

# 8• Examens cyto- bactériologiques des sécrétions broncho- pulmonaires

## Plan du chapitre

- 1• Contextes identifiés
- 2• Objectifs
- 3• Difficultés de recueil : contamination salivaire
- 4• Pneumopathies communautaires
- 5• Pneumopathies nosocomiales sous ventilation artificielle
- 6• Pneumopathies à germes opportunistes chez l'immunodéprimé
- 7• Pneumopathies atypiques
- 8• Recherche de *Bordetella*
- 9• Recherche de *Nocardia*
- 10• Mucoviscidose

## 1• Contextes

Pneumopathies communautaires

Pneumopathies nosocomiales sous ventilation artificielle

Pneumopathie atypiques

Pneumopathies chez l'immunodéprimé

Mucoviscidose

Surinfections bronchiques (BPCO)

## 2• Objectifs

- Identifier la bactérie ou les bactéries en cause
- Différencier les bactéries commensales des pathogènes
- Étudier la sensibilité aux agents antimicrobiens.
- Rechercher une colonisation (surveillance épidémiologique)
- Identifier certains critères pronostiques (paucicellularité, bactérie muqueuse)
- Participer au suivi thérapeutique

## 3• Difficultés de recueil : contamination salivaire

De nombreuses espèces bactériennes responsables d'infections pleuropulmonaires peuvent être présentes à l'état de commensales dans l'oropharynx et la salive.

Ce sont notamment :

*Haemophilus influenzae*,  
*Streptococcus pneumoniae*,  
*Staphylococcus aureus*,  
 des bactéries anaérobies strictes.

## Micro-organismes responsables d'infections broncho- pulmonaires

	Pneumopathies		Surinfections bronchiques	Mucoviscidose
	communautaires	nosocomiales		
<i>S. pneumoniae</i>	■	■	■	■
<i>H. influenzae</i>	■	■	■	■
<i>S. aureus</i>	■	■	■	■
<i>M. catarrhalis</i>	■	■	■	■
<i>K. pneumoniae</i>	■	■	■	■
Autres BGN	□	■	■	■
<i>P. aeruginosa</i>	□	■	■	■
<i>Burkholderia cepacia</i>	□	■	□	■
Mycobactéries	●	●	●	□
<i>Nocardia</i>	●	●	□	□
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	●	●	□	□
<i>Mycoplasma</i>	●	●	□	□
<i>Legionella</i>	●	●	□	□
<i>Coxiella</i>	●	□	□	□
Anaérobies	□	●	□	□
<i>Candida</i>	□	●	□	□
<i>Aspergillus</i>	□	●	□	●

■ à rechercher dans tous les cas

● à rechercher dans des circonstances particulières

□ à rechercher de façon exceptionnelle

Une attention extrême doit être portée aux conditions de recueil de ces prélèvements. Il faut éviter la présence de salive qui risque de diluer la flore pathogène et de la contaminer par des bactéries commensales.

Sont considérées comme bactéries salivaires :

staphylocoques à coagulase négative,  
streptocoques autres que *S. pneumoniae*,  
corynéformes,  
*Neisseria* commensales.

Pour remédier à cet écueil important, plusieurs mesures sont préconisées :

- ◆ éliminer les prélèvements dont l'examen microscopique montre une contamination salivaire évidente ;
- ◆ procéder à une analyse quantitative de la flore bactérienne ;
- ◆ recueillir les sécrétions pulmonaires des malades ayant une pneumopathie grave au moyen de méthodes invasives mais plus fiables : brossage bronchique protégé et lavage broncho-alvéolaire.

Pour éviter la pullulation des bactéries commensales aux dépens de bactéries fragiles comme *S. pneumoniae*, le prélèvement doit être acheminé rapidement au laboratoire.

Dans les pneumopathies graves, l'examen bactériologique des sécrétions pulmonaires est complété utilement par la pratique d'hémocultures et éventuellement par l'examen du liquide pleural.

Les antibiotiques modifiant les flores, il est fondamental de recueillir les sécrétions bronchopulmonaires avant le début du traitement antibiotique si cela est possible.

#### 4 • Pneumopathies communautaires

➔ **Pour certains auteurs l'examen bactériologique du crachat en routine doit être proscrit.**

- ◆ Il ne doit pas retarder la mise en route du traitement probabiliste.
- ◆ Plus de 90 % de ces infections sont dues à un nombre limité d'espèces bactériennes à savoir :
  - *Streptococcus pneumoniae*,
  - *Haemophilus influenzae*,
  - *Mycoplasma pneumoniae*,
  - *Legionella pneumophila*,
  - *Chlamydia pneumoniae*.
- ◆ Ses résultats sont aléatoires en raison de la contamination salivaire.
- ◆ Le traitement antibiotique de première intention est prescrit de façon probabiliste en fonction de critères épidémiologiques.

- ◆ Ses indications sont alors limitées aux supurations bronchiques réfractaires.
- ◆ Les pneumopathies qui s'aggravent sous traitement justifient une hospitalisation et la mise en œuvre de méthodes invasives visant notamment à mettre en évidence une *Legionella* (voir ci-dessous).

➔ **Pour d'autres auteurs les indications sont moins restrictives.** Cet examen a une valeur informative à condition que :

- 1) le recueil de l'expectoration soit de bonne qualité ;
- 2) la qualité du prélèvement soit confirmée par l'examen microscopique ;
- 3) une signification clinique soit accordée uniquement à l'espèce prédominante si elle atteint ou dépasse le seuil de  $10^7$  bactéries/ml.

Si ces trois conditions sont remplies il est intéressant de procéder à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de la souche bactérienne isolée, particulièrement s'il s'agit de *S. pneumoniae*.

➔ **Le recueil de l'expectoration** doit respecter un protocole rigoureux : il doit se faire le matin, au réveil, après rinçage bucco-dentaire à l'eau distillée stérile et lors d'un effort de toux aidé, si besoin d'une kinésithérapie. L'examen bactériologique doit être effectué sans délai.

➔ **L'examen microscopique**

La technique suivie, décrite par Bartlett et adaptée par Murray et Washington, permet d'apprécier le degré de contamination par la salive. Elle consiste à examiner soit à l'état frais, soit un frottis coloré par la méthode de Gram au microscope à grossissement x 100 et à dénombrer en faisant une moyenne sur 10 champs les cellules épithéliales et les leucocytes par champ (après vérification de la morphologie à un grossissement plus fort).

Les résultats de l'examen microscopique permettent de distinguer 5 classes de crachats :

Classe	Cellules par champ	
	Épithéliales	Leucocytes
1	> 25	< 10
2	> 25	10 - 25
3	> 25	> 25
4	10 - 25	> 25
5	< 10	> 25

La présence de macrophages alvéolaires est le témoin de l'origine basse des sécrétions.

Les crachats de classe 1 et 2 sont fortement contaminés par la salive. Ils ne sont pas utilisables pour la culture. Un autre prélèvement est à demander.

Les crachats de classe 3, 4 ont un nombre de leucocytes qui témoigne d'une réaction inflammatoire mais sont contaminés par la salive.

Les crachats de classe 5 sont les plus appropriés pour l'examen bactériologique.

Ceux de classe 4 sont acceptables.

### ➔ Cultures et dénombrement

Après fluidification du prélèvement on ensemence une dilution appropriée permettant un dénombrement des bactéries au delà de  $10^5$  UFC/ml sur :

- ◆ gélose chocolat enrichie (5 à 10 % de  $\text{CO}_2$ ) avec ou sans bacitracine

- ◆ gélose au sang

- ◆ gélose sélective pour les bacilles à Gram –

Habituellement on se limite à l'identification et à l'antibiogramme d'une ou deux espèces bactériennes en quantité  $10^7$  bactéries par ml.

## 5 • Pneumopathies nosocomiales sous ventilation artificielle

- Elles sont fréquentes : 10 à 30 % des malades sous respirateur.
- Elles sont graves : mortalité 20 à 50 %.
- L'isolement des micro-organismes en cause est la clé du traitement.

### 1- Principales espèces responsables

Ce sont les bacilles à Gram négatif (BGN) pour 60 % des cas et les staphylocoques pour 40 % des cas. Dans un tiers des cas, il s'agit d'une infection polymicrobienne.

- ◆ Les BGN sont par ordre de fréquence :

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Klebsiella* - *Enterobacter* - *Serratia*

- ◆ Les staphylocoques sont *Staphylococcus aureus* (30 %) et aussi *S. epidermidis* (10 %).

- ◆ Les *Candida* spp. sont trouvés avec une fréquence croissante, jusqu'à 10 % des cas.

- ◆ Parmi les autres espèces, citons :

- *S. pneumoniae* et *H. influenzae*, au cours de pneumopathies nosocomiales précoces (moins de 5 jours d'hospitalisation) ;
- les bactéries anaérobies dont la fréquence est

probablement sous-estimée et dont l'incidence est importante lors des pneumopathies de déglutition ;

- *Legionella pneumophila*.

### 2- Méthodes préconisées

Le diagnostic microbiologique le plus fiable d'une pneumopathie nosocomiale est assuré par l'association :

- d'une culture quantitative à partir d'un prélèvement endobronchique protégé distal et dirigé vers la lésion ;
- de l'examen cyto-bactériologique des sécrétions issues de poumon profond.

Trois techniques de recueil des sécrétions sont utilisées couramment :

- le brossage bronchique protégé (BBP),
- le lavage broncho-alvéolaire (LBA),
- l'aspiration endotrachéale (AET).

La BBP est la méthode de référence pour établir le diagnostic de pneumonie. Lorsque BBP et LBA sont associés, la sensibilité et la spécificité de ces examens dépassent 90 %. Ces examens invasifs permettent d'orienter le traitement antibiotique.

L'AET est pratiquée si les deux méthodes invasives ne sont pas réalisables notamment chez le nourrisson. Chez l'adulte, elle a essentiellement une valeur prédictive négative.

### 3- Brossage bronchique protégé

- ◆ La référence demeure le dispositif de Wimberley constitué d'une brosse en nylon fixée à l'extrémité d'un guide métallique. Brosse et guide coulisent à l'intérieur d'un premier cathéter, lui-même placé à l'intérieur d'un second cathéter, obturé par un bouchon de polyéthylène glycol.

- ◆ Cette brosse télescopique est glissée au travers d'un fibroscope et dirigée sous contrôle de la vue dans une petite bronche de 4<sup>e</sup> ordre drainant le territoire pulmonaire radiologiquement suspect. Le cathéter interne est alors poussé, expulsant le bouchon et permettant d'avancer la brosse de quelques centimètres, pour réaliser le prélèvement bactériologique.

- ◆ Après cela les manœuvres inverses sont effectuées : on désinfecte alors la partie externe du cathéter interne par de l'alcool à 90°C, puis on fait sortir la brosse interne et on la coupe avec des ciseaux stériles pour qu'elle tombe dans 1 ml de liquide (eau physiologique tamponnée stérile ou liquide de Ringer) que l'on agite sur place au lit du malade (agitation mécanique de type vor-

tex) pendant 2 min. Le prélèvement est apporté sans délai au laboratoire.

- ◆ Après avoir prélevé la quantité nécessaire à la culture on réalise une coloration de Gram sur le culot de centrifugation. La culture quantitative s'effectue dans les conditions décrites plus haut.
- ◆ Un seuil de  $10^3$  UFC/ml est considéré comme significatif. La sensibilité et la spécificité sont de l'ordre de 70 % c'est à dire qu'il est observé environ 30 % de faux négatifs.
- ◆ Le seuil de significativité peut être abaissé à  $5.10^2$  UFC/ml notamment chez les malades recevant des antibiotiques. Chez ces malades un dénombrement bactérien  $< 10^3$  UFC/ml ne peut éliminer le diagnostic d'infection pulmonaire.

#### 4- Lavage broncho- alvéolaire

- ◆ La technique consiste à instiller après blocage du bronchofibroscope dans une bronche segmentaire ou sous-segmentaire des échantillons de 50 ml de sérum physiologique (à 37°C) 4 à 6 fois et on ramène entre 20 et 60 % de la quantité injectée.
- ◆ Le LBAa plusieurs avantages : possibilité d'examen microscopique du culot de centrifugation du liquide, exploration d'un territoire pulmonaire plus important que le BBP, recueil d'une plus grande quantité de sécrétions.
- ◆ Chez les malades intubés et ventilés, suspects de pneumonie nosocomiale, la concordance entre BBP et LBAest de 90 % environ.
- ◆ Cette méthode de prélèvement est particulièrement utile pour le diagnostic des pneumopathies observées chez les immunodéprimés et permet de rechercher : des bactéries (*Nocardia*, *Legionella*, mycobactéries, *Mycoplasma pneumoniae*, *Actinomyces*) mais également des virus (*Cytomegalovirus*, *Herpes*), des parasites (*Pneumocystis carinii*), des champignons et levures (*Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida*).
- ◆ Le traitement des échantillons consistera à :
  - centrifuger 30 à 40 ml de liquide dans un tube conique stérile à 5000 tours pendant 10 minutes ;
  - à partir du culot, faire des frottis et procéder aux colorations suivantes : Gram, Ziehl-Neelsen (Gram-Weigert ou Gomori-Grocott pour la recherche de *Pneumocystis*), immunofluorescence directe pour la recherche de *Legionella*.

La prise en compte et la numération des cellules (> à 7 %) du lavage broncho-alvéolaire conte-

nant des bactéries intracellulaires permettrait de prédire dès l'examen direct l'existence d'une pneumopathie bactérienne chez les malades ventilés.

- ◆ Les cultures et le dénombrement sont réalisés dans les conditions indiquées plus haut.
- ◆ Un dénombrement des germes banals supérieur à  $10^4$  UFC/ml est généralement considéré comme significatif d'une pneumonie.

#### 5- Aspiration endotrachéale (AET)

L'aspiration des sécrétions par la sonde d'intubation est une méthode alternative lorsque les méthodes invasives sont contre-indiquées. Le risque de contamination par la flore buccosalivaire est important. Différents critères d'acceptabilité du prélèvement sont proposés.

- ◆ Chez l'adulte, après coloration de Gram ne sont mis en culture que les prélèvements contenant des bactéries visibles au microscope (grossissement x 1000) ou contenant moins de 10 cellules épithéliales par champ microscopique (grossissement x 100).
- ◆ Chez l'enfant, le seul critère permettant de rejeter un prélèvement est l'absence de bactéries visibles après coloration de Gram (grossissement x 1000).

### 6 • Pneumopathies à germes opportunistes chez l'immunodéprimé

La méthode de prélèvement de choix est le lavage broncho-alvéolaire. Ici ne se pose pas le problème de la contamination par la flore oropharyngée.

Les micro-organismes à rechercher sont :

- *Pneumocystis carinii*
- *Toxoplasma gondii*
- CMV
- *M. tuberculosis*
- *Aspergillus* spp
- *Candida* spp
- *Cryptococcus neoformans*

### 7 • Pneumopathies atypiques

- ◆ Recherche de *Chlamydia psittaci* et *C. pneumoniae* : préférentiellement à partir de l'écouvillonnage de l'oropharynx postérieur.
- ◆ Pneumopathie néonatale : recherche de *Chlamydia trachomatis* dans les aspirations nasopharyngées ou la gorge.

- ◆ Recherche de *Mycoplasma pneumoniae* : les expectorations étant trop contaminées par la flore commensale le recueil des sécrétions doit être réalisé par brosse endo-bronchique ou lavage broncho-alvéolaire.
- ◆ Recherche de *Legionella* dans les sécrétions recueillies par brosse endo-bronchique ou lavage broncho-alvéolaire par IFD sur le culot et par culture sur BCYE additionné d'antibiotiques. L'incubation se poursuit durant 10 jours avec une observation journalière à la loupe binoculaire. La recherche de *Legionella* par amplification est réalisée dans certains laboratoires principalement sur les LBA, de même que la recherche précoce d'antigènes urinaires.

## 8 • Recherche de Bordetella

La majeure partie des cas de coqueluche observés en France le sont chez des enfants de moins de 2 ans ou chez des adultes anciennement vaccinés qui peuvent faire des formes atypiques de la maladie.

- ◆ Le prélèvement doit être le plus précoce possible, ce qui est difficile en dehors d'un contexte épidémique. Recueilli par aspiration nasopharyngée postérieure, il est acheminé au laboratoire dans les 2 heures à température ambiante.
- ◆ L'immunofluorescence directe manque de sensibilité et de spécificité. Elle n'est pas recommandée.
- ◆ La culture est une méthode délicate, spécifique mais peu sensible. Elle s'effectue sur milieu de Bordet et Gengou ou sur milieu de Reagan et Lowe au charbon additionné de 15 à 20 % de sang de cheval ou de mouton, additionné ou non de céphalexine. *B. pertussis* se développe après incubation à 37°C pendant 4 à 6 jours.
- ◆ La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est spécifique et sensible, mais elle n'est pas disponible en routine.
- ◆ La recherche de l'adénylate cyclase sécrétées par *B. pertussis* est une méthode qui a une bonne sensibilité, mais une spécificité moyenne. Intéressante par sa rapidité, elle vient en complément de la culture.

## 9 • Recherche de Nocardia

Elle s'effectue principalement sur les LBA. L'examen direct après coloration de Gram peut montrer des bacilles à Gram positif ramifiés. Une coloration de Ziehl à froid est conseillée. La culture est

réalisée sur gélose au sang incubée pendant 20 jours. L'identification complète est confiée à un laboratoire spécialisé.

## 10 • Mucoviscidose

Des recommandations pour l'analyse bactériologique des prélèvements d'expectoration chez les patients atteints de mucoviscidose ont été publiées par un groupe de travail spécifique. Ces recommandations sont reproduites ci-dessous.

### Recommandations pour l'analyse bactériologique des prélèvements d'expectoration chez les patients atteints de mucoviscidose

**Groupe de travail** : P.Y. Allouch, O. Bajolet,

E. Bingen, G. Chabanon, J.P. Flandrois, N. Marty, M. de Montclos, H. Monteil, B. Pangon, P. Plésiat, V. Vernet, M. Weber

**Coordonnateur** : B. Pangon

La mucoviscidose est une maladie chronique dont l'une des principales manifestations est la survenue d'infections respiratoires. Au cours des épisodes infectieux, le clinicien ne décide pas de la thérapeutique ou de ses modifications sur des critères uniquement cliniques. Il a besoin pour l'aider dans sa décision d'un prélèvement microbiologique accompli selon des règles rigoureuses et interprétées de façon homogène.

Pour la recherche d'une meilleure qualité des soins, il est apparu nécessaire d'établir des recommandations portant sur l'analyse bactériologique de l'expectoration. Ces recommandations concernent la qualification des prélèvements, le seuil de dénombrement des différentes espèces, les milieux de culture et l'antibiogramme.

### 1- Critères de qualité des prélèvements

La qualité du prélèvement est évaluée par la coloration de Gram selon les critères microscopiques habituels : rapport entre le nombre de polynucléaires neutrophiles et le nombre de cellules épithéliales pharyngées. La flore bactérienne présente est décrite.

Les échantillons ne répondant pas aux critères de qualité (absence de polynucléaires neutrophiles) ne sont pas considérés comme impropre à l'analyse. Mais la mauvaise qualité du prélèvement doit être signalée afin qu'un autre échantillon soit éventuellement adressé au laboratoire.

## 2- Seuil de dénombrement des différentes espèces

Les échantillons sont homogénéisés dans une solution de fluidificateur pour expectorations et un dénombrement est réalisé selon les critères suivants :

- ◆ Pour les **patients dont le diagnostic de mucoviscidose est récent** et pour lesquels la colonisation à *P. aeruginosa* n'est pas connue :
  - Le seuil inférieur de dénombrement doit être de  $10^2$  UFC/ml pour *P. aeruginosa* et *B. cepacia*.
  - Le seuil inférieur de dénombrement doit être de  $10^5$  UFC/ml pour les espèces n'appartenant pas à la flore commensale : bacilles à Gram négatif type Entérobactéries ou non fermentants et pour les 3 espèces pathogènes suivantes appartenant aussi à la flore saprophyte : *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*.
- ◆ Pour les **patients dont le diagnostic de mucoviscidose est plus ancien** : c'est-à-dire dont la colonisation à *P. aeruginosa* est connue :
  - Le seuil inférieur de dénombrement doit être de  $10^2$  UFC/ml pour *B. cepacia*.
  - Le seuil inférieur de dénombrement doit être de  $10^5$  U.F.C./ml pour les espèces n'appartenant pas à la flore commensale : bacilles à Gram négatif type Entérobactéries ou non fermentants y compris *P. aeruginosa* et pour les 3 espèces pathogènes suivantes appartenant aussi à la flore commensale : *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*.

La sérotypie de *P. aeruginosa* est de peu d'apport (beaucoup de souches ne sont pas typables). En revanche, la description du caractère muqueux ou non des souches est d'un réel apport pour le clinicien.

## 3- Milieux de culture

Les prélèvements doivent êtreensemencés au minimum sur les milieux suivants :

- ◆ Gélose nutritive permettant la croissance de *S. pneumoniae*, *S. aureus* et *S. pyogenes*.
- ◆ Gélose nutritive permettant la croissance de *Haemophilus*.
- ◆ Gélose sélective permettant la croissance de bacilles à Gram négatif et plus particulièrement *P. aeruginosa* et *B. cepacia*.
- ◆ Gélose permettant la croissance de champignons (*Candida*, *Aspergillus*).

Tous les milieux sont incubés 48 à 72 heures à 37°C après une première observation à 24 heures.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la recherche de mycobactéries ne semble pas devoir être systématisée en dehors d'un contexte clinique particulier.

## 4- Recommandations pour l'antibiogramme

- ◆ Un antibiogramme restreint est réalisé avec recherche de bêta-lactamase pour :
  - *Haemophilus influenzae*.
  - *Moraxella catarrhalis*.
- ◆ Un antibiogramme pour les cocci à Gram positif : *S. aureus*, *S. pneumoniae*.
- ◆ Un antibiogramme pour les bacilles à Gram négatif :
  - Pour chaque morphotype dominant de *P. aeruginosa*.
  - Pour *B. cepacia*.
  - Pour les autres bacilles à Gram négatif non fermentants (*S. maltophilia*, *A. xylosoxidans*).
    - Certaines molécules ne doivent pas être oubliées : ticarcilline, ceftazidime, aztréonam, imipénème, tobramycine, amikacine, ciprofloxacine, colimycine.
    - D'autres molécules peuvent être testées : ticarcilline + ac. clavulanique, pipéracilline + tazobactam, céfépime, moxalactam, cotrimoxazole, isépaïmicine.

## Bibliographie

- FOUCAUD, P., PANGON, B., PETITPREZ, P., ALLOUCH, P., Infections bronchopulmonaires chez les enfants atteints de mucoviscidose. *Infect. Immunol.*, 1996, 3 : 272-276.
- LEROY, O., GEORGES, H., BEUSCART, C., SANTRE, C., MOUTON, Y., Analyse critique des critères de diagnostic des pneumonies nosocomiales. *Lettre Infect.*, 1994, 9 : 339-343.
- MEDURI, G.U., CHASTRE, J., The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator-associated pneumonia. *Chest*, 1992, 102 suppl. : 555 S-563 S.
- MORRIS, A.J., TANNER, D.C., RELLER, L.B., Rejection criteria for endotracheal aspirates from adults. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31 : 1027-1029.
- MURRAY, P., WASHINGTON, J.A., Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo. Clin. Proc.*, 1975, 50 : 339-344.
- ZAIDI, A., RELLER, B., Rejection criteria for endotracheal aspirates from pediatric patients. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34 : 352-354.
- GUISSO N., Diagnostic biologique de l'infection à *Bordetella pertussis*. *Lettre Infect.*, 1995, 10 : 315-320.