

Le point de vue du biologiste : Importance des phases Pré- et Post-analytiques



Bon usage des prélèvements microbiologiques.

RésO-InfectiO-PACA-Est

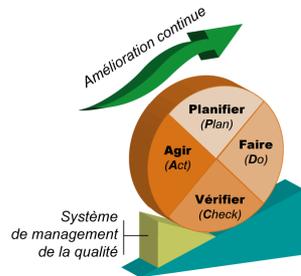
Aurélie SMETS

Le 6 Mai 2015

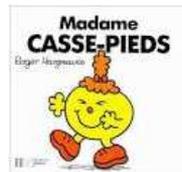
Le contexte réglementaire

- Code de la Santé Publique : Un LBM ne peut plus réaliser d'examen de biologie médicale sans accréditation.
- Accréditation délivrée par le **COFRAC** selon la norme NF EN **ISO 15189**.
- Reconnaissance de la **compétence** du LBM.
- **Audits.**
- Ordonnance du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

Le contexte réglementaire



- Progresser dans la qualité des pratiques microbiologiques!!!
- Valorisation de la biologie médicale!



Les 3 phases d'un examen de microbiologie médicale



- Préanalytique**
- Prélèvement d'un échantillon
 - Recueil des éléments cliniques pertinents
 - Préparation, transport et conservation de l'échantillon jusqu'au laboratoire
 - Conseil



- Postanalytique**
- Validation
 - Interprétation contextuelle du résultat
 - Communication appropriée du résultat au prescripteur dans un délai compatible avec l'état de l'art
 - Conseil

- Analytique**
- Processus technique permettant l'obtention du résultat de l'analyse microbiologique



I- La phase pré-analytique

1- Prescription



- Question clinique : diagnostic? thérapeutique? pronostic? préventif?
- Valeur pré-test : critères cliniques/localisation de l'infection
 ⚠️ ↗spécificité du test microbiologique

Enhancing the etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia in adults using the urinary antigen assay (Binax NOW)

Daniel Genné^{a,*}, Hans H. Siegrist^b, Reto Lienhard^b

- ↗ du taux de diagnostic étiologique des PAC
- Spécificité >95% si test réalisé sur critères radio+clinique +bio de PAC

Pertinence de la prescription des antigènes solubles urinaires pneumocoque et légionelle dans un service d'urgences. Étude rétrospective monocentrique portant sur 131 dossiers

F. Pasquet^a, M. Pavic^a, P. Gomez^a, L. Karkowski^a, P. Gérome^b, P. Debourdeau^a

- 131 AGU réalisés
- 66 imageries pulmonaires en faveur
- 79 PAC
- Prescription raisonnée

2-Recueil des données cliniques et biologiques

2-Recueil des données cliniques

- Nécessité
- Localisation
- Intérêt

Boîte Candida	Boîte PVA	Boîte CCS	Boîte CNA
06230/4 (VF)	Culture aseptique	Culture inférieure au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml. Traitement antibiotique en cours au moment du prélèvement ?	
06230/1a (manu)	Bact Uif < 100 Bact IER > 100	Culture inférieure au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml.	
	Gram Lacto	Culture inférieure au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml. Contamination vaginale probable.	
	Gram: Pas de germe	Culture inférieure au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml.	
	Gram	Cultures stériles. Absence de culture des germes visés.	
	Présence de germe	Examen direct après 48h d'incubation en milieu anaérobie.	
	CO2	Cultures inférieures au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml après 48h d'incubation en milieu aérobie.	
	ATP	Culture > 10 ³	
	< 10 ³	Culture inférieure au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml. A confronter au contexte clinique. Traitement antibiotique en cours au moment du prélèvement ?	
	21073	Cherchez la femme 15. Le second germe = endococci, signaler uniquement - pas d'ATB	Culture microbologique à un seul germe significatif composé des germes suivants: 144 - ATB
	213	Flora polymorphe. Contamination du recueil probable conduisant à un mauvais prélèvement. En cas de syndromes urinaires, ECBU de contrôle à réaliser dans des conditions d'asepsie stricte.	
06-230/4 (VF)	< 10 ³	Culture inférieure au seuil de pathogénéité de 10 ³ UFC/ml. Infection urinaire peu probable.	
06-10/4 (manu)	21073 et 213	Culture microbologique à un seul germe significatif composé des germes suivants: 144 - ATB.	
	213	Discordance cyto-bactérielle. Contamination du recueil probable conduisant à un mauvais prélèvement.	
	213	Flora polymorphe. Contamination du recueil probable conduisant à un mauvais prélèvement.	

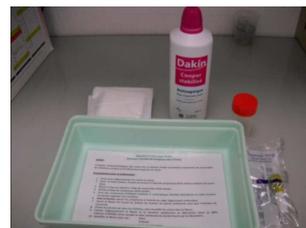
Biologique

Urinaire

3-Prélèvement et acheminement au laboratoire

- Etape clé
- Prélèvement → Ensemencement : Maintien viabilité
- Conditions de réalisation et transport:
 - Personnel habilité
 - Respect des conditions préconisées par le laboratoire
 - Conditions d'asepsie
 - Avant ATB
 - Choix du matériel de prélèvement.
 - Contenant approprié
 - Température de conservation
 - Délais d'ensemencement
- Qualité du prélèvement et transport :
 - Fiabilité du résultat
 - ↗ sensibilité des cultures microbiologiques

Manuel de prélèvement disponible dans les services



3-Prélèvement et acheminement au laboratoire

Risques	Causes
Faux + : prolifération des bactéries présentes au départ dans l'échantillon.	Délais de transport trop long > 2h en l'absence de milieu de transport
Faux - : « viabilité » des bactéries fragiles non maintenue dans le prélèvement.	Température

→ **Prélèvement de pus ou génitaux** : Utilisation de milieux de transport évalués Eswab

- Conception par floccage avec des fibres en nylon : Meilleure élution dans le milieu de transport des bactéries présentes dans l'échantillon.



→ **Recueil des urines** : Utilisation de tubes boratés car la conservation au frigo pas toujours possible.



Exemple 1 : Impact de l'utilisation de différents écouvillons sur les résultats de culture microbiologique:

- écouvillons avec milieu de transport liquide Eswab Copan,
- écouvillons avec milieu de transport gélosé.

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, May 2008, p. 1655-1658
 0095-1137/08/5008-00+0 doi:10.1128/JCM.02047-07
 Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 46, No. 5

Comparison of the Copan ESwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability⁷

Kenneth G. Van Horn,* Carol D. Audette, Denise Sebeck, and Kelly A. Tucker†
 Focus Diagnostics, Cypress, California




TABLE 1. Recovery of aerobic microorganisms from three swab systems stored at room temperature

Organism	Swab system	No. (%) of CFU recovered at:			
		0 h	6 h	24 h	48 h
<i>H. influenzae</i>	MaxV	1.3 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁸ (108)	8.2 × 10 ⁷ (63)	1.7 × 10 ⁷ (130)
	ESwab	7.0 × 10 ⁷	9.2 × 10 ⁷ (131)	2.3 × 10 ⁷ (329)	3.0 × 10 ⁷ (429)
	RBS	1.8 × 10 ⁷	7.1 × 10 ⁷ (26)	1.1 × 10 ⁷ (1006)	No growth
<i>S. pneumoniae</i>	MaxV	8.0 × 10 ⁷ (290)	1.5 × 10 ⁸ (1407)	8.0 × 10 ⁷ (1290)	1.0 × 10 ⁷ (16,130)
	ESwab	3.4 × 10 ⁷ (253)	3.4 × 10 ⁷ (253)	3.7 × 10 ⁷ (25)	3.7 × 10 ⁷ (25)
	RBS	3.7 × 10 ⁷ (112)	8.1 × 10 ⁷ (1258)	3.7 × 10 ⁷ (112)	7.1 × 10 ⁷ (215)
<i>P. aeruginosa</i>	MaxV	5.2 × 10 ⁷ (>10 ⁸)	3.6 × 10 ⁷ (>10 ⁸)	1.7 × 10 ⁷ (>10 ⁸)	1.7 × 10 ⁷ (>10 ⁸)
	ESwab	2.7 × 10 ⁷ (28,370)	1.7 × 10 ⁷ (>10 ⁸)	1.7 × 10 ⁷ (>10 ⁸)	1.7 × 10 ⁷ (>10 ⁸)
	RBS	1.7 × 10 ⁷ (>10 ⁸)	1.9 × 10 ⁷ (27,616)	No growth	No growth
<i>N. gonorrhoeae</i>	MaxV	No growth	No growth	No growth	No growth
	ESwab	No growth	No growth	No growth	No growth
	RBS	No growth	No growth	No growth	No growth

Pyo : PROLIFERATION après 24 et 48h!!!
Après 48h : gono non retrouvé!

TABLE 3. Recovery of anaerobic microorganisms from three swab systems stored at room temperature

Organism	Swab system	No. (%) of CFU recovered at:			
		0 h	6 h	24 h	48 h
<i>P. anaerobius</i>	MaxV	1.6 × 10 ⁷	6.6 × 10 ⁶ (54)	1.2 × 10 ⁶ (9)	1.1 × 10 ⁶ (67)
	ESwab	1.6 × 10 ⁷	6.6 × 10 ⁶ (54)	1.2 × 10 ⁶ (9)	1.1 × 10 ⁶ (67)
	RBS	1.6 × 10 ⁷	6.6 × 10 ⁶ (54)	1.2 × 10 ⁶ (9)	1.1 × 10 ⁶ (67)
<i>B. fragilis</i>	MaxV	4.2 × 10 ⁶	4.4 × 10 ⁶ (102)	3.9 × 10 ⁶ (91)	2.9 × 10 ⁶ (67)
	ESwab	2.8 × 10 ⁶	1.6 × 10 ⁶ (57)	6.5 × 10 ⁵ (230)	1.8 × 10 ⁵ (64)
	RBS	8.4 × 10 ⁵	7.6 × 10 ⁵ (91)	5.8 × 10 ⁵ (69)	3.2 × 10 ⁵ (38)
<i>F. nucleatum</i>	MaxV	1.9 × 10 ⁶	4.2 × 10 ⁶ (247)	2.7 × 10 ⁶ (14)	3.8 × 10 ⁵ (2)
	ESwab	1.5 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶ (80)	3.7 × 10 ⁵ (25)	6.0 × 10 ⁵ (62)
	RBS	6.0 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁵ (42)	2.4 × 10 ⁵ (4)	9.0 × 10 ⁴ (6)
<i>P. acetii</i>	MaxV	2.8 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶ (22)	6.8 × 10 ⁵ (96)	5.6 × 10 ⁵ (112)
	ESwab	7.0 × 10 ⁵	8.9 × 10 ⁵ (127)	8.3 × 10 ⁵ (119)	1.4 × 10 ⁵ (200)
	RBS	1.6 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶ (69)	No growth	No growth
<i>P. melanogenica</i>	MaxV	6.6 × 10 ⁵	1.0 × 10 ⁶ (152)	No growth	No growth
	ESwab	2.5 × 10 ⁶	2.1 × 10 ⁶ (84)	No growth	No growth
	RBS	1.5 × 10 ⁶	6.2 × 10 ⁵ (41)	No growth	No growth

TABLE 2. Recovery of aerobic microorganisms from three swab systems stored at refrigerated temperature

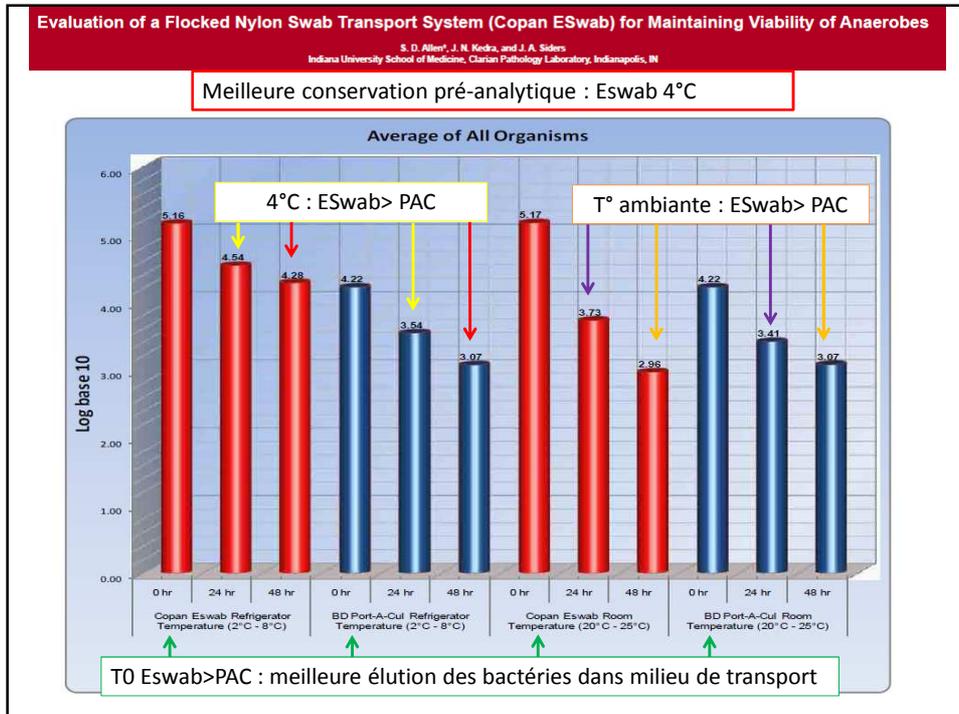
Organism	Swab system	No. (%) of CFU recovered at:			
		0 h	6 h	24 h	48 h
<i>H. influenzae</i>	MaxV	3.7 × 10 ⁷	4.6 × 10 ⁷ (126)	6.0 × 10 ⁷ (161)	7.2 × 10 ⁷ (191)
	ESwab	4.0 × 10 ⁷	3.4 × 10 ⁷ (85)	1.7 × 10 ⁷ (43)	1.3 × 10 ⁷ (33)
	RBS	1.6 × 10 ⁷	8.0 × 10 ⁶ (50)	3.2 × 10 ⁶ (20)	1.4 × 10 ⁶ (9)
<i>S. pneumoniae</i>	MaxV	2.1 × 10 ⁸	2.9 × 10 ⁸ (94)	4.8 × 10 ⁸ (125)	3.2 × 10 ⁸ (103)
	ESwab	6.1 × 10 ⁷	6.0 × 10 ⁷ (98)	4.7 × 10 ⁷ (77)	4.9 × 10 ⁷ (80)
	RBS	6.4 × 10 ⁷	2.8 × 10 ⁷ (41)	9.1 × 10 ⁷ (142)	5.9 × 10 ⁷ (90)
<i>P. aeruginosa</i>	MaxV	1.6 × 10 ⁸ (114)	1.6 × 10 ⁸ (114)	1.6 × 10 ⁸ (114)	1.6 × 10 ⁸ (114)
	ESwab	4.3 × 10 ⁷ (52)	4.3 × 10 ⁷ (52)	4.3 × 10 ⁷ (52)	4.3 × 10 ⁷ (52)
	RBS	1.3 × 10 ⁷ (50)	1.3 × 10 ⁷ (50)	1.3 × 10 ⁷ (50)	1.3 × 10 ⁷ (50)
<i>N. gonorrhoeae</i>	MaxV	7.8 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁷ (126)	9.3 × 10 ⁶ (119)	2.8 × 10 ⁶ (33)
	ESwab	4.2 × 10 ⁶	5.0 × 10 ⁶ (12)	3.8 × 10 ⁶ (9)	2.9 × 10 ⁶ (7)
	RBS	1.3 × 10 ⁷	4.9 × 10 ⁶ (36)	4.2 × 10 ⁶ (32)	1.6 × 10 ⁶ (12)

Pyo : Pas de prolifération!

TABLE 4. Recovery of anaerobic microorganisms from three swab systems stored at refrigerated temperature

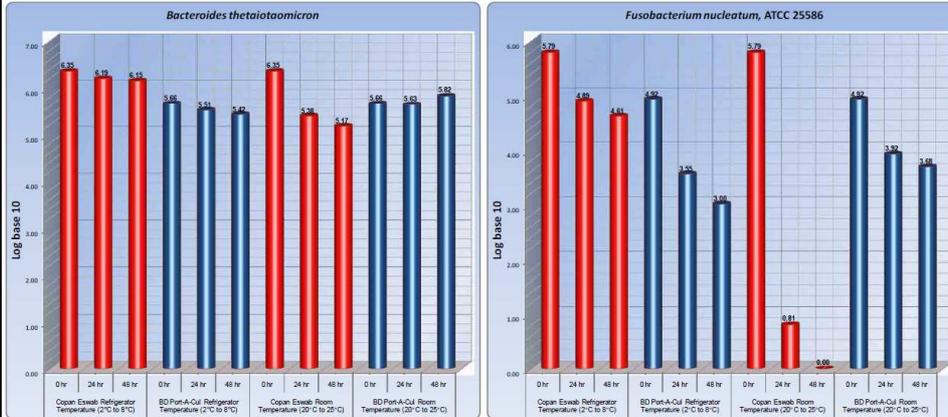
Organism	Swab system	No. (%) of CFU recovered at:			
		0 h	6 h	24 h	48 h
<i>P. anaerobius</i>	MaxV	3.8 × 10 ⁷	3.1 × 10 ⁷ (82)	2.9 × 10 ⁷ (76)	1.2 × 10 ⁷ (32)
	ESwab	2.9 × 10 ⁷	2.6 × 10 ⁷ (68)	6.2 × 10 ⁶ (17)	8.1 × 10 ⁶ (22)
	RBS	2.9 × 10 ⁷	4.0 × 10 ⁷ (101)	2.5 × 10 ⁷ (61)	No growth
<i>B. fragilis</i>	MaxV	3.4 × 10 ⁶	4.2 × 10 ⁶ (124)	1.8 × 10 ⁶ (53)	1.3 × 10 ⁶ (38)
	ESwab	1.2 × 10 ⁶	9.0 × 10 ⁵ (75)	1.0 × 10 ⁶ (83)	5.5 × 10 ⁵ (46)
	RBS	3.2 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁶ (113)	4.8 × 10 ⁶ (150)	7.8 × 10 ⁵ (24)
<i>F. nucleatum</i>	MaxV	3.0 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁶ (75)	3.3 × 10 ⁶ (111)	1.0 × 10 ⁶ (3)
	ESwab	9.3 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁶ (129)	1.8 × 10 ⁶ (19)	7.5 × 10 ⁵ (8)
	RBS	5.7 × 10 ⁵	7.3 × 10 ⁵ (125)	2.9 × 10 ⁵ (51)	1.2 × 10 ⁵ (21)
<i>P. acetii</i>	MaxV	7.3 × 10 ⁶	5.0 × 10 ⁶ (68)	6.5 × 10 ⁶ (89)	4.9 × 10 ⁶ (67)
	ESwab	2.0 × 10 ⁶	2.5 × 10 ⁶ (115)	1.8 × 10 ⁶ (80)	1.4 × 10 ⁶ (70)
	RBS	1.0 × 10 ⁶	5.0 × 10 ⁵ (20)	6.5 × 10 ⁵ (62)	4.5 × 10 ⁵ (43)
<i>P. melanogenica</i>	MaxV	6.4 × 10 ⁵	1.2 × 10 ⁶ (188)	1.0 × 10 ⁶ (28)	1.0 × 10 ⁶ (2)
	ESwab	5.9 × 10 ⁵	3.6 × 10 ⁵ (61)	1.1 × 10 ⁶ (19)	1.3 × 10 ⁵ (2)
	RBS	1.7 × 10 ⁶	5.2 × 10 ⁵ (31)	3.7 × 10 ⁵ (2)	1.3 × 10 ⁵ (0)

T0 : Nombre de colonies > avec Eswab : meilleure élution des bactéries.
 Meilleure performance à 4°C (viabilité des bactéries fragiles et absence de prolifération).
 ⚠ Anaérobies fragiles au-delà de 6h à T° ambiante.



Evaluation of a Flocked Nylon Swab Transport System (Copan ESwab) for Maintaining Viability of Anaerobes

S. D. Allen¹, J. N. Kedra, and J. A. Siders
Indiana University School of Medicine, Clarian Pathology Laboratory, Indianapolis, IN



**Perte des Anaérobies fragiles à Température ambiante dans Eswab.
Mettre les écouvillons au frigo en cas de PEC différée.
Organisation des transports de prélèvements au laboratoire efficace.
Prise en charge rapide des prélèvements profonds au laboratoire.**

Exemple 2 : Impact de la conservation des urines sur les résultats de culture des ECBU:

- Urines sans conservateur, réfrigérées,
- Urines sans conservateur, température ambiante,
 - Urines sur tubes boratés BD.

Evaluation of the BD Vacutainer Plus Urine C&S Preservative Tubes Compared With Nonpreservative Urine Samples Stored at 4°C and Room Temperature

Stephen W. Eisinger, MS,¹ Matthew Schwartz, M(ASCP),² Lisa Dam, MT(ASCP),² and Stefan Riedel, MD, PhD^{1,2}

- 110 urines
- Ensemencement immédiat
- 3 types de conservation :
 - température ambiante, sans conservateur
 - 4°C, sans conservateur
 - température ambiante, tube boraté
- Ensemencement à 2h, 4h, 24h, 48h.
- Résultats de cultures quantitatives

Evaluation of the BD Vacutainer Plus Urine C&S Preservative Tubes Compared With Nonpreservative Urine Samples Stored at 4°C and Room Temperature

Stephen W. Eisinger, MS,¹ Matthew Schwartz, M(ASCP),² Lisa Dam, MT(ASCP),² and Stefan Riedel, MD, PhD^{1,2}

Categorical Changes of Quantitative Urine Cultures From Reference Culture (T_0) Over 48 Hours^a

Categorical Interpretation (Culture Result)	Initial Culture (Reference) ^b [T_0]	No. of Urine Cultures											
		Température ambiante				Réfrigération				Tube boraté BD			
		T_1 (2 h)	T_2 (4 h)	T_3 (24 h)	T_4 (48 h)	T_1 (2 h)	T_2 (4 h)	T_3 (24 h)	T_4 (48 h)	T_1 (2 h)	T_2 (4 h)	T_3 (24 h)	T_4 (48 h)
Negative	18	23	22	14	10	24	23	24	20	22	25	25	19
MSF (<10 ⁴ CFU/mL)	10	9	9	5	3	9	11	12	12	15	10	8	15
MSF (10 ⁴ -10 ⁵ CFU/mL)	14	13	10	1	3	15	16	9	10	9	15	11	7
MSF (>10 ⁵ CFU/mL)	8	8	8	11	1	6	8	7	7	7	6	7	6
Pathogen (<10 ⁴ CFU/mL)	15	11	10	5	3	13	10	11	17	13	11	14	14
Pathogen (10 ⁴ -10 ⁵ CFU/mL)	10	10	10	4	2	9	6	12	7	10	10	9	9
Pathogen (>10 ⁵ CFU/mL)	35	36	41	70	76	34	36	35	37	34	33	36	40

Changes of Clinical Significance of Quantitative Urine Cultures From Reference Culture (T_0) Over 48 Hours^a

Clinical Interpretation (Culture Result)	Initial Culture (Reference) ^b [T_0]	No. of Urine Cultures											
		Température ambiante				Réfrigération				Tube boraté BD			
		RT-NPU ^c				R-NPU ^b				BDU ^d			
		T_1 (2 h)	T_2 (4h)	T_3 (24 h)	T_4 (48 h)	T_1 (2 h)	T_2 (4h)	T_3 (24 h)	T_4 (48 h)	T_1 (2 h)	T_2 (4h)	T_3 (24 h)	T_4 (48 h)
Significant	45	46	51	76	80	43	43	47	44	45	43	45	49
Insignificant	65	64	59	34	30	67	67	63	66	65	67	65	61
P	NA	NS	NS	<.001	<.001	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

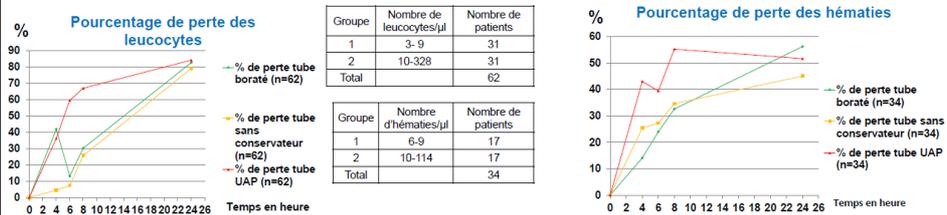
- La conservation à température ambiante d'une urine sans conservateur permet la prolifération des germes présents :
 - Modification des résultats de culture.
 - Identifications et antibiogrammes réalisés à tort.
 - Erreurs de diagnostic : prescription d'ATB.
- Si la réfrigération n'est pas possible, utilisation de tube boraté nécessaire.

Exemple 3 : Impact de la conservation des urines sur la Cytologie urinaire :

- tube sans conservateur,
 - tube boraté,
 - tube UAP.

Quel tube de prélèvement pour l'analyse cytologique des urines : avec ou sans conservateur ?

F. Canis¹, C. Parent¹, N. Chatelain², G. Dewulf¹, C. Cattoen¹, A.J. Belle-Soppo³, L. Vrigneaud⁴

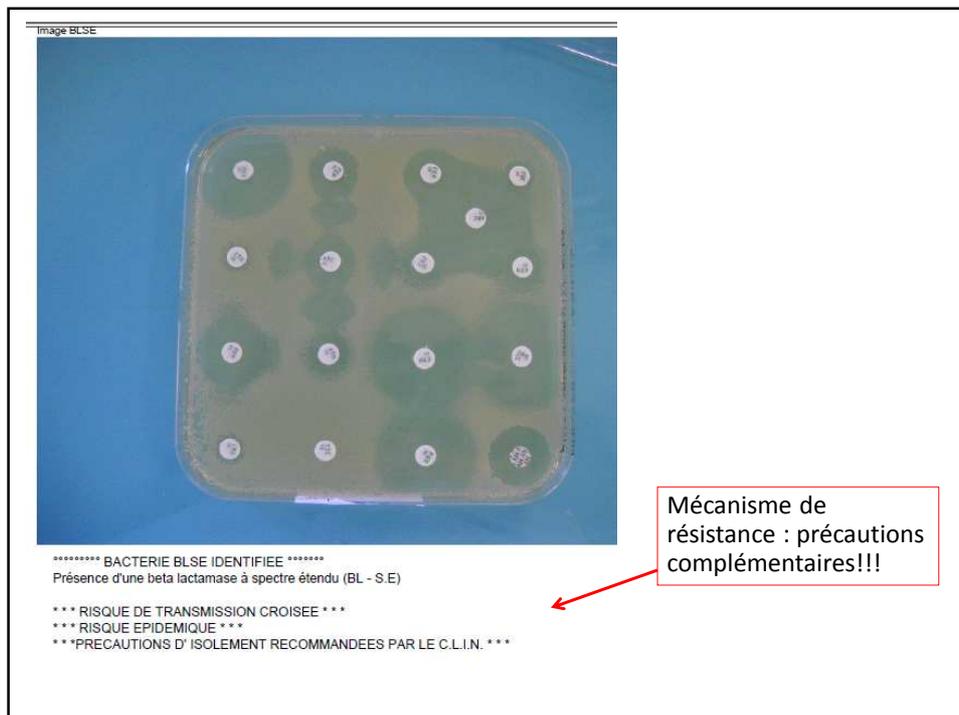


- **Dégradation de 30% leucocytes et hématies 8h après le prélèvement** sans conservateur ou acide borique
- Délais de prise en charge à considérer dans l'interprétation d'un ECBU surtout autour des seuils décisionnels
- Cytologie urinaire = analyse à réaliser rapidement

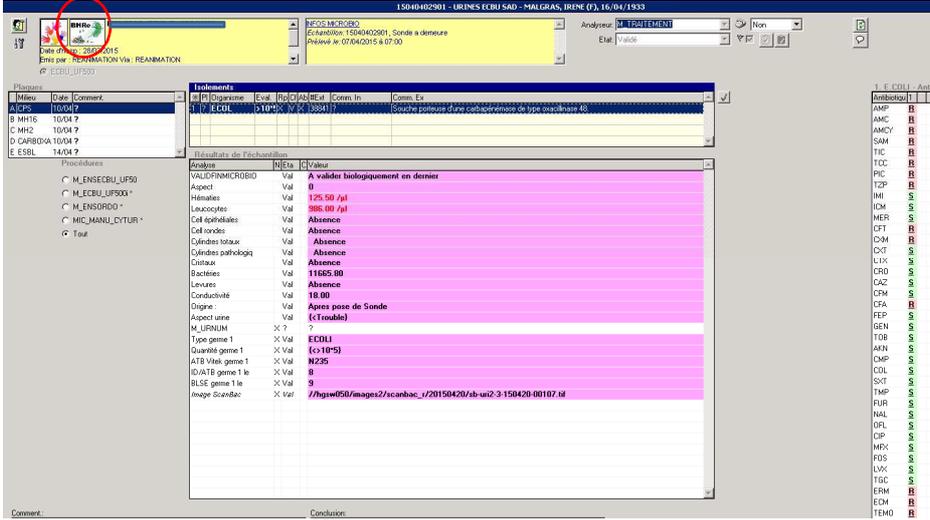
II- La phase post-analytique

1-Validation biologique et Interprétation

- Cohérence du dossier microbio :
Gram/Cytologie/culture/ATCD/ plusieurs dossiers microbio/renseignements cliniques?
- Interprétation obligatoire → Compte-rendu!



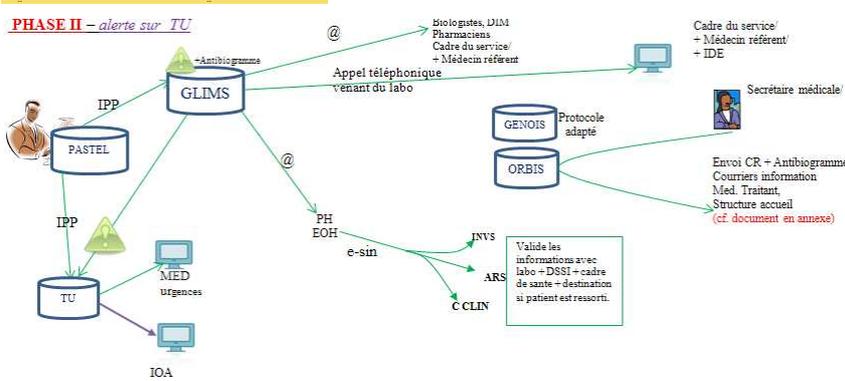
Attribut BHRé : durée illimitée.
 Marquage du patient
 Information du service si patient hospitalisé de nouveau.

The screenshot shows a patient record for 'NEOS MICRORBO' (Echantillon 'S04M0001', Source à domicile, Prélèvement 07/04/2015 à 07:00). The 'Résultats de Pischonchilum' table lists various analyses with their values:

Analyse	Unité	Valeur
Aspect	Val	A validé biologiquement en dernier
Hématies	Val	125.50 /µl
Leucocytes	Val	985.00 /µl
Cell. érythrocytaires	Val	Absence
Cell. rondes	Val	Absence
Cylindres totaux	Val	Absence
Cylindres pathologiques	Val	Absence
Distaux	Val	Absence
Bactéries	Val	11685.00
Levures	Val	Absence
Conductivité	Val	18.00
Origine	Val	Après pose de Sonde
Aspect sane	Val	{(Trousble)}
M_LURNUM	X ?	?
Type game 1	X Val	ECOLI
Quantié game 1	X Val	{(105)}
ATB Vitek game 1	X Val	N235
Q/ATB game 1 le	X Val	8
BLSC game 1 le	X Val	3
Image ScanBac	X Val	//hgw050/images2/scanbac_/20150420/lab-ur2-3-150420-00107.tif

Circuit des alertes



PHASE II - alerte sur TU

The flowchart illustrates the alert circuit starting from GLIMS (Antibiogramme). It branches into several paths:

- IPP (Infectiologie Préventive) / PASTEL / TU (Tuberculose) / MED Urgences / IOA (Infectiologie Opérationnelle):** These are connected to GLIMS via IPP.
- Appel téléphonique venant du labo:** GLIMS sends alerts to Biologistes, DIM, Pharmaciens, and Médecin référent.
- PH EOH (Pharmacie Hospitalière - Eau, Oxygène, Hygiène):** Connected to GLIMS via @.
- GENOIS / ORBIS (Protocoles adaptés):** Connected to GLIMS via @.
- ARS (Agence Régionale de Santé) / C CLIN:** Connected to PH EOH via e-sin.
- Secrétaire médicale:** Connected to GENOIS / ORBIS.
- Envoi CR + Antibiogramme, Courriers information Med. Traitant, Structure accueil:** Connected to GENOIS / ORBIS.
- Cadre du service + Médecin référent + IDE:** Connected to the top right of the diagram.

Conclusion

- 70% des mauvais résultats sont dus à des erreurs pré-analytiques.
- Efforts sur le post-analytique.

Merci pour votre attention !