettre en évidence la présence de bactéries dans le sang, oriente la recherche d'un foyer infectieux indéterminé et participe à l'adaptation du traitement antibiotique.

### **1- Réalisation d'une hémoculture**

#### **1-1 Le prélèvement**

Il correspond à l'ensemencement, lors d'une ponction veineuse ou artérielle chez un patient, de flacons d'hémocultures contenant un milieu de culture (bouillon nutritif). Il s'agit d'une étape importante de l'analyse. En effet, certains facteurs pré-analytiques peuvent diminuer la sensibilité de l'examen.

##### **1-1-1 Mode de prélèvement et précautions**

La ponction veineuse est la méthode de choix (14). Le prélèvement à partir des autres sites est à éviter, particulièrement les dispositifs intra-vasculaires (cathéter, site implantable), car ils augmentent significativement le risque de contamination (64,65). Lors de cette ponction, des précautions doivent être prises afin de limiter le risque de contamination du sang, qui pourrait gêner l'interprétation et compromettre la mise en évidence du pathogène en stoppant précocement l'incubation. Ces précautions ont aussi pour objectif de diminuer le risque d'exposition au sang pour le préleveur. Elles consistent notamment en une désinfection des mains du préleveur, la désinfection de l'opercule du flacon d'hémoculture, ainsi que celle du point de ponction.

##### **1-1-2 Conditions et quantité de sang à prélever**

Chez l'adulte, il existe une faible quantité de bactéries présentes dans le torrent circulatoire lors d'un épisode bactériémique (inférieure à 1 UFC/mL pour la moitié des patients) (66). La quantité de sang prélevée apparaît comme un paramètre essentiel dans les performances diagnostiques de l'hémoculture. En effet, il a été démontré une proportionnalité entre le volume de sang prélevé et le pourcentage de résultats positifs, notamment avec l'utilisation des systèmes de détection automatisés (67–69). Afin d'atteindre une sensibilité

maximale, le volume optimal recommandé par épisode clinique et par 24 heures est de 40 à 60 mL (14,70). Ce volume peut être atteint en effectuant deux à trois ponctions de paire de flacons d'hémoculture par épisode clinique et par 24 heures. En cas de suspicion d'endocardite, il est préférable de recueillir 60 mL de sang (70). Une attention particulière à un remplissage correct de ces flacons est essentielle, car celui-ci apparaît très souvent comme incorrect, notamment par défaut de sang (inférieur au 8 mL minimum requis) (70).

A l'inverse, chez l'enfant, le volume optimal est plus difficile à déterminer car la concentration bactérienne dans le sang lors des épisodes bactériémiques est dépendante de l'âge de l'enfant (14,70). Le volume de sang est moins important mais la densité bactérienne lors d'un sepsis est généralement plus élevée. Enfin, la difficulté de prélèvement chez l'enfant s'ajoute à ces facteurs.

Le bouillon d'hémoculture utilisé comprend des facteurs de croissance bactériens, des substances anticoagulantes (polyanéthol sulfonate de sodium, le plus souvent) et des produits adsorbants (résines, charbon activé) qui inhibent les antibiotiques (14,71). Le ratio bouillon/sang doit être compris entre 1/5 et 1/10 (vol/vol), afin de diluer suffisamment les substances inhibitrices présentes dans le sang (complément, lysozyme, cellules phagocytaires...) (14). Le remplissage correct des flacons prend ainsi d'autant plus d'importance.

### **1-1-3 A quel moment prélever ?**

L'intervalle entre deux prélèvements n'influence pas la sensibilité de l'examen (67). Aujourd'hui, au C.H.U. de Nantes, le prélèvement des hémocultures est espacé sur 24 heures. La tendance actuelle est au prélèvement unique, c'est-à-dire au prélèvement en une seule fois de plusieurs séries d'hémoculture. Le prélèvement unique présenterait l'avantage, tout en ayant une sensibilité équivalente au prélèvement multiple sur 24 heures, d'une pratique plus simple et mieux suivie, permettant la mise en place rapide d'une antibiothérapie (72-74). De plus, le risque de contamination serait mieux maîtrisé. Il n'est cependant pas recommandé d'utiliser une ponction unique dans le cadre du diagnostic d'une endocardite ou d'une infection liée à un dispositif intra-vasculaire (70). Les hémocultures sont classiquement prélevées au moment des pics fébriles, bien que l'idée que le pic fébrile soit un facteur prédictif de bactériémie soit remis en cause (75). Leur prélèvement est à effectuer, si possible, avant l'initiation du traitement antibiotique (52,53).

## 1-1-4 Transport du prélèvement

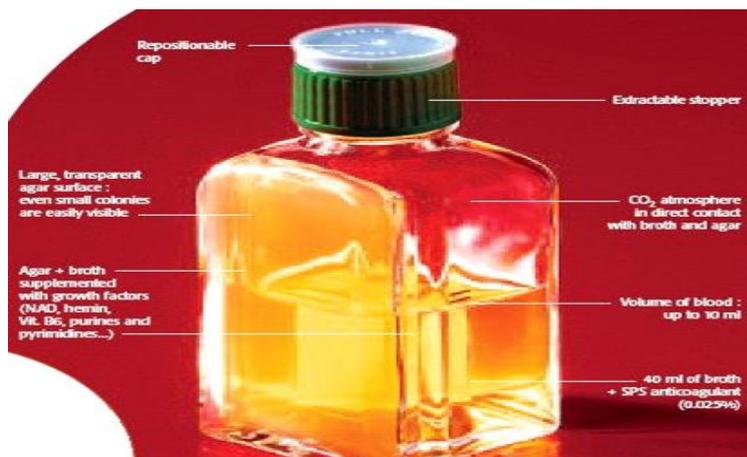
Une fois effectué, le prélèvement doit être acheminé rapidement au laboratoire (14,70). En effet, Saito *et al* ont montré une augmentation significative du délai de positivité en cas de retard à l'insertion dans les systèmes de détection automatisés (76). Si cela est impossible, il doit être conservé à température ambiante, et non à 37°C, afin d'éviter le risque de faux négatif ou d'augmentation du délai de positivité.

## 1-2 L'examen bactériologique

### 1-2-1 Détection de la croissance bactérienne

#### 1-2-1-1 Historique

Les anciennes méthodes utilisant des lectures non automatisées ont aujourd'hui laissé place aux systèmes automatisés. Elles utilisaient des flacons d'hémoline constitué d'un milieu biphasique, qui étaient inspectés macroscopiquement quotidiennement, à la recherche de signes visibles de croissance bactérienne (turbidité, hémolyse, ...) (Figure 5) (71).



**Figure 5 : Schéma d'une hémoculture manuelle.**

#### 1-2-1-2 Systèmes automatisés

Des systèmes automatisés à détection continue, avec agitation permanente, sont aujourd'hui utilisés (Tableau 9, page 37). Ils ont amélioré significativement la détection de la croissance bactérienne (69,77). Il existe différents principes de détection (14,78). Une mesure indirecte du CO<sub>2</sub> lié à la croissance des micro-organismes dans le flacon, *via* une mesure de fluorescence (Bactec BD<sup>®</sup>) ou de colorimétrie (Bact/Alert bioMérieux<sup>®</sup>), peut être utilisée. Le flacon est déclaré positif selon un algorithme de lecture prenant en compte la concentration

initiale en CO<sub>2</sub> et sa vitesse de production. La détection peut aussi être basée sur une variation de la pression atmosphérique au sein du flacon, liée à la consommation et à la production de gaz par les bactéries présentes dans le flacon (versaTREK<sup>®</sup>, TREK<sup>®</sup>).

Classiquement, des flacons dédiés aux atmosphères aérobie et anaérobie (composée d'azote) sont utilisés. La faible fréquence des bactéries anaérobies a amené à envisager l'abandon de l'utilisation systématique de l'atmosphère anaérobie (79,80). Cependant, cet abandon n'est pas recommandé dans les publications récentes, notamment dans les services de Réanimation, Chirurgie ou Gynécologie (14,70). En effet, une réémergence des bactériémies à bactéries anaérobies est évoquée et leur sensibilité à certains antibiotiques semble moins prévisible (81–83). En cas d'abandon du flacon anaérobie, il est conseillé de le remplacer par un flacon aérobie afin de ne pas perdre en quantité de sang mis en culture et donc en sensibilité.

La durée d'incubation classique des flacons est de cinq jours à 35°C pour les systèmes automatisés. Une durée de sept jours est préconisée sans ces systèmes (14,71). Au-delà, les bactéries détectées sont en grande majorité des contaminants (71,84). Lors de situations cliniques particulières, des mesures spécifiques pourront être mises en œuvre afin d'assurer une sensibilité maximale de l'examen. Une incubation plus longue (jusqu'à 15 jours) pourra ainsi être envisagée en cas de suspicion d'endocardite (85). De même, un repiquage systématique sur milieu spécifique après incubation des hémocultures est recommandé en cas de suspicion d'infection à *Legionella* sp., bactéries non détectées par les systèmes automatisés (86).

**Tableau 9 : Caractéristiques des automates commercialisés en France (d'après La Société Française de Microbiologie, REMIC, 2004).**

Tableau 3 : Caractéristiques des automates actuellement commercialisés en France			
Type	Principe de détection	Nbre de lecture quotidienne	Volume de bouillon par flacon
Bactec 9240	mesure non invasive de CO <sub>2</sub> par fluorescence	toutes les 10 mn	25 ml
Vital	mesure de variation CO <sub>2</sub> - H <sub>2</sub> et/ou pH par fluorescence	toutes les 15 mn	40 ml
BacT/Alert	mesure du CO <sub>2</sub> par «sensor» indicateur de pH	toutes les 10 mn	40 ml
Bio Argos	mesure du CO <sub>2</sub> par infra-rouge à travers le verre	programmé 8 à 2	25 ml

## 1-2-2 Traitement des flacons positifs

Aujourd'hui, à partir des flacons déclarés positifs, un examen direct est effectué et des subcultures sont ensemencées à J<sub>0</sub>. Celles-ci sont effectuées au minimum sur des milieux supplémentés en sang, en atmosphère aérobie enrichie en CO<sub>2</sub>, et en conditions aérobies (14). Selon le contexte, l'examen direct ou la bactérie suspectée, des milieux supplémentaires pourront être ajoutés. Une identification à partir des bactéries issues de la subculture est conduite généralement à J<sub>1</sub> et un antibiogramme de toute bactérie isolée potentiellement impliquée dans un processus infectieux est réalisé et interprétable habituellement à J<sub>2</sub>.

## 1-3 Interprétation

### 1-3-1 La contamination

La contamination d'une hémoculture correspond à l'introduction accidentelle lors du prélèvement d'une bactérie qui n'était pas présente pas le sang du patient. Ces bactéries sont le plus souvent issues de la flore cutanée du patient ou du préleveur (staphylocoques à coagulase négative, *Corynebacterium* sp., *Propionibacterium* sp.), ou encore des bactéries de l'environnement ou du matériel utilisé lors de la ponction (87).

L'identification de la bactérie isolée et le nombre d'hémocultures positives permettent, dans un premier temps, d'apprécier le caractère contaminé ou réellement positif de l'hémoculture. Le nombre de flacons positifs par paire d'hémoculture n'apparaît pas comme prédictif d'une souillure. Ces éléments sont à associer, dans un second temps, aux données cliniques du patient et à la porte d'entrée suspectée. L'idée que le délai de positivité de l'hémoculture soit un marqueur supplémentaire reste soumise à débat (14,70,88).

Le taux de contamination retrouvé dans diverses publications, rapporté aux nombres d'hémocultures positives, est reporté dans le Tableau 10.

**Tableau 10 : Taux de contamination rapporté au nombre d'hémocultures positives.**

Références	Taux de contamination estimé
Bourneton <i>et al</i> , 2007 (22)	15,9 à 24,3 %
Pien <i>et al</i> , 2010 (12)	41 %
Roth <i>et al</i> , 2010 (89)	38 %

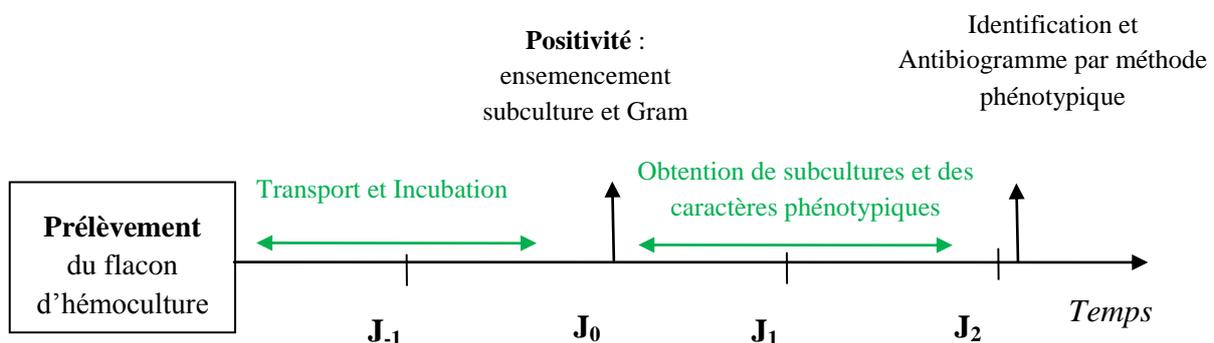
### 1-3-2 Cas des dispositifs intra-vasculaires (cathéter, chambre implantable)

Le prélèvement d'hémoculture à partir de dispositifs intra-vasculaires est à réserver au diagnostic d'infections microbiennes liées à un dispositif intra-vasculaire. Dans les situations où la présomption d'infection liée au cathéter central veineux est faible ou modérée, et en l'absence de signes de gravité chez les patients, cette stratégie diagnostique est envisageable (14,90). Elle permet alors d'éviter le retrait de celui-ci (diagnostic d'infection par ablation du matériel). En théorie, cette méthode diagnostique passe par le prélèvement simultané (moins de dix minutes d'intervalle) de deux hémocultures, l'une par ponction veineuse et l'autre par ponction *via* le matériel, après purge de ce dernier (14). La différence de délai de positivité permet la mise en cause du matériel : un délai supérieur à deux heures en faveur de l'hémoculture prélevée sur cathéter est hautement prédictif d'une bactériémie à point de départ du cathéter (spécificité et sensibilité supérieures à 90 %) (90).

## 1-4 Impact de l'hémoculture dans la prise en charge du patient bactériémique

### 1-4-1 Résumé de la prise en charge traditionnelle des hémocultures

Le laboratoire et les biologistes ont un rôle primordial dans le diagnostic des bactériémies. En effet, la prise en charge des hémocultures positives permet la mise en évidence de l'agent pathogène, son identification, ainsi que l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques. Différentes techniques sont mises en œuvre : incubation des flacons d'hémocultures, coloration de Gram, subculture, techniques d'identification et d'étude de la sensibilité bactérienne (Figure 6).



**Figure 6 : Délai classiquement retrouvé avant obtention des résultats de l'hémoculture par les méthodes phénotypiques.**

Il existe habituellement un délai, d'un à trois jours (voire plus long selon l'espèce bactérienne), avant l'obtention des résultats microbiologiques suite à la détection de la positivité du flacon d'hémoculture. Ce délai est à ajouter au temps d'incubation nécessaire à la détection de la bactériémie, le plus fréquemment dans les 48 premières heures suite à l'insertion du flacon dans les systèmes de détection automatisés (91,92).

#### **1-4-2 Limites de l'hémoculture**

L'hémoculture reste aujourd'hui le "gold standard" dans le diagnostic de routine des bactériémies. Cependant, cette technique montre des limites. Le délai d'obtention des résultats reste parfois trop tardif dans un contexte où une antibiothérapie précoce et adaptée influence le pronostic. De plus, la sensibilité de ce test demeure imparfaite. Certains micro-organismes à croissance lente ou non cultivables (*Nocardia* sp., *Legionella* sp., *Bartonella* sp., *Tropheryma whippelii*...), ainsi que les prélèvements de patients sous antibiotiques peuvent conduire à des faux négatifs (93–96). Enfin, l'hémoculture ne permet pas d'estimer la concentration bactérienne dans le sang, alors que celle-ci apparaît comme corrélée à la sévérité de l'infection d'après certaines études (97,98).

#### **1-4-3 Optimisation de la prise en charge des hémocultures**

Diverses études ont montré l'influence des résultats microbiologiques sur le traitement antibiotique administré. L'identification bactérienne fait partie des paramètres clés. Dans l'étude de Stoneking *et al*, seuls 23 % des traitements probabilistes mis en place chez 61 patients auraient été similaires si l'identification bactérienne avait été connue au moment de la mise en place du traitement (99). Toutefois, Martiny *et al* ont montré que l'identification bactérienne amène une modification du traitement antibiotique probabiliste dans seulement 13,4 % des cas (100).

Le temps d'obtention des résultats microbiologiques des hémocultures apparaît comme un facteur important dans l'amélioration de la prise en charge des patients bactériémiques. L'obtention plus rapide de résultats microbiologiques contribuerait à la mise en place précoce d'une antibiothérapie optimale, influençant la mortalité, la durée de séjour des patients et le coût d'hospitalisation (92,101–103).

Une détermination plus rapide de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, directement à partir des hémocultures positives, avec obtention des résultats dès J<sub>1</sub>, a été testée avec succès (104,105).

Une identification rapide à partir des flacons d'hémocultures positifs, s'affranchissant du délai lié à la subculture, apparaît donc pertinente dans l'optimisation de la prise en charge d'un patient bactériémique. Cette information serait obtenue dès la positivité de l'hémoculture, soit de manière contemporaine au résultat de l'examen direct par coloration de Gram. L'information fournie par l'examen direct est déjà d'une importance capitale dans la prise en charge des patients bactériémiques. En 2003, Munson *et al* ont montré l'importance de téléphoner au clinicien l'examen direct des hémocultures positives (103). En effet, le résultat du Gram apparaît comme ayant une plus grande influence sur l'antibiothérapie que les résultats de l'antibiogramme, plus tardifs. De même, l'étude de Barenfanger *et al* a montré que la rapidité de communication de l'examen direct avait un impact sur la mortalité (106). L'apport d'une identification rapide et précoce par rapport à l'examen direct réside dans l'amélioration de la précision du rendu du résultat microbiologique. Elle permet ainsi de confirmer ou d'infirmier une contamination (100). Par exemple, l'identification bactérienne permet de différencier une souche de *S. aureus* d'un staphylocoque à coagulase négative. De même, *Listeria monocytogenes* est plus facilement différenciée d'une *Corynebacterium* sp. commensale. Par ailleurs, elle permet la mise en place plus rapide d'un traitement probabiliste approprié, celui-ci pouvant être plus ciblé : entérobactéries *versus* *P. aeruginosa* ou bactéries anaérobies par exemple. Des études récentes ont montré l'intérêt de cette technique d'identification rapide par rapport à l'information apportée par l'examen direct. Vlek *et al* ont montré que l'utilisation d'une telle stratégie augmenterait de 11,3 % le pourcentage de traitement approprié 24 heures après la positivité de l'hémoculture (107). De même, Clerc *et al* ont montré que cette démarche diagnostique présente un impact supérieur à l'examen direct sur l'antibiothérapie des bactériémies à Gram négatif (changement d'antibiotiques dans 35,1 % cas contre 20,8 %) (108).

## **2- Les nouvelles techniques moléculaires**

Dans ce contexte, de nouvelles stratégies ont été développées pour améliorer la prise en charge des bactériémies. Elles utilisent des techniques d'identification basées sur les protéines ou les acides nucléiques bactériens. Selon les techniques, cette identification peut avoir lieu à partir d'une hémoculture positive ou directement à partir du sang du patient.

### **2-1 Les technologies moléculaires, basées sur la détection des acides nucléiques**

Diverses techniques récentes permettent une identification rapide des bactéries présentes dans les hémocultures positives, s'affranchissant de l'étape de subculture habituellement effectuée. Après pré-traitement du bouillon d'hémoculture, ces méthodes peuvent détecter des micro-organismes directement à partir de flacons détectés positifs. Des techniques utilisent également la PCR directement à partir du sang des patients.

#### **2-1-1 Hybridation**

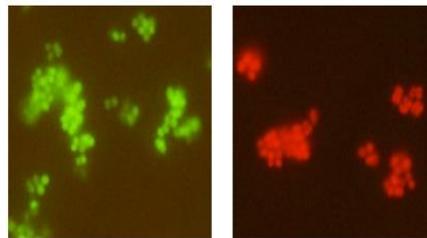
La technique d'hybridation la plus couramment utilisée pour identifier les bactéries à partir des flacons d'hémoculture positifs est l'hybridation fluorescente *in situ* (F.I.S.H.). Cette technique est basée sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARN ribosomal (ARNr) bactérien et marquées par un fluorochrome. L'hybridation à l'ARNr est suivie d'une détection au microscope à fluorescence (Figure 7, page 43).

Cette technologie autorise l'identification de différents genres et espèces bactériens, ainsi que certains gènes de résistance, en quelques heures. De plus, elle est relativement peu coûteuse comparé à l'équipement nécessaire pour les techniques basées sur la PCR ou la spectrométrie de masse (109).

La technique commercialisée QuickFISH BC® (AdvanDx, USA), basée sur la méthodologie F.I.S.H., permet de distinguer les SCN de *S. aureus* en une vingtaine de minutes, directement à partir des hémocultures positives (110). Elle utilise des sondes P.N.A.-F.I.S.H. (Peptide Nucleic Acid) neutres, au contraire des sondes classiques chargées négativement, facilitant la pénétration dans les bactéries et la liaison à l'ARNr (78). Elle peut être associée à la technique *mecA* XpressFISH® (AdvanDx, USA), basée aussi sur la technique P.N.A.-F.I.S.H., et ciblant l'ARN messager (ARNm) codé par le gène *mecA* (111). D'après l'étude de Salimnia *et al*, le test QuickFISH BC®, évalué sur 491 hémocultures positives à cocci à Gram positif, présente une sensibilité de 99,4 % et une spécificité de 99,6

% (111). Par ailleurs, le test *mecA* XpressFISH<sup>®</sup> révèle une sensibilité de 99,1 % et une spécificité de 99,6 % pour la détection des S.A.R.M.

Une autre technique commercialisée basée sur l'hybridation, AccuProbe<sup>®</sup> (Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif.), permet d'identifier, à partir des flacons d'hémocultures positives à cocci à Gram positif, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus agalactiae* (109). Il s'agit d'un test de protection de l'hybridation (plus spécifique que l'hybridation simple) : une sonde chimiluminescente complémentaire de la région cible (ARNr) est marquée d'une molécule d'ester d'acridinium. Il se forme alors des hybrides stables. La lumière émise par ceux-ci est mesurée dans un luminomètre. D'après Lindholm *et al*, ce test apparaît comme performant, même si l'identification de *S. aureus* demande à être améliorée (109).



**Figure 7: Exemples représentatifs d'échantillons positifs à *S. aureus* (vert), à staphylocoques coagulase négative (rouge), avec le test QuickFISH BC<sup>®</sup> (AdvanDx, USA).**

La limite principale des techniques d'hybridation est liée au nombre limité de sondes existantes. En effet, le nombre de bactéries identifiables reste restreint (112,113). De plus, ces techniques nécessitent toujours une étape préalable de coloration de Gram, ce qui peut biaiser l'identification, en omettant des espèces bactériennes minoritaires potentiellement présentes.

## **2-1-2 Techniques d'amplification**

### 2-1-2-1 Principe de la PCR

La PCR est la technique d'amplification génique la plus utilisée. Elle permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN cible à partir d'un échantillon biologique. Il s'agit d'une réaction cyclique, composée de trois étapes (114) :

- La dénaturation de l'ADN, pour obtenir des matrices simple brin ;
- L'hybridation d'amorces oligonucléotidiques spécifiques, permettant de borner et d'amorcer la réplication de la séquence à amplifier ;

- La synthèse du brin complémentaire.

Les trois étapes d'un cycle de PCR sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique. Un thermocycleur permet ces variations de température. La réaction de PCR est rapide (une à deux heures). Il s'agit d'une technique avec une grande sensibilité et spécificité (115). Une première étape d'extraction des acides nucléiques est nécessaire avant toute PCR à partir d'un échantillon biologique.

Les PCR classiques dites en point final se distinguent des PCR en temps réel. Avec la PCR classique, la mise en évidence des amplicons est réalisée en fin de réaction. En revanche, la PCR en temps réel utilise le principe de la PCR classique avec, pour différence, une détection des amplicons à chaque cycle de PCR (116). Cette technique est plus rapide et comporte un risque moindre de contamination. En effet, la PCR classique nécessite une étape supplémentaire pour la mise en évidence des amplicons. Une seule bactérie, plusieurs ou l'ensemble des bactéries peuvent être recherchées. De ce fait, selon le ou les gènes ciblés par les amorces, trois types de PCR sont définis : la PCR spécifique, la PCR multiplex, la PCR universelle dite 16S. Des gènes de résistance ou des facteurs de virulence peuvent également être détectés.

Une PCR spécifique détecte une seule bactérie recherchée. Son intérêt reste donc limité dans le diagnostic des bactériémies en raison de la grande variété de micro-organismes pouvant être à l'origine de bactériémies. A l'inverse, la PCR universelle est théoriquement capable de détecter toute bactérie présente dans l'échantillon (117). Elle cible des gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr 16S) composé de régions conservées chez les bactéries, mais aussi de régions hypervariables permettant la distinction des différentes espèces. Les séquences obtenues sont ensuite analysées et comparées à des banques de données telles que BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ou BiBi (BioInformatics Bacterial Identification). Cette technique est fréquemment utilisée en Bactériologie, en l'absence ou en cas de doute sur l'identification de bactéries par les méthodes de routine. Une PCR multiplex détecte plusieurs espèces ou genres bactériens. En cas de PCR multiplex classique, suite à la production des amplicons, d'autres techniques devront être mises en œuvre pour identifier ces amplicons, comme l'électrophorèse ou l'hybridation.

#### 2-1-2-2 Exemples de tests commercialisés à partir des hémocultures positives

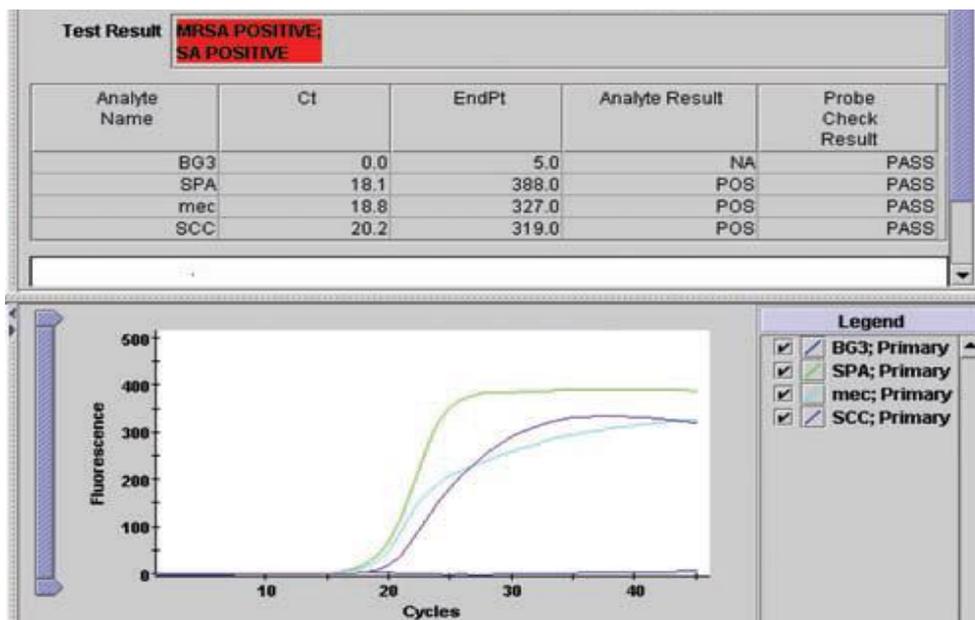
Le StaphPlex system (Genaco Biomedical Products, Inc., Huntsville, AL) est un test commercialisé permettant l'identification en environ cinq heures des espèces du genre *Staphylococcus*, de la toxine de Panton-Valentine et de cinq gènes de résistance aux

antibiotiques des staphylocoques dont le gène *mecA* (118). Ce test combine des techniques d'amplification par PCR multiplex et de détection par hybridation de 18 gènes cibles. D'après l'étude de Tang *et al*, ce test est efficace pour la distinction entre SCN et *S. aureus*, et pour la détection des S.A.R.M. (sensibilité de 92 %) (118).

Le test Hyplex BloodScreen PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.) system (BAG, Lich, Germany) est lui aussi basé sur une amplification par PCR multiplex suivie d'une détection par hybridation à des sondes spécifiques détectées par méthode E.L.I.S.A. (119). Il permet la détection, en environ six heures, de plusieurs cocci à Gram positif et bacilles à Gram négatif, ainsi que du gène *mecA*. L'étude de Wellinghausen *et al* a démontré une sensibilité et une spécificité supérieure à 90 % pour chaque espèce identifiable par ce test, ainsi qu'une totale concordance avec les méthodes phénotypiques pour la détection du gène *mecA* (119).

Le test Xpert™ MRSA/SA (Cepheid, Maurens-Scopont, France) sur GeneXpert® BC (Cepheid) est basé sur une PCR multiplex en temps-réel et permet la distinction entre SCN et *S. aureus*, ainsi que la détermination de la sensibilité à la méticilline (gène *mecA* et cassette *SSC mec*) (Figure 8, page 46) (120). Dans l'étude de Biendo *et al*, sur 56 isolats de *Staphylococcus* sp. testés, toutes les identifications apparaissaient concordantes. Seules trois discordances (5,4 %) ont été observées par rapport aux tests phénotypiques, et concernaient la détection de la méticillino-résistance (120).

Enfin, le test commercialisé Prove-it Sepsis® (Mobidiag, Finland) est basé sur une technique associant une PCR multiplex et une puce à ADN (121). Il permet l'identification de plus de 90 % des pathogènes (50 au total) potentiellement isolés dans les bactériémies, ainsi que du gène de résistance *mecA*. L'étude de Tissari *et al* a montré que 86 % des bactéries identifiées dans les 2107 hémocultures testées étaient présentes dans le panel de bactéries identifiables par Prove-it sepsis® (121). La concordance avec l'identification classique pour les espèces détectables était élevée (96,7 %). Toutefois, l'identification des bactéries retrouvées au sein des hémocultures polymicrobiennes apparaissait comme moins performante.



**Figure 8: Exemple d'un résultat MRSA positif /*S. aureus* positif, avec le test Xpert™ MRSA/SA (Cepheid, Maurens-Scopont, France) sur GeneXpert® BC (Cepheid).**

### 2-1-2-3 Evolution des tests moléculaires utilisés à partir des hémocultures positives

L'intérêt des tests utilisant une PCR multiplex est limité par le nombre restreint de bactéries identifiables. De nouvelles technologies ont été développées pour améliorer l'étape, lourde et chronophage, d'identification bactérienne par séquençage, suite à l'amplification par PCR universelle.

La technologie de PCR couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par électrobulbation (PCR-ESI MS) peut aussi être utilisée dans l'identification des bactéries directement à partir des hémocultures positives (122,123). La spectrométrie de masse de type ESI est la deuxième technique d'ionisation douce, à côté de la technique MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), détaillée ultérieurement. Elle associe une technique de PCR universelle et une analyse des amplicons produits par ESI-MS. La composition en nucléotides qui représente la "signature moléculaire" des amplicons est ensuite comparée à une base de données. Cette technologie permet l'identification d'un très large panel de bactéries en une seule étape, ainsi que celle de virus ou de champignons. Le typage, la détection de gènes de résistance ou de facteurs de virulence bactériens sont également possibles (124). De plus, il s'agit d'une méthode quantitative (125). L'étude de Kaleta *et al* a montré de très bonnes performances à partir des bouillons d'hémocultures (96,6 % de concordance avec les méthodes de routine), y compris en cas d'hémoculture polymicrobienne

(122). Les résultats d'identification apparaissent disponibles en cinq à six heures après la positivité de l'hémoculture. Cette technique est d'autant plus intéressante qu'elle peut s'appliquer directement à partir de prélèvements (126,127). Laffler *et al* ont montré des performances correctes d'identification de bactéries et levures directement à partir du sang, avec une concordance de 78,6 % avec les techniques d'hémocultures classiques et un délai d'obtention des résultats de six à huit heures seulement. Toutefois, la sensibilité de cette technique à partir du sang apparaît comme inférieure à celle de l'hémoculture (128). De plus, son coût conséquent constitue une limite importante dans son utilisation en routine.

Les techniques de séquençage nouvelle génération (Next Generation Sequencing) permettent un séquençage rapide et haut débit des génomes. L'une de ces techniques, le pyroséquençage, montre des capacités dans l'identification bactérienne (129). L'étude de Jordan *et al* a montré l'efficacité d'une technique combinant PCR temps réel et pyroséquençage pour l'identification bactérienne à partir des hémocultures positives (130). La concordance avec l'identification après subculture était de 97,8 %. Cependant, le séquençage reste une technique complexe, onéreuse, et rencontrant des difficultés dans l'identification des mélanges bactériens (130).

#### 2-1-2-4 Exemples de tests d'identification bactérienne directement à partir du sang du patient

Les techniques utilisables directement à partir du sang des patients permettent un gain de temps important, s'affranchissant de l'étape de culture dans un bouillon d'enrichissement de type hémoculture. La détection et l'identification du pathogène sont ainsi possibles en quelques heures. De plus, ces techniques s'affranchissent de l'action éventuelle des antibiotiques et permettent une meilleure détection des micro-organismes à croissance fastidieuse. Elles imposent une étape d'extraction à partir de sang total, suivie par une PCR universelle ou multiplex. Le sang total procure en effet une plus grande quantité de bactéries que le sérum, bien que l'extraction et la purification des acides nucléiques bactériens soient plus délicates (131,132). Selon les études, ces tests présentent, en comparaison à l'hémoculture constituant le gold-standard, des sensibilités variables (Tableau 11, page 48). Il faut cependant remarquer que le taux de positivité de ces tests moléculaires reste supérieur à celui des hémocultures.

**Tableau 11: Performances des techniques commercialisées pour l'identification bactérienne directement à partir du sang.**

Techniques commercialisées	Principe d'identification	Micro-organismes détectés	Temps (heure)	Sensibilité (%)
<b>LightCycler SeptiFast Test® (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ)</b>	PCR temps-réel multiplex	25 + gène <i>mecA</i>	6	68-85 (133-136)
<b>SepsiTest® (Molzym, Bremen, Germany)</b>	PCR universelle + séquençage	> 300	8-12	87-88,5 (137,138)
<b>Vyoo® (SIRS-Lab, Jena, Germany)</b>	PCR multiplex + Électrophorèse sur gel	> 40 + gènes de résistance	8	60 (139)

### 2-1-3 Limites des techniques de biologie moléculaire

Ces nouvelles techniques apparaissent comme intéressantes, particulièrement lorsqu'elles s'affranchissent de l'étape de pré-culture du sang, permettant un important gain de temps dans la détection et l'identification des bactéries. Ces dernières sont toutes basées sur une amplification par PCR, qui peut présenter quelques difficultés (112). Les écueils sont d'ordre technique : contamination entre échantillons ou par les réactifs utilisés, extraction délicate préalable mais nécessaire en raison de la présence de grandes quantités d'ADN humain ou d'inhibiteurs de PCR dans le sang, nécessité d'un personnel qualifié. Ils sont aussi d'ordre financier, en raison du coût des équipements et des kits de réactifs nécessaires. Enfin, l'interprétation des résultats reste délicate : les techniques utilisant la PCR détectent aussi les micro-organismes non viables, ne nécessitant pas dans tous les cas une antibiothérapie, et les techniques multiplex ne détectent pas un certain nombre de bactéries potentiellement impliquées dans les bactériémies. Outre ces inconvénients, ces nouvelles techniques ne permettent pas la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, ou seulement quelques génotypes de résistance.

## **2-2 La technologie MALDI-TOF MS**

La spectrométrie de masse est une technologie datant du début du XX<sup>e</sup> siècle. Il s'agit d'une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés, ainsi que leur identification et quantification. Cette technologie, limitée à l'étude des petites molécules à ses débuts, a évolué pour permettre l'étude de macromolécules.

Le principe de la spectrométrie de masse repose sur l'ionisation de molécules organiques (peptides, protéines notamment), qui aboutit à la production d'ions moléculaires. Les ions formés sont séparés selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) grâce à l'utilisation de champs magnétiques et/ou électriques. Puis, ces ions sont détectés et un spectre de masse est obtenu, représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport  $m/z$  (140).

Un spectromètre de masse comporte :

- une source d'ionisation, où se produit le passage de l'échantillon en phase gazeuse et l'ionisation des molécules ;
- un analyseur de masse, où règne un vide important, qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) ;
- un détecteur, qui permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés ;
- et un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres.

L'essor de la technologie de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight) a permis l'élargissement de ses domaines d'application, notamment à la Biologie Médicale (141).

### **2-2-1 Principe de la technique MALDI-TOF MS**

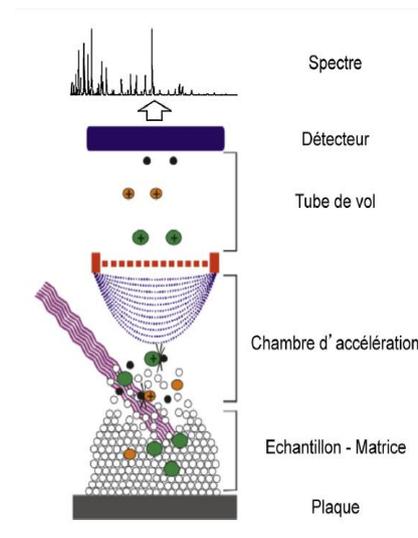
Le MALDI-TOF MS repose sur la technique de spectrométrie de masse, à ionisation dite douce. Dans le cas de méthodes d'ionisation dites « douces », l'ion formé est relativement stable et peut être consécutif à l'addition d'un ion ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ) ou d'un électron à la molécule, mais également à la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé (hydrure ou proton), (140). Cette technique permet l'analyse des protéines incluses dans les micro-organismes.

La spectrométrie de masse type MALDI-TOF se décompose en quatre étapes principales : ionisation douce, accélération et analyseur à temps de vol, détection (Figure 9, page 50).

L'ionisation est obtenue après mélange de l'échantillon à analyser avec une matrice sur une cible. Après cristallisation, le mélange est soumis à l'action d'un faisceau laser. La matrice a pour rôle l'absorption de l'énergie du laser, permettant ainsi la vaporisation de l'échantillon (désorption) et le transfert de charge aux protéines, aboutissant à la formation d'ions.

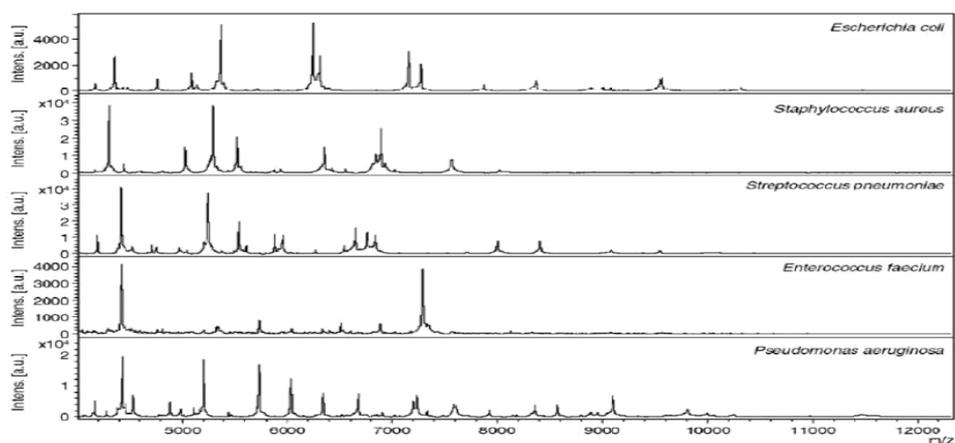
L'accélération des ions formés est obtenue grâce à un champ électromagnétique, établi entre la cible et l'entrée du tube de vol. Les ions produits traversent ensuite le tube de vol, à l'extrémité duquel se trouve le détecteur. Dans le tube de vol, ils sont séparés en fonction de leur vitesse, fonction de leur rapport  $m/z$  (masse/charge).

Le détecteur traduit l'impact des ions en signal exprimé sous la forme d'une fonction temps/intensité. La mesure du temps de vol (Time Of Flight) pour atteindre le détecteur est fonction du rapport  $m/z$ . La somme des ions analysés forme un spectre caractéristique de l'échantillon à identifier.



**Figure 9 : Schéma du spectromètre de masse et principe de la technologie MALDI-TOF (d'après Gravet *et al*, 2013).**

L'identification des micro-organismes est ensuite effectuée par comparaison à une base de données, le spectre obtenu étant différent d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre (figure 10).



**Figure 10: Empreintes spectrales obtenues à partir de colonies entières de cinq espèces bactériennes différentes (d'après Carbone *et al*, 2011).**

### 2-2-2 Systèmes et bases de données disponibles

Trois systèmes MALDI-TOF MS sont actuellement commercialisés en France, par les firmes Andromas, bioMérieux et Bruker daltonics (142). Ces spectromètres possèdent leur propre logiciel de pilotage, incluant leur propre banque de données. Les bases de données contiennent des spectres de références créés à partir de pics communs, reproductibles, plus ou moins intenses, retrouvés à plusieurs reprises lors du passage en MALDI-TOF de souches de référence. Elles fonctionnent avec un algorithme statistique d'interprétation, nécessaire pour comparer le spectre de masse de la bactérie à identifier aux empreintes spectrales de référence (143–145).

### 2-2-3 Application en bactériologie

Depuis quelques années, la technique MALDI-TOF MS a révolutionné la Microbiologie Médicale et est désormais utilisée pour l'identification des bactéries isolées à partir de milieux solides. De nombreuses études ont montré ses très bonnes performances (143,146–149).

### 2-2-3-1 Utilisation en routine : exemple du spectromètre VitekMS<sup>®</sup>

L'identification bactérienne par MALDI-TOF MS se décompose en trois étapes (d'après le manuel d'utilisation VitekMS<sup>®</sup>):

1- le dépôt de l'échantillon bactérien, associé à la matrice, directement sur la cible. Un contrôle de qualité interne est associé à ces dépôts. Dans le cas du VitekMS<sup>®</sup>, la matrice utilisée est composée d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique ( $\alpha$ -CHCA). L'échantillon est déposé grâce à une öse sur les cibles MALDI du VitekMS<sup>®</sup> puis recouvert d'un microlitre de matrice. Le mélange est séché à température ambiante. La firme bioMérieux ne préconise pas d'extraction pour les bactéries (hors mycobactéries et *Nocardia* sp.).

2- l'acquisition du spectre, une fois la cible introduite dans le spectromètre de masse. Pour chaque dépôt, le VitekMS<sup>®</sup> acquiert une centaine de spectre, couvrant des masses allant de 1000 à 15000 Daltons.

3- la comparaison du spectre à la base de données. La base de données du VitekMS<sup>®</sup> (Version 3.2.0-7) contient près de 1000 espèces bactériennes. Elle a été réalisée grâce à des spectres issus de souches parfaitement caractérisées de chaque espèce référencée. Une pondération a été affectée à chaque pic pour chaque espèce en fonction de sa spécificité. Les résultats sont associés à un indice de confiance, exprimant la similitude entre le micro-organisme à identifier et toute bactérie de la base de données. Une identification est considérée comme « bonne » si une identification simple s'affiche avec un indice de confiance compris entre 60 et 99,9 %. Il s'agit d'une base marquée CE-IVD, l'ajout de spectre ne peut être effectué que par des mises à jour fournisseur.

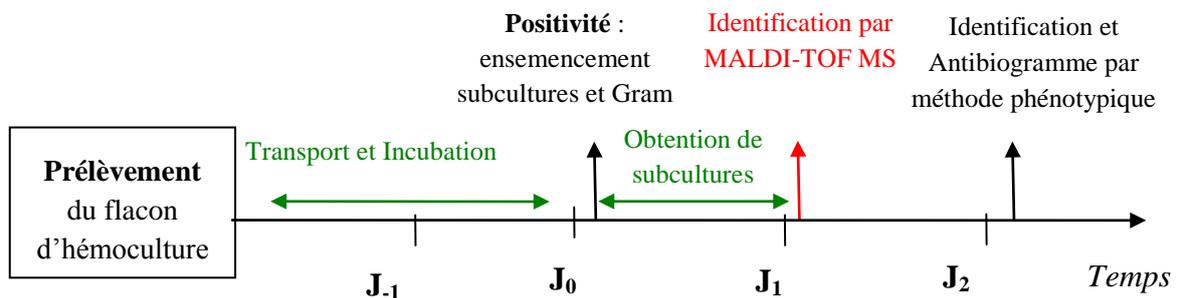
### 2-2-3-2 Intérêt de la spectrométrie de masse

Cette technologie a supplanté les méthodes phénotypiques majoritairement utilisées en routine jusqu'alors. En effet, elle présente divers atouts :

- Sa rapidité. Elle permet de réduire le délai d'obtention de l'identification des bactéries, passant de plusieurs heures par les techniques phénotypiques à quelques minutes (Figure 11, page 53).

- Sa simplicité d'utilisation, le point le plus délicat étant l'étape du dépôt (150). Le dépôt d'une quantité insuffisante de certains genres ou espèces bactériens rend ainsi leur identification difficile (*P. aeruginosa* muqueux, *Nocardia* sp., *Propionibacterium* sp.). Une étape supplémentaire d'extraction peut améliorer la qualité des spectres et donc l'identification des bactéries (150).

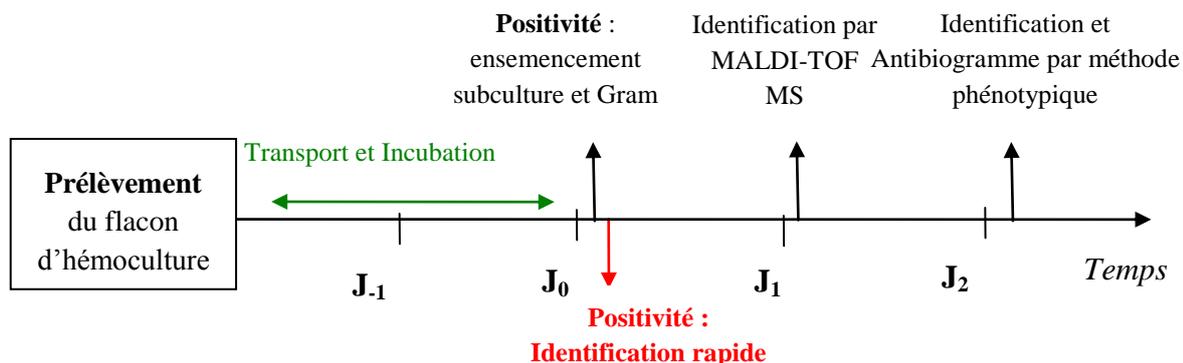
- Sa précision. Elle pallie l'imprécision des techniques phénotypiques (146). En effet, certaines bactéries, comme les bacilles à Gram positif ou certains streptocoques, n'étaient souvent identifiés qu'au genre. Il faut cependant souligner que les performances de la technologie MALDI-TOF varient en fonction des espèces (146,151). Les insuffisances des bases de données sont souvent mises en cause (146).
- Son faible coût par échantillon, une fois le spectromètre acquis (146).
- Sa robustesse. Les identifications bactériennes apparaissent comme peu affectées par le temps de croissance bactérien ou le milieu utilisé (142).



**Figure 11: Délai classiquement retrouvé avant obtention des résultats de l'hémoculture avec l'apport de la technologie MALDI-TOF MS.**

#### 2-2-4 Identification directement à partir des flacons d'hémoculture positifs

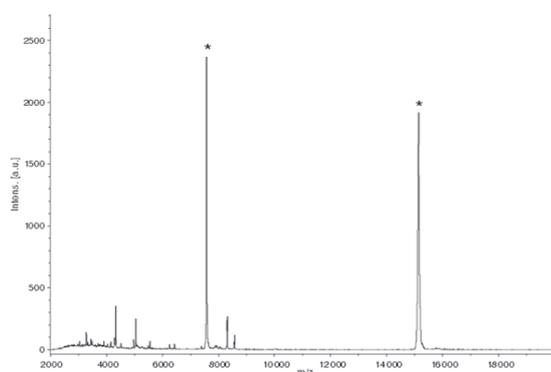
Grâce à sa grande sensibilité, la technologie MALDI-TOF permet de détecter directement des micro-organismes issus de prélèvements cliniques. Cette identification est améliorée par un traitement préalable des échantillons, consistant à enlever une partie des éléments pouvant inhiber l'analyse (protéines, acides nucléiques, débris cellulaires) et de concentrer les bactéries. L'identification des bactéries à partir d'urines s'est ainsi montrée efficace en cas de bactériurie importante (supérieure à  $10^5$  UFC/mL) à bacilles à Gram négatif (152,153). Des identifications à partir du liquide céphalo-rachidien ont aussi été testées, avec moins de succès (154). Des protocoles utilisant le MALDI-TOF MS ont été développés afin d'identifier directement les bactéries à partir des flacons d'hémocultures. Ces protocoles n'utilisent pas de subculture et permettent donc un gain de temps important (Figure 12, page 54).



**Figure 12 : Délai classiquement retrouvé avant obtention des résultats de l'hémoculture avec l'apport de l'identification rapide à partir des flacons positifs.**

#### 2-2-4-1 Principes des protocoles

Dans ces protocoles, l'identification des bactéries utilise les flacons d'hémocultures détectés positifs par les systèmes automatisés. Dans ces flacons, les bactéries sont associées au milieu de culture, mais aussi aux composants du sang, notamment l'hémoglobine contenue dans les globules rouges et d'autres protéines, comme l'albumine. Celles-ci interfèrent avec le spectre obtenu, en engendrant des pics supplémentaires qui entravent l'interprétation du spectre (Figure 13). De ce fait, contrairement à l'identification des bactéries isolées sur milieu solide, une extraction préalable des bactéries à partir du milieu liquide doit être effectuée avant identification par MALDI-TOF MS (155). Les flacons d'hémoculture contenant du charbon ne sont pas utilisables avec ces protocoles (156)



**Figure 13 : Pics liés aux composants du sang dans les spectres de masse (d'après Drancourt *et al*, 2010).**

Divers protocoles ont été publiés (Tableau 12, pages 57-58). Ils débutent par le recueil d'une aliquote du bouillon d'hémoculture positive. Ce recueil est effectué dans un tube stérile, avec ou sans gel séparateur. Ensuite, diverses étapes sont utilisées, avec des objectifs différents :

- Elimination des globules rouges, par utilisation d'eau distillée, de tampon de lyse ou de saponine, ou encore par une centrifugation lente avec de l'eau distillée. Le lavage par eau distillée permet aussi l'élimination des autres protéines sanguines.
- Précipitation des protéines, par lavage avec de l'éthanol.
- Extraction et solubilisation des protéines, par incubation avec acide trifluoroacétique, acétonitrile, acide formique.

Après ces étapes, l'extrait bactérien est déposé sur la cible, associé à la matrice.

#### 2-2-4-2 Performance des protocoles

Avant la disponibilité des kits commerciaux de traitement des échantillons d'hémocultures, la technologie a été évaluée par des protocoles « maison ». Un certain nombre de protocoles ont ainsi été décrits. Le tableau 12 (pages 57-58) présente les résultats de différentes études menées sur les bouillons d'hémoculture. Leurs performances sont établies par comparaison avec les méthodes d'identification phénotypiques utilisées en routine et, en cas de difficultés, par biologie moléculaire. Bruker daltonics® a franchi une étape importante dans la normalisation de la méthode d'extraction de l'échantillon avec l'introduction du kit Sepsityper®.

Les performances d'identification des protocoles décrits varient en fonction des stratégies utilisées et des espèces testées. Diverses études proposent d'utiliser des critères de validité d'identification moins stricts afin d'obtenir des performances encore meilleures, tout en préservant une fiabilité des résultats (157–161). Dans ce contexte, certaines espèces bactériennes montrent régulièrement des difficultés d'identification. Outre les problèmes d'identification liés aux performances intrinsèques des systèmes MALDI-TOF, concernant notamment *S. pneumoniae* (157,162), des études pointent des performances médiocres de certains protocoles pour certaines espèces bactériennes. Ainsi les staphylocoques à coagulase négative (155,160,162), les streptocoques (155,160), ou encore les bactéries encapsulées (155) présentent des problèmes d'identification dans certaines études.

Quelle que soit la méthode utilisée, une identification à l'espèce ne permet cependant pas d'éliminer la présence d'une deuxième espèce dans le bouillon d'hémoculture. En effet, dans le cas d'hémocultures polymicrobiennes, une seule espèce peut être détectée, correspondant probablement à l'espèce majoritaire (157,161–163). Une culture polymicrobienne peut toutefois être suspectée si deux espèces sont proposées, chacune avec un score acceptable, par Microflex LT Biotyper<sup>®</sup> (157,161,164). La comparaison par Chen *et al* (164) des systèmes Microflex LT Biotyper<sup>®</sup> et VitekMS<sup>®</sup> a montré que cette conclusion n'est pas possible dans le cas du VitekMS<sup>®</sup>. De plus, elle a révélé une performance globale significativement supérieure pour l'identification bactérienne à partir des flacons d'hémoculture du Microflex LT Biotyper<sup>®</sup> comparé au VitekMS<sup>®</sup>.

### **2-2-5 Autres applications potentielles des systèmes MALDI-TOF**

La spectrométrie MALDI-TOF est une méthode sensible pour l'analyse des protéines bactériennes, il semblerait qu'elle puisse être utilisée pour caractériser les enzymes ou les produits de dégradation dus aux mécanismes de résistance aux antibiotiques (165,166). Toutefois, aucune de ces méthodes n'est actuellement utilisée en routine. Des études ont aussi montré les capacités de cette technologie dans la différenciation au niveau du sérotype, du biotype, ou de la sous-espèce bactérienne (167,168).

**Tableau 12 : Caractéristiques et performances des protocoles d'identification par MALDI-TOF à partir de flacons d'hémocultures monomicrobiens.**

	<b>Prod'hom <i>et al, 2010</i> (155)</b>	<b>Stevenson <i>et al, 2010</i> (162)</b>	<b>Ferroni <i>et al, 2010</i> (163)</b>	<b>Christner <i>et al, 2010</i> (158)</b>	<b>Moussaoui <i>et al, 2010</i> (157)</b>
<b>Nombre hémocultures</b>	122	202	362	277	482
<b>Flacons d'hémocultures</b>	BACTEC®	BACTEC®	BacT/Alert®	BACTEC®	BACTEC®
<b>Temps d'obtention de l'identification</b>	30 à 45 min	1 h	20 min	100 min	80 min (série de 12)
<b>Quantité de bouillon</b>	5 mL	4 mL	200 µL	6 mL	1,5 mL
<b>Tube séparateur de sérum</b>	Non	Oui	Non	Non	Oui
<b>Agent de lyse ou Kit commercial</b>	Eau distillée + NH <sub>4</sub> Cl/ KHCO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> Cl/ NaHCO <sub>3</sub>	Saponine 5%, eau distillée	Eau distillée	Eau distillée
<b>Nombre de centrifugations avant extraction</b>	2 lentes	5 rapides	2 rapides	2 rapides	3 (1 lente, 2 rapides)
<b>Extraction protéique</b>	Oui (non systématique)	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Spectromètre</b>	Bruker microflex®	Bruker microflex®	Bruker microflex®	Bruker microflex®	Bruker microflex®
<b>Base de données</b>	Biotyper®	Biotyper®	Andromas®	Biotyper®	Biotyper®
<b>Performance</b>	78,7 % (Id genre et espèce)	76,4 % (Id genre et espèce)	96,7 % (Id espèce et groupe)	87,0 % (Id espèce et genre)	90,0 % (Id espèce ou genre)

**Tableau 12 (2): Caractéristiques et performances des protocoles d'identification par MALDI-TOF à partir de flacons d'hémocultures monomicrobiens.**

	<b>Loonen <i>et al</i>, 2012 (159)</b>	<b>Jamal <i>et al</i>, 2013 (160)</b>	<b>Chen <i>et al</i>, 2013 (164)</b>	<b>Chen <i>et al</i>, 2013 (164)</b>	<b>Rand <i>et al</i>, 2013 (169)</b>	<b>Monteiro <i>et al</i>, 2014 (170)</b>
<b>Nombre hémocultures</b>	101	152	92	92	151	245
<b>Flacons d'hémocultures</b>	BacT/Alert®	BACTEC®, BacT/Alert®	BACTEC®	BACTEC®	BACTEC®	BACTEC®
<b>Temps d'obtention de l'identification</b>	20 min	35 min	/	/	1 heure	50 min
<b>Quantité de bouillon</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	2 mL	5 mL
<b>Tube séparateur de sérum</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Non
<b>Agent de lyse ou Kit commercial</b>	Sepsityper®	Sepsityper®	Saponine 5%, eau distillée	Saponine 5%, eau distillée	Filtration+ Brij®	/
<b>Nombre de centrifugations avant extraction</b>	2 rapides	2 rapides	2 rapides	2 rapides	2 rapides	1 lente 1 rapide
<b>Extraction protéique</b>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Spectromètre</b>	Bruker microflex®	Bruker microflex®	VitekMS®	Bruker microflex®	VitekMS®	VitekMS®
<b>Base de données</b>	Biotyper®	Biotyper®	VitekMS®	Biotyper®	VitekMS®	VitekMS®
<b>Performance</b>	78,2 (Id genre et espèce)	72,4 % (Id genre et espèce)	88,0 % (Id genre et espèce)	96,7 % (Id espèce et groupe)	94 % (Id espèce et genre)	91,4 % (Id espèce et genre)

## **PARTIE II : MATERIELS ET METHODES**

---

## **I- Objectifs de notre étude**

### **1- Objectif principal**

Le but de notre étude était la mise au point et l'évaluation d'une technique permettant de réduire le délai d'obtention de l'identification bactérienne à partir des hémocultures détectées positives. Pour cela, nous avons évalué prospectivement l'efficacité de quatre protocoles internes, simples, autorisant une identification des bactéries directement à partir des flacons d'hémocultures déclarés positifs par l'automate, sans passer par l'étape préalable de subculture d'une durée moyenne de 18 à 24 heures (Tableau 13, page 64).

### **2- Objectif secondaire**

Parallèlement, nous souhaitons évaluer l'influence de divers facteurs sur l'efficacité des protocoles testés : le délai de positivité de l'hémoculture, la numération leucocytaire, l'hématocrite, l'aspect du culot bactérien obtenu.

## **II- Sélection des échantillons**

Cette étude a été conduite dans le service de Bactériologie-Hygiène du C.H.U. de Nantes entre Novembre 2013 et Septembre 2014 au C.H.U. Durant cette période, nous avons collecté des flacons d'hémocultures détectés positifs par le système BACTEC<sup>®</sup> (BACTEC<sup>®</sup> Plus Aerobic/F et Plus Anaerobic/F, et BACTEC<sup>®</sup> Peds Plus/F, Becton Dickinson, France). Parallèlement, ces hémocultures étaient analysées en suivant le protocole de routine mis en œuvre dans le laboratoire. Tous les échantillons, quel que soit leur statut- monomicrobien ou plurimicrobien-, ont été inclus dans cette étude comparative des performances et de la rapidité du rendu de l'identification bactérienne par quatre protocoles différents. Ces échantillons, collectés au cours de quatre périodes distinctes, ont été testés avec un seul des protocoles.

### **III- Protocoles d'identification rapide**

#### **1- Protocole inspiré de l'étude de Prod'hom *et al* (155) (Protocole 1)**

Le premier protocole utilisé était inspiré de la publication de Prod'hom *et al* (2010). Ce protocole présente l'avantage, tout en étant relativement performant, de ne pas systématiquement effectuer une étape d'extraction protéique finale, permettant un gain en termes de simplicité et de temps.

Directement à partir du flacon d'hémoculture détecté positif, environ cinq millilitres du mélange sang/bouillon nutritif étaient prélevés dans un tube sec à l'aide d'un système de ponction. Quatre millilitres de ce mélange étaient dilués à 11 mL d'eau distillée. Après centrifugation à 650 g pendant dix minutes, un culot bactérien était obtenu à partir de ce mélange. Après avoir éliminé soigneusement le surnageant, le culot était remis en suspension avec un millilitre de tampon de lyse NH<sub>4</sub>Cl/KHCO<sub>3</sub>. La suspension était transférée dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> et centrifugée à 2000 g pendant dix minutes. Le culot bactérien était obtenu après élimination du surnageant. Une aliquote du culot était déposée en double sur les puits d'une cible VITEK MS-DS<sup>®</sup>. Un microlitre d'une solution matrice (CHCA VitekMS<sup>®</sup>) était ensuite déposé sur le puits avec l'extrait bactérien. Après séchage du mélange, la cible était chargée dans l'automate VitekMS<sup>®</sup> (Figure 14, page 62).



**Figure 14 : Protocole 1 d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémocultures positifs.**

## **2- Optimisation du protocole avec centrifugation rapide (Protocole 2)**

Ce second protocole présente deux différences avec le premier : la quantité de bouillon utilisée était plus faible et les centrifugations plus rapides. Il a été développé d'une part, afin d'améliorer les performances du premier protocole et, d'autre part, pour diminuer le temps de manipulation. En effet, de nombreux protocoles performants utilisent une quantité plus faible de sang et des centrifugations plus courtes et puissantes (Tableau 12, page 57-58).

A partir d'un flacon d'hémoculture détecté positif, environ deux millilitres de mélange sang/bouillon nutritif étaient prélevés dans un tube sec à l'aide d'un système de ponction. Un millilitre de ce mélange était dilué dans trois millilitres d'eau distillée. Après centrifugation à 2500 g pendant deux minutes, un culot bactérien était obtenu à partir de ce mélange. Après

avoir éliminé soigneusement le surnageant, le culot était remis en suspension avec un millilitre de tampon de lyse  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$ . La suspension était transférée dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> et centrifugée à 13000 g pendant deux minutes. Un culot bactérien était obtenu après élimination du surnageant. Une aliquote du culot était déposée en double sur les puits d'une cible VITEK MS-DS<sup>®</sup>. Un microlitre d'une solution matrice (CHCA VitekMS<sup>®</sup>) était ensuite déposé sur le puits avec l'extrait bactérien. Après séchage du mélange, la cible était chargée dans l'automate VitekMS<sup>®</sup>.

### **3- Protocole avec centrifugation rapide et utilisation de saponine** **(Protocole 3)**

Les techniques décrites par Chen *et al* et Ferroni *et al* utilisent la saponine comme agent de lyse et montrent des performances satisfaisantes. Ce troisième protocole incorporait donc au second protocole une étape de lyse par une solution de saponine à 5 %.

A partir d'un flacon d'hémoculture détecté positif, environ deux millilitres de mélange étaient prélevés dans un tube sec à l'aide d'un système de ponction. Un millilitre de ce liquide était mélangé à 200  $\mu\text{L}$  de saponine 5%. Le mélange était incubé cinq minutes, puis trois millilitres d'eau distillée étaient ajoutés. Après une centrifugation à 2500 g pendant deux minutes, un culot bactérien était obtenu à partir de ce mélange. Après avoir éliminé soigneusement le surnageant, le culot était remis en suspension avec un millilitre de tampon de lyse  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{KHCO}_3$ . La suspension était transférée dans un tube Eppendorf<sup>®</sup> et centrifugée à 13000 g pendant deux minutes. Le culot bactérien était obtenu après élimination du surnageant. Une aliquote du culot était déposée en double sur les puits d'une cible VITEK MS-DS<sup>®</sup>. Un microlitre d'une solution matrice (CHCA VitekMS<sup>®</sup>) était ensuite déposé sur le puits avec l'extrait bactérien. Après séchage du mélange, la cible était chargée dans l'automate VitekMS<sup>®</sup>.

### **4- Protocole avec centrifugation rapide et utilisation d'acide formique** **(Protocole 4)**

De nombreuses études ont montré l'efficacité d'une extraction protéique finale. Ce protocole incorporait donc une étape d'extraction protéique finale. Celle-ci diffère des extractions complètes utilisées par les études précédemment citées. Elle n'utilise qu'un réactif

(acide formique) et ne nécessite pas de centrifugation. Il s'agit d'une extraction directe et rapide, semblable à celle utilisée notamment pour l'identification des levures (171).

A partir d'un flacon d'hémoculture détecté positif, environ deux millilitres de mélange étaient prélevés dans un tube sec à l'aide d'un système de ponction. Un millilitre de ce liquide était dilué dans trois millilitres d'eau distillée. Après centrifugation à 2500 g pendant deux minutes, un culot bactérien était obtenu à partir de ce mélange. Après avoir éliminé soigneusement le surnageant, le culot était remis en suspension avec un millilitre de tampon de lyse NH<sub>4</sub>Cl/KHCO<sub>3</sub>. La suspension était transférée dans un tube Eppendorf® et centrifugée à 13000 g pendant deux minutes. Le culot bactérien était obtenu après élimination du surnageant. Une aliquote du culot était déposée en double sur les puits d'une cible VITEK MS-DS®. Un demi-microlitre d'une solution d'acide formique était déposé sur le culot. Après séchage du mélange, une solution matrice (CHCA VitekMS®) était ensuite déposée sur la colonie. Après séchage du mélange, la cible était chargée dans l'automate VitekMS®.

**Tableau 13 : Synthèse des quatre protocoles mis au point et évalués dans notre étude.**

	<b>PROTOCOLE 1</b>	<b>PROTOCOLE 2</b>	<b>PROTOCOLE 3</b>	<b>PROTOCOLE 4</b>
<b>Durée</b>	40 min	15 min	20 min	15 min
<b>Volume de bouillon</b>	4 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Obtention du culot bactérien</b>	1- Centrifugation (10' à 650 g) + Eau distillée (11 mL) 2- Centrifugation (10' à 2000 g) + tampon de lyse (1 mL)	1- Centrifugation (2' à 2500 g) + Eau distillée (3 mL) 2- Centrifugation (2' à 13000 g) + tampon de lyse (1 mL)	1- Incubation 5' avec saponine 5% (200 µL) 2- Centrifugation (2' à 2500 g) + Eau distillée (3 mL) 3- Centrifugation (2' à 13000 g) + tampon de lyse (1 mL)	1- Centrifugation (2' à 2500 g) + Eau distillée (3 mL) 2- Centrifugation (2' à 13000 g) + tampon de lyse (1 mL)
<b>Dépôt du culot sur cible</b>	Standard (associé à la matrice)	Standard	Standard	Dépôt d'acide formique avant dépôt de la matrice

#### **IV- Protocole d'identification classique en routine**

A partir du flacon d'hémoculture détecté positif, environ trois millilitres de mélange sang/bouillon nutritif étaient prélevés dans un tube sec à l'aide d'un système de ponction.

**A J<sub>0</sub>**, dans un premier temps, un examen lame/lamelle était réalisé puis un examen direct était systématiquement effectué par réalisation et lecture de la coloration de Gram. Cette étape fournit une orientation sur la bactérie présente : morphologie, coloration de Gram, mode de regroupement, mobilité (172).

Dans un second temps, une subculture bactérienne était systématiquement réalisée : une goutte du mélange sang/bouillon nutritif était ensemencée sur une gélose au sang et dans un bouillon Schaedler. D'autres milieux enrichis ou sélectifs pouvaient être ajoutés en cas de suspicion de bactéries exigeantes (examen direct évocateur, subculture stérile). Si une paire de flacons aérobie/anaérobie était détectée positive, une seule gélose au sang était ensemencée à partir du flacon aérobie. Les milieux étaient ensuite incubés en atmosphère adéquate à 37°C : la gélose au sang sous CO<sub>2</sub> et le bouillon anaérobie en atmosphère normale.

A noter qu'en l'absence de micro-organisme à l'examen direct (suspicion de fausse positivité de l'automate), les flacons étaient à nouveau incubés dans l'automate et une subculture était effectuée.

**A J<sub>1</sub>**, la lecture de la subculture avait lieu. Une identification et/ou un antibiogramme étaient effectués à partir des colonies isolées sélectionnées. Des milieux de culture adaptés pouvaient également être ajoutés à cette étape.

L'identification à partir des colonies obtenues par subculture était effectuée en routine grâce à l'utilisation de l'automate VitekMS<sup>®</sup>, système d'identification rapide utilisant la méthode de spectrométrie de masse à désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Une portion de colonie était déposée sur un puits d'une cible VITEK MS-DS<sup>®</sup>. Un microlitre d'une solution matrice (CHCA VitekMS<sup>®</sup>) était ensuite déposé sur la colonie. Après séchage du mélange, la cible était chargée dans l'automate.

En absence de résultats ou en cas de doute sur la véracité des résultats, des identifications biochimiques (VITEK2, bioMérieux, France) étaient effectuées et obtenus à **J<sub>2</sub>**. En l'absence de résultats valides et cohérents avec l'examen direct, le recours aux techniques d'identifications moléculaires (séquençage des diverses cibles : ARN 16S, *rpoB*, *sodA*, *tuf*) pouvait être envisagé plus tardivement.

L'identification obtenue à partir de cette méthode de routine a été considérée comme la méthode d'identification de référence pour les échantillons sélectionnés.

## **VI- Analyse des résultats**

Le VitekMS<sup>®</sup> associe à chaque identification un indice de confiance, exprimant la similitude entre le spectre du pathogène à identifier et l'ensemble des spectres de référence des différents pathogènes inclus présent dans la base de données VitekMS<sup>®</sup> CE-IVD. Le manuel d'utilisation du VitekMS<sup>®</sup> considère comme « bonne » une identification simple associée à un indice de confiance compris entre 60 et 99,9 %.

Un succès dans l'identification des bactéries directement à partir des flacons d'hémoculture doit répondre à deux critères :

- Identification considérée comme « bonne » d'après le manuel d'utilisation du VitekMS<sup>®</sup>, pour un ou deux des dépôts effectués.
- Concordance avec le protocole de routine

Une identification est considérée comme un échec dans quatre cas :

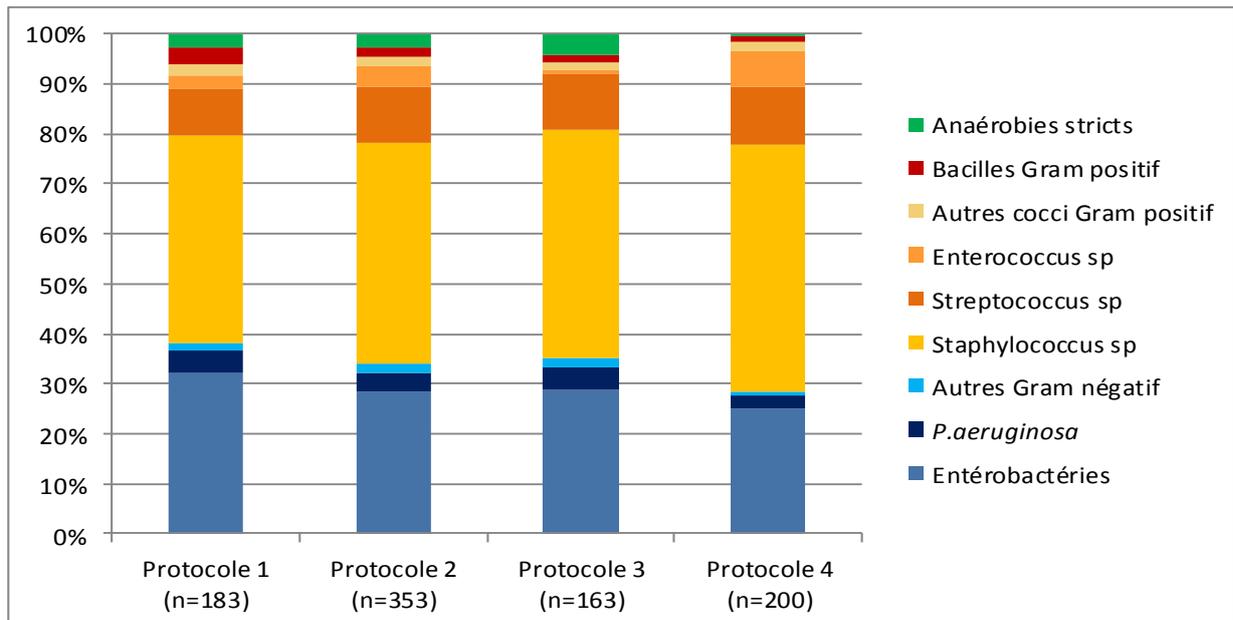
- Absence d'identification (absence d'acquisition de spectre ou spectre inconnu)
- Indice de confiance trop faible
- Espèce bactérienne identifiée improbable, notamment *Mycobacterium kansasii*, *Vibrio fluvialis*, *Listeria grayii*, *Gemella sanguinis*, et non cohérente avec l'examen direct obtenu.
- Identifications considérées comme « bonnes » pour les deux dépôts effectués, mais discordantes.

# **PARTIE III : RESULTATS**

---

## I- Répartition des familles bactériennes dans les divers protocoles

Sur la période d'étude considérée, nous avons analysé en double 944 hémocultures bactériennes, dont 899 étaient monomicrobiennes et 45 étaient polymicrobiennes. Les quatre protocoles ont été successivement testés à partir d'hémocultures recueillies sur des périodes différentes. Par conséquent, la répartition des familles bactériennes isolées varie selon les protocoles, sans différence significative majeure (Figure 15).



**Figure 15 : Répartition des familles bactériennes isolées dans les protocoles (hémocultures monomicrobiennes)**

Une majorité de bactéries à Gram positif a été isolée lors de chaque protocole. Le protocole 4 contient la plus forte proportion de bactéries à Gram positif : 71 %, contre 61 %, 65 % et 64 % respectivement pour les protocoles 1, 2 et 3. Parmi les bactéries à Gram positif, le genre *Staphylococcus* apparaît comme majoritairement isolé (entre 70 et 75 % des bactéries à Gram positif selon les protocoles). Les entérobactéries représentaient la famille bactérienne majoritaire chez les bactéries à Gram négatif (80 à 90 % des bactéries à Gram négatif selon les protocoles). A la lumière des résultats de l'épidémiologie des bactériémies au C.H.U. de Nantes, les trois principaux espèces/groupes bactériens isolés, représentant dans chaque protocole plus de la moitié des isolats, s'avèrent être dans l'ordre de fréquence : staphylocoques à coagulase négative, *E. coli* et *S. aureus*.

## II- Résultats de l'identification bactérienne

### 2-1 Protocole 1, inspiré de Prod'hom *et al*, 2009 (155)

Le protocole 1 a été testé sur un total de 194 hémocultures, dont 183 monomicrobiennes (Annexe 1). La performance du Protocole 1 dans l'identification des hémocultures monomicrobiennes était de 61,7 %, dont 58,5 % d'identification correcte à l'espèce et 3,3 % d'identification correcte au genre (Tableau 14).

**Tableau 14 : Résultats d'identification par le Protocole 1 (n=194)**

		Nombre (%) d'identification (Id)		
		Id à l'espèce	Id au genre	Echec d'Id
<b>Bacilles à Gram négatif</b>	Entérobactéries	39 (67,8)	1	19
	<i>P. aeruginosa</i>	7 (88)	0	1
	Autres BGN	1	0	1
<b>Cocci à Gram négatif</b>	<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0	0
<b>Cocci à Gram positif</b>	<i>Staphylococcus</i> sp.	48 (67,1)	3	25
	<i>Streptococcus</i> sp.	4 (29,4)	1	12
	<i>Enterococcus</i> sp.	2	1	2
	Autres CGP	2	0	2
<b>Bacilles à Gram positif</b>		1	0	5
<b>Anaérobies stricts</b>		2	0	3
<b>Total</b>		107 (58,5)	6 (3,3)	70

Avec ce protocole, l'identification rapide directement à partir des flacons d'hémocultures positifs était correcte (à l'espèce) pour 67 % des bactéries à Gram négatif et 53 % des bactéries à Gram positif. Les trois espèces majoritairement isolées des hémocultures, *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis* montraient une identification correcte à l'espèce respectivement dans 73 %, 64 % et 41 % des cas.

Aucune discordance dans l'identification du genre bactérien n'a été observée, en dehors des espèces improbables précédemment citées (*Mycobacterium kansasii*, *Vibrio*

*fluvialis*, *Listeria grayii*, *Gemella sanguinis*), identifiées avec un score pourtant élevé. Seules six discordances dans l'identification à l'espèce avec le protocole d'identification de routine ont été observées : identification d'un *Enterobacter cancerogenus* à la place d'un *E. cloacae*, identification d'un *Enterococcus faecalis* à la place d'un *Enterococcus faecium*, identification d'un *Staphylococcus intermedius* à la place d'un *Staphylococcus aureus*, identification d'un *Staphylococcus haemolyticus* à la place d'un *Staphylococcus epidermidis*, identification d'un *Staphylococcus hominis* à la place d'un *Staphylococcus haemolyticus*, et identification d'un *Streptococcus suis* à la place d'un *Streptococcus salivarius*.

Concernant les 11 hémocultures polymicrobiennes, une seule espèce était identifiée dans six cas (54,5 %). L'identification rendue avec le protocole 1 était confirmée et exacte lors de l'identification classique pour l'une des bactéries de ces hémocultures polymicrobiennes. Pour les autres hémocultures (n=5), aucune identification n'a été obtenue avec le protocole 1.

## **2-2 Protocole 2, avec utilisation de centrifugation rapide**

Ce protocole a été testé sur un total de 367 hémocultures, dont 353 monomicrobiennes (Annexe 2). La performance du Protocole 2 dans l'identification des hémocultures monomicrobiennes était de 74,5 %, dont 73,4 % d'identification correcte à l'espèce bactérienne et 1,1 % d'identification au genre (Tableau 15).

**Tableau 15 : Résultats d'identification par le Protocole 2 (n=367)**

		Nombre (%) d'identification correcte (Id)		
		Id à l'espèce	Id au genre	Echec d'id
<b><i>Bacilles à Gram négatif</i></b>	Entérobactéries	90 (90)	0	10
	<i>P. aeruginosa</i>	14 (100)	0	0
	Autres BGN	4	0	0
<b><i>Cocci à Gram négatif</i></b>	<i>Neisseria meningitidis</i>	2	0	0
<b><i>Cocci à Gram positif</i></b>	<i>Staphylococcus</i> sp.	112 (71,8)	2	42
	<i>Streptococcus</i> sp.	13 (32,5)	1	26
	<i>Enterococcus</i> sp.	10	0	4
	Autres CGP	6	0	1
<b><i>Bacilles à Gram positif</i></b>		1	1	4
<b><i>Anaérobies stricts</i></b>		7	0	3
<b><i>Total</i></b>		259 (73,4)	4 (1,1)	90

Les performances de ce protocole pour l'identification rapide directement à partir des flacons d'hémocultures positifs étaient correctes (à l'espèce) pour 91 % des bactéries à Gram négatif et 63 % des bactéries à Gram positif. Les trois espèces majoritairement isolées des hémocultures, *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis* montraient une identification correcte respectivement dans 92 % et 86 % et 48 % des cas.

Une seule discordance avec le protocole d'identification de routine dans l'identification au genre a été observée (en dehors des espèces improbables précédemment citées) : identification d'un *Clostridium sporogenes* à la place d'un *E. faecalis* avec un score

acceptable. Seule une discordance dans l'identification à l'espèce a été observée : identification d'un *Streptococcus alactolyticus* à la place d'un *Streptococcus gallolyticus*.

Concernant les 14 hémocultures polymicrobiennes, une seule espèce était identifiée dans 5 cas (35,7%). L'identification rendue avec le protocole 2 était confirmée et exacte lors de l'identification classique pour l'une des bactéries de ces hémocultures polymicrobiennes. Pour les autres hémocultures (n=9), aucune identification n'a été obtenue avec le protocole 2.

### **2-3 Protocole 3, avec utilisation de centrifugation rapide et de saponine**

Ce protocole a été testé sur un total de 168 hémocultures, dont 163 monomicrobiennes (Annexe 3). La performance du Protocole 3 dans l'identification des hémocultures monomicrobiennes était de 81,6 %, dont 80,4 % d'identification correcte à l'espèce et 1,2 % d'identification correcte au genre (Tableau 16).

**Tableau 16 : Résultats d'identification par le Protocole 3 (n=168)**

		Nombre (%) d'identification correcte (Id)		
		Id à l'espèce	Id au genre	Echec d'id
<b><i>Bacilles à Gram négatif</i></b>	Entérobactéries	45 (95,7)	0	2
	<i>P. aeruginosa</i>	7 (100)	0	0
	Autres BGN	2	0	0
<b><i>Cocci à Gram négatif</i></b>	<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0	0
<b><i>Cocci à Gram positif</i></b>	<i>Staphylococcus</i> sp.	58 (77,3)	2	15
	<i>Streptococcus</i> sp.	8 (44,4)	0	10
	<i>Enterococcus</i> sp.	1	0	0
	Autres CGP	3	0	0
<b><i>Bacilles à Gram positif</i></b>		1	0	1
<b><i>Anaérobies stricts</i></b>		5	0	2
<b><i>Total</i></b>		131 (80,4)	2 (1,2)	30

Les performances de ce protocole pour l'identification rapide directement à partir des flacons d'hémocultures positifs étaient correctes (à l'espèce) pour 95 % des bactéries à Gram négatif et 71 % des bactéries à Gram positif. Les trois espèces majoritairement isolées des hémocultures, *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis* montraient une identification correcte respectivement dans 97 %, 91 % et 64 % des cas.

Aucune discordance dans l'identification bactérienne avec le protocole d'identification de routine n'a été observée.

Concernant les cinq hémocultures polymicrobiennes, aucune identification n'a été obtenue avec le protocole 3.

## **2-4 Protocole 4, avec utilisation de centrifugation rapide et acide formique**

Ce protocole a été testé sur un total de 215 hémocultures, dont 200 monomicrobiennes (Annexe 4). La performance du Protocole 4 dans l'identification des hémocultures monomicrobiennes était de 84 %, dont 83% d'identification correcte à l'espèce et 1% d'identification correcte au genre (Tableau 17).

**Tableau 17 : Résultats d'identification par le Protocole 4 (n=200)**

		Nombre (%) d'identification correcte (Id)		
		Id à l'espèce	Id au genre	Echec d'id
<b><i>Bacilles à Gram négatif</i></b>	Entérobactéries	48 (96)	0	2
	<i>P. aeruginosa</i>	5 (100)	0	0
	Autres BGN	1	0	1
<b><i>Cocci à Gram positif</i></b>	<i>Staphylococcus</i> sp.	83 (83,8)	1	15
	<i>Streptococcus</i> sp.	13 (56,5)	1	9
	<i>Enterococcus</i> sp.	11	0	3
	Autres CGP	4	0	0
<b><i>Bacilles à Gram positif</i></b>		0	0	2
<b><i>Anaérobies stricts</i></b>		1	0	0
<b><i>Total</i></b>		166 (83)	2 (1)	32

Les performances de ce protocole pour l'identification rapide directement à partir des flacons d'hémocultures positifs étaient correctes (à l'espèce) pour 95 % des bactéries à Gram négatif et 78 % des bactéries à Gram positif. Les trois espèces majoritairement isolées des hémocultures, *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis* ont montré une identification correcte dans respectivement 97 %, 96 % et 75 % des cas.

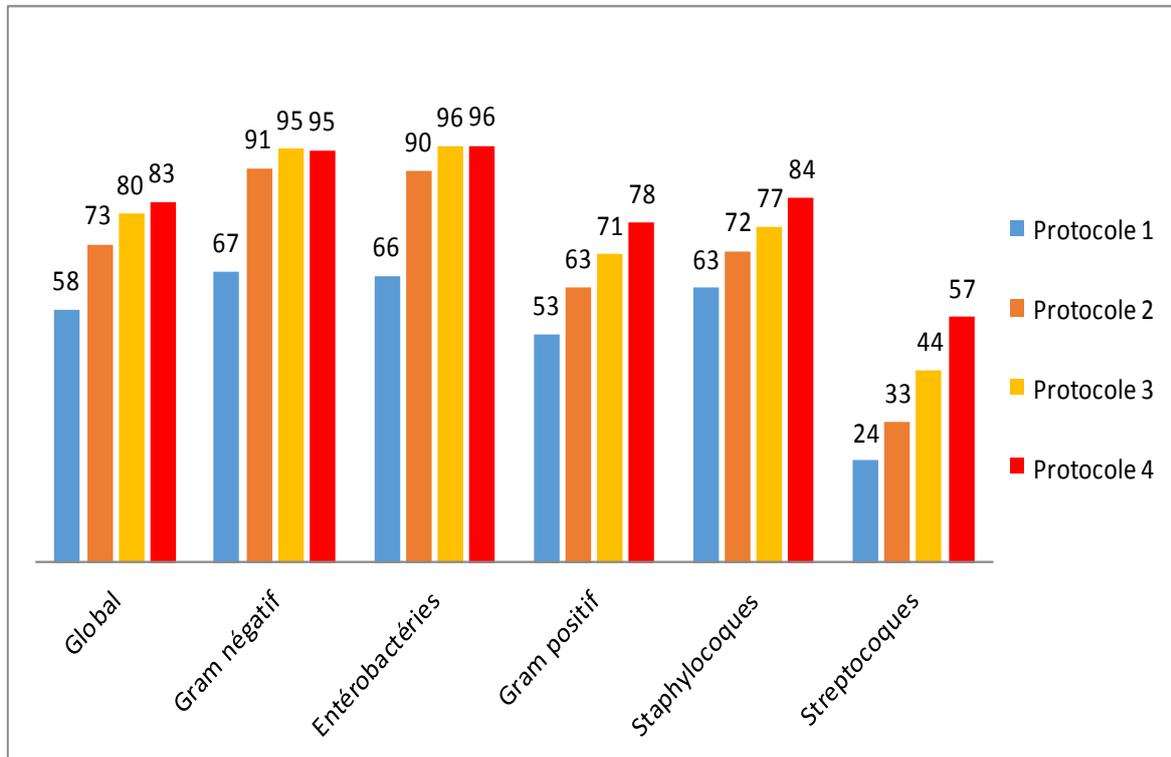
Une seule discordance dans l'identification au genre a été observée, en dehors des espèces improbables précédemment citées : identification d'un *E. cloacae* avec un score acceptable à la place d'une *K. pneumoniae*. Cependant, cette erreur était à relativiser car une seconde hémoculture de ce patient prélevée le même jour est apparue comme polymicrobienne, avec présence des deux bactéries. Seule une discordance dans l'identification à l'espèce avec le

protocole d'identification de routine a été observée : un *S. epidermidis* identifié *S. haemolyticus*.

Concernant les 15 hémocultures polymicrobiennes, une seule espèce était identifiée dans quatre cas (26,7 %). L'identification rendue avec le protocole 4 était confirmée et exacte lors de l'identification classique pour l'une des bactéries de ces hémocultures polymicrobiennes. Pour les autres hémocultures, aucune identification n'a été obtenue avec le protocole 4.

### III- Performance comparative des différents protocoles

La Figure 16 montre les performances dans l'identification bactérienne des quatre protocoles testés.



**Figure 16 : Pourcentage d'identification correcte à l'espèce des différentes catégories bactériennes selon les quatre protocoles**

Les performances présentées dans la Figure 16 ont été analysées par un test exact de Fisher. Cette analyse souligne une infériorité significative des performances globales du Protocole 1 comparé aux trois autres protocoles ( $p < 0,05$ ). Les performances du Protocole 4 apparaissent aussi comme significativement supérieures à celles du Protocole 2 ( $p = 0,01$ ).

Concernant l'identification des bactéries à Gram négatif, le Protocole 1 apparaît comme significativement inférieur aux autres protocoles ( $p < 0,05$ ). Cette infériorité est retrouvée dans l'identification des bactéries à Gram positif. La seule autre différence significative concerne la supériorité du Protocole 4 par rapport au Protocole 2 dans l'identification des bactéries à Gram positif.

Concernant l'identification de la famille des entérobactéries, le Protocole 1 apparaît significativement moins performant que les autres protocoles. Le Protocole 4 apparaît comme significativement supérieur aux Protocoles 1 et 2 dans l'identification des bactéries du genre *Staphylococcus* sp. et *Streptococcus* sp.

#### **IV- Influence des différents paramètres étudiés**

L'impact des quatre paramètres quantitatifs étudiés (délai de positivité des hémocultures, hémocrite et numération leucocytaire du patient au moment du prélèvement, aspect du culot bactérien obtenu) sur l'efficacité des protocoles a été étudié grâce à une analyse des variances (ANOVA).

Cette analyse montre que l'hémocrite et le délai d'incubation n'interviennent pas significativement dans les performances des protocoles d'identification rapide. La numération leucocytaire n'intervient significativement que dans le protocole 2 ( $p=0,048$ ). Cette observation n'est pas retrouvée dans les autres protocoles ( $p>0,05$ ). L'aspect du culot montre un impact très significatif ( $p<0,01$ ) sur les performances d'identification rapide des quatre protocoles.

**Tableau 18 : Caractéristiques des paramètres étudiés selon les divers protocoles et résultats obtenus**

		Délai de positivité (en heures)		Hématocrite		Numération leucocytaire (en G/L)	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
<b>Protocole 1</b>	Id à l'espèce	19h	13h	32,3	6,2	11,1	1,0
	Id au genre	28h	18h	28,6	3,5	7,0	3,4
	Echec d'id	24h	21h	31,9	7,9	9,0	0,9
<b>Protocole 2</b>	Id à l'espèce	19h	15h	32,2	6,9	10,2	8,0
	Id au genre	21h	8h	35,0	8,4	14,7	12,6
	Echec d'id	21h	15h	33,1	7,0	12,8	9,0
<b>Protocole 3</b>	Id à l'espèce	19h	17h	33,1	7,7	10,2	0,8
	Id au genre	20h	5h	27,2	NC*	6,5	1,1
	Echec d'id	20h	12h	33,6	7,3	12,0	1,6
<b>Protocole 4</b>	Id à l'espèce	19h	11h	31,7	5,8	11,8	0,7
	Id au genre	16h	10h	26,8	4,3	3,5	NC*
	Echec d'id	22h	18h	29,7	5,9	10,8	1,7

\*NC : Non calculable

### **V- Durée des différents protocoles**

Le temps entre le prélèvement du bouillon d'hémoculture et l'obtention du culot bactérien varie selon les protocoles. Ainsi, pour une hémoculture manipulée, le temps d'obtention du culot bactérien est :

- Protocole 1 : environ 35 minutes,
- Protocole 2 : environ 15 minutes,
- Protocole 3 : environ 20 minutes,
- Protocole 4 : environ 15 minutes.

## **VI- Coût des protocoles**

L'estimation du coût des protocoles précédemment cités prend en compte les réactifs et matériels utilisés. Il faut noter que ces techniques utilisent des équipements de base d'un laboratoire de Biologie Médicale (centrifugeuses, pipettes). Le coût pour l'identification rapide des bactéries directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif est compris entre 1,50 et 2 euros selon le protocole.

## **PARTIE IV: DISCUSSION**

---

Les bactériémies demeurent aujourd'hui une cause importante de mortalité en France et dans le monde (5–7). Elles représentent un surcoût élevé (8,9). Une détection plus rapide des patients bactériémiques et une identification plus précoce des bactéries en cause par le laboratoire de Biologie Médicale permettraient d'augmenter la pertinence de la prescription antibiotique et de réduire l'impact des bactériémies en termes de mortalité et de surcoût (101,107,108). Récemment, Huang *et al* ont montré qu'une stratégie intégrant des résultats microbiologiques rapides et l'intervention d'une équipe d'infectiologie permettaient de réduire le délai avant administration d'une antibiothérapie efficace et optimale, la mortalité, la durée d'hospitalisation en soins intensifs, ainsi que la fréquence des infections chroniques (173).

En 2015, l'hémoculture reste encore le "gold standard" dans le diagnostic de routine des bactériémies. Cependant, cette méthode est imparfaite en termes de sensibilité et de rapidité dans le rendu de résultat (93–96). Les systèmes de détection automatisés ont permis de réduire le délai nécessaire à la détection des pathogènes. Toutefois, suite à la positivité de l'hémoculture, l'obtention des résultats microbiologiques définitifs exige quelques jours supplémentaires (généralement entre deux et trois jours). En effet, une étape de subculture doit notamment être effectuée. Ce délai demeure souvent trop long aux yeux des cliniciens, qui débutent le plus souvent une antibiothérapie avant l'obtention des résultats définitifs de l'identification et de la sensibilité aux antibiotiques (106).

Des techniques permettant l'obtention d'une identification et d'un antibiogramme plus rapidement ont été développées. Concernant l'antibiogramme, des études ont montré la possibilité d'obtenir, par méthodes phénotypiques, la sensibilité des bactéries aux antibiotiques directement à partir d'un culot bactérien obtenu après pré-traitement de l'hémoculture positive (104,105). Parallèlement, diverses méthodes ont été proposées pour pallier la lenteur d'obtention des résultats d'identification bactérienne. Des techniques d'identification des bactéries directement à partir des hémocultures positives grâce aux automates d'identification phénotypique ont été proposées, mais n'ont montré une réelle efficacité que pour les bactéries à Gram négatif (174). L'apport des techniques de Biologie Moléculaire, basées principalement sur l'hybridation ou la PCR, a aussi été évalué dans l'identification des bactéries directement à partir des hémocultures positives, voire directement à partir du sang du patient en utilisant des techniques basées sur la PCR (113). L'hybridation ne permet, cependant, que la mise en évidence d'un nombre limité de bactéries, en raison du nombre de sondes nécessaires (112,113). L'utilisation de la PCR, bien que

présentant un réel apport en termes de temps lorsqu'elle est utilisée directement sur le sang du patient, reste difficilement applicable en routine (112). De plus, outre un coût élevé, ces technologies complexes peuvent conduire à des faux positifs (contamination de l'échantillon, détection de bactéries non viables) ou de faux négatifs (difficulté technique liée à l'utilisation d'une PCR à partir d'une matrice riche en potentiels inhibiteurs, comme le sang). Par ailleurs, il faut aussi noter que ces techniques de Biologie Moléculaire ne permettent de connaître que le génotype de sensibilité à certains antibiotiques. Elles ne peuvent donc se substituer à un antibiogramme par méthodes phénotypiques classiques avec l'expertise d'un microbiologiste.

En raison de son efficacité, sa simplicité, sa rapidité et son faible coût, la technologie MALDI-TOF MS a révolutionné l'identification bactérienne dans les laboratoires de Bactériologie. Elle a ainsi depuis quelques années pris la place des méthodes phénotypiques d'identification. Diverses études ont proposé l'utilisation de cette technique pour diminuer le temps nécessaire à l'obtention des résultats d'identification bactérienne, dans le cadre des bactériémies. Des protocoles utilisant une identification à partir d'une subculture rapide (avec incubation d'environ quatre heures), efficaces grâce à la grande sensibilité de la technologie MALDI-TOF MS, ont été proposés (175). Récemment, l'identification précoce de micro-organismes directement à partir d'échantillons biologiques par la technologie MALDI-TOF MS a été décrite (176,177). Des protocoles appliquent ainsi la technologie MALDI-TOF MS directement à partir des flacons d'hémocultures positifs, s'affranchissant de l'étape de subculture. Un traitement préalable du bouillon d'hémoculture, consistant à éliminer une partie des éléments pouvant interférer avec l'analyse (protéines, acides nucléiques, débris cellulaires,...) est nécessaire avant l'identification bactérienne à partir de ces flacons (155). Divers protocoles expérimentaux ont été proposés, montrant de bonnes performances, avec un gain de temps conséquent dans le délai de rendu de l'identification bactérienne (160,178). Il faut distinguer les protocoles dits « maison » des protocoles commercialisés. Bruker daltonics<sup>®</sup> a en effet franchi des étapes importantes dans la normalisation de la méthode d'extraction de l'échantillon avec la commercialisation du kit Sepsityper<sup>®</sup>, qui apparaît toutefois plus coûteux et parfois plus fastidieux d'utilisation que certains protocoles « maison » recensés (163). La société bioMérieux<sup>®</sup> qui commercialise le spectromètre VitekMS<sup>®</sup> disponible au C.H.U. de Nantes, n'a commercialisé aucun protocole à cet effet. En revanche, elle préconise l'utilisation d'un protocole comprenant des étapes de filtration et lavage apparaissant complexe, long et mal adapté au traitement de plusieurs hémocultures en routine (169).

Dans ce contexte, le but de notre étude a été d'évaluer l'efficacité de méthodes « maisons » simples et rapides d'identification bactérienne directement à partir des flacons d'hémocultures, compatibles avec le système VitekMS<sup>®</sup>. Pour cela, nous nous sommes inspirés de protocoles publiés montrant de bonnes performances. Le Protocole 1 a été largement inspiré du protocole publié par Prod'Hom *et al* en 2010. Ses performances se sont montrées finalement décevantes, significativement inférieures aux performances précédemment rapportées (61,8 % d'identification au genre ou à l'espèce *vs* 78,7 %). Diverses explications peuvent expliquer cette différence : une plus faible quantité de bouillon utilisé, l'absence d'une étape d'extraction finale, une écologie bactérienne légèrement différente entre les deux études ou des performances supposées inférieures du VitekMS<sup>®</sup> comparé au Bruker Biotyper<sup>®</sup> utilisé dans cette étude (164). Par conséquent, nous avons tenté d'améliorer les performances considérées comme trop faibles de ce protocole, par l'utilisation de centrifugations rapides (Protocole 2), puis par l'utilisation, en plus de la centrifugation rapide, de la saponine, agent lysant les érythrocytes (Protocole 3) ou l'ajout d'acide formique, substance permettant l'extraction des protéines bactériennes (Protocole 4). Les résultats d'identification rapide obtenus à partir des quatre protocoles montrent que le Protocole 4, utilisant centrifugation rapide et acide formique, a la meilleure efficacité. Celui-ci a en effet permis l'identification à l'espèce de 83 % des bactéries testées, performance significativement supérieure aux protocoles 1 (58,5 %) et 2 (73,4 %). Cette supériorité est d'autant plus significative qu'il s'agit du protocole testant le plus de bactéries à Gram positif, dont l'identification à partir des flacons d'hémocultures est considérée comme plus délicate que celle des bactéries à Gram négatif d'après la littérature (155,157,158,162). Notre travail confirme cette observation. L'efficacité dans l'identification des bactéries à Gram négatif est, en effet, supérieure de plus de 10% à celle des bactéries à Gram positif dans tous les protocoles utilisés. Diverses hypothèses peuvent expliquer ce phénomène, notamment une plus faible concentration bactérienne dans le sang, une paroi plus difficile à lyser et/ou des performances moindres de la technologie MALDI-TOF MS dans l'identification des bactéries à Gram positif, notamment des streptocoques, dans ce contexte (146,151,179).

Les protocoles 2, 3 et 4 présentent des performances intéressantes dans l'identification à l'espèce des bactéries à Gram négatif, de l'ordre respectivement de 90,7 %, 95,2 % et 94,8 %. Le protocole 1 apparaît comme significativement inférieur aux autres protocoles dans l'identification à l'espèce de ces bactéries (67,1 % d'identification correcte). Une centrifugation rapide, associée à une diminution du volume de bouillon d'hémoculture utilisé,

permet donc un apport significatif lors de l'identification des bactéries à Gram négatif. De plus, l'ajout de saponine ou d'acide formique permet d'accroître les performances dans l'identification de ces bactéries. Cette conclusion est transposable pour les entérobactéries, famille la plus isolée parmi les bactéries à Gram négatif, et notamment pour l'espèce majoritaire, *E. coli*.

Concernant les bactéries à Gram positif, le protocole 4 se révèle significativement plus performant que les protocoles 1 et 2. La centrifugation rapide et la diminution du volume de bouillon utilisé ont permis d'améliorer les performances d'identification de ces bactéries, médiocres avec le protocole 1 (52,7 % (protocole 1) vs 63,4 % (protocole 2)). L'acide formique est apparu comme plus efficace dans l'amélioration des performances d'identification des bactéries à Gram positif que la saponine, permettant l'identification de 79,6 % de ces bactéries. Les mêmes tendances sont observées pour les deux genres bactériens les plus isolés parmi ces bactéries, *Staphylococcus* sp. et *Streptococcus* sp., de même que pour les deux espèces bactériennes majoritairement isolées, *S. aureus* et *S. epidermidis*. L'ajout d'une étape d'extraction protéique directe par acide formique serait donc le plus pertinent pour l'identification de ces bactéries, dont la paroi semble plus difficile à lyser (155). *S. epidermidis* apparaît comme l'espèce du genre *Staphylococcus* posant le plus de problème d'identification, ses performances d'identification n'atteignant que 75 % d'identification correcte dans le protocole 4. Il faut aussi noter que *S. capitis* a posé d'inattendus problèmes d'identification dans le protocole 3. Le faible nombre d'isolats ou l'utilisation de saponine peuvent être mis en cause. Les performances concernant l'identification des streptocoques, bien qu'optimisées avec l'utilisation d'acide formique, demeurent faibles, avec seulement 56,5 % d'identification à l'espèce correcte. Il faut cependant pondérer ce constat. En effet, les performances dans l'identification dépendent des espèces de *Streptococcus* sp. testées. Par exemple, les deux espèces les plus isolées des hémocultures dans la littérature, *S. pneumoniae* et *S. agalactiae*, sont identifiées inégalement. L'identification de *S. pneumoniae* est ainsi problématique (12,5% d'identification correcte), y compris avec le protocole 4 (aucun des trois cas identifiés). A l'inverse, les isolats de *S. agalactiae*, sont identifiés dans 92,3 % des cas, quel que soit le protocole.

Parmi les 944 hémocultures testées, nous avons observé uniquement une discordance d'identification à l'espèce et/ou au genre dans dix cas (soit 1,1 %). Il existe donc une très grande concordance entre l'identification bactérienne à J<sub>0</sub> et celle obtenue après subculture à J<sub>1</sub>, comme rapporté dans la littérature (155,158,160,164). De manière intéressante, la majorité

de ces discordances (six) étaient retrouvées avec le protocole 1, protocole le moins performant. Trois d'entre elles étaient sans conséquence pour le patient (confusion entre espèces de SCN ou entre espèces de *Enterobacter* sp.). Les trois autres étaient plus problématiques. Un cas de bactériémie à *S. aureus* identifié à *S. intermedius*, aurait pu conduire à une interprétation erronée du résultat (fausse contamination). Il faut noter qu'aucune autre discordance entre SCN et *S. aureus* n'a été retrouvée avec les autres protocoles. La deuxième confusion concernait une erreur d'identification entre *S. suis* et *S. salivarius*, qui aurait pu entraîner une erreur dans la recherche de la porte d'entrée, en raison du caractère pathogène différent de ces deux espèces. Enfin, l'identification d'un *Enterococcus faecalis* à la place d'un *Enterococcus faecium* aurait pu conduire à la mise en place d'un traitement probabiliste inactif (amoxicilline, par exemple). Il faut cependant souligner que dans ces trois derniers cas, l'identification bactérienne étaient associée à un score inférieur à 70 %. Les quatre autres discordances, retrouvées dans les protocoles 2 et 4, ne paraissent pas avoir d'impact sur la prise en charge du patient. Il s'agissait d'une identification, dans le protocole 2, d'un *Clostridium sporogenes* avec un score acceptable alors qu'il s'agissait d'un *E. faecalis*. L'examen direct par coloration de Gram a permis de déceler rapidement cette erreur. Les autres discordances concernaient des espèces bactériennes proches (SCN, streptocoques) et ne conduisaient pas à des erreurs d'interprétation. Il faut noter que les discordances dans l'identification à l'espèce par technologie MALDI-TOF MS entre espèces proches ont déjà été décrites dans la littérature, notamment pour les bactéries du genre *Streptococcus* et, dans un degré moindre, les staphylocoques à coagulase négative, généralement en raison de la grande proximité des spectres de masse de ces bactéries. Le type de protocole utilisé n'était pas incriminé (155,180). Toutefois, l'identification de bactéries improbables (*Mycobacterium kansasii*, *Vibrio fluvialis*, *Listeria grayii*, *Gemella sanguinis*) associée à un score élevé n'a pas été précédemment décrite dans la littérature. Il pourrait s'agir d'un effet du VitekMS<sup>®</sup>. Aucune discordance d'identification entre les résultats des deux dépôts n'a été observée.

Les trois paramètres étudiés dans notre travail (délai d'incubation de l'hémoculture avant positivité, hématocrite et numération globulaire du patient au moment du prélèvement de l'hémoculture) ne semblent pas avoir d'impact significatif sur la qualité des spectres issus des culots bactériens obtenus avec les différents protocoles. En effet, la présence d'une forte concentration d'érythrocytes ou de globules blancs dans le sang du patient n'influence pas l'efficacité des protocoles d'identification rapide à partir des flacons d'hémocultures. Suite à

l'obtention du culot, l'aspect de celui-ci (présence plus ou moins importante de globules rouges voire d'autres composants du sang) a un impact significatif sur l'obtention d'une identification bactérienne. Ce résultat était attendu, puisque les protocoles visent justement à éliminer les composants sanguins, afin d'obtenir le culot bactérien le plus « pur » possible. Il est ainsi possible de discuter de l'ajout d'une étape supplémentaire (lavage ou extraction complète) dans le cas d'un culot bactérien trop hémorragique.

L'identification rapide directement à partir des flacons d'hémoculture a montré tout son intérêt par rapport à l'examen direct dans des cas fréquemment rencontrés. Les trois derniers protocoles, très efficaces dans l'identification des bactéries à Gram négatif, ont, en effet, permis de distinguer efficacement entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*, distinction intéressante lors de la mise en place d'un traitement antibiotique probabiliste (108). La distinction de ces bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram négatif anaérobies strictes, notamment le genre *Bacteroides* sp., potentiellement intéressante en vue de l'optimisation du traitement antibiotique, a montré des performances plus moyennes (66,7 % d'identification correcte). Concernant les bactéries à Gram positif, les souches de *S. aureus* et de SCN ont été relativement bien distinguées dans le Protocole 4 (dans 84 des 99 cas, soit 85 % des cas). Ce résultat apparaît comme particulièrement intéressant pour une interprétation rapide de la souillure/contamination ou non de l'hémoculture positive.

En dehors des SCN, d'autres bactéries, plus rarement isolées mais considérées fréquemment comme contaminantes, ont été détectées dans les divers protocoles. *Micrococcus luteus* a ainsi été identifié efficacement (13 cas sur 14). A l'inverse, les protocoles ont montré de mauvaises performances dans l'identification du genre *Corynebacterium* (une seule identification au genre sur les six isolats). De même, aucune identification des cas isolés de *Bacillus* sp. (Protocole 1 et 2), *Propionibacterium acnes* (Protocole 1) et *Dermabacter hominis* (protocole 4) n'a été rendue. Les performances médiocres d'identification des bacilles à Gram positif (*Propionibacterium acnes*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp.) par technologie MALDI-TOF MS ont déjà été décrites dans la littérature et mises principalement en relation avec l'existence de bases de données trop pauvres pour représenter la diversité des profils de ces bactéries (143,146,148).

D'autres cas recensés dans notre étude ont souligné l'intérêt d'une identification rapide. Des bactéries provoquant des situations cliniques bruyantes ont pu être identifiées : *Listeria monocytogenes* (Protocole 1, 2, 3), *Neisseria meningitidis* (protocoles 1, 2, 3), *Salmonella typhi* (protocole 4). Il faut noter qu'un cas de *Nocardia nova* n'a pas été identifié

avec le protocole 4. Cette bactérie nécessite, en effet, une extraction préalable pour être identifiée par la technologie MALDI-TOS MS, et la base de donnée actuellement utilisée n'est pas optimale pour son identification (181). Par ailleurs, des bactéries dont la culture est potentiellement fastidieuse ont aussi été identifiées : *Haemophilus influenzae* (Protocole 1, 2), *Abiotrophia defectiva* (Protocole 2 et 4) et *Capnocytophaga sputigena* (protocole 2, 3). Deux bactéries présentant potentiellement de nombreuses résistances aux antibiotiques, *Acinetobacter baumannii* (non identifié dans le protocole 4) et *Stenotrophomonas maltophilia* (non identifié dans le protocole 1), n'ont pu être identifiées. Cette remarque est à relativiser par le faible nombre d'isolats testés. Une autre observation intéressante concerne l'identification d'une bactérie (*Streptococcus mitis/oralis*) dans un flacon d'hémoculture détecté positif mais ne montrant pas de bactéries après coloration de Gram, qui a permis d'éviter une nouvelle incubation d'une hémoculture suspectée à tort d'être faussement positive.

Concernant les hémocultures polymicrobiennes, les divers protocoles ont abouti soit à l'identification d'une seule espèce bactérienne (15 cas sur 45), soit à l'absence de résultat. La littérature a rapporté les mêmes conclusions pour les protocoles utilisant le VitekMS<sup>®</sup>, ceux utilisant le Bruker<sup>®</sup> laissant parfois supposer la présence de deux espèces (en cas d'obtention de deux espèces associées à des scores d'identification élevé) (157,162,164,180). Cette observation est potentiellement problématique : une hémoculture pourrait être considérée comme monomicrobienne alors que plusieurs bactéries étaient présentes dans le flacon. Cependant, cette situation ne concerne qu'un nombre très faible de cas (15 des 944, soit 1,6 % des cas), et elle sera mise en évidence dans certains cas par la réalisation en parallèle d'un examen direct, qui ne doit pas être omis.

Le protocole testé le plus performant est le protocole 4, d'une part, en raison de son efficacité dans l'identification bactérienne rapide et, d'autre part, en raison d'un délai d'obtention du culot bactérien relativement court. L'incorporation de ce protocole en routine dans le cadre du diagnostic des bactériémies au C.H.U. de Nantes s'avère rapidement envisageable (Annexe 5). Ce protocole représente un coût marginal, inférieur aux techniques commercialisées. De plus, il faut pondérer ce coût par le gain qu'une identification microbiologique rapide engendre, en termes de durée d'hospitalisation et de prise en charge globale (173). Ainsi, les bactéries à Gram négatif sont très bien identifiées dans ce protocole (94,8 % d'identification correcte). Les performances sont perfectibles pour l'identification des bactéries à Gram positif (80,1 % d'identification correcte) et inférieures à celles d'autres

protocoles « maisons » décrits (157,158,161,163,164). Diverses explications peuvent être avancées. Comparées aux performances des études utilisant Microflex LT Biotyper<sup>®</sup>, il semble que celles du VitekMS<sup>®</sup> pour l'identification des bactéries, notamment à Gram positif, à partir des hémocultures, soient inférieures (164). De plus, l'absence d'une extraction protéique complète pourrait être évoquée. Bien que coûteuse et fastidieuse, celle-ci améliore significativement l'identification à partir des flacons d'hémocultures des bactéries à Gram positif d'après Ferreira *et al* (176). Cette étape permettrait notamment de lyser correctement la paroi de ces bactéries. Néanmoins, Farfour *et al* ont montré que les bacilles à Gram positif, bactéries délicates à identifier avec la technologie MALDI-TOF MS, pouvaient être correctement identifiées sans une étape préalable d'extraction (143). Enfin, l'exhaustivité de la base de données serait également en cause.

De ce fait, les progrès de la technologie MALDI-TOF MS elle-même pourraient permettre d'améliorer les performances d'identification. Outre les problèmes liés à la lyse de la paroi des bactéries à Gram positif, les performances médiocres d'identification de certaines bactéries à Gram positif par technologie MALDI-TOF MS sont en effet liées à l'absence ou à un trop faible nombre de spectre de référence dans la base de données (*P. acnes* par exemple), ou à une trop grande similitude entre les spectres de certaines espèces (*Streptococcus* sp., staphylocoques coagulase négative) (146,151,155). Ainsi, *S. pneumoniae*, dont l'identification s'avère problématique dans les protocoles d'identification rapide utilisant Bruker<sup>®</sup>, ne pouvait pas être différencié des streptocoques du groupe mitis par identification sur colonie avec cet automate. Les récentes possibilités d'identification de cette bactérie à partir des colonies par Bruker<sup>®</sup> peuvent faire envisager une identification rapide de cette bactérie à partir des hémocultures (182). A l'inverse, notre étude montre que, malgré les excellentes capacités du VitekMS<sup>®</sup> dans l'identification de *S. pneumoniae* et sa distinction par rapport aux autres streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques, son identification à partir des hémocultures demeure problématique (183). Pour améliorer les performances d'identification directement à partir des flacons d'hémocultures des bactéries à Gram positif, Buchan *et al* ont aussi proposé la mise en place d'un algorithme spécifique pour identifier les bactéries directement à partir des flacons d'hémocultures (180).

Les limites de ces protocoles imposent l'utilisation en parallèle d'un examen direct et d'une subculture. Cette dernière permettra d'identifier la bactérie en cas d'absence de résultats avec le protocole d'identification rapide. De plus, elle permettra de confirmer le caractère monomicrobien de l'hémoculture, en cas d'obtention de résultats par ce protocole. Enfin, elle

sera nécessaire pour établir le profil de sensibilité de la bactérie. L'existence de tests de détection rapide de phénotype de résistance directement à partir des hémocultures positives (mécicillino-résistance, BLSE, carbapénemases) peut s'avérer, cependant, intéressant en combinaison d'une identification rapide, dans l'objectif de la mise en place d'une antibiothérapie la plus pertinente possible (184,185). D'un point de vue technique, il faut aussi noter la certaine expérience technique que ce protocole demande, notamment lors des étapes de lavage du culot bactérien et de dépôt de celui-ci sur la cible. Des axes d'amélioration de ce protocole peuvent être discutés. L'utilisation d'un tube séparateur, afin d'améliorer la purification du culot bactérien pourrait permettre d'améliorer les performances de celui-ci. Cette méthode n'allongera pas la durée du protocole. De même, l'ajout au protocole d'une extraction complète finale, en cas de culot bactérien « impur », notamment en cas de bactéries à Gram positif à l'examen direct, serait aussi envisageable.

# Conclusion

---

En raison de l'enjeu que représente une prise en charge thérapeutique précoce des patients bactériémiques, l'identification des bactéries à l'origine de bactériémies directement à partir du bouillon d'hémoculture par la technologie MALDI-TOF MS montre tout son intérêt. En effet, cette technique offre une meilleure précision que le Gram dans l'information fournie aux cliniciens à J<sub>0</sub> de positivité. Par conséquent, elle permet d'adapter plus facilement l'antibiothérapie du patient.

Les résultats du travail effectué montrent l'efficacité supérieure du dernier protocole testé utilisant une étape finale rapide d'extraction par acide formique. Sa grande capacité de distinction entre *S. aureus* et staphylocoques coagulase négative, ou encore entre entérobactéries et *P. aeruginosa*, cas fréquemment problématiques à la lecture du Gram, est particulièrement intéressante. Sa rapidité d'exécution (environ 15 minutes), sa grande concordance avec les techniques d'identification de routine et son faible coût peuvent faire rapidement envisager son utilisation en routine, lors du diagnostic des bactériémies au laboratoire.

Cependant, l'intégration de ce protocole ne permettra pas de supprimer l'étape de subculture. Ce protocole montre en effet quelques limites, notamment la détection et l'identification des hémocultures polymicrobiennes, ou l'identification de certaines bactéries d'identification délicate, comme *S. pneumoniae*. La subculture est ainsi nécessaire pour confirmer le caractère monomicrobien de l'hémoculture, et pour effectuer l'antibiogramme. Si des axes d'amélioration du protocole proposé existent, les protocoles décrits dans la littérature retrouvent les mêmes principales limites. Toutefois, les progrès technologiques de la technique MALDI-TOF MS elle-même (base de données, standardisation du dépôt dans un contexte d'automatisation) pourront permettre de pallier ses limites.

# Annexes

---

## **Annexe 1 : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 1**

	Identification			Total
	Identification à l'espèce	Identification au genre	Pas d'identification	
<b>Bacilles à Gram négatif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>47</b>	<b>1</b>	<b>21</b>	<b>69</b>
<i>Escherichia coli</i>	35	0	13	48
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	0	1	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	2	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1 ( <i>E. cancerogenus</i> )	1	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0	1	2
<i>Serratia marcescens</i>	2	0	0	2
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	1	1
<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0	1	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0	0	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	1	1
<b>Cocci à Gram positif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>56</b>	<b>5</b>	<b>41</b>	<b>102</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	1 ( <i>S. haemolyticus</i> )	15	27
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	1 ( <i>S. intermedius</i> )	8	25
<i>Staphylococcus hominis</i>	10	0	0	10
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	1 ( <i>S. hominis</i> )	1	5
<i>Staphylococcus capitis</i>	4	0	1	5
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	1	0	4	5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	3	4
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	0	0	3
<i>Streptococcus salivarius</i>	0	1 ( <i>S. suis</i> )	2	3
<i>Enterococcus faecium</i>	0	1 ( <i>E. faecalis</i> )	2	3
<i>Micrococcus luteus</i>	2	0	1	3
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	2	0	0	2

<i>Enterococcus faecalis</i>	2	0	0	2
<i>Kocuria varians</i>	0	0	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	0	1	1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	0	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0	0	1	1
<b>Bactéries anaérobies strictes</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	0	1	2
<i>Clostridium tertium</i>	1	0	0	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0	0	1	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	1	1
<b>Autres</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	1	2
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	1
<i>Brevibacterium</i> sp.	0	0	1	1
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	0	1	1
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	0	1	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>107</b>	<b>6</b>	<b>70</b>	<b>183</b>

## **Annexe 2 : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 2.**

	Identification			Total
	Identification à l'espèce	Identification au genre	Pas d'identification	
<b>Bacilles à Gram négatif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>108</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>118</b>
<i>Escherichia coli</i>	65	0	6	71
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14	0	0	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	0	2	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	0	1	7
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0	1	5
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	2	0	0	2
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0	2
<i>Serratia marcescens</i>	2	0	0	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0	0	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	1
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0	1
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0	0	1
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0	1
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	1
<b>Cocci à Gram positif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>141</b>	<b>3</b>	<b>73</b>	<b>217</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29	1 ( <i>Staphylococcus</i> sp.)	31	61
<i>Staphylococcus aureus</i>	51	1 ( <i>Staphylococcus</i> sp.)	7	59
<i>Staphylococcus hominis</i>	15	0	1	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0	4	14
<i>Staphylococcus capitis</i>	8	0	1	9
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	1	1 ( <i>S. alactolyticus</i> )	6	8
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	5	0	3	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	0	5	6

<i>Micrococcus luteus</i>	5	0	0	5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0	4	5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3	0	1	4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	0	0	3
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3	0	0	3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	0	2	3
<i>Streptococcus canis</i>	1	0	1	2
<i>Streptococcus mutans</i>	0	0	2	2
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	0	0	2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	0	1	1
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	0	0	1
<i>Kocuria varians</i>	0	0	1	1
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0	0	1	1
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	0	0	1	1
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus groupe G</i>	0	0	1	1
<b>Bactéries anaérobies strictes</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
<i>Bacteroides fragilis</i>	4	0	0	4
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2	0	1	3
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	0	1	2
<i>Clostridium ramosum</i>	0	0	1	1
<b>Autres</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<i>Neisseria meningitidis</i>	2	0	0	2
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	0	2	2
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	1
<i>Brevibacterium</i> sp.	0	0	1	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	0	1 ( <i>Corynebacterium</i> sp.)	0	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>259</b>	<b>4</b>	<b>90</b>	<b>353</b>

### **Annexe 3 : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 3**

	Identification			Total
	Identification à l'espèce	Identification au genre	Pas d'identification	
<b>Bacilles à Gram négatif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>54</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>56</b>
<i>Escherichia coli</i>	33	0	1	34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	0	0	7
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	0	0	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	1	3
<i>Citrobacter freundii</i>	2	0	0	2
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	0	0	1
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	1	0	0	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	1
<i>Hafnia alvei</i>	1	0	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	1
<b>Cocci à Gram positif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>70</b>	<b>2</b>	<b>25</b>	<b>97</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	2 ( <i>Staphylococcus sp.</i> )	1	35
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	0	9	25
<i>Staphylococcus hominis</i>	8	0	0	8
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0	4	5
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4	0	0	4
<i>Micrococcus luteus</i>	3	0	0	3
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	2	0	1	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	3	3

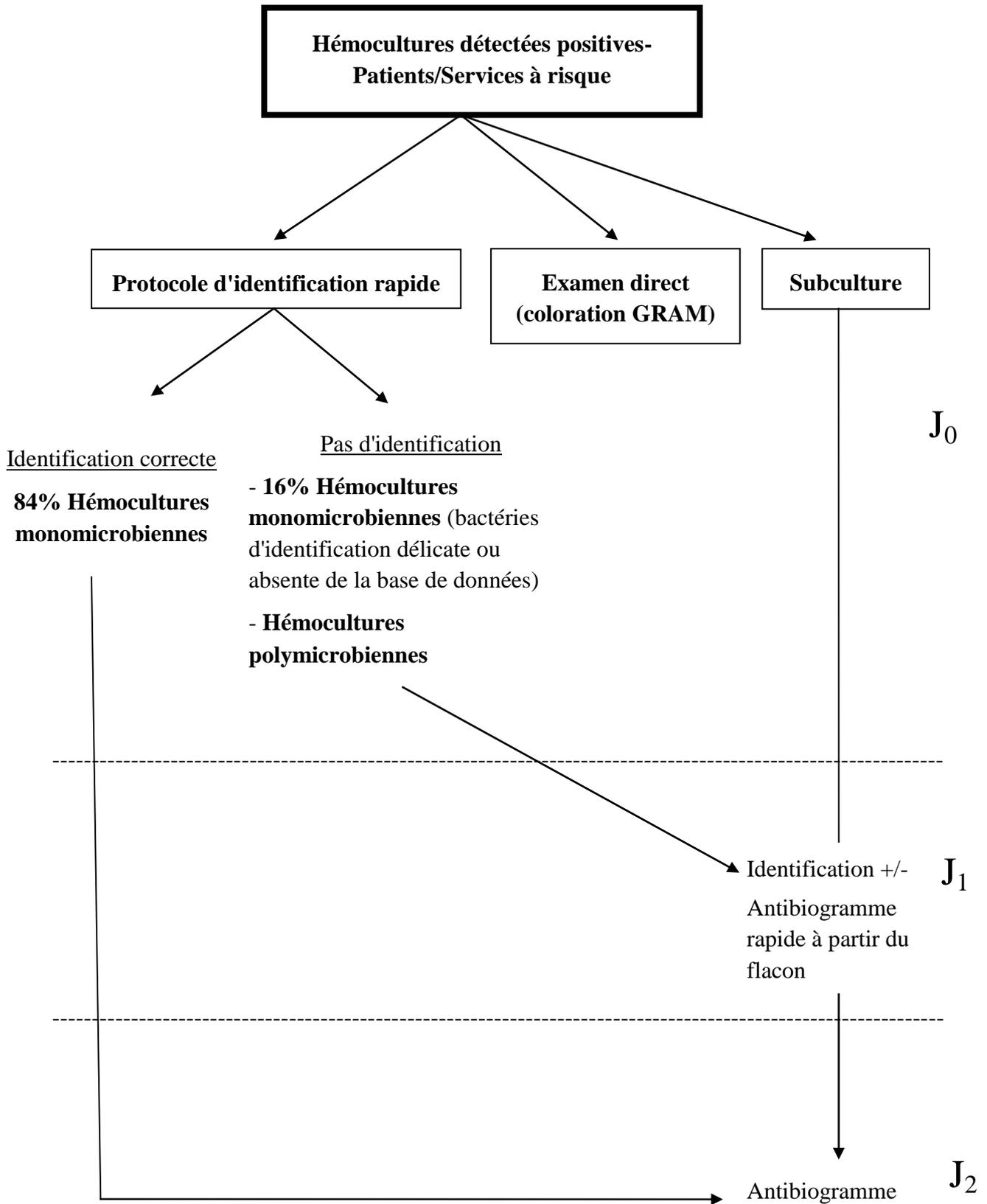
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	0	1	3
<i>Streptococcus mutans</i>	0	0	2	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus canis</i>	0	0	1	1
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0	0	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0	0	1
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	0	0	1	1
<i>Streptococcus groupe G</i>	0	0	1	1
<b>Bactéries anaérobies strictes</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>
<i>Bacteroides fragilis</i>	3	0	0	3
<i>Bacteroides thetaiomicron</i>	2	0	0	2
<i>Bacteroides uniformis</i>	0	0	1	1
<i>Clostridium ramosum</i>	0	0	1	1
<b>Autres</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	0	1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0	0	1
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	0	0	1
<b>TOTAL</b>	<b>131</b>	<b>2</b>	<b>30</b>	<b>163</b>

## **Annexe 4 : Résultats d'identification bactérienne rapide à partir des flacons d'hémoculture monomicrobiens avec le Protocole 4**

	Identification			Total
	Identification à l'espèce	Identification au genre	Pas d'identification	
<b>Bacilles à Gram négatif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>54</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>57</b>
<i>Escherichia coli</i>	31	0	1	32
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	0	1	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0	0	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	0	0	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	0	0	3
<i>Morganella morganii</i>	2	0	0	2
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	0	1	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	1
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	1
<i>Salmonella typhi</i>	1	0	0	1
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>	1	0	0	1
<b>Cocci à Gram positif aérobie/anaérobie facultatifs</b>	<b>111</b>	<b>2</b>	<b>27</b>	<b>140</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	39	1 ( <i>S. haemolyticus</i> )	12	52
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	0	1	27
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	0	3	13
<i>Staphylococcus hominis</i>	11	0	2	13
<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	4	1 ( <i>Streptococcus</i> sp.)	3	8
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5	0	0	5
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2	0	2	4
<i>Micrococcus luteus</i>	3	0	0	3
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	0	0	3

<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3	0	0	3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	3	3
<i>Abiotrophia defectiva</i>	1	0	0	1
<i>Enterococcus faecium</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus canis</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus constellatus</i>	0	0	1	1
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	0	0	1
<b>Bactéries anaérobies strictes</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<i>Bacteroides thetaiomicron</i>	1	0	0	1
<b>Autres</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<i>Dermabacter hominis</i>	0	0	1	1
<i>Nocardia nova</i>	0	0	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>166</b>	<b>2</b>	<b>32</b>	<b>200</b>

**Annexe 5 : Algorithme d'utilisation du protocole d'identification rapide au sein de la stratégie de diagnostic des bactériémies au laboratoire**



# Bibliographie

---

1. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ; ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest J.* 2009;136(5):e28.
2. Vincent JL, Martinez EO, Silva E. Evolving concepts in sepsis definitions. *Crit Care Clin.* oct 2009;25(4):665-75.
3. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ, others. Sepsis definitions: time for change. *Lancet.* 2013;381(9868):774-5.
4. Seifert H. The Clinical Importance of Microbiological Findings in the Diagnosis and Management of Bloodstream Infections. *Clin Infect Dis.* 15 mai 2009;48(s4):S238-45.
5. Bearman GML, Wenzel RP. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res.* déc 2005;36(6):646-59.
6. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 1 janv 2014;5(1):4-11.
7. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med.* 1 avr 2004;30(4):580-8.
8. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay É, de Lassence A, Cohen Y, et al. Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care.* mars 2005;20(1):46-58.
9. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-10.
10. Vallés J, Calbo E, Anoro E, Fontanals D, Xercavins M, Espejo E, et al. Bloodstream infections in adults: Importance of healthcare-associated infections. *J Infect.* janv 2008;56(1):27-34.
11. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-54.
12. Pien BC, Sundaram P, Raouf N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, et al. The Clinical and Prognostic Importance of Positive Blood Cultures in Adults. *Am J Med.* sept 2010;123(9):819-28.
13. Institut de veille sanitaire. Surveillance des bactériemies nosocomiales en France - réseau BN-Raisin. 2004.

14. Société française de microbiologie. Hémoculture. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; 2010 : p.55-63.
15. Haug JB1, Harthug S, Kalager T, Digranes A, Solberg CO. Bloodstream infections at a Norwegian university hospital, 1974-1979 and 1988-1989: changing etiology, clinical features, and outcome. *Clin Infect Dis*. août 1994;19(2):246-56.
16. Bouza E, Sousa D, Rodríguez-Crèixems M, Lechuz JG, Muñoz P. Is the Volume of Blood Cultured Still a Significant Factor in the Diagnosis of Bloodstream Infections? *J Clin Microbiol*. sept 2007;45(9):2765-9.
17. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, Brecher S, Carroll KC, Stamper PD, et al. Timing of Specimen Collection for Blood Cultures from Febrile Patients with Bacteremia. *J Clin Microbiol*. 1 avr 2008;46(4):1381-5.
18. DEFINITIONS PUI. CDC definitions for nosocomial infections, 1988.
19. Yardena S-I, Boaz F, Ruth O-W, Yoav G, Aliza N, David S, et al. Reappraisal of community-acquired bacteremia: a proposal of a new classification for the spectrum of acquisition of bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2002;34(11):1431-9.
20. Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Morel KA, Munson E, Doern GV. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J Clin Microbiol*. août 2003;41(8):3655-60.
21. Porcheret H, Barraud D, Bingen M, Rabenja T, Costa Y, Estève V, et al. Community- and non-community-acquired bacteremia: correlation between empiric antimicrobial therapy and susceptibility of micro-organisms isolated during 2007 in the Ile-de-France microbiologists network. *Pathol Biol (Paris)*. 2010;58(2):e7-14.
22. Bourneton O, Mutel T, Heranney D, Hernandez C, Lavigne T, Waller J, et al. Incidence des bactériémies et fongémies aux hôpitaux universitaires de Strasbourg de 2005 à 2007. *Pathol Biol*. 2010;58(1):29-34.
23. Berche P. Les bactéries des infections humaines. Flammarion medecine-sciences; 1988.
24. Campus de Microbiologie - Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène. Structure et physiologie de la bactérie: Anatomie - Structure [Internet]. [http://umvf.univ-nantes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie\\_4/site/html/6\\_2.html](http://umvf.univ-nantes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_4/site/html/6_2.html)
25. Bidet P, Bonarcorsi S, Bingen E. Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra-intestinaux. *Arch Pédiatrie*. nov 2012;19, Supplement 3:S80-92.
26. Van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(1):32-43.
27. Freney. Précis de bactériologie clinique. ESKA. 2000.
28. Merrell DS, Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature*. 8 juill 2004;430(6996):250-6.

29. Moine P, Abraham E. Immunomodulation and sepsis: impact of the pathogen. *Shock* Augusta Ga. oct 2004;22(4):297-308.
30. O'Brien JM, Ali NA, Aberegg SK, Abraham E. Sepsis. *Am J Med.* déc 2007;120(12):1012-22.
31. Bouglé A, Annane D. Physiopathologie du choc septique. *Antibiotiques.* 2007;9(1):9-19.
32. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E. Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* Augusta Ga. oct 2005;24(4):300-12.
33. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 24 févr 2006;124(4):783-801.
34. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 2002;420(6917):885-91.
35. Doyle SL, O'Neill LAJ. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol.* 30 oct 2006;72(9):1102-13.
36. Sagy M, Al-Qaqaa Y, Kim P. Definitions and Pathophysiology of Sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* nov 2013;43(10):260-3.
37. Morris GE. Cooperative molecular and cellular networks regulate Toll-like receptor-dependent inflammatory responses. *FASEB J.* 1 oct 2006;20(12):2153-5.
38. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* oct 2008;8(10):776-87.
39. Asehnoune K, Roquilly A, Abraham E. Innate Immune Dysfunction in Trauma Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Anesthesiology.* août 2012;117(2):411-6.
40. Lentz SR, Tsiang M, Sadler JE. Regulation of thrombomodulin by tumor necrosis factor-alpha: comparison of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood.* 1 févr 1991;77(3):542-50.
41. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, et al. Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *J Biol Chem.* 30 avr 2004;279(18):18127-36.
42. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 8 juill 2006;368(9530):157-69.
43. Fink MP. Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Crit Care Lond Engl.* déc 2002;6(6):491-9.
44. Kang KW, Choi SY, Cho MK, Lee CH, Kim SG. Thrombin induces nitric-oxide synthase via Galpha12/13-coupled protein kinase C-dependent I-kappaBalpha

phosphorylation and JNK-mediated I-kappaB $\alpha$  degradation. *J Biol Chem.* 9 mai 2003;278(19):17368–78.

45. Landry DW, Levin HR, Gallant EM, Ashton RC, Seo S, D'Alessandro D, et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation.* 4 mars 1997;95(5):1122–5.

46. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med.* 9 août 2001;345(6):408–16.

47. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet.* 29 nov 2003;362(9398):1799–805.

48. Ertel W, Kremer JP, Kenney J, Steckholzer U, Jarrar D, Trentz O, et al. Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood.* 1 mars 1995;85(5):1341–7.

49. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* juill 1999;27(7):1230–51.

50. Mohr A, Polz J, Martin EM, Griessler S, Kammler A, Pötschke C, et al. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. *Eur J Immunol.* févr 2012;42(2):341–52.

51. Prise en charge initiale des états septiques graves de l'adulte et de l'enfant. *Réanimation.* 19 janv 2007;16, Supplement 1:S1–21.

52. Réanimation SF d'Anesthésie et de Réanimation. Antibiothérapie probabiliste des états septiques graves. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation.* Elsevier Masson; 2004. p. 1020–6.

53. The Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric Subgroup\*, Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. *Intensive Care Med.* févr 2013;39(2):165–228.

54. Geissler A, Gerbeaux P, Granier I, Blanc P, Facon K, Durand-Gasselien J. Rational use of antibiotics in the intensive care unit: impact on microbial resistance and costs. *Intensive Care Med.* 2003;29(1):49–54.

55. Morel J, Casotto J, Jospé R, Aubert G, Terrana R, Dumont A, et al. De-escalation as part of a global strategy of empiric antibiotherapy management. A retrospective study in a medico-surgical intensive care unit. *Crit Care.* 2010;14(6):R225.

56. Safdar N, Handelsman J, Maki DG. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* août 2004;4(8):519–27.

57. Bliziotis IA, Samonis G, Vardakas KZ, Chrysanthopoulou S, Falagas ME. Effect of aminoglycoside and beta-lactam combination therapy versus beta-lactam monotherapy on the emergence of antimicrobial resistance: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juill 2005;41(2):149–58.
58. Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med.* nov 1998;244(5):379–86.
59. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest J.* 2000;118(1):146–55.
60. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Med.* nov 2003;115(7):529–35.
61. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* juin 2006;34(6):1589–96.
62. Garnacho-Montero J, Aldabo-Pallas T, Garnacho-Montero C, Cayuela A, Jiménez R, Barroso S, et al. Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Crit Care.* 2006;10(4):R111.
63. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric Antibiotic Treatment Reduces Mortality in Severe Sepsis and Septic Shock From the First Hour: Results From a Guideline-Based Performance Improvement Program\*. *Crit Care Med.* août 2014;42(8):1749–55.
64. Bryant JK, Strand CL. Reliability of blood cultures collected from intravascular catheter versus venipuncture. *Am J Clin Pathol.* juill 1987;88(1):113–6.
65. Norberg A, Christopher NC, Ramundo ML, Bower JR, Berman SA. Contamination rates of blood cultures obtained by dedicated phlebotomy vs intravenous catheter. *JAMA.* 12 févr 2003;289(6):726–9.
66. Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Hoa NTT, Parry CM, et al. Quantitation of Bacteria in Blood of Typhoid Fever Patients and Relationship between Counts and Clinical Features, Transmissibility, and Antibiotic Resistance. *J Clin Microbiol.* juin 1998;36(6):1683–7.
67. Li J, Plorde JJ, Carlson LG. Effects of volume and periodicity on blood cultures. *J Clin Microbiol.* 1994;32(11):2829–31.
68. Tenney JH, Reller LB, Mirrett S, Wang WL, Weinstein MP. Controlled evaluation of the volume of blood cultured in detection of bacteremia and fungemia. *J Clin Microbiol.* avr 1982;15(4):558–61.

69. Cockerill FR, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 juin 2004;38(12):1724–30.
70. Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van den Abeele A-M, et al. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in 5 Belgian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mai 2012;73(1):1–8.
71. Koeck J-L, Trueba F, Chakour M. Les hémocultures en 2001. *Rev Fr Lab.* sept 2001;2001(335):43–7.
72. Lamy B, Roy P, Carret G, Flandrois J-P, Delignette-Muller ML. What is the relevance of obtaining multiple blood samples for culture? A comprehensive model to optimize the strategy for diagnosing bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2002;35(7):842–50.
73. Schifman RB, Strand CL, Braun E, Louis-Charles A, Spark RP, Fried ML. Solitary blood cultures as a quality assurance indicator. *Qual Assur Util Rev Off J Am Coll Util Rev Physicians.* 1991;6(4):132–7.
74. Arendrup M, Jensen IP, Justesen T. Diagnosing bacteremia at a Danish hospital using one early large blood volume for culture. *Scand J Infect Dis.* 1996;28(6):609–14.
75. Riedel S, Bourbeau P, Swartz B, Brecher S, Carroll KC, Stamper PD, et al. Timing of Specimen Collection for Blood Cultures from Febrile Patients with Bacteremia. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2008;46(4):1381–5.
76. Saito T, Inuma Y, Takakura S, Nagao M, Matsushima A, Shirano M, et al. Delayed insertion of blood culture bottles into automated continuously monitoring blood culture systems increases the time from blood sample collection to the detection of microorganisms in bacteremic patients. *J Infect Chemother.* févr 2009;15(1):49–53.
77. Weinstein MP. Current blood culture methods and systems: clinical concepts, technology, and interpretation of results. *Clin Infect Dis.* juill 1996;23(1):40–6.
78. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The Era of Molecular and Other Non-Culture-Based Methods in Diagnosis of Sepsis. *Clin Microbiol Rev.* 1 janv 2010;23(1):235–51.
79. Lombardi DP, Engleberg NC. Anaerobic bacteremia: incidence, patient characteristics, and clinical significance. *Am J Med.* janv 1992;92(1):53–60.
80. Ortiz E, Sande MA. Routine use of anaerobic blood cultures: are they still indicated? *Am J Med.* 15 avr 2000;108(6):445–7.
81. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L, et al. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis.* juin 2000;30(6):870–6.

82. Hecht DW. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*. juin 2006;12(3):115–21.
83. Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*. 1 avr 2007;44(7):895–900.
84. Weinstein MP. Emerging data indicating that extended incubation of blood cultures has little clinical value. *Clin Infect Dis*. 1 déc 2005;41(11):1681–2.
85. Société française de microbiologie. Diagnostic microbiologique d'une endocardite. In : REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; 2010: p.65-69.
86. Reller LB, Weinstein MP, Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* Infection. *Clin Infect Dis*. 1 janv 2003;36(1):64–9.
87. Caldeira D, David C, Sampaio C. Skin antiseptics in venous puncture-site disinfection for prevention of blood culture contamination: systematic review with meta-analysis. *J Hosp Infect*. mars 2011;77(3):223–32.
88. Hall KK, Lyman JA. Updated Review of Blood Culture Contamination. *Clin Microbiol Rev*. 1 oct 2006;19(4):788–802.
89. Roth A, Wiklund AE, Pålsson AS, Melander EZ, Wullt M, Cronqvist J, et al. Reducing Blood Culture Contamination by a Simple Informational Intervention. *J Clin Microbiol*. 12 janv 2010;48(12):4552–8.
90. Timsit J-F. Réactualisation de la douzième conférence de consensus de la Société de réanimation de langue française (SRLF): infections liées aux cathéters veineux centraux en réanimation. *Réanimation*. 2003;12(3):258–65.
91. Akan OA, Yildiz E. Comparison of the effect of delayed entry into 2 different blood culture systems (BACTEC 9240 and BacT/ALERT 3D) on culture positivity. *Diagn Microbiol Infect Dis*. mars 2006;54(3):193–6.
92. Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV. Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges. *J Clin Microbiol*. 1 juill 2003;41(7):3119–25.
93. Moreillon P, Que Y-A. Infective endocarditis. *Lancet*. 10 janv 2004;363(9403):139–49.
94. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents*. nov 2007;30 Suppl 1:S7–15.
95. McKenzie R, Reimer LG. Effect of antimicrobials on blood cultures in endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. nov 1987;8(3):165–72.
96. Grace CJ, Lieberman J, Pierce K, Littenberg B. Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *Clin Infect Dis*. 1 juin 2001;32(11):1651–5.

97. Yagupsky P, Nolte FS. Quantitative aspects of septicemia. *Clin Microbiol Rev.* juill 1990;3(3):269–79.
98. Rello J, Lisboa T, Lujan M, Gallego M, Kee C, Kay I, et al. Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest.* sept 2009;136(3):832–40.
99. Stoneking LR, Patanwala AE, Winkler JP, Fiorello AB, Lee ES, Olson DP, et al. Would Earlier Microbe Identification Alter Antibiotic Therapy in Bacteremic Emergency Department Patients? *J Emerg Med.* janv 2013;44(1):1–8.
100. Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gérard M, Aoun M, Martin C, et al. Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect.* déc 2013;19(12):E568–81.
101. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* juill 1994;32(7):1757–62.
102. Kerremans JJ, van der Bij AK, Goessens W, Verbrugh HA, Vos MC. Immediate Incubation of Blood Cultures Outside Routine Laboratory Hours of Operation Accelerates Antibiotic Switching. *J Clin Microbiol.* 1 nov 2009;47(11):3520–3.
103. Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV. Detection and Treatment of Bloodstream Infection: Laboratory Reporting and Antimicrobial Management. *J Clin Microbiol.* 1 janv 2003;41(1):495–7.
104. Romero-Gómez M-P, Gómez-Gil R, Paño-Pardo JR, Mingorance J. Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. *J Infect.* déc 2012;65(6):513–20.
105. Lupetti A, Barnini S, Castagna B, Capria A-L, Nibbering PH. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* janv 2010;29(1):89–95.
106. Barenfanger J, Graham DR, Kolluri L, Sangwan G, Lawhorn J, Drake CA, et al. Decreased Mortality Associated With Prompt Gram Staining of Blood Cultures. *Am J Clin Pathol.* 1 déc 2008;130(6):870–6.
107. Vlek ALM, Bonten MJM, Boel CHE. Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Improves Appropriateness of Antibiotic Treatment of Bacteremia. Doherty TM, éditeur. *PLoS ONE.* 16 mars 2012;7(3):e32589.
108. Clerc O, Prod'homme G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G. Impact of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on the Clinical Management of Patients With Gram-negative Bacteremia: A Prospective Observational Study. *Clin Infect Dis.* 15 avr 2013;56(8):1101–7.
109. Lindholm L, Sarkkinen H. Direct Identification of Gram-Positive Cocci from Routine Blood Cultures by Using AccuProbe Tests. *J Clin Microbiol.* 1 déc 2004;42(12):5609–13.

110. Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol.* janv 2002;40(1):247–51.
111. Salimnia H, Fairfax MR, Lephart P, Morgan M, Gilbreath JJ, Butler-Wu SM, et al. An International, Prospective, Multi-Center Evaluation of the Combination of the AdvanDx *Staphylococcus* QuickFISH BC with the mecA XpressFISH for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 27 août 2014;
112. Ecker DJ, Sampath R, Li H, Massire C, Matthews HE, Toleno D, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn.* mai 2010;10(4):399–415.
113. Loonen AJM, Wolffs PFG, Bruggeman CA, van den Brule AJC. Developments for improved diagnosis of bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22 mai 2014;
114. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie. FMPMC-PS - Biologie génique [Internet]. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.8.html>
115. Billiald P. PCR : principe et perspectives en biologie clinique. 1995;53(4):155–62.
116. Mathys V, Lefèvre P, Fontaine V, Dehem M, Donnio PY, Février F, et al. La PCR en temps réel: principe et application en infectiologie. *Antibiotiques.* 2007;9(3):205–11.
117. Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Médecine Mal Infect.* août 2013;43(8):322–30.
118. Tang Y-W, Kilic A, Yang Q, McAllister SK, Li H, Miller RS, et al. StaphPlex System for Rapid and Simultaneous Identification of Antibiotic Resistance Determinants and Pantone-Valentine Leukocidin Detection of Staphylococci from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2007;45(6):1867–73.
119. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for Direct Identification of Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 1 juill 2004;42(7):3147–52.
120. Biendo M, Mammeri H, Pluquet E, Guillon H, Rousseau F, Canarelli B, et al. Value of Xpert MRSA/SA blood culture assay on the Gene Xpert® Dx System for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in patients with staphylococcal bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* févr 2013;75(2):139–43.
121. Tissari P, Zumla A, Tarkka E, Mero S, Savolainen L, Vaara M, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *The Lancet.* 2010;375(9710):224–30.
122. Kaleta EJ, Clark AE, Johnson DR, Gamage DC, Wysocki VH, Cherkaoui A, et al. Use of PCR Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Rapid Identification of

Bacterial and Yeast Bloodstream Pathogens from Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* 1 janv 2011;49(1):345–53.

123. Jacob D, Sauer U, Housley R, Washington C, Sannes-Lowery K, Ecker DJ, et al. Rapid and High-Throughput Detection of Highly Pathogenic Bacteria by Ibis PLEX-ID Technology. Lin B, éditeur. *PLoS ONE.* 29 juin 2012;7(6):e39928.

124. Caugant DA, éditeur. *Molecular Genotyping of Microbes by Multilocus PCR and Mass Spectrometry: A New Tool for Hospital Infection Control and Public Health Surveillance* - Springer. Humana Press; 2009.

125. Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents.* déc 2010;36:S6–16.

126. Huttner A, Emonet S, Harbarth S, Renzi G, Kaiser L, Schrenzel J. Polymerase-chain reaction/electrospray ionization-mass spectrometry for the detection of bacteria and fungi in bronchoalveolar lavage fluids: a prospective observational study. *Clin Microbiol Infect.* déc 2014;20(12):O1059–66.

127. Jacovides CL, Kreft R, Adeli B, Hozack B, Ehrlich GD, Parvizi J. Successful identification of pathogens by polymerase chain reaction (PCR)-based electron spray ionization time-of-flight mass spectrometry (ESI-TOF-MS) in culture-negative periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am.* 19 déc 2012;94(24):2247–54.

128. Laffler TG, Cummins LL, McClain CM, Quinn CD, Toro MA, Carolan HE, et al. Enhanced Diagnostic Yields of Bacteremia and Candidemia in Blood Specimens by PCR-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 1 nov 2013;51(11):3535–41.

129. Jordan JA, Butchko AR, Durso MB. Use of pyrosequencing of 16S rRNA fragments to differentiate between bacteria responsible for neonatal sepsis. *J Mol Diagn.* févr 2005;7(1):105–10.

130. Jordan JA, Jones-Laughner J, Durso MB. Utility of pyrosequencing in identifying bacteria directly from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* févr 2009;47(2):368–72.

131. Ohlin A, Bäckman A, Björkqvist M, Mölling P, Jurstrand M, Schollin J. Real-time PCR of the 16S-rRNA gene in the diagnosis of neonatal bacteraemia. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. oct 2008;97(10):1376–80.

132. Queipo-Ortuño MI, Garcia-Ordoñez MA, Colmenero JD, Morata P. Hydrogen peroxide improves the efficiency of a peripheral blood PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *BioTechniques.* août 1999;27(2):248–50, 252.

133. Lucignano B, Ranno S, Liesenfeld O, Pizzorno B, Putignani L, Bernaschi P, et al. Multiplex PCR Allows Rapid and Accurate Diagnosis of Bloodstream Infections in Newborns and Children with Suspected Sepsis. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2011;49(6):2252–8.

134. Burdino E, Ruggiero T, Alice T, Milia MG, Gregori G, Milano R, et al. Combination of conventional blood cultures and the SeptiFast molecular test in patients with suspected

sepsis for the identification of bloodstream pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juill 2014;79(3):287–92.

135. Herne V, Nelovkov A, Kütt M, Ivanova M. Diagnostic performance and therapeutic impact of LightCycler SeptiFast assay in patients with suspected sepsis. *Eur J Microbiol Immunol*. 1 mars 2013;3(1):68–76.

136. Westh H, Lisby G, Breysse F, Bøddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect*. juin 2009;15(6):544–51.

137. Wellinghausen N, Kochem A-J, Disque C, Muhl H, Gebert S, Winter J, et al. Diagnosis of Bacteremia in Whole-Blood Samples by Use of a Commercial Universal 16S rRNA Gene-Based PCR and Sequence Analysis. *J Clin Microbiol*. 1 sept 2009;47(9):2759–65.

138. Grif K, Heller I, Prodingner WM, Lechleitner K, Lass-Florl C, Orth D. Improvement of Detection of Bacterial Pathogens in Normally Sterile Body Sites with a Focus on Orthopedic Samples by Use of a Commercial 16S rRNA Broad-Range PCR and Sequence Analysis. *J Clin Microbiol*. 1 juill 2012;50(7):2250–4.

139. Bloos F, Sachse S, Kortgen A, Pletz MW, Lehmann M, Straube E, et al. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction Assay for Pathogen Detection in Septic Patients under Routine Condition: An Observational Study. *Salluh JIF, éditeur. PLoS ONE*. 27 sept 2012;7(9):e46003.

140. Menet M-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Rev Francoph Lab*. déc 2011;2011(437):41–53.

141. Gravet A, Gessier M. Spectrométrie de masse et microbiologie. *Immuno-Anal Biol Spéc*. oct 2013;28(5–6):297–308.

142. Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathol Biol*. 2014.

143. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol*. août 2012;50(8):2702–7.

144. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol*. avr 2010;48(4):1169–75.

145. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PloS One*. 2011;6(1):e16424.

146. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 août 2009;49(4):543–51.
147. Van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* mars 2010;48(3):900–7.
148. Gravet A, Camdessouens-Miehé G, Gessier M, Peluso A-R, Vogelsperger-Fuchs B, Lohmann C, et al. The use in routine of mass spectrometry in a hospital microbiology laboratory. *Pathol Biol (Paris).* févr 2011;59(1):19–25.
149. Bessède E, Angla-Gre M, Delagarde Y, Sep Hieng S, Ménard A, Mégraud F. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2011;17(4):533–8.
150. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences.* oct 2011;27(10):882–8.
151. Blondiaux N, Gaillot O, Courcol R-J. MALDI-TOF mass spectrometry to identify clinical bacterial isolates: evaluation in a teaching hospital in Lille. *Pathol Biol (Paris).* févr 2010;58(1):55–7.
152. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect.* juill 2011;17(7):1007–12.
153. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Avila M, Cembrero-Fuciños D, Herrero-Hernández A, González-Buitrago JM, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* juin 2010;48(6):2110–5.
154. Nyvang Hartmeyer G, Kvistholm Jensen A, Böcher S, Damkjaer Bartels M, Pedersen M, Engell Clausen M, et al. Mass spectrometry: Pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scand J Infect Dis.* 1 sept 2010;42(9):716–8.
155. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2010;48(4):1481–3.
156. Schmidt V, Jarosch A, März P, Sander C, Vacata V, Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption

ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2012;31(3):311–7.

157. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A-M, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* nov 2010;16(11):1631–8.

158. Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1584–91.

159. Loonen AJM, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PFG, van den Brule AJC. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* juill 2012;31(7):1575–83.

160. Jamal W, Saleem R, Rotimi VO. Rapid identification of pathogens directly from blood culture bottles by Bruker matrix-assisted laser desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry versus routine methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* août 2013;76(4):404–8.

161. Gray TJ, Thomas L, Olma T, Iredell JR, Chen SC-A. Rapid identification of Gram-negative organisms from blood culture bottles using a modified extraction method and MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* oct 2013;77(2):110–2.

162. Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* févr 2010;48(2):444–7.

163. Ferroni A, Suarez S, Beretti J-L, Dauphin B, Bille E, Meyer J, et al. Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1542–8.

164. Chen JHK, Ho P-L, Kwan GSW, She KKK, Siu GKH, Cheng VCC, et al. Direct Bacterial Identification in Positive Blood Cultures by Use of Two Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *J Clin Microbiol.* 1 juin 2013;51(6):1733–9.

165. Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 12 sept 2007;389(5):1633–8.

166. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *J Clin Microbiol.* mars 2012;50(3):927–37.

167. Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pflüger V, Tonolla M, Ravasi D, et al. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF Mass spectrometry. *J Microbiol Methods*. nov 2011;87(2):150–3.
168. Karger A, Ziller M, Bettin B, Mintel B, Schares S, Geue L. Determination of Serotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates by Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2 janv 2011;77(3):896–905.
169. Rand KH, Delano JP. Direct identification of bacteria in positive blood cultures: comparison of two rapid methods, FilmArray and mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. juill 2014;79(3):293–7.
170. Monteiro J, Inoue FM, Lobo APT, Sugawara EK, Boaretti FM, Tufik S. Fast and reliable bacterial identification direct from positive blood culture using a new TFA sample preparation protocol and the Vitek® MS system. *J Microbiol Methods*. févr 2015;109:157–9.
171. Cella ALF. Evaluation de quatre procédures de prétraitement pour l'identification des levures par spectrométrie de masse de type Maldi-Tof (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight). 2014.
172. Joly-Guillou M-L, Eveillard M. Avantages et limites de l'examen direct (ED) en bactériologie. *Rev Francoph Lab*. juill 2011;2011(434):33–8.
173. Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis*. nov 2013;57(9):1237–45.
174. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJHM, Wolfhagen MJHM. Identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol*. janv 2004;42(1):7–11.
175. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*. 3 avr 2014;
176. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, Muñoz-Bellido JL, González-Buitrago JM. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. juill 2011;17(7):1007–12.
177. La Scola B, Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE*. 25 nov 2009;4(11):e8041.

178. Lagace-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, et al. Identification of Blood Culture Isolates Directly from Positive Blood Cultures by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and a Commercial Extraction System: Analysis of Performance, Cost, and Turnaround Time. *J Clin Microbiol.* 1 oct 2012;50(10):3324–8.
179. De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. *J Clin Microbiol.* août 2004;42(8):3734–8.
180. Buchan BW, Riebe KM, Ledebner NA. Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* févr 2012;50(2):346–52.
181. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol.* nov 2010;48(11):4015–21.
182. Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal Streptococci of the *Streptococcus mitis* Group by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* sept 2012;50(9):2863–7.
183. Dubois D, Segonds C, Prere M-F, Marty N, Oswald E. Identification of Clinical *Streptococcus pneumoniae* Isolates among other Alpha and Nonhemolytic Streptococci by Use of the VitekMS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System. *J Clin Microbiol.* juin 2013;51(6):1861–7.
184. Romero-Gómez MP, Quiles-Melero I, Navarro C, Paño-Pardo JR, Gómez-Gil R, Mingorance J. Evaluation of the BinaxNOW PBP2a assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mars 2012;72(3):282–4.
185. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* sept 2012;50(9):3016–22.

**Nom - Prénom : THOMIN Jean**

**Titre de la thèse : Comparaison de quatre protocoles d'identification bactérienne par spectrométrie de masse directement à partir d'hémocultures positives**

---

**Résumé de la thèse :**

Les bactériémies demeurent, aujourd'hui, un problème de Santé publique majeur, en raison de la mortalité et du surcoût qu'elles engendrent. La précocité et la qualité de l'antibiothérapie, particulièrement en cas de sepsis sévère, apparaissent comme primordiales dans ce contexte. L'objectif de notre étude a été d'optimiser la prise en charge des hémocultures au sein du Service de Bactériologie du C.H.U. de Nantes, afin de fournir aux cliniciens des résultats microbiologiques le plus rapidement possible. Dans ce but, nous avons mis au point puis testé quatre protocoles, permettant une identification bactérienne rapide, directement à partir des hémocultures, grâce à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry).

Au cours de l'étude, un total de 944 cultures de sang a été testé. 58,5 %, 73,4 %, 80,4 % et 83 % d'identification correcte à l'espèce bactérienne ont été obtenus, respectivement, avec les protocoles 1, 2, 3 et 4, pour les hémocultures monomicrobiennes. Il est intéressant de noter que 99 % des identifications MALDI-TOF directes obtenues étaient correctes au niveau d'espèce. Parmi les 45 hémocultures polymicrobiennes testées, une identification précise à l'espèce a été obtenue pour une des deux bactéries présentes dans 33,3% des cas (n=15). Les 30 autres hémocultures polymicrobiennes n'ont donné aucun résultat.

Le protocole 4, combinant centrifugation rapide et acide formique, apparaît comme le plus efficace, autant dans les performances d'identification bactérienne que dans la rapidité d'exécution. Sa rapidité d'exécution (environ 15 minutes), sa grande concordance avec les techniques d'identification de routine et son faible coût sont prometteurs dans l'optique d'une utilisation en routine, lors du diagnostic des bactériémies au laboratoire.

---

**MOTS CLÉS : BACTERIEMIE, MALDI-TOF MS, HEMOCULTURE, IDENTIFICATION BACTERIENNE**

---

**JURY**

**PRÉSIDENT : Mme Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie**

**ASSESEURS : M. David Boutoille, Professeur de Maladies infectieuses et Tropicales**

**M. Eric Batard, Professeur de Thérapeutique**

**M. Cédric Bretonnière, Praticien Hospitalier de Réanimation**

**M. Stéphane Corvec, Maître de Conférences de Bactériologie**

**M. Guillaume Aubin, Assistant Hospitalo-Universitaire de Bactériologie**

**Mme F. Le Gallou, Praticien Hospitalier de Bactériologie - Hygiène**

---

**Adresse de l'auteur : 2 bis rue de la Traquette – 49100 Angers**