CHU Sainte-Justine
Le centre hospitalier universitaire mère-enfant
Pour l'amour des enfants
Université de Montréal

Unité de biologie médicale
Département de microbiologie et immunologie
3175, chemin Côte-Sainte-Catherine
Montréal (Québec) H3T 1C5
Téléphone : 514 345-4642
Télécopieur : 514 345-4860

MANUEL DE PROCÉDURES DE LABORATOIRE	**PRCD-BACT-0701-01**
Prélèvements hémocultures	Approuvé

Préparé par :	Céline Laferrière, M.D. Fabien Rallu, Ph. D. Maude Saint-Jean, M.D.	Date : 2007-10-19
Vérifié par :	Cybèle Bergeron, M.D. Johanne Ethier, coordonnatrice Carole Scrivo, coordonnatrice Chantal Lavallée, coordonnatrice Annie Canuel, infirmière	
Approuvé par :	Céline Laferrière, M.D.	
Date d'entrée en vigueur :	2007-11-27	
Nombre de page :	Treize	
Localisation des copies :	Deux copies disponibles : · une au cahier laissé au laboratoire (pièce 2955); · une au cahier bureau chef de département (pièce 2944).	

HISTORIQUE DE LA PROCÉDURE :

Date de la dernière révision : Par :

Ce document remplace les documents suivants : N/A

Nom	Nature de la modification	Date d'archivage	Lieu d'archivage

1. Objectif

- Au CHU Sainte-Justine, les hémocultures prélevées des patients sont incubées dans l'appareil VersaTREK dès leur arrivée au laboratoire. Cet appareil est conçu pour détecter les hémocultures positives en continu avec l'avantage de les rapporter aux cliniciens dès que trouvées positives.
- La détection des cultures positives est basée sur la mesure des changements de pression dans la bouteille (dus à la consommation et la production de gaz par les microorganismes).
- Les cultures détectées positives sont signalées par une alarme sonore, un voyant lumineux au site de l'hémoculture et un affichage sur l'écran de l'ordinateur. Les hémocultures sont alors traitées par le (la) technicien(ne) : une coloration de Gram est faite et le résultat est communiqué immédiatement au médecin traitant selon le protocole en cours au laboratoire.

2. Domaine d'application

Les bouteilles d'hémocultures doivent être utilisées pour la recherche d'infections bactériennes ou fongiques dans le sang ou les liquides biologiques normalement stériles.

3. Politiques et procédures en lien

Procédure d'analyse des hémocultures : PRCD-BACT-1552-01
Procédure des erreurs

4. Abréviations

GMO : Greffé de moelle osseuse

5. Responsabilités

Cette procédure s'applique à toute personne habilitée à faire un prélèvement chez un patient.

6. Mesures de sécurité

- Les bouteilles d'hémocultures doivent être entreposées dans un milieu frais et sec, à l'abri de la lumière. Une rotation des bouteilles est assurée de manière à ce que les bouteilles soient utilisées avant la date d'expiration inscrite sur chacune d'elles.
- Avant l'utilisation des bouteilles d'hémocultures, il convient de les examiner pour vérifier si elles sont endommagées ou présentent des signes de détérioration.
  Occasionnellement, le goulot de la bouteille peut être fissuré et donc se briser quand la capsule

de protection est enlevée ou pendant les manipulations. De plus, une bouteille peut ne pas être bien bouchée. Il ne faut pas utiliser une bouteille non intacte ou une bouteille dont le milieu est trouble, décoloré, foncé.

7. Échantillons

7.1 Échantillons requis

- Sang ou liquide biologique normalement stérile.

  Voir en annexe : Tableau I pour le choix des bouteilles d'hémoculture
  Tableau II pour le volume sanguin en fonction de l'âge du patient
  Tableau III pour l'inoculation des liquides biologiques normalement stériles

- Nombre d'hémocultures à prélever :
  Il est préférable de toujours faire un minimum de deux séries d'hémocultures, plus particulièrement chez les patients porteurs de cathéters centraux ou de matériel corps étranger (ex.: vis, tige, prothèse valvulaire). Avec une seule hémoculture, le faible volume prélevé diminue la sensibilité du test. De plus, l'interprétation du résultat est plus difficile, en ce qui concerne la distinction entre les vraies bactériémies par rapport aux contaminations.
  Quoi que souhaitable, le prélèvement d'hémocultures multiples est parfois impossible chez le tout petit. On devrait alors s'en tenir à une seule bouteille, en optimisant le volume de sang que l'on y met.

- Délai entre les prélèvements :
  Lorsque la situation clinique demande l'introduction d'une antibiothérapie d'urgence, prélever les hémocultures sans délai entre chaque prélèvement. Toutefois, les hémocultures doivent être prélevées à des sites différents. Le délai de 30-60 minutes traditionnellement recommandé entre les hémocultures n'augmente pas la sensibilité du test. Il pourrait servir à documenter la présence d'une bactériémie continue.

- Type de bouteille à utiliser :
  La recherche de bactéries aérobiques doit être incluse dans tous les cas (bouteille aérobique). La bouteille anaérobique peut être optionnelle selon la prescription médicale. Ensemencer toujours en premier le bouillon de culture de la **bouteille aérobique,** puis la **bouteille anaérobique**. Voir tableau I pour les indications (non-exhaustives) de culture anaérobique.

7.2 Critères d'acceptabilité

- Les hémocultures sont prélevées de préférence avant de débuter ou de modifier l'antibiothérapie et au moment le plus éloigné possible de la dernière dose d'antibiotique. Les antibiotiques en cours doivent être mentionnés sur la requête.
- Il est préférable de prélever le sang via ponction veineuse plutôt que via un cathéter veineux pour diminuer le risque de contamination.
- Les liquides biologiques normalement stériles (amniotique, articulaire, ascite, pleural, péricardique) peuvent être ensemencés directement au chevet du patient dans les bouteilles d'hémoculture en respectant le volume et la bouteille recommandée. Voir tableau III.

7.3 Critères de rejet

- Échantillon de sang prélevé dans une bouteille brisée, contaminée, ou expirée.
- Si une erreur d'identification de l'échantillon est notée à la réception au laboratoire, l'infirmière qui a prélevé l'hémoculture sera appelée pour faire la correction au laboratoire à défaut de quoi le prélèvement sera rejeté.

8. Méthodologie

8.1 Matériel

- Bouteille d'hémoculture
  Les bouteilles VersaTREK sont disponibles à l'unité de soins ou au magasin.
  Les tubes Isolator sont disponibles seulement au laboratoire de microbiologie et sur prescription d'un pédiatre-infectiologue ou d'un microbiologiste-infectiologue.
- Requête appropriée
- Plateau à ponction veineuse incluant microperfuseur et barillet

8.2. Procédure

8.2.1. Ponction périphérique veineuse

Cela demeure la technique de choix de prélèvements d'hémocultures.

1. Opter pour la bouteille d'hémoculture selon l'analyse demandée et les recommandations du tableau I.
2. Se laver les mains.
3. Désinfecter le bouchon de caoutchouc de la bouteille avec un tampon d'alcool. Laisser sécher 30 secondes. La proviodine n'est pas recommandée car elle peut endommager le septum
4. Choisir un site de ponction où la peau est saine et de préférence sur les membres supérieurs.
5. Installer un garrot.
6. Palper la veine au site choisi.
7. Désinfecter le site de ponction veineuse par friction vigoureuse, soit avec une tige montée de chlorexidine et d'alcool, soit avec de l'eau stérile, selon le tableau ci-dessous.

ÂGE DE L'ENFANT	DÉSINFECTANT
Nouveau-nés de 26 semaines et moins :	Eau stérile
< 2mois :	Chlorexidine 0,5 % et alcool 70 %
Enfant ≥ 2mois et adulte:	Chlorexidine 2 % et alcool 70 %

8. Désinfecter de façon circulaire en partant du site prévu de ponction. Laisser sécher 30 secondes.
9. Mettre des gants propres. Aucune nécessité que les gants soient stériles.
10. Si nécessité de repalper la veine, redésinfecter la peau après avoir touché et laisser sécher.
11. Effectuer la ponction. Un prélèvement avec circuit fermé est souhaitable pour éviter l'introduction d'air dans les bouteilles et diminuer les risques d'accident.
12. Si la veine est ratée, le prélèvement doit être repris avec un nouveau circuit.
13. Maintenir la bouteille à la verticale lors du mode de prélèvement par système sous vide pour :
    - lire sur l'échelle le volume de sang ayant infusé dans la bouteille;
    - éviter le retour du bouillon de culture dans la circulation sanguine.

14. Prélever le volume sanguin maximal recommandé selon l'âge du patient pour optimiser la sensibilité de l'hémoculture (Voir tableau II). C'est la variable la plus importante dans la détection de la bactériémie.
15. Prélever la bouteille aérobie suivie de la bouteille anaérobie.
16. Chasser l'air de la seringue et injecter le sang dans la bouteille lorsque le prélèvement est fait via un papillon. Il n'est pas nécessaire de changer l'aiguille. **Éviter un remplissage inadéquat**. Renverser délicatement la bouteille plusieurs fois pour bien mélanger le sang au bouillon de culture.
17. Jeter l'aiguille de façon sécuritaire.
18. Si l'extérieur d'une bouteille est souillé de sang, on doit la désinfecter avec une lingette Virox.
19. Identifier l'échantillon au chevet du patient en collant l'étiquette verticalement sur la bouteille. Ne pas cacher le code à barres de la bouteille.
20. N'utiliser qu'une requête de bactériologie pour une hémoculture aérobique et anaérobique. Prendre une autre requête pour chaque autre demande spéciale : hémoculture ISOLATOR, hémoculture pour mycobactéries.
21. Remplir la requête en spécifiant la date et l'heure, le diagnostic, le site exact du prélèvement, les antibiotiques en cours, toute demande spéciale ainsi que le diagnostic présumé (ex.: brucellose, endocardite). Les techniques de laboratoire et la période d'incubation peuvent varier selon les organismes recherchés et le diagnostic soupçonné (Voir tableau I). Noter sur la requête toute déviation dans le volume prélevé. (Voir tableau II)
22. Acheminer l'échantillon au laboratoire dans un délai maximal de 30 minutes afin de l'incuber le plus tôt possible. **Ne jamais le réfrigérer**.

8.2.2. Ponction via un cathéter

Sauf exception, ne pas prélever à partir d'un cathéter moins d'une heure après l'administration d'un antibiotique.

1. Opter pour la bouteille d'hémoculture selon l'analyse demandée et les recommandations du tableau I.
2. Se laver les mains.
3. Désinfecter le bouchon de caoutchouc de la bouteille avec un tampon d'alcool. Laisser sécher 30 secondes. La proviodine n'est pas recommandée car elle peut endommager le septum.

4. Désinfecter le site de prélèvement du cathéter et la tubulure au pourtour à l'aide d'un tampon d'alcool en frottant vigoureusement au moins 15 secondes. Laisser sécher 30 secondes. Répéter une fois.
5. Mettre des gants propres. Aucune nécessité que les gants soient stériles.
6. ➜ **Ne pas rincer le cathéter** d'aucune façon avant le prélèvement de l'hémoculture.
7. À l'aide d'une seringue, prélever un volume de sang correspondant à l'espace mort du cathéter qui ne sera pas utilisé pour la culture. Utiliser une nouvelle seringue pour faire le prélèvement qui sera utilisé pour la culture.
8. Maintenir la bouteille à la verticale lors du mode de prélèvement par système sous vide pour :
   - lire sur l'échelle le volume de sang ayant infusé dans la bouteille;
   - éviter le retour du bouillon de culture dans la circulation sanguine.
9. Prélever le volume sanguin maximal recommandé selon l'âge du patient pour optimiser la sensibilité de l'hémoculture (Voir tableau II). C'est la variable la plus importante dans la détection de la bactériémie.
10. Prélever la bouteille aérobie suivie de la bouteille anaérobie.
11. Chasser l'air de la seringue et injecter le sang dans la bouteille lorsque le prélèvement est fait via un papillon. Il n'est pas nécessaire de changer l'aiguille. **Éviter un remplissage inadéquat**. Renverser délicatement la bouteille plusieurs fois pour bien mélanger le sang au bouillon de culture.
12. Jeter l'aiguille de façon sécuritaire.
13. Si l'extérieur d'une bouteille est souillé de sang, on doit la désinfecter avec une lingette Virox.
14. Identifier l'échantillon au chevet du patient en collant l'étiquette verticalement sur la bouteille.
15. N'utiliser qu'une requête de bactériologie pour une hémoculture aérobique et anaérobique. Prendre une autre requête pour chaque autre culture spéciale : hémoculture ISOLATOR, hémoculture pour mycobactéries.
16. Remplir la requête en spécifiant la date et l'heure, le diagnostic, le site exact du prélèvement, les antibiotiques en cours, toute demande spéciale ainsi que le diagnostic recherché (ex.: brucellose, endocardite). Les techniques de laboratoire et la période d'incubation peuvent varier selon les organismes recherchés et le diagnostic suspecté (Voir tableau I). Noter sur la requête toute déviation dans le volume prélevé. (Voir tableau II)
17. Acheminer l'échantillon au laboratoire dans un délai maximal de 30 minutes afin de l'incuber le plus tôt possible. **Ne jamais le réfrigérer**. Ne pas mettre dans le pneumatique.

N. B. Pour faire le diagnostic d'une **bactériémie reliée à un cathéter**, il faut prélever en même temps une hémoculture via cathéter et une hémoculture périphérique, avec le même volume de sang dans les deux bouteilles. Bien inscrire le site et l'heure exacte du prélèvement et acheminer en même temps au laboratoire. Dans ces conditions, si la bouteille prélevée via cathéter est détectée positive plus de 2 heures avant celle prélevée en périphérie, cela signe une bactériémie reliée à un cathéter.

8.2.3. Ponction pour un tube ISOLATOR™

1. Le prélèvement s'effectue exactement de la même façon que pour les bouteilles.
2. Choisir le format du tube selon l'analyse demandée et les recommandations du tableau I. Les tubes Isolator sont disponibles seulement au laboratoire de microbiologie et sur demande par le pédiatre-infectiologue ou le microbiologiste-infectiologue.
3. Porter une attention particulière à la désinfection vigoureuse du bouchon de caoutchouc du tube avec un tampon d'alcool 70 %. Laisser sécher 30 secondes. La proviodine n'est pas recommandée car elle peut endommager le septum.
4. Prélever le volume sanguin maximal recommandé selon le format du tube et l'indication du prélèvement pour optimiser la sensibilité de l'hémoculture (Voir tableau II). C'est la variable la plus importante dans la détection de la bactériémie.

9. Annexes

Tableau I : Choix des bouteilles d'hémocultures

Tableau II : Volume sanguin en fonction de l'âge du patient

Tableau III : Inoculation des liquides biologiques normalement stériles

10. Références

(1) Baron EJ, Weinstein MP, Dunne WM Jr, Yagupsky P, Welch DF and Wilson DM. 2005. Cumitech 1C, *Blood Cultures IV*, Coordinating ed., EJ Baron, ASM press, Washington, DC

(2) CLSI. Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

(3) Isenberg, HD. Specimen Collection and Transport. In: Isenberg HD (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd edition. ASM press, Washington, DC, 2004 section 2.1.

(4) Isenberg, HD.Blood cultures. In: Isenberg HD (ed), Clinical Microbiology Procedures Handbook, 2nd edition. ASM press, Washington, DC, 2004 section 3.4.

(5) AMMIQ. Groupe de travail sur les hémocultures; guide de pratique. Document de travail. 2007

(6) Norberg A, Christopher NC, Ramundo ML, Bower JR, and Berman SA. Contamination rates of blood cultures obtained by dedicated phlebotomy vs intravenous catheter. JAMA 2003; 289**:**726-729.

(7) Paisley JW and Lauer BA. Pediatric blood cultures. Clin Lab Med 1994; 14:17-30.

(8) Richter, SS. Strategies for Minimizing the Impact of Blood Culture Contaminants. Clinical Microbiology Newsletter 2002;24:49-56.

(9) Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; Approved standard-Fifth edition. CLSI document H3-A5. CLSI, Wayne, Pennsylvania. 2005.

(10) Procedures for the collection of arterial blood specimens; Approved standards-Fourth edition. CLSI document H11-A4. CLSI, Wayne, Pennsylvania. 2005.

Tableau I : CHOIX DES BOUTEILLES D'HÉMOCULTURES

Nombre de prélèvements recommandés : HÉMOCULTURE X 2

CHOIX DE BOUTEILLES SELON PRESCRIPTION MÉDICALE SPÉCIALE		
MICROORGANISMES RECHERCHÉS OU DIAGNOSTIC SUSPECTÉ	BOUTEILLE OU TUBE	REMARQUES
▪ Anaérobes ▪ Infections abdominales ou péri-anales, gynécologiques, ORL, patients neutropéniques recevant des stéroïdes, morsure, bébés nés de mère avec chorioamnionite.	Aérobique (bouchon violet) **ET** Anaérobique (bouchon rouge)	Incubation de 5 jours
▪ Champignons (Mycoses) Immunocompromis, prématuré, porteur de cathéter central	Aérobique (bouchon violet)	Mentionner sur la requête : Culture fongique. Incubation de 21 jours
▪ Endocardite, fièvre d'origine indéterminée.	Aérobique (bouchon violet)	Mentionner sur la requête : Endocardite ou FUO Incubation de 21 jours
▪ *Brucella*	Aérobique (bouchon violet)	Mentionner sur la requête : Recherche de *Brucella* Incubation de 10 jours
▪ *Bartonella*	Aérobique (bouchon violet) **ET** ISOLATOR™ 10*	Mentionner sur la requête : Recherche de *Bartonella* Incubation de 21 jours
▪ Microorganismes reliés au bioterrorisme.	Aérobique (bouchon violet)	· Mentionner l'organisme recherché sur la requête · Appeler le microbiologiste de garde
▪ *Malassezia furfur* porteur de cathéter central	ISOLATOR™ 1.5 ou 10*	Mentionner sur la requête : Recherche de *Malassezia furfur*

CHOIX DE BOUTEILLES SELON PRESCRIPTION MÉDICALE SPÉCIALE		
MICROORGANISMES RECHERCHÉS OU DIAGNOSTIC SUSPECTÉ	BOUTEILLE OU TUBE	REMARQUES
▪ *Streptobacillus moniliformis* (rat bite fever)	Aérobique (bouchon violet) **avec deux fois le volume de sang recommandé pour l'âge** **ET** 2 tubes citrate (bouchon bleu clair)	Mentionner sur la requête : Rat bite fever Incubation de 21 jours
▪ Mycobactéries Tuberculose, mycobactéries atypiques.	ISOLATOR™ 1.5 ou 10*	Mentionner sur la requête : Recherche de mycobactéries
▪ Champignons dimorphes (Histoplasma, Blastomyces, Coccidioidomyces, Paracoccidioidomyces)	ISOLATOR™ 10*	Mentionner sur la requête : Recherche de champignons dimorphes
▪ *Legionella*	ISOLATOR™ 1.5 ou 10*	Mentionner sur la requête : Recherche de *Legionella*

* ISOLATOR™ 1.5 : patients < 11ans
ISOLATOR™10 : patients 11 ans et plus, *Bartonella*

Tableau II : VOLUME SANGUIN EN FONCTION DE L'ÂGE DU PATIENT

Les bouteilles VersaTrek acceptent un volume <u>maximal de 5 ml</u>.

Le volume de sang est la variable la **plus importante** dans la détection de la bactériémie. Prélever le maximum de sang possible optimise la sensibilité de l'hémoculture.

BOUTEILLE OU TUBE	MILIEU	VOLUME SANGUIN MINIMAL PAR BOUTEILLE *
Aérobique (bouchon violet)	<u>Aérobique</u>	Nouveau-nés < 2,5 kg : 1 ml > 2,5 kg : 1 à 2 ml 1 mois à 2 ans : 2 à 3 ml 2 à 10 ans : 3 à 5 ml > 10 ans : · Dans les cas suivants, faire 2 bouteilles avec 5 ml par bouteille : endocardite, fièvre d'origine indéterminée, champignons ou autres cas jugés critiques. · Dans tous les autres cas, faire1 bouteille avec 5 ml.
Anaérobique (bouchon rouge)	<u>Anaérobique</u>	Nouveau-nés < 2,5 kg : 1 ml > 2,5 kg : 1 à 2 ml 1 mois à 2 ans : 2 à 3 ml 2 à 10 ans : 3 à 5 ml > 10 ans : · Dans les cas suivants, faire 2 bouteilles avec 5 ml par bouteille : endocardite, fièvre d'origine indéterminée, champignons ou autres cas jugés critiques. · Dans tous les autres cas, faire1 bouteille avec 5 ml.
ISOLATOR™ 1.5 (patients < 11ans) ISOLATOR™10 (patients 11 ans et plus, Bartonella)		ISOLATOR™ 1.5 : 1,5 ml ISOLATOR™ 10 : 10 ml

* ***Éviter un remplissage inadéquat*** *(volume trop élevé ou trop faible).*
Mentionner le volume prélevé sur la requête si le volume est inférieur ou supérieur au volume recommandé.

Tableau III : INOCULATION DES LIQUIDES BIOLOGIQUES NORMALEMENT STÉRILES

Dans les cas de prélèvements de liquides biologiques normalement stériles, les deux options suivantes sont possibles :

1. Les liquides biologiques normalement stériles peuvent être acheminés au laboratoire de bactériologie dans une seringue ou un contenant stérile bien vissé.
2. Une partie peut être inoculée dans une bouteille d'hémoculture. Dans ces cas :
   - Le volume optimal est inoculé directement dans une bouteille d'hémoculture au chevet du malade selon les mêmes recommandations que celles des hémocultures.
   - Le volume restant de l'échantillon est acheminé dans un contenant stérile hermétique bien vissé ou dans une seringue pour coloration de Gram en **stat** et cultures selon les spécifications de la prescription médicale, comme pour les hémocultures.
   - **Tous les liquides seront incubés 10 jours, sauf les greffons de GMO qui seront incubés 21 jours.**

Échantillon	Volume disponible	Bouteille	volume à inoculer
Liquide amniotique	1 à 4 ml	Aérobique (bouchon violet) :	1 à 4 ml
	> 4 ml	Aérobique (bouchon violet) : + Anaérobique (bouchon rouge) :	2 à 5 ml 2 à 5 ml
Liquide articulaire	1 à 5 ml	1 bouteille aérobique (bouchon violet) :	1 à 5 ml
	> 5 ml	2 bouteilles aérobiques (bouchon violet) :	3 à 5 ml
Liquide d'ascite	1 à 4 ml	Aérobique (bouchon violet) :	1 à 4 ml
	> 4 ml	Aérobique (bouchon violet) : + Anaérobique (bouchon rouge) :	2 à 5 ml 2 à 5 ml
Liquides pleural et péricardique	1 à 4 ml	Aérobique (bouchon violet) :	1 à 4 ml
	> 4 ml	Aérobique (bouchon violet) : + Anaérobique (bouchon rouge) : **N. B. : ISOLATOR™ 10 sur demande de l'infectiologue**	2 à 5 ml 2 à 5 ml
Greffon de GMO	1 à 5 ml	Aérobique (bouchon violet) :	1 à 5 ml

Le médecin requérant sera consulté pour prioriser les demandes lorsque le volume disponible est inférieur aux volumes optimaux pour les tests requis.