

Fiche : prélèvements biologiques devant un patient suspect de peste

Recommandations de la SFM et du CNR Peste à destination des laboratoires des Etablissements de Santé de Référence et des Hôpitaux militaires, octobre 2017.

Yersinia pestis est une entérobactérie appartenant au groupe de risque 3. Elle est également listée parmi les microorganismes et toxines de l'arrêté du 30 avril 2012. La dose infectante est de 100 à 500 bactéries. *Yersinia pestis* est sensible aux ammoniums quaternaires, à l'hypochlorite de sodium et aux solutions à base d'acide peracétique/péroxyde d'hydrogène. Il s'agit d'une bactérie fragile, son caractère infectieux sur des surfaces sèches ou en aérosol n'excéderait pas une heure. En cas d'exposition, il existe une antibioprophylaxie efficace.

La manipulation d'échantillons biologiques susceptibles de contenir *Yersinia pestis* doit s'effectuer dans des conditions de biosécurité adaptées sans occasionner de perte de chances pour le patient (panel diagnostique, diagnostics différentiels, paramètres d'urgence, délais...).

La manipulation des échantillons microbiologiques d'un patient suspect de peste, susceptibles de contenir de fortes concentrations de bactéries (prélèvements respiratoires, pus de bubons, hémocultures) doit s'effectuer en LSB3.

Pour les autres échantillons, l'annexe Peste-Charbon-Tularémie du plan Biotox (2007, fiche n°3.4) autorise leur manipulation en LSB2 sous réserve d'une organisation claire, d'un renforcement des équipements de protection individuelle (EPI), d'un respect des bonnes pratiques de travail, particulièrement lors des manipulations pouvant générer accidentellement des aérosols, de la mise à

disposition de conduite à tenir en cas d'incident, de la traçabilité du personnel et des échantillons.

La Société Française de Microbiologie est en accord avec ce principe.

En France, le diagnostic spécifique de peste peut être effectué par une PCR spécifique sur les échantillons biologiques, dont le résultat peut être obtenu généralement en moins de 12 heures. La culture de la bactérie nécessite au minimum 48 heures, elle doit être complétée d'un antibiogramme.

Références :

- Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
- Arrêté du 30 avril 2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique.
- Arrêté du 11 juin 2013 modifiant l'arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnées à l'article R.5139-18 du code de la santé publique.
- Biorisk management. Laboratory biosecurity guidance. World Health Organization. September 2006.
- Guide Peste-Charbon-Tularémie, annexe du plan Biotox, avril 2007
- Manuel de Sécurité et de sûreté biologiques, Société Française de Microbiologie, 1^{ère} édition, 2014.
- Prévention des risques infectieux dans les laboratoires d'analyses de biologie médicale, SFHH, 2007
- Référentiel de formation en sécurité et sûreté biologiques, Société Française de Microbiologie, 1^{ère} édition, 2016.
- Risques biologiques, Les cahiers de Prévention santé-sécurité-environnement, CNRS, mars 2015.
- Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses (2017-2018), www.who.int/ihr/publications/WHO-WHE-CPI-2017.8/en/

Prérequis

Le service clinique prévient immédiatement le laboratoire de la suspicion de peste. Les prélèvements biologiques destinés au laboratoire doivent être limités au strict nécessaire pour établir le diagnostic de peste pulmonaire et les soins du malade.

- Les prélèvements biologiques sont emballés en triple emballage, en prenant soin que la partie la plus externe du colis ne pénètre jamais dans la chambre du patient afin de garantir la sécurité du personnel en aval.
- Il convient de faire au minimum :
 - un triple emballage pour les échantillons destinés à la bactériologie : crachats, LBA, PDP, aspiration de bubons, hémocultures, selon le tableau clinique, tube de sang total sur EDTA pour PCR *Yersinia pestis*.
 - un triple emballage pour les échantillons destinés aux autres analyses (hématologie, hémostase, immuno-hématologie, paludisme, biochimie...). Pour les sites ayant des UF très éloignées les unes des autres, plusieurs triples emballages sont souhaités. Les triples emballages correctement identifiés sont acheminés par voie pédestre au laboratoire (pas de pneumatique).

Le triple emballage destiné à la bactériologie ne sera ouvert qu'en laboratoire de sécurité microbiologique de niveau 3.. Pour les autres triples emballages, à l'arrivée au laboratoire ou au centre de tri, les prélèvements sont déballés sous PSM, enregistrés, numérotés. Ils peuvent être repérés par une pastille de couleur. Cette opération est réalisée par un technicien ou un interne de biologie ou un biologiste dont la tenue a été renforcée (sur-blouse, double paire de gants, masque FFP2 et lunette de protection).

Pour les laboratoires LSB3 ne disposant pas d'automate à hémoculture, les hémocultures seront déballées sous PSM comme les échantillons destinés aux autres analyses (hématologie, biochimie...) identifiées par une pastille de couleur et incubées dans l'automate hors LSB3. **Toute hémoculture positive devra être transférée impérativement dans le LSB3 pour être ouverte.** Il s'agit d'un point critique qui devra être parfaitement encadré par le laboratoire.

2. Les prélèvements à effectuer

2.1 Les prélèvements pour le diagnostic microbiologique de peste

- A prélever si possible avant toute antibiothérapie.
- **Prélèvements respiratoires** : Crachats ou aspiration trachéale ou LBA,
- **Hémocultures +++**,
- **Aspiration du bubon** (si présent), utiliser une seringue avec un peu de sérum physiologique et procéder par aspiration-refoulement, adresser l'aspirât dans un pot sec, bouchon rouge,
- **Un tube de sang sur tube sec** à l'admission et un autre 10 j après (sérologie à visée épidémiologique),
- **Un tube de sang avec EDTA** pour le diagnostic par PCR.

2.2 Les prélèvements éventuels pour le diagnostic microbiologique différentiel, selon le tableau clinique

- Tube de sang avec EDTA pour recherche de **paludisme**,
- Urines pour réaliser une **antigénurie Pneumocoque et Légionelle**.

3. Gestion des autres types de prélèvements en laboratoire de confinement LSB2

Les prélèvements biologiques qui ne sont pas dédiés au diagnostic étiologique doivent être limités au strict minimum, sans occasionner de perte de chance pour le malade, avant la confirmation ou l'infirmité du diagnostic microbiologique d'infection à *Y. pestis*, diagnostic pouvant être obtenu par PCR, dans un délai de 12-24 heures selon l'éloignement.

En cas de nécessité (diagnostics différentiels probables, sévérité du tableau clinique..), les échantillons de sang total, plasma, sérum, destinés à l'hématologie, l'hémostase, l'immuno-hématologie, la biochimie, la recherche de paludisme, aux TDR et sérologies d'urgence et les échantillons d'urine pour la recherche d'antigènes solubles, peuvent être manipulés en laboratoire LSB2 sous réserve :

- du respect des précautions standard d'hygiène en laboratoire,
- d'un renforcement des équipements de protection individuelle,
- d'une traçabilité et conservation sécurisée des échantillons.

Sont listés ci-dessous les grands principes recommandés.

- Personnel en nombre limité,
- Tenue recommandée : sur-blouse, lunettes, masque respiratoire FFP2, 2 paires de gants,
- Privilégier dès que possible les automates à tubes fermés, pour lesquels le risque d'exposition est minime; après usage lancer une désinfection de l'automate,
- Toute centrifugation doit se faire en nacelle étanche et toute ouverture de nacelle de centrifugation doit se faire sous PSM,
- Pour les analyses nécessitant un passage sur des automates à tubes ouverts, en fonction de l'organisation et de l'architecture locales, plusieurs stratégies sont possibles :

Stratégie 1 : Maintien du passage des tubes ouverts sur la chaîne :

- Ne pas utiliser les modules pré-analytiques (pas de passage sur trieur-aliquoteur),
- Centrifuger en nacelle étanche et ouvrir la nacelle sous PSM, déboucher les tubes sous PSM,
- Transférer le(s) tube(s) dans son portoir dans une boîte de transport hermétiquement fermée pour l'acheminer jusqu'à l'automate,
- Lancer une désinfection après usage ou avant toute intervention sur l'automate.

Stratégie 2 : techniques manuelles et utilisation de petits automates à tubes ouverts, sous PSM.

- Pour les techniques manuelles, toute ouverture de tube, toute réalisation de TDR, tout étalement et au minimum toute fixation de frottis sanguin (recherche de paludisme) doit se faire sous PSM. Fermer immédiatement les conteneurs DASRI contenant les déchets de ces activités.
- Le poste de sécurité microbiologique doit être nettoyé immédiatement après usage avec un détergent-désinfectant bactéricide. L'eau de Javel 0.5% de chlore actif fraîchement diluée est un désinfectant adapté (temps de contact de 10 min) ainsi que le Surfasafe Premium ou Aniospray avec un temps de contact de 10 minutes.

- Disposer d'un CAT en cas de déversement de liquides biologiques,
- A l'issue des manipulations, retirer les EPI,
- Procéder à une hygiène des mains avec PHA,
- Respecter les précautions standard d'hygiène lors de la gestion des DASRI,
- Traçabilité du personnel,
- A l'issu des analyses, l'ensemble des tubes primaires ou secondaires doivent être regroupés pour être conservés dans un triple emballage identifié jusqu'à réception des résultats. Maintenir l'ensemble à +4°C.
 - Si peste confirmée :
 - destruction de l'ensemble des tubes primaires reçus et manipulés dans le L2, par autoclavage (30 minutes à 121°C) avant de rejoindre le circuit classique des DASRI, ou sur demande de l'ARS ou du CNR, transfert des tubes primaires au Centre de référence de la peste en transport UN3373, catégorie B.
 - Si peste exclue : les échantillons peuvent rejoindre le circuit classique de conservation des échantillons puis d'évacuation du laboratoire par la filière DASRI

4. Gestion des prélèvements dans un laboratoire de confinement LSB3

Doivent être traités en LSB3, les prélèvements susceptibles de contenir des quantités importantes de *Y. pestis* : prélèvements respiratoires, aspirât de bubon, hémocultures positives.

- Réalisation des techniques de lyse et/ou d'extraction des acides nucléiques des prélèvements à visée diagnostique (selon les étapes d'inactivation validées), pour la PCR,
- Mise en culture,
- Repiquage des hémocultures positives,
- Réalisation des colorations des prélèvements à visée pulmonaire, des hémocultures positives... Séchage de la lame et fixation à l'alcool sous PSM2, suivi d'une coloration manuelle.

4.1. Milieux de culture et méthode d'identification

- Ensemencer les prélèvements à visée pulmonaire sur gélose au sang, Drigalski ou MacConkey, prévoir un milieu sélectif pour *Yersinia* (milieu CIN). Incuber à 25-28°C pendant 3 à 4 jours,
- Ensemencer également les géloses habituelles pour le diagnostic classique des infections respiratoires basses et les incuber à 37°C (diagnostic différentiel),
- Incuber les flacons d'hémoculture à 35°C sous agitation pendant 5 jours (durée habituelle d'incubation).
- Lecture des cultures :
 - Culture lente, apparition des colonies généralement entre 48-72 h, à 24 h culture punctiforme. A 48-72 h sur gélose au sang, colonies blanches en œuf au plat, sur gélose Drigalski ou MacConkey, colonies lactose négative,
 - Test uréase/indol négatif (permet de différencier de *Y. pseudotuberculosis*, espèce génétiquement très proche). Attention le test de l'urée n'est valable que sur culture incubée à 28°C (le gène de l'uréase étant dérégulé à 37°C chez *Y. pseudotuberculosis*),
 - PCR sur colonies,
 - Galerie d'identification API incubée à 28°C,
 - Spectrométrie de masse Maldi-TOF après extraction avec alcool 70% et acide formique selon le protocole Brüker ([J Clin Microbiol.](#) 2017 Oct 11. pii: JCM.01023-17. doi: 10.1128/JCM.01023-17). Attention, la spectrométrie de masse Maldi-TOF ne permet pas toujours de distinguer *Y. pestis* de *Y. pseudotuberculosis*.

4.2. Confirmation du diagnostic

Transfert au Centre National de Référence de la peste :

- de la souche isolée, repiquée en Carry Blair ou dans un tube de conservation, transport de catégorie A, UN2814 après obtention d'une autorisation de cession auprès de l'ANSM, pour confirmation de l'identification bactérienne, typage moléculaire et surveillance de la sensibilité aux antibiotiques,

- du prélèvement primaire conservé à +4°C, transport de catégorie B UN3373 si envoi seul, non accompagné de la souche, sur demande du CNR.

Coordonnée du CNR de la peste

Responsable du CNR : Anne-Sophie Le Guern

Tel : 01 45 68 83 29

Adresse email : cnr.yersinia@pasteur.fr

Site : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/cnr/les-cnr/peste-autres-yersiniose>

4.3. Gestion des déchets du LSB3

- Déchets solides (prélèvements et cultures) : autoclavage selon le protocole en vigueur du LSB3 de l'établissement,
- Déchets liquides (colorants) : ajouter à un récipient étanche ou bonbonne, de l'eau de javel à raison d'un berlingot à 9.6% de chlore actif pour 20 litres et laisser agir 30-60 min. Désinfecter ensuite la surface du récipient avec le désinfectant actif sur les pathogènes présents dans le LSB3 avant évacuation du P3 (en prenant en compte uniquement le risque *Yersinia pestis*, l'eau de javel à 0.5% de chlore actif ou du Surfasec Premium ou de l'Aniospray 29 sont acceptables).