

Le Bulletin de la Dialyse à Domicile

PRÉLÈVEMENTS À VISÉE BACTÉRIOLOGIQUE DES LIQUIDES DE DIALYSE PÉRITONÉALE.

COMMENT LIMITER LE NOMBRE DE PÉRITONITES À CULTURE NÉGATIVE ?

BACTERIOLOGICAL SAMPLING IN PERITONEAL DIALYSIS FLUID : DECREASING THE NUMBER OF STERILE PERITONITIS

Antoine Grillon¹, Pierre-Hugues Boyer¹ et Françoise Heibel²,

¹Laboratoire de Bactériologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

²Service de Néphrologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Résumé

Les péritonites sont une complication majeure et grave en termes de morbi-mortalité chez les patients traités par dialyse péritonéale. Leur diagnostic microbiologique est compliqué tant au point vu de la détection des agents étiologiques des péritonites que de l'interprétation des cultures positives.

De nombreux micro-organismes peuvent être à l'origine de cette infection; germes « classiques » comme les staphylocoques à coagulase négative ou les entérobactéries, mais également des bactéries « atypiques », de culture ou de détection plus fastidieuse.

Pour mettre en évidence les bactéries responsables, des techniques de biologie moléculaire et de culture peuvent être mises en place. La biologie moléculaire (particulièrement la recherche universelle (ADNr 16s)) permet d'identifier d'éventuels germes atypiques, mais ne permet pas la réalisation d'un antibiogramme.

La culture des liquides de dialyse péritonéale reste donc le « gold-standard » pour le diagnostic de ces infections. Celle-ci doit être néanmoins optimisée pour abaisser son seuil de sensibilité.

Le diagnostic étiologique des péritonites chez les patients traités par dialyse péritonéale peut être difficile, mais la microbiologie moderne combinée à une discussion bactério-clinique permet l'identification du germe responsable de l'infection dans la très grande majorité des cas.

Mots clés : dialyse péritonéale, péritonite, bactériologie, dialysat

Abstract

Peritonitis is a major and serious complication in terms of morbi-mortality for patients treated with peritoneal dialysis. Their microbiological diagnosis is challenging for both the detection of the etiological agents and in interpreting positive cultures.

Many microorganisms can cause this infection; usual micro-organisms such as coagulase-negative staphylococci or Enterobacteriaceae, but also 'atypical' bacteria, which culture or detection, is more tedious can be found.

To identify the responsible bacteria, molecular biology and culture techniques can be set up. Molecular biology (particularly the sequencing of the universal 16s rDNA gene) makes it possible to identify atypical agents, but antimicrobial susceptibility testing cannot be performed following these technics.

The culture of peritoneal dialysis fluids remains the 'gold-standard' for the diagnosis of these infections. Nevertheless this must be optimized to enhance its sensitivity.

The etiological diagnosis of peritonitis in patients treated with peritoneal dialysis may be difficult, but modern microbiology combined with a bacteriological discussion allow the identification of the microorganism responsible for the infection in the great majority of the cases.

Keywords : peritoneal dialysis, peritonitis, bacteriology, dialysate sampling

INTRODUCTION

Les péritonites sont une complication majeure et grave chez les patients traités par dialyse péritonéale (DP). Elles sont responsables d'environ 18 % de la mortalité infectieuse chez ces patients et les péritonites répétées peuvent conduire à une altération de la membrane péritonéale. Dans ces cas, l'échec de la DP oblige les patients à recourir à l'hémodialyse (1,2). Les péritonites à culture négative, également appelées péritonites stériles ou aseptiques sont définies comme l'association d'un dialysat effluent trouble et/ou douleurs abdominales avec la présence dans le liquide de drainage de plus de 100 leucocytes, dont plus de 50 % de polynucléaires neutrophiles, sans croissance bactérienne après 72 heures de culture (3). Les recommandations de l'ISPD fixent un niveau maximal de péritonites à culture négative à ne pas dépasser à 20 %, et un niveau souhaité de 10 % (3).

Le diagnostic microbiologique d'une péritonite d'un patient sous dialyse péritonéale constitue un véritable défi pour le microbiologiste. De multiples facteurs peuvent rendre difficile à la fois la détection des germes et l'interprétation d'une culture positive.

Le nombre de bactéries présentes dans un liquide de dialyse péritonéale infecté est extrêmement variable d'un individu à un autre, compris entre 1 et 106 UFC/mL de dialysat (4). Par ailleurs, une quantité bactérienne de l'ordre de 1 à 10 UFC/mL peut être mise en évidence chez des patients asymptomatiques ayant un compte de leucocytes < 100 mm³ dans le liquide de DP (5). La positivité d'une culture peut donc aussi bien être le reflet d'une véritable infection qu'une contamination du prélèvement lors du recueil ou du processus analytique (4). Il faut ajouter à cette complexité l'identité même des germes responsables de péritonites chez les patients traités par DP (Tableau I). Parmi ceux-ci, nombreux sont ceux appartenant à la flore commensale cutanée, digestive ou environnementale, nécessitant souvent la répétition des prélèvements pour confirmer ou infirmer leur caractère pathogène. Les germes les plus fréquemment isolés sont les cocci à Gram positif, avec une prépondérance de staphylocoques à coagulase négative, suivis par le genre *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium* sp., et *Enterococcus* sp (6). Il est à noter que les cocci à Gram positif ont une viabilité dans les liquides de DP beaucoup plus faible que les bactéries à Gram négatif, ce qui laisse supposer que les péritonites à culture négative concerneraient principalement le genre *Staphylococcus*. Dans le cas d'une péritonite confirmée, la quantité de staphylocoques à coagulase négative contenue dans le liquide de DP diminue dès la quatrième heure, pour devenir in-

détectable à 48 heures (7). Cet aspect peut être expliqué au moins en partie par la présence de leucocytes et de trace d'antibiotique dans les liquides de DP contenant des effluents de patients (8). Parmi les bacilles à Gram négatif, ce sont les *Enterobacteriaceae* qui prédominent largement par rapport à *Pseudomonas aeruginosa* (6).

À côté des bactéries dites « classiques », certaines bactéries responsables de péritonites chez les patients traités par DP sont de détection et/ou de culture difficile par les méthodes conventionnelles. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les mycobactéries, tuberculeuses ou atypiques, ainsi que les bactéries des genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Rhodococcus*, *Brucella*, *Campylobacter* ou encore *Ureaplasma* (9-16).

Face à ces divers problèmes, le microbiologiste doit trouver des solutions adaptées à chaque situation. Le dialogue avec le clinicien est dès lors indispensable pour une prise en charge optimale du patient.

Tableau I Fréquence relative des principaux germes détectés dans les péritonites associées à la dialyse péritonéale d'après (6)

Tableau I Fréquence relative des principaux germes détectés dans les péritonites associées à la dialyse péritonéale d'après (6)

| Germes | Fréquence relative |
|------------------------------------|--------------------|
| Gram positif | ++++ |
| Staphylocoque à coagulase négative | +++ |
| <i>Streptococcus</i> sp. | ++ |
| <i>S. aureus</i> | + |
| <i>Corynebacterium</i> sp. | + |
| <i>Enterococcus</i> sp. | + |
| Gram négatif | ++ |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | ++ |
| <i>Acinetobacter</i> sp. | + |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | + |
| Champignon | + |

DISCUSSION

Pour toutes les raisons précédemment citées, il est nécessaire au microbiologiste de disposer de techniques suffisamment sensibles pour détecter jusqu'à 1 UFC/mL et suffisamment fiable pour éliminer au maximum un risque de contamination analy-

tique. Deux approches permettent cela : la biologie moléculaire et l'optimisation de la culture conventionnelle bactérienne.

La détection de l'ADN bactérien directement à partir du liquide de DP dans les cas de péritonites à cultures négatives a été étudiée. Deux approches sont proposées : la recherche spécifique de pathogène via l'utilisation de PCR ciblée, ou la recherche dite « universelle » (ADNr16s), gène commun à l'ensemble des bactéries, suivi d'un séquençage pour identification. L'utilisation de PCR ciblée est connue pour être une technique très sensible, mais ne détecte que le germe ciblé par la celle-ci. Son intérêt dans les péritonites associées à la DP est donc limité aux mycobactéries tuberculeuses. La sensibilité de la recherche de l'ADNr16S est équivalente à celle de la culture (17,18). Néanmoins, son utilisation ne doit être réservée qu'à un nombre restreint de cas. Cette approche ne permet pas l'obtention d'un antibiogramme, essentiel à l'optimisation de l'antibiothérapie, et est relativement longue comparée aux techniques de culture. Elle nécessite une amplification du gène codant l'ARNr16S (1-3 jours selon les laboratoires), suivi d'un séquençage de l'amplicon obtenu pour identification (2-5 jours selon les laboratoires). De plus, elle ne permet pas la détection des levures. Elle peut toutefois être utile pour la recherche de germes atypiques, ou lorsque le patient a reçu une antibiothérapie préalable au prélèvement (16, 19, 20).

La culture conventionnelle des liquides de DP reste donc le « gold standard » pour le diagnostic étiologique des péritonites sur DP. Malheureusement, celle-ci est d'une sensibilité relativement faible. L'examen direct du liquide de DP après coloration de Gram, même après cyto-centrifugation (technique utilisée pour les LCR), ne détecte les bactéries que dans moins de 50 % des cas (4). La sensibilité de la culture conventionnelle, consistant à ensemercer directement une partie du liquide de DP sur des géloses nutritives ou dans des bouillons nutritifs, possède une sensibilité de l'ordre de 50 % (6). Une optimisation de celle-ci est donc indispensable pour limiter au maximum le nombre de péritonites à culture négative.

Plusieurs options ont été envisagées afin d'atteindre ce but. Les premières se sont concentrées sur l'utilisation d'un large volume de liquide de DP, afin d'augmenter les chances de détection des microorganismes. L'utilisation d'un large volume, généralement de l'ordre de 50 mL, suivi d'une sédimentation (4-6 heures), ou d'une centrifugation, afin de concentrer artificiellement les bactéries, ne permet pas un réel gain de sensibilité (8,21). Pire, l'utilisation de telles techniques pourrait différer la mise en culture du liquide de DP, et donc différer d'autant l'obtention d'un antibiogramme (8).

Une alternative peut consister en une inocula-

tion directe de 2 à 3 mL de liquide de DP dans des milieux nutritifs liquides et de 1 mL sur milieux gélosés nutritifs (22). Parallèlement à l'utilisation de milieux liquides, il a été montré que l'adjonction de produits lysant les cellules phagocytaires permet une amélioration de la sensibilité de la culture d'environ 10 % (4). Or, actuellement, le microbiologiste dispose de matériel permettant à la fois l'utilisation d'un milieu liquide riche, associé à des produits lysant les cellules phagocytaires et inhibant l'action des antibiotiques. Il s'agit des flacons utilisés pour les hémocultures.

L'utilisation de flacons d'hémocultures, un flacon aérobie et un flacon anaérobie, inoculés avec le liquide de DP, permet d'augmenter la sensibilité de 50 à 80 % (6). Les 2 flacons sont incubés au minimum 5 jours et peuvent être prolongés jusqu'à 10 jours si besoin, la croissance bactérienne se faisant de manière automatique. La quantité de liquide de DP introduit dans ces flacons est primordiale. Un volume de 10 mL par flacon permet une positivité de deux fois supérieures à celle obtenue pour un volume de 5 mL (23). Les subcultures des flacons positifs se font sur milieux gélosés supplémentés en sang de mouton et incubés en aérobioses et anaérobioses. Dans le cas où l'examen direct à l'état frais et après coloration de Gram met en évidence de petits bacilles à Gram négatif, très mobiles et incurvés, il est nécessaire d'ajouter un milieu incubé en atmosphère micro-aérophile pour la détection de *Campylobacter* sp. (15). Les flacons d'hémocultures nécessitent par contre une antisepsie rigoureuse du site de prélèvement, afin d'éviter les contaminations par des germes environnementaux. L'utilisation de protocole de prélèvement doit donc être la norme pour d'une part diminuer ce risque de contamination et d'autre part d'homogénéiser les pratiques (24).

Les recommandations pour le diagnostic étiologique bactérien des péritonites chez les patients traités par DP pourraient être les suivantes (Figure 1) : après stase du liquide de DP chez le patient pendant 2 heures, et avant antibiothérapie si possible, le liquide contenu dans la poche doit être homogénéisé par action mécanique. Le prélèvement du liquide de DP doit se faire au niveau de la poche, préalablement désinfectée de façon rigoureuse. Deux flacons d'hémocultures, un aérobie et un anaérobie doivent être inoculés avec 10 mL de liquide de DP. Les flacons doivent être ensuite acheminés le plus rapidement possible au laboratoire pour y être incubés. A cela, il faut adjoindre un tube stérile contenant 2 à 3 mL de liquide de DP, servant au comptage des leucocytes du liquide, et permettant éventuellement la réalisation de techniques de biologie moléculaire en cas de culture négative ou suspicion de germes atypiques. Enfin, en cas de suspicion de germes atypiques, une discussion clinico-biologique est indispensable pour la réalisation d'examens complémentaires.

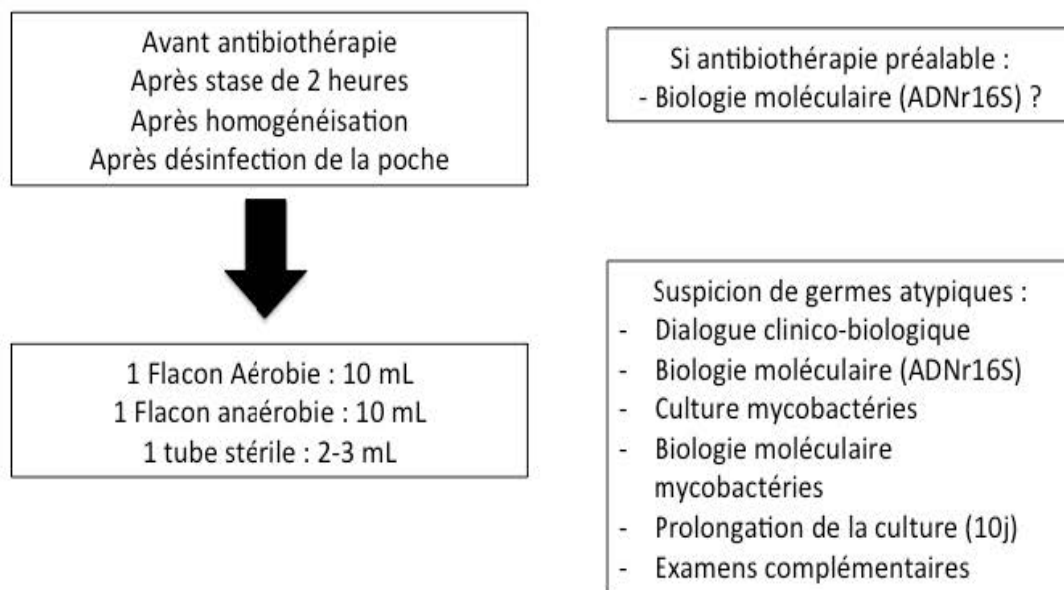


Figure 1. Proposition de prise en charge des prélèvements à visée bactériologique dans la suspicion de péritonites chez les patients traités par dialyse péritonéale

Enfin, il ne faut pas oublier que dans certains cas, les péritonites à culture négative peuvent être liées à d'autres étiologies que celles bactériennes : inflammations péritonéales sur ischémie mésentérique, infarctus splénique, causes médicamenteuses (amphotéricine B, vancomycine, dihydropyridines), excès d'acétaldéhyde, formation de fibrine dans la cavité péritonéale, présence de triglycérides, traumatismes des vaisseaux lymphatiques lors de l'insertion du cathéter, etc.(25).

En conclusion, le diagnostic étiologique des péritonites chez les patients traités par DP peut être difficile, mais la microbiologie moderne, via l'optimisation de la culture conventionnelle et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, peut permettre l'identification du germe responsable de l'infection dans la très grande majorité des cas.

CONFLITS D'INTERET

les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt pour cet article.

BIBLIOGRAPHIE

1. Monteon-Ramos FJ, Correa-Rotter R, Paniagua R, Amato D, Hurtado ME, Medina JL, et al. Prevention of peritonitis with disconnect systems in CAPD: A randomized controlled trial. *Kidney Int.* 1998;54(6):2123–8.
2. Li PKT, Szeto CC, Piraino B, Bernardini J, Figueiredo AE, Gupta A, et al. Peritoneal dialysis-related infections re-

commendations: 2010 update. *Perit Dial Int.* 2010;30(4):393–423.

3. Li PKT, Szeto CC, Piraino B, de Arteaga J, Fan S, Figueiredo AE, et al. ISPD peritonitis recommendations: 2016 update on prevention and treatment. *Perit Dial Int.* 2016; 36:481–508.

4. von Graevenitz a, Amsterdam D. Microbiological aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(1):36–48.

5. Rubin J, Rogers WA, Taylor HM, Everett ED, Prowant BF, Fruto L V., et al. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med.* 1980;92(1):7–13.

6. Yoon SH, Choi NW, Yun SR. Detecting bacterial growth in continuous ambulatory peritoneal dialysis effluent using two culture methods. *Korean J Intern Med.* 2010;25(1):82–5.

7. Sheth NK, Bartell CA, Roth DA. In vitro study of bacterial growth in continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids. *J Clin Microbiol.* 1986;23(6):1096–8

8. Katzap RM, Pagnussatti VE, Figueiredo AE, Motta JG, D'Avila DO, da Costa BEP, et al. Time to positivity of bacteria cultures in peritoneal dialysis fluid: Evaluation of different laboratory techniques. *Perit Dial Int.* 2017;37(3):342–4.

9. Jiang SH, Senanayake S, Talaulikar GS. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to *Mycobacterium smegmatis*. *Perit Dial Int.* 2011; 31: 215-6.

10. Song Y, Wu J, Yan H, Chen J. Peritoneal dialysis-associated nontuberculous mycobacterium peritonitis: A systematic review of reported cases. *Nephrol Dial Transplant.* 2012; 27:1639–44.

11. Varughese S, Bargman J. *Actinomyces neuii* PD peritonitis ? resolution of infection without catheter removal.

Perit Dial Int. 2014; 34: 815-6.

12. Kendrick-Jones J, Ratanjee SK, Taylor SL, Marshall MR. Nocardia asteroides peritoneal dialysis-related peritonitis: A case of successful treatment and return to peritoneal dialysis. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(8):2693-4.

13. Azzam O, Crowe A, Sajiv C, Pawar B. Rhodococcus equi peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: A first in Australia. BMJ Case Rep. 2015;2015.

14. Koz S, Sahin I, Kayabas U, Kuzucu C. Brucella and peritoneal dialysis related peritonitis: case report and review of literature. Clin Nephrol. 2014;82(4):283-6.

15. Ma TK wing, Lee KP, Chow KM, Pang WF, Ha Kwan BC, Leung CB, et al. Campylobacter peritonitis complicating peritoneal dialysis: A review of 12 consecutive cases. Perit Dial Int. 2013;33(2):189-94.

16. Yager JE, Ford ES, Boas ZP, Haseley LA, Cookson BT, SenGupta DJ, et al. Ureaplasma urealyticum continuous ambulatory peritoneal dialysis-associated peritonitis diagnosed by 16S rRNA gene PCR. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4310-2.

17. Ahmadi SH, Neela V, Hamat RA, Goh BL, Syafinaz AN. Rapid detection and identification of pathogens in patients with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) associated peritonitis by 16s rRNA gene sequencing. Trop Biomed. 2013;30(4):602-7.

18. Prasad N, Singh K, Gupta A, Prasad KN. Isolation of bacterial DNA followed by sequencing and differing cytokine response in peritoneal dialysis effluent help in identifying bacteria in culture negative peritonitis. Nephrology. 2018;23(2):148-54.

19. Yeo SH, Kwak JH, Kim YU, Lee JS, Kim HJ, Park KH, et al. Peritoneal dialysis-related peritonitis due to Ha-

lomonas hamiltonii A first case report. Med (United States). 2016;95(47).

20. Matsukuma Y, Sugawara K, Shimano S, Yamada S, Tsuruya K, Kitazono T, et al. A case of bacterial peritonitis caused by Roseomonas mucosa in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. CEN Case Reports. 2013;3(2):127-31.

21. Hächler H, von Graevenitz A, Vogt K, Binswanger U. Centrifugation of 50 ml of peritoneal fluid is sufficient for microbiological examination in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients with peritonitis. Infection. 1986;14(3):102-4.

22. DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF PERITONITIS IN CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIALYSIS. Report of a Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Lancet. 1987;329(8537):845-9.

23. Chang J, Park JS, Park S, Choi B, Yoon NS, Sung H, et al. Impact of monitoring blood volume in the BD BACTECTM FX blood culture system: Virtual volume versus actual volume. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015;81(2):89-93.

24. Kocyigit I, Unal A, Karademir D, Bahcebasi S, Sipahioglu MH, Tokgoz B, et al. Improvement in culture-negative peritoneal dialysis-related peritonitis: A single center's experience. Perit Dial Int. 2012;32(4):476-8.

25. de Freitas DG, Gokal R. Sterile peritonitis in the peritoneal dialysis patient. Perit Dial Int. 2005;25:146-51.

Reçu le 03/05/18, accepté après révision le 22/05/18, publié le 13/06/18