

4. Examen cyto bactériologique des sécrétions broncho pulmonaires

L'examen cyto bactériologique des sécrétions broncho-pulmonaires est un examen médical qui a comme objectifs :

- Recherche de bactéries responsables d'infections broncho-pulmonaires (Pneumopathies);
- Détermination de traitement adapté ;
- Surveillance d'efficacité de traitement en cours.

4.1. Examen macroscopique

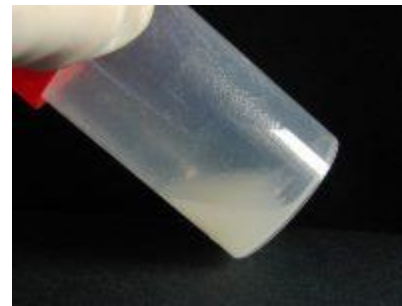
Cet examen macroscopique concerne seulement les expectorations (crachat) et les aspirations bronchiques. On décrira si l'aspect est :

- Muqueux : donnant un aspect en gelée avec de rares parcelles purulentes ;
- Mucopurulent : muqueux avec des parcelles de pus plus nombreuses ;
- Salivaire ;
- Fluide et purulent ;
- Visqueux et adhérent.

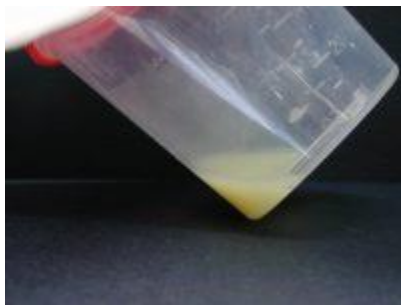
Préciser aussi la couleur éventuellement : rouille, verdâtre, hémoptoïque (sang). De même, la perception d'une odeur fétide témoigne de la présence des bactéries anaérobies.



muqueux



salivaire



fluide et purulent



visqueux et adhérent

Figure 07 : Différents aspects macroscopiques de crachat.

4.2. L'examen microscopique : L'examen microscopique présente deux objectifs :

- évaluer la qualité du prélèvement en s'assurant d'une part qu'il n'a pas été trop contaminé lors du passage par les voies aérienne supérieures et d'autre part qu'il provient bien d'un foyer infectieux (présence de granulocytes neutrophiles).
- observer la flore bactérienne de l'expectoration afin d'orienter rapidement le diagnostic et choisir les méthodes pour le confirmer.

Tout d'abord, c'est dans les parcelles purulentes que la probabilité de trouver l'agent infectieux est la plus grande. Il s'agit donc de prélever une parcelle purulente, de l'écraser entre 2 lames et de l'étaler sur 3 lames pour une coloration de au bleu de méthylène ou MGG, coloration de Gram, coloration de Ziehl-Neelsen ou à l'auramine.

- **Coloration au bleu de méthylène :** Apprécier les cellules présentes : Cellules épithéliales, polynucléaires, lymphocytes, autre cellules, et confirmer la qualité du prélèvement ou le rejeter (critères de Bertlett) (**Tab. 03**).

Tableau 03 : Confirmation de la qualité du prélèvement.

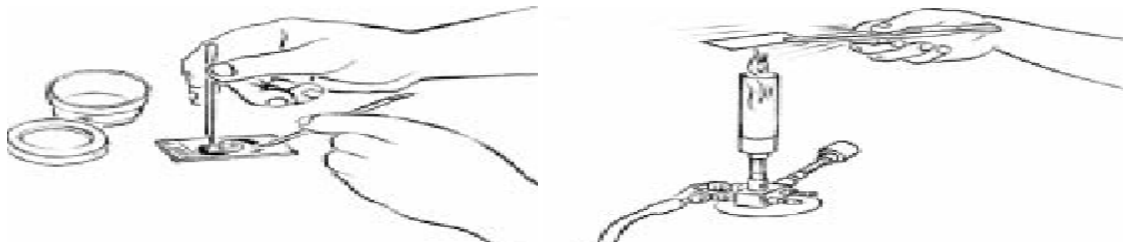
Nombre de cellules par champ : objectif x100			Interprétation selon les critères de Bertlett*
Cellules épithéliales	Leucocytes		
1	>25	<25	Contamination salivaire – prélèvement à rejeter
2	>25	>25	Réaction inflammatoire – contamination salivaire
3	10-25	>25	Prélèvement acceptable
4	<10	>25	Prélèvement adapté

- **Coloration de Gram** : Apprécier la flore bactérienne.
- **Coloration de Ziehl-Neelsen**

La **coloration de Ziehl-Neelsen** est une méthode de coloration permettant l'identification des mycobactéries au microscope. Elle fait partie des colorations qui mettent en évidence l'acido-alcoolo-résistance, caractère fondamental des mycobactéries, en prenant en compte la difficulté de pénétration des colorants. Les étapes sont les suivantes :

➤ **Préparation de frotti**

- Etaler l'expectoration régulièrement sur la zone centrale de la lame grâce à un mouvement continu de rotation ; on recommande un étalement d'environ 20 mm sur 10mm.
- Placer les lames sur le séchoir avec la surface d'étalement vers le haut et laisser sécher à l'air durant environ 30 minutes.
- Procéder à la fixation des lames séchées en les tenant avec une pince et en les passant sur la flamme 5 fois pendant environ 4 secondes, la face d'étalement tournée vers le haut.



➤ **Coloration**

- ① Placer les lames fixées sur le support de coloration selon leur numéro d'ordre, la face d'étalement vers le haut. Les lames devraient être séparées par un intervalle d'1 cm et ne jamais se toucher l'une l'autre.
- ② Recouvrir les lames l'une après l'autre au moyen de la solution de travail de fuchsine phéniquée de Ziehl à 0,3 % filtrée.
- ③ En plaçant une bande de papier absorbant comme un papier filtre ou même du papier journal, on retiendra la solution de coloration et on évitera le dépôt de cristaux de fuchsine sur le frottis.
- ④ Chauffer les lames par le dessous au moyen de la flamme d'un bec Bunsen, d'une lampe à alcool ou d'un tampon d'ouate imbibé d'alcool, jusqu'à émission de vapeur. Il ne faut jamais aller jusqu'à l'ébullition de la solution de colorant. Ne pas laisser le colorant se dessécher
- ⑤ Laisser les lames recouvertes d'une solution chaude et fumante de fuchsine phéniquée pendant 5 minutes en repassant la flamme si c'est nécessaire.
- ⑥ Rincer les lames délicatement à l'eau pour écarter l'excès de fuchsine phéniquée.
- ⑦ Evacuer l'excès d'eau de rinçage des lames. Les frottis d'expectoration ont une couleur rouge.

➤ **Décoloration**

- ① Recouvrir les lames au moyen d'acide sulfurique à 25 % ou d'une solution d'alcoolacide et laisser agir pendant 3 minutes, après cela la coloration rouge devrait avoir presque disparu. En cas de nécessité, répéter cette séquence durant deux minutes supplémentaires.

② Laver délicatement l'acide sulfurique ou l'alcool-acide et l'excès de colorant à l'eau. Evacuer des lames l'excès d'eau de rinçage.

➤ **Contre-coloration**

① Recouvrir les lames l'une après l'autre avec la solution de contre-coloration (bleu de méthylène à 0,3 %) et laisser agir pendant 1 minute.

② Rincer les lames à l'eau individuellement

③ Evacuer l'eau des lames et les laisser sécher à l'air.

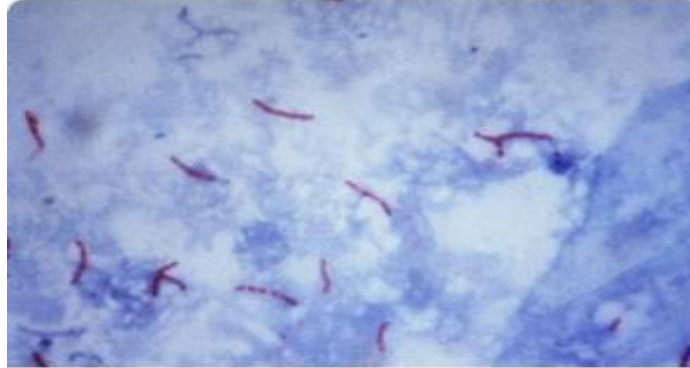


Figure 08 : *Mycobacterium tuberculosis* par la coloration de Ziehl-Neelsen.

➤ **La coloration à l'auramine**

La coloration à l'auramine est une coloration en fluorescence, pour la mise en évidence des mycobactéries. (Les BAAR ou Bacilles Acido-Alcool Résistants). Ils sont colorés en jaune-vert fluorescent sur fond rouge. C'est une alternative à la coloration de Ziehl-Neelsen pour la mise en évidence des mycobactéries. Elle permet d'augmenter la sensibilité de l'examen direct et permet un screening plus rapide. Un résultat positif à la coloration par l'auramine doit être confirmé par une coloration de Ziehl-Neelsen (qui peut être réalisé sur la même lame).

Voici la technique selon la méthode de Degommier :

- 1) Recouvrir la lame d'alcool méthylique : 2 minutes
- 2) Rincer à l'eau distillée
- 3) Recouvrir la lame d'auramine : 15 minutes
- 4) Rincer à l'eau distillée
- 5) Recouvrir la lame d'alcool acide : 5 minutes
- 6) Rincer à l'eau distillée
- 7) Recouvrir la lame de rouge de thiazine : 1 minute 30
- 8) Rincer à l'eau distillée
- 9) Recouvrir la lame d'alcool acide : 3 minutes
- 10) Rincer à l'eau distillée
- 11) Laisser sécher à l'air libre ou dans une étuve

La lecture se fait avec un microscope à fluorescence, de préférence dans une pièce sombre. Les BAAR apparaissent en vert/jaune brillant sur fond rouge orangé. Ceci permet une exploration rapide du frottis (3 à 5 minutes); la lecture peut se faire à faible grossissement : x25 pour un dépistage rapide et x40 pour confirmation. On doit observer au minimum 30 champs pour déclarer une lame négative (où il n'y a pas de BAAR).

4.3. Mise en culture

La liste des milieux ensemencés est généralement déterminée à l'avance et dépend des germes recherchés et donc des contextes cliniques (**Tab. 04**).

Tableau 04 : Milieux et conditions de culture.

Milieux	Justification de l'usage	Conditions d'incubation
Ensemencement systématique		
Gélose chocolat enrichie (gélose chocolat + polyvitex)	Gélose non sélective qui permet la culture de la plupart des bactéries aérobies rencontrées dans les crachats.	37° C Atmosphère humide enrichie en CO ₂
Gélose au sang frais + ANC (acide nalidixique + colistine)	Les deux antibiotiques inhibent la plupart des bactéries Gram -, ce milieu permettra donc un meilleur isolement des streptocoques et des staphylocoques,	37° C Atmosphère enrichie en CO ₂
Gélose chocolat enrichie + bacitracine (50 UI/mL) avec ou sans vancomycine	Milieu sélectif des <i>Haemophilus</i>	37° C Atmosphère humide enrichie en CO ₂
Gélose Drigalski ou Mac Conkey	Elle permet une meilleure orientation des bacilles à Gram négatifs non exigeants	37° C Atmosphère ordinaire
Ensemencement non systématique		
Gélose BCYE	Gélose non sélective pour la culture des <i>Legionella</i> ensemencement non systématique	35° C Atmosphère ordinaire
Gélose BCYE sélective (GVPC)	Gélose sélective utile à la culture des <i>Legionella</i> , intéressante aussi pour les <i>Nocardia</i> ensemencement non systématique	35° C Atmosphère ordinaire
Gélose Sabouraud + chloramphénicol ± gentamicine	Gélose sélective des champignons son ensemencement se justifie si des levures ou des moisissures sont observées à l'examen microscopique (à ensemercer directement avec le crachat fluidifié).	37° C Atmosphère ordinaire
Gélose Schaedler + sang de mouton + néomycine et vancomycine	Gélose sélective des bacilles à Gram négatifs anaérobie stricte. son ensemencement dépend du contexte (expectoration fétide)	37° C Anaérobiose

4.4. Interprétation des résultats

De nombreux microorganismes responsables d'infections broncho-pulmonaires proviennent des flores commensales des voies aériennes supérieures et peuvent coloniser les voies aériennes inférieures sans provoquer une infection. Pour cette raison, il est nécessaire de distinguer une colonisation d'une infection. C'est pourquoi, il faut connaître la concentration des différents germes dans le prélèvement. En effet, on considère qu'un germe est responsable d'une infection broncho-pulmonaire si sa concentration dans le prélèvement dépasse un certain seuil. Notons que les seuils retenus dépendent du mode de recueil des sécrétions.

Tableau 05: Protocoles pour un dénombrement des germes et seuils définissant la pathogénicité selon les modalités du prélèvement.

	Dilution finale obtenue	Volume de l'inoculum	Seuils définissant la pathogénicité
Expectoration	1/10000	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ⁷ UFC/mL
	1/1000	10 µL	
Aspiration endotrachéale	1/100	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ⁵ UFC/mL
Aspiration bronchique		10 µL	
Aspiration bronchique protégée	1/2*	100 µL	≥ 50 colonies /boite soit 10 ³ UFC/mL
Lavage bronchoalvéolaire	1/10*	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ⁴ UFC/mL
Mini- LBA	Pas de dilution*	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ³ UFC/mL
Brossage bronchique protégé	Pas de dilution* / extrémité de la brosse dans 1 mL d'eau physiologique	100 µL	≥ 100 colonies /boite soit 10 ³ UFC/mL

5. Examen cyto- bactériologique et biochimique du liquide céphalo- rachidien (LCR)

L'examen du liquide céphalorachidien (LCR) est une urgence dans laquelle le rôle du laboratoire est fondamental: il permet très rapidement de confirmer un diagnostic de méningite, de reconnaître une cause bactérienne et d'orienter un traitement antibiotique. En effet, la méningite bactérienne est une maladie grave, et c'est seulement un traitement précoce et efficace qui peut conduire à une guérison sans séquelles.

L'analyse biologique du liquide céphalorachidien comporte trois étapes:

- L'examen direct avec l'étude macroscopique et microscopique pour la recherche des cellules et bactéries ;
- La mise en culture suivie le lendemain de l'identification et de l'antibiogramme du micro-organisme isolé ;
- L'examen biochimique : dosage des protéines, du glucose et des chlorures.

5.1. Examen macroscopique

Après homogénéisation par une légère agitation, on note le degré de limpidité du liquide et sa coloration.

- **Un liquide clair** (appelé souvent eau de roche) correspond soit à un liquide normal, soit à un liquide pathologique: les liquides clairs peuvent se rencontrer dans les méningites virales, tuberculeuses, mycosiques ou à leptospires.
- **Un liquide trouble** ou franchement purulent (eau de riz) correspond à une réaction leucocytaire marquée, traduisant généralement une méningite bactérienne.
- En cas de **piqûre d'un vaisseau** au cours de la ponction, on note une coloration rouge du liquide, plus marquée dans le premier tube que dans le dernier, avec souvent formation d'un petit caillot.
- **Les liquides sanglants ou jaunes** (appelés xanthochromiques) dans les trois tubes évoquent plutôt une hémorragie méningée, sans toutefois éliminer systématiquement une méningite.

5.2. Examen microscopique

Les examens microscopiques sont des examens d'urgence. Ils permettent l'orientation du diagnostic d'une méningite. Ils doivent être communiqués au clinicien dès leur réalisation. Il comporte :

5.2.1. Examen cytologique (qualitatif et quantitatif)

Les **examens cytologiques** sont importants, ils permettent d'orienter vers la méningite purulente ou lymphocytaire et permettent également de suivre l'évolution de l'infection.

➤ Examen quantitatif (Numération des cellules)

La numération cellulaire est un examen d'urgence. Elle permet l'orientation du diagnostic. C'est une étape très importante dans l'ECB du LCR. Après homogénéisation du liquide céphalorachidien, la numération des leucocytes et des hématies est effectuée en cellule de Malassez. La cellule de Malassez contient 1 mm^3 . Elle est divisée en dix bandes de $1/10 \text{ mm}^3$. Chaque bande est divisée en dix rectangles de $1/100$ de mm^3 (quadrillés ou non). Cet examen consiste à compter le nombre de leucocytes sur plusieurs champs ou bandes en fonction de la richesse de la cellule. Pour faciliter l'examen, on peut ajouter une trace de colorant (solution de bleu de méthylène) à quelques gouttes du liquide céphalorachidien. Un LCR normal contient moins de 5 leucocytes / mm^3 chez l'adulte et entre 10 et 30 leucocytes / mm^3 dont 50% de polynucléaires neutrophiles chez le nourrisson.

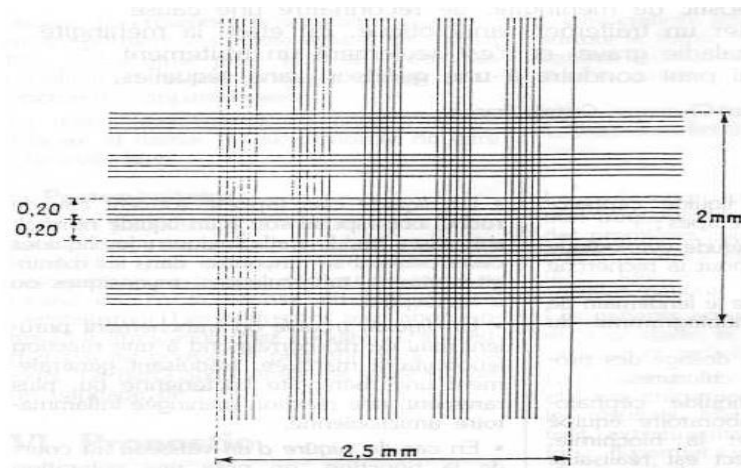


Figure 10 : Cellule de Malassez.

➤ Examen qualitatif des éléments

Il doit être fait dès que le nombre de cellules dépasse dix par mm^3 . Centrifuger le liquide céphalorachidien à 5 000 tours/mn pendant cinq à dix minutes dans un tube conique stérile.

Décantier le surnageant (dans un récipient contenant de l'eau de Javel). Maintenir le tube incliné à 45° , la partie effilée dirigée vers le haut. Introduire une effilure de pipette Pasteur au contact du culot: celui-ci monte spontanément par capillarité. Le répartir sur deux lames à raison d'une goutte par lame (**Fig. 11**). Étaler de façon à ne pas disperser les éléments. Dans le cas d'un culot important, étaler en couche mince, dans le cas contraire, concentrer l'échantillon sur une petite surface. Laisser sécher. Colorer la première lame avec du bleu de méthylène, ou du colorant de May Grünwald Giemsa. Etablir une formule en pourcentages respectifs des polynucléaires, des lymphocytes et des monocytes (compter au moins 100 éléments).

Les liquides clairs contiennent en général une majorité de lymphocytes, alors que les liquides troubles sont le plus souvent à prédominance de polynucléaires. On trouve:

- une majorité de polynucléaires dans les méningites bactériennes ;
- une majorité de lymphocytes dans les méningites virales, tuberculeuses, ou mycosiques;
- parfois des formules mixtes, en particulier dans les formes de début et au cours des méningites à *Listeria*.

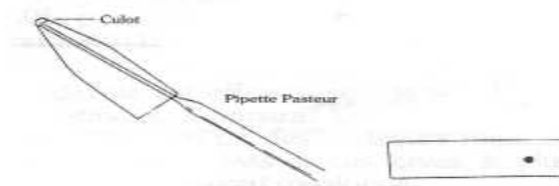


Figure 11

-Coloration au bleu de méthylène : La coloration au bleu de méthylène permet de faire la différence entre les polynucléaires et les lymphocytes. Elle permet également de voir l'aspect morphologique des bactéries (bacilles, Cocci, diplocoques, chainettes...etc.)

-Coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) : Cette coloration permet d'établir l'équilibre leucocytaire dans le LCR (Exemple : 80% de PNA, 20% de lymphocytes).

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) est la coloration de référence pour l'analyse des cellules en hématologie cellulaire. Elle colore les éléments acidophiles ainsi que les granulations neutrophiles des leucocytes et des lymphocytes. La technique de coloration est :

- Couvrir le frottis avec 1 mL de May-Grünwald en solution pendant 3 minutes.
- Ajouter avec précautions 1 mL de Tampon en solution pour hématologie et réaliser le mélange sans débordement. Laisser le mélange en contact 1 minute.
- Rejeter l'excès de colorant par égouttage ou rinçage rapide.
- Couvrir le frottis avec le Colorant de Giemsa R diluée au 1/30 dans un Tampon en solution pour Hématologie pendant 10 minutes.
- Rinçage rapide à l'eau courante ou dans un Tampon en solution pour Hématologie pendant 10 secondes.

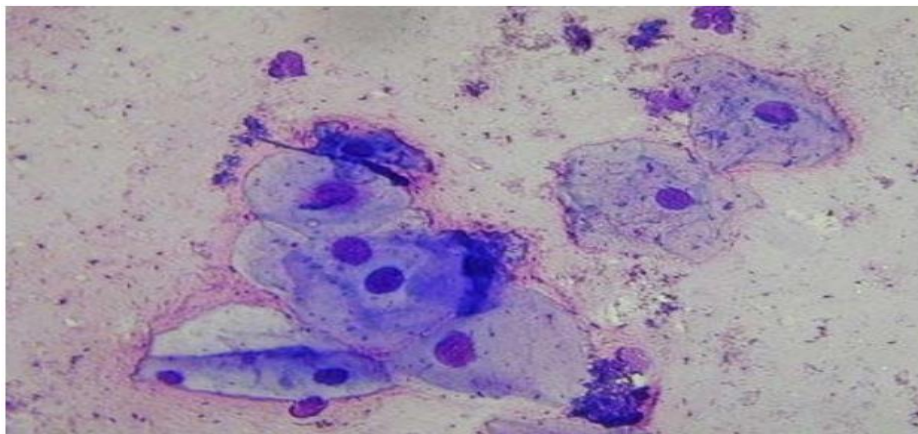


Figure 09 : Observation après coloration MGG.

5.2.2. Examen bactériologique

- **Coloration de Gram** : La coloration de Gram permet d'avoir l'aspect morpho-tinctorial des bactéries.
- **Coloration Ziehl neelsen** : La coloration de Ziehl neelsen permet la recherche des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR).

5.3. Examens biochimique

En plus de l'ECB du LCR, des examens de biochimie sont également effectués à partir du LCR. Cet examen permet d'identifier essentiellement les mesures de la protéinorachie et Glycorachie :

- Protéinorachie : les valeurs normales se situent entre 0,10 et 0,45 g/L. Une protéinorachie très élevée oriente vers une méningite bactérienne. Elle varie de 1 à 5 g/L lors de méningites purulentes.
- Glycorachie doit toujours être exprimée en fonction de la glycémie. Une Glycorachie normale est égale à 65% de la glycémie (valeur normale = 0,6 g/L). Une hypoglycorachie oriente vers une méningite bactérienne.
- Albuminorachie : taux normal < à 0,40 g/l.
- Chlorurorachie : en cas de méningite tuberculeuse.

5.4. Mise en culture

Dans les méningites bactériennes, la culture est obligatoire. Au laboratoire, une culture est réalisée immédiatement en fonction de l'orientation des examens microscopiques ou de l'orientation clinique, sur les milieux suivants

- Gélose au sang frais (Streptocoques, suspicion de Listériose).
- Gélose au sang cuit (GSC).
- Gélose au sang cuit additionnée de polyvitex (surtout s'il s'agit d'un nourrisson).
- Gélose de Loweinstein Jensen quand il y a suspicion de méningite tuberculeuse (plusieurs tubes).

Quand il s'agit d'un liquide purulent ou trouble, la culture est réalisée avant les examens microscopiques pour éviter les contaminations.

Quand il s'agit d'un liquide hématique, généralement la cytologie est impraticable et la culture est obligatoire. L'incubation des milieux de culture se fait pendant 18h à 24h à 37°C dans une atmosphère enrichie en 5 à 10% de CO₂.

Quand il s'agit de méningite tuberculeuse, les milieux sont incubés à 37°C pendant 28 jours. La première lecture s'effectue après une semaine (éliminer les tubes contaminés).

5.5. Lecture et interprétation

Le tableau n°06 montre les résultats normaux et les résultats pathologiques du LCR :

Tableau 06 : Tableau de lecture des résultats du LCR.

Paramètres	LCR normal	LCR purulent	LCR lymphocytaire
Aspect	Claire	Trouble	Clair
Eléments/mm ³	< 5	>10	>10
Type d'éléments		50% Polynucléaires	50% Lymphocytes
Protéinorachie	<0,4 g/l	>0,4 g/l	>0,4 g/l
Orientation	Normal	Méningite bactérienne	Méningite virale Méningite à <i>Listeria</i> Méningite tuberculeuse