

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 ; et surveillance d'efficacité de traitement en cours.

Cet examen a une sensibilité et spécificité variables. Notamment à cause d'une contamination fréquente du prélèvement par la salive et la flore oropharyngée.

Le choix du prélèvement est fonction de l'importance clinique, du terrain du patients (immunodépression) et du résultat attendu (atypiques, mycobactéries). La stratégie diagnostique d'une infection broncho-pulmonaire va dépendre de sa gravité clinique. Pour des cas simples, chez des patients ayant un état général conservé, l'analyse bactériologique des expectorations convenablement recueillies et lavées peut fournir des résultats acceptables.

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.

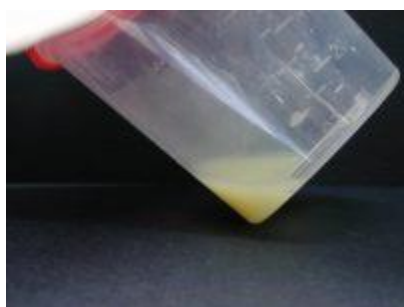
Préciser aussi la couleur éventuellement : rouille, verdâtre, hémoptoïque (sang). De même, la perception d'une odeur fétide témoigne de la présence des bactéries anaérobies.



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 au bleu de méthylène ou MGG, coloration de Gram, coloration de Ziehl-Neelsen ou à l'auramine.

- **Coloration au bleu de méthylène ou MGG:** 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-alcool-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'alcool-acide 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.

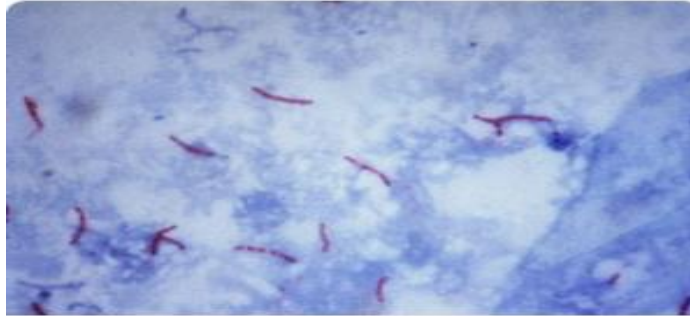


Figure 08 : *Mycobacterium tuberculosis* par la coloration de Ziehl-Neelsen.

➤ 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. 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 (**Fig.09**). 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).

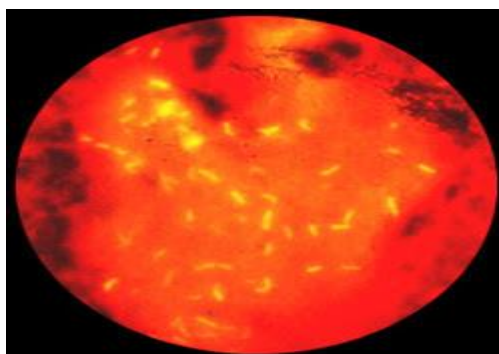


Figure 09 : *Mycobacterium tuberculosis* après coloration à l'auramine.

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 ensemencer 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

Pour la recherche de *Mycobacterium tuberculosis*, on utilise le milieu de de Lowenstein-Jensen. L'incubation des tubes de Lowenstein se fait à 35-37°C pendant 2 à 3 jours en position horizontale, les bouchons étant dévissés d'un demi-tour. Les tubes de culture seront ensuite conservés à 37°C pendant 6 semaines, puis inspectés une fois par semaine à la recherche d'une prolifération. Au cours de ces inspections, toute croissance d'une colonie de bactéries à la surface des tubes devra être notée. Les souches typiquement humaines de *Mycobacterium tuberculosis* sont rugueuses, résistantes et crème-beige, et s'observent parfois au bout de 2 à 3 semaines d'incubation (mais rarement plus tôt).

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