

Infections broncho-pulmonaires : Du prélèvement au diagnostic au laboratoire

Anne-Laure Roux
Hôpital Ambroise Paré, Boulogne Billancourt

Indications des prélèvements pour le diagnostic d'une infection broncho-pulmonaire

- Modification de la prise en charge thérapeutique
- Situations cliniques où les prélèvements présentent la meilleure sensibilité

→ Le choix du type de prélèvement est fonction des symptômes

→ Bilan systématique des patients immunodéprimés

Quel prélèvement pour quel microorganisme?

- Prélèvements respiratoires « invasifs » → bactéries et champignons
- Sécrétions nasales ou trachéo-bronchiques → virus

Performances des prélèvements respiratoires

- Absence de traitement anti-infectieux préalable
- Rapidité du transport
- Rapidité de prise en charge au laboratoire
- **Qualité du prélèvement**

Délai d'acheminement des prélèvements respiratoires

- Moins de 2 heures à T° ambiante
- Conservation à +4°C au maximum pendant 24h
- Exception pour les mycobactéries / *Legionella* : maximum 72h à +4°C

Les expectorations

- Prélèvement rarement contributif et source d'erreur
- Contamination par de la salive dans plus de 50% des cas
- Indications :
 - Surinfection de bronchite chronique
 - Infections à mycobactérie
 - Infections chez patients atteints de mucoviscidose, BPCO
 - Recherche de *Pneumocystis jirovecii* par PCR

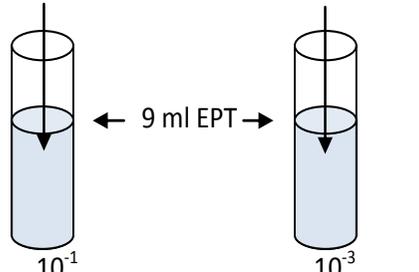
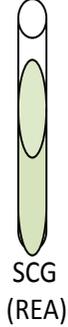
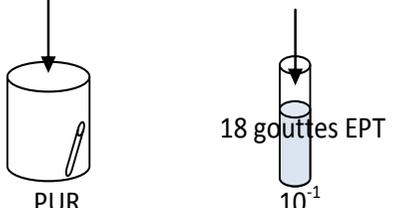
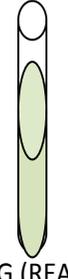
Lavage broncho-alvéolaire

- Indications :
 - Documentation des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM)
 - Documentation des pneumopathies aiguës communautaires chez les patients immunodéprimés ou en cas d'échec du traitement empirique

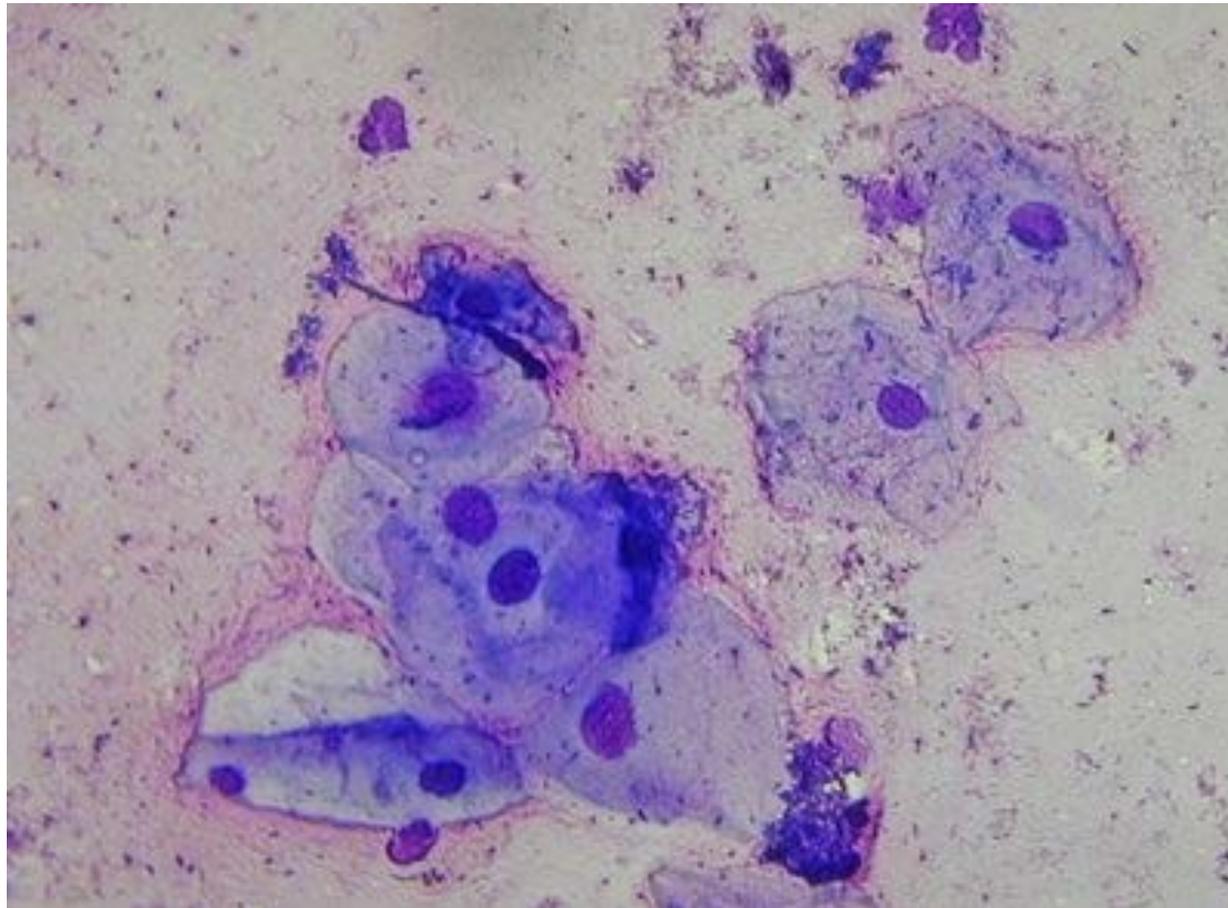
Brossage bronchique

- Mêmes indications que le LBA
- Meilleure prélèvement pour les cultures virales et la cytologie

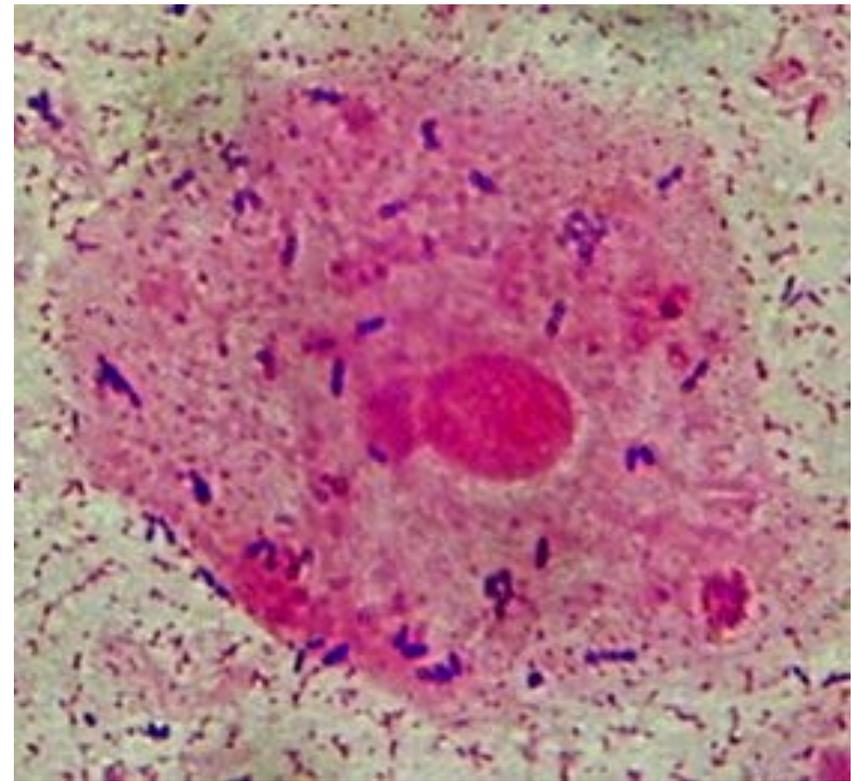
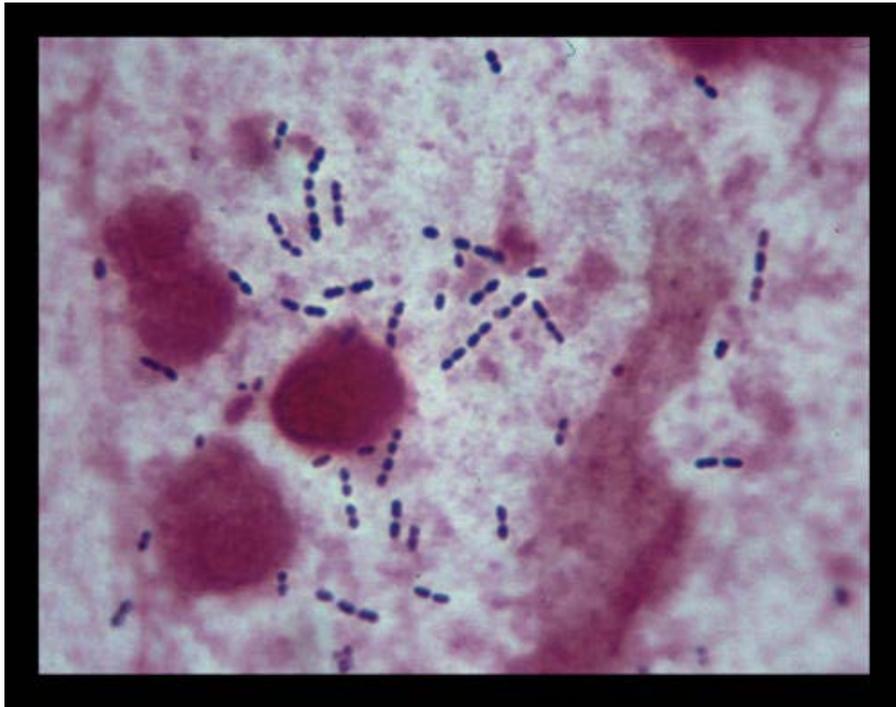
Traitement des prélèvements au laboratoire de bactériologie

<p>LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE</p>	<p>1 ml de prélèvement 10⁻¹</p> <p>← 9 ml EPT →</p> <p>100 µl de la dilution 10⁻¹ 10⁻³</p> 	<p>Aérobie COS</p> <p>Anaérobie COS</p> <p>CO2 PVX</p> <p>SCG (REA)</p> 	<p>DRIG ANC CAND</p>	<p></p> <p>GRAM Objx100</p> <p></p> <p>MGG Obj x 10</p>
<p>PRELEVEMENT DISTAL PROTEGE</p> <p>BROSSE</p>	<p>1ml EPT</p> <p>2 gouttes du pur</p> <p>18 gouttes EPT</p> <p>PUR</p> <p>10⁻¹</p> 	<p>Aérobie COS</p> <p>Anaérobie COS</p> <p>CO2 PVX</p> <p>SCG (REA)</p> 	<p>DRIG ANC CAND</p>	<p></p> <p>GRAM Objx100</p> <p></p> <p>MGG Obj x 10</p>

Coloration de May Grunwald Giemsa



Coloration de Gram



Choix des milieux de culture / atmosphères

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

Définition des seuils de significativité

	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	1/10	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

REMIC, 2015



Interprétation des résultats de culture

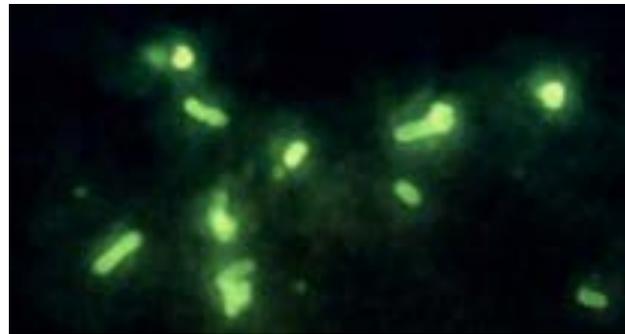
Brossage bronchique protégé	<p>Un seuil de 10^3 UFC/mL est considéré comme significatif.</p> <p>Chez les malades sous antibiothérapie, un dénombrement bactérien $< 10^3$ UFC/ml ne peut éliminer la possibilité d'une infection pulmonaire.</p>
Lavage bronchoalvéolaire	<p>Une concentration de germes banals supérieure ou égale à 10^4 UFC/mL est généralement considérée comme significative d'une pneumonie.</p> <p>Pour les bactéries des genres <i>Nocardia</i>, <i>Legionella</i>, <i>Mycobacterium</i>, <i>Actinomyces</i>, leur présence à des concentrations inférieures à 10^4 UFC/mL sera prise en compte.</p>

Recherches spécifiques

- *Legionella spp* → immunofluorescence + mise en culture sur milieu spécifique
- *Nocardia spp* et autres actinomycètes → examen bactériologique standard + conservation plus longue des milieux de culture
- *Aspergillus spp* → examen mycologique standard
- *Pneumocystis jirovecii* → immunofluorescence + PCR
- Mycobactéries → examen mycobactériologique
- Histoplasmosse → le LBA est le prélèvement le plus adapté

Legionella spp

- Immunofluorescence directe : technique utilisant des anticorps monoclonaux reconnaissant tous les sérogroupes



- **Culture** des légionelles : lente (le délai de réponse est de 10 jours) et difficile.
 - Bactéries exigeantes, nécessitant l'utilisation de milieux spécialisés → milieu BCYE. Les légionelles sont des bactéries aérobies strictes dont la croissance est favorisée par la présence de CO₂ (2,5 %).
- aspect caractéristique des colonies dit en “**verre fritté**”

Legionella spp



Colonies en « verre fritté » sur milieu BCYE

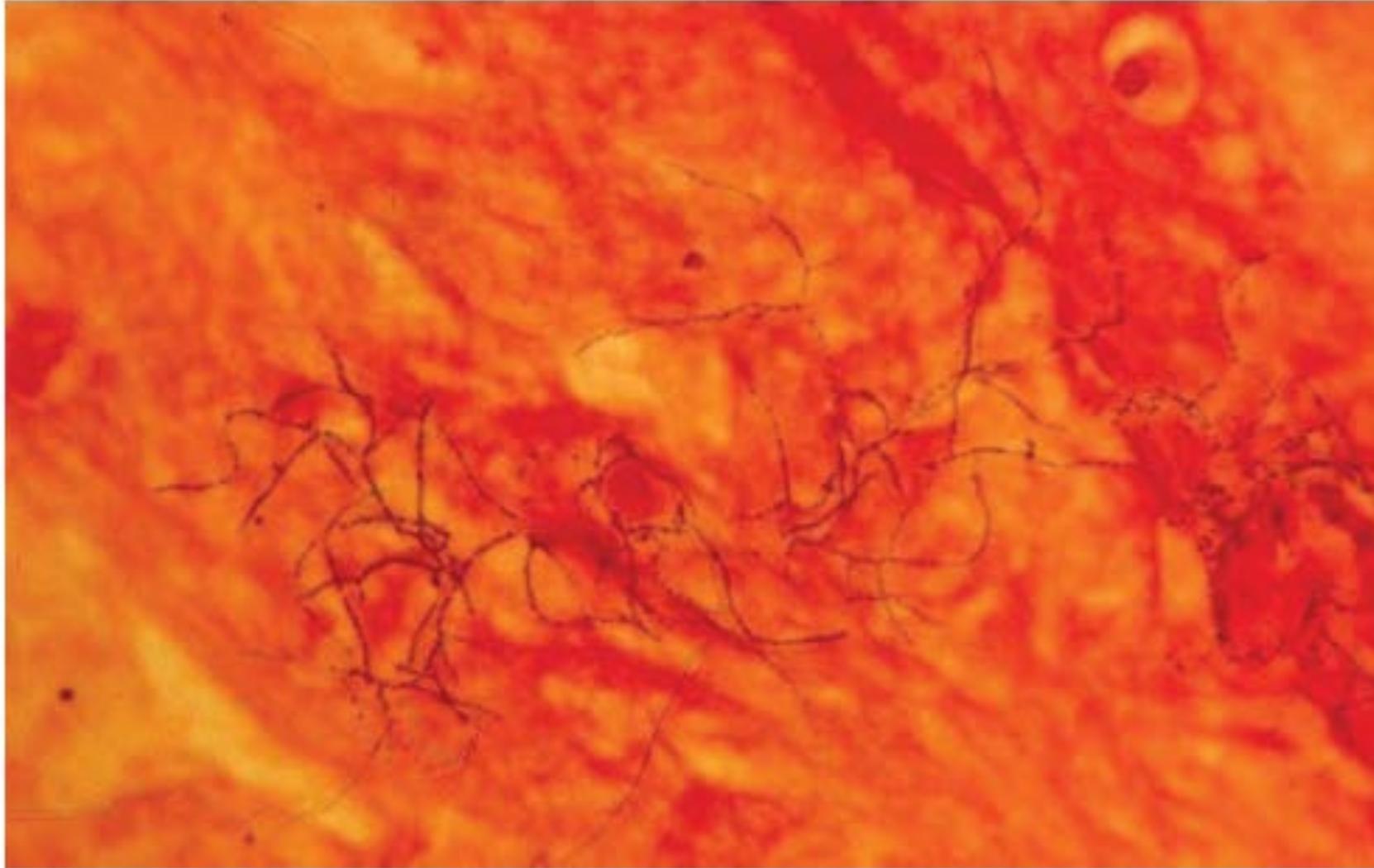
Nocardia spp et actinomycètes



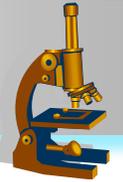
- Diagnostic exclusivement direct
 - Examen direct et mise en culture
 - Bacilles à Gram positif ramifiés avec un aspect moucheté ou tigré
 - Culture sur milieux standards (gélose au sang, gélose chocolat) en aérobiose ou sous 5% de CO₂.
- Nécessité de prolonger l'incubation des milieux au moins 10 jours**
- ✓ 30% de cultures positives en 48 heures
 - ✓ 50% après 5 jours

Demande spécifiée par le clinicien de recherche de *Nocardia* obligatoire!!!

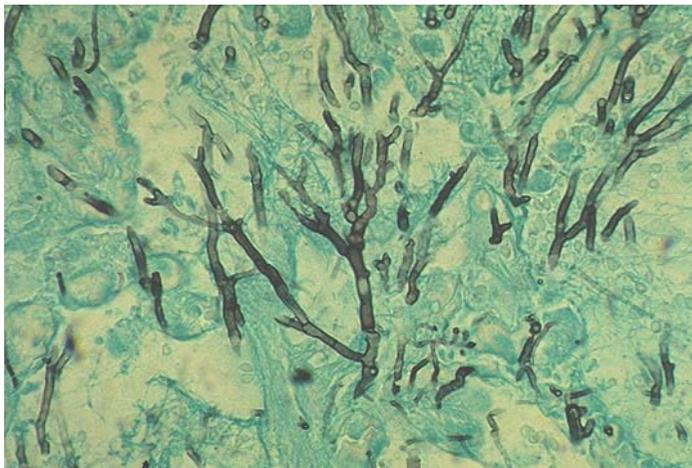
Nocardia spp et actinomycètes



Aspergillus spp, examen microscopique



- Mise en évidence de filaments mycéliens de « type aspergillaire »
- Entre lame et lamelle, ils mesurent de 2 à 4 μm de diamètre, apparaissent hyalins, cloisonnés, et parfois ramifiés (dichotomie avec angles aigus à 45°)
- Utilisation de méthodes de marquage (noir chlorazol) ou de coloration spécifiques (Gomori-Grocott)



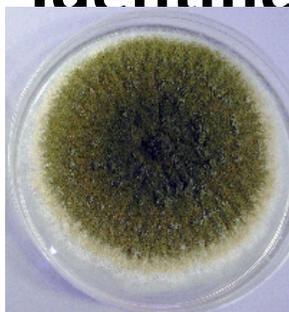
Aspergillus spp : Culture et identification



- Milieu fongique spécifique (Sabouraud+/- antibiotiques) → identification précise du genre et de l'espèce du champignon. *Aspergillus* pousse en 3 à 5 jours à 37°C.

L'aspect macroscopique est ras à poudreux, velouté parfois cotonneux, et de couleur variée en fonction de l'espèce

- **Examen direct à partir de la culture → orientation diagnostique**
- **Identification par spectrométrie de masse**

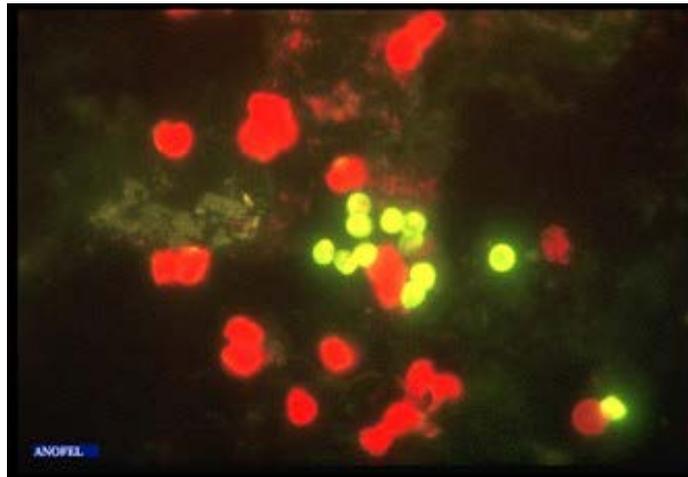


Aspergillus spp : autres techniques

- **Biologie moléculaire**
 - Techniques d'amplification génique spécifiques d'*Aspergillus*
 - Sérum, prélèvements respiratoires
 - Intérêt : bonne valeur prédictive négative dans le sérum
 - Limites :
 - Equipement spécifique
 - Très sensibles → distinction entre colonisation (portage asymptomatique) et infection plus difficile

Pneumocystis jirovecii

- Intérêt de la coloration de MGG pour voir les formes végétatives
- Immunofluorescence directe



- La PCR qui permet de détecter de faibles charges fongiques

Le diagnostic de la tuberculose au laboratoire : étapes principales



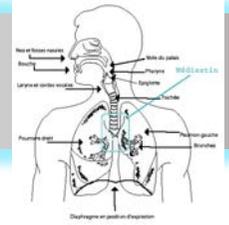
Méthodes classiques

- ✓ examen microscopique
- ✓ culture

Méthodes génétiques

- ✓ amplification d'ADN/ARN
- mycobactérien dans le prélèvement
- ✓ identification
- ✓ identification par sonde génétique
- ✓ antibiogramme
- ✓ identification des mutations conférant la résistance aux antibiotiques dans les gènes cibles

Les prélèvements : quelques principes



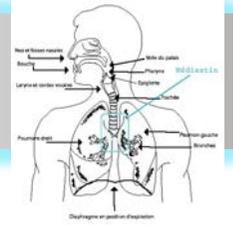
- ✓ On peut chercher les mycobactéries dans tous les prélèvements !



avec plus ou moins de succès !

- ✓ Emission irrégulière des bacilles tuberculeux → nécessité de répéter les prélèvements
- ✓ 10 à 30% des cas de tuberculose sont diagnostiqués uniquement sur la clinique

Prélèvements pulmonaires



- ✓ Crachat spontané, le matin à jeun si possible (2 à 3 ml minimum)
- ✓ **Crachat induit**
- ✓ Tubage gastrique

→ à répéter deux (ou trois) jours successifs

Dans un 2^{ème} temps:

- ✓ Aspiration bronchique
- ✓ Lavage broncho-alvéolaire

Hygiène et sécurité

- ✓ Les espèces du complexe *tuberculosis* à l'exception de la souche vaccinale BCG → bactéries du groupe de risque biologique 3
- **protection adéquate des personnels et de l'environnement : mesures de confinement d'un niveau 3 (laboratoire L3)**



Masque FFP2



PSM 2

Etape de décontamination = étape essentielle

- ✓ Elimination de la flore oro-pharyngée dans les prélèvements respiratoires
 - ✓ Elimination de la flore dans les prélèvements urinaires et digestifs
- méthode de Kubica : N acétyl-L-cystéine/citrate de sodium/NaOH



 élimine la flore, mais aussi une partie des BAAR

Le diagnostic au laboratoire : étapes principales



Méthodes classiques

✓ **examen microscopique** →

✓ culture

✓ identification →

✓ antibiogramme →

Méthodes génétiques

✓ amplification d'ADN/ARN

mycobactérien dans le prélèvement

✓ identification par sonde génétique

✓ identification des mutations conférant la résistance aux antibiotiques dans les gènes cibles

Examen microscopique

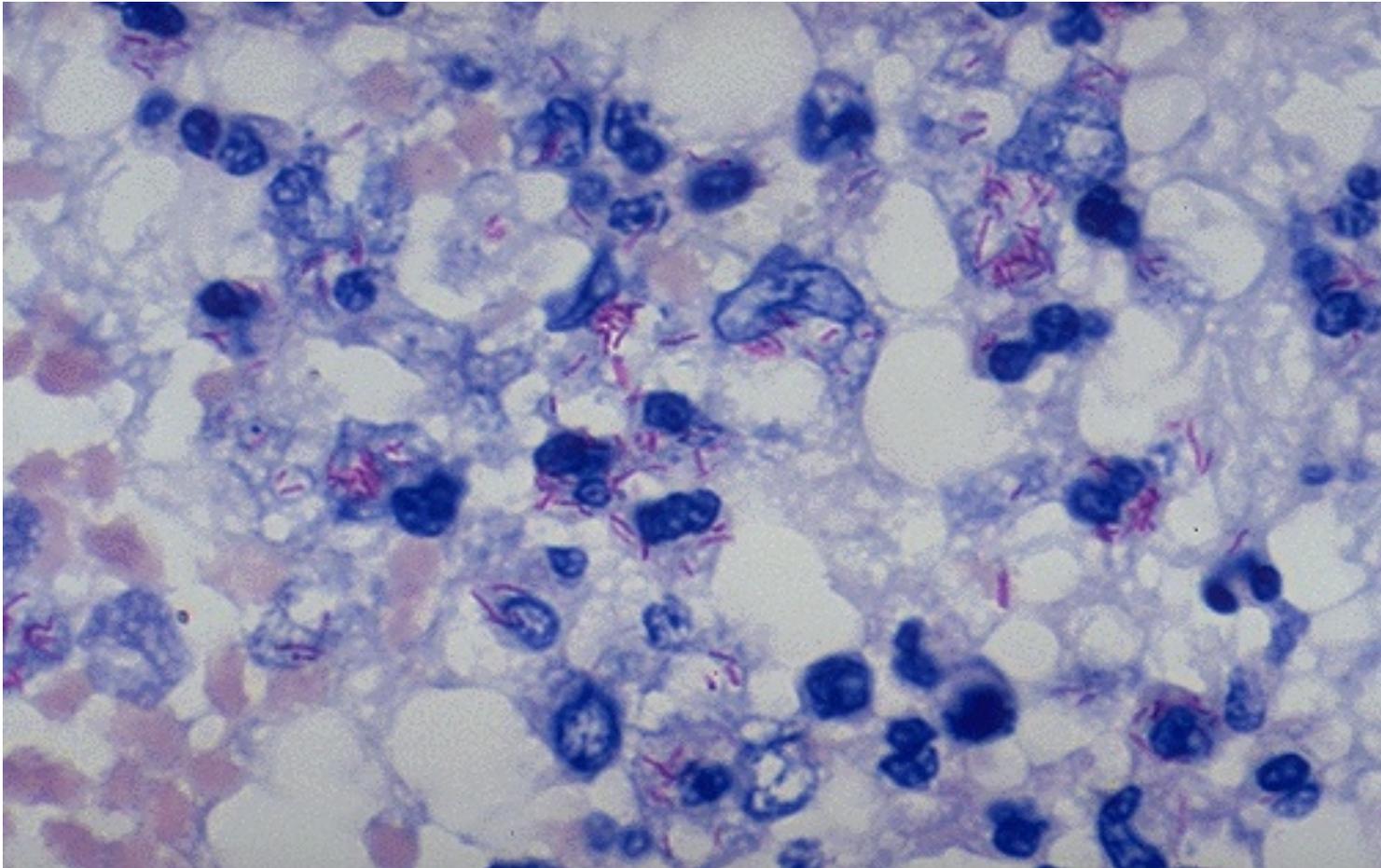


- ✓ Coloration de Ziehl-Neelsen (méthode de référence)
- ✓ Coloration à l'auramine fluorescente = méthode de Degommier
- ✓ Non spécifique
- ✓ Peu sensible : $5 \cdot 10^3$ à 10^4 bacilles/ml
- ✓ Rendu des résultats en nombre de BAAR par lame ou par champs

Résultats rendus

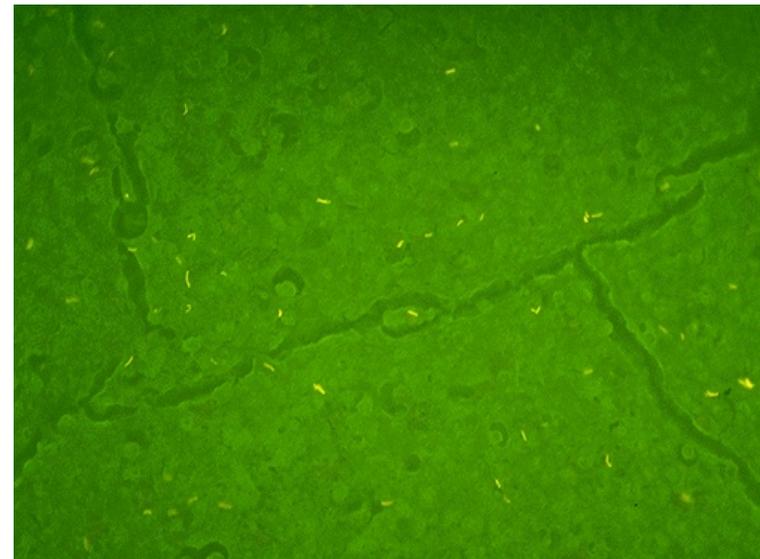
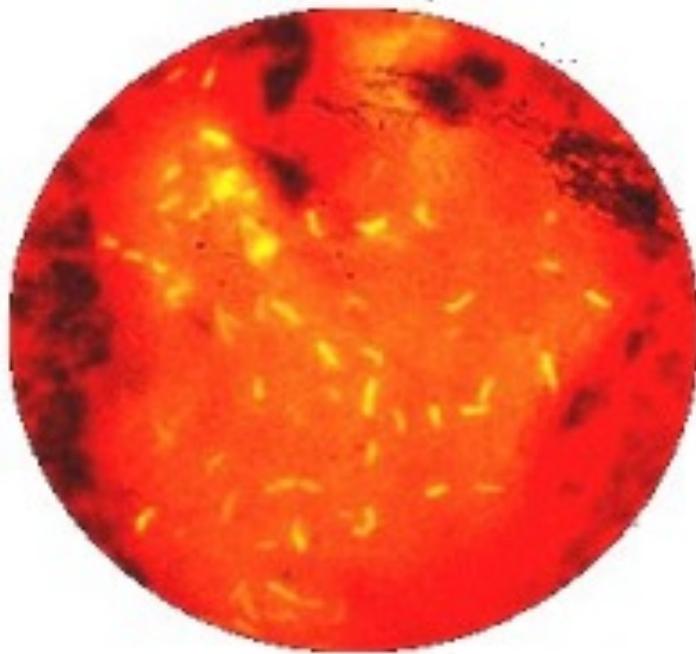
Résultats rendus	BAAR vus à la coloration	
	Fluorescence	
	X 250	x400
Aucun BAAR détecté	0	0
Présence de BAAR en très faible nombre	1-2	1-2
+	1-9 (lame)	1-9 (lame)
++	1-9 (1 champ)	4-36 (10 champs)
+++	1-90 (1 champ)	4-36 (1 champ)
++++	> 90 (1 champ)	>36 (1 champ)

Coloration de Ziehl-Neelsen



Diagnostic en 15 min

Coloration à l'auramine fluorescente



Diagnostic en 3 min



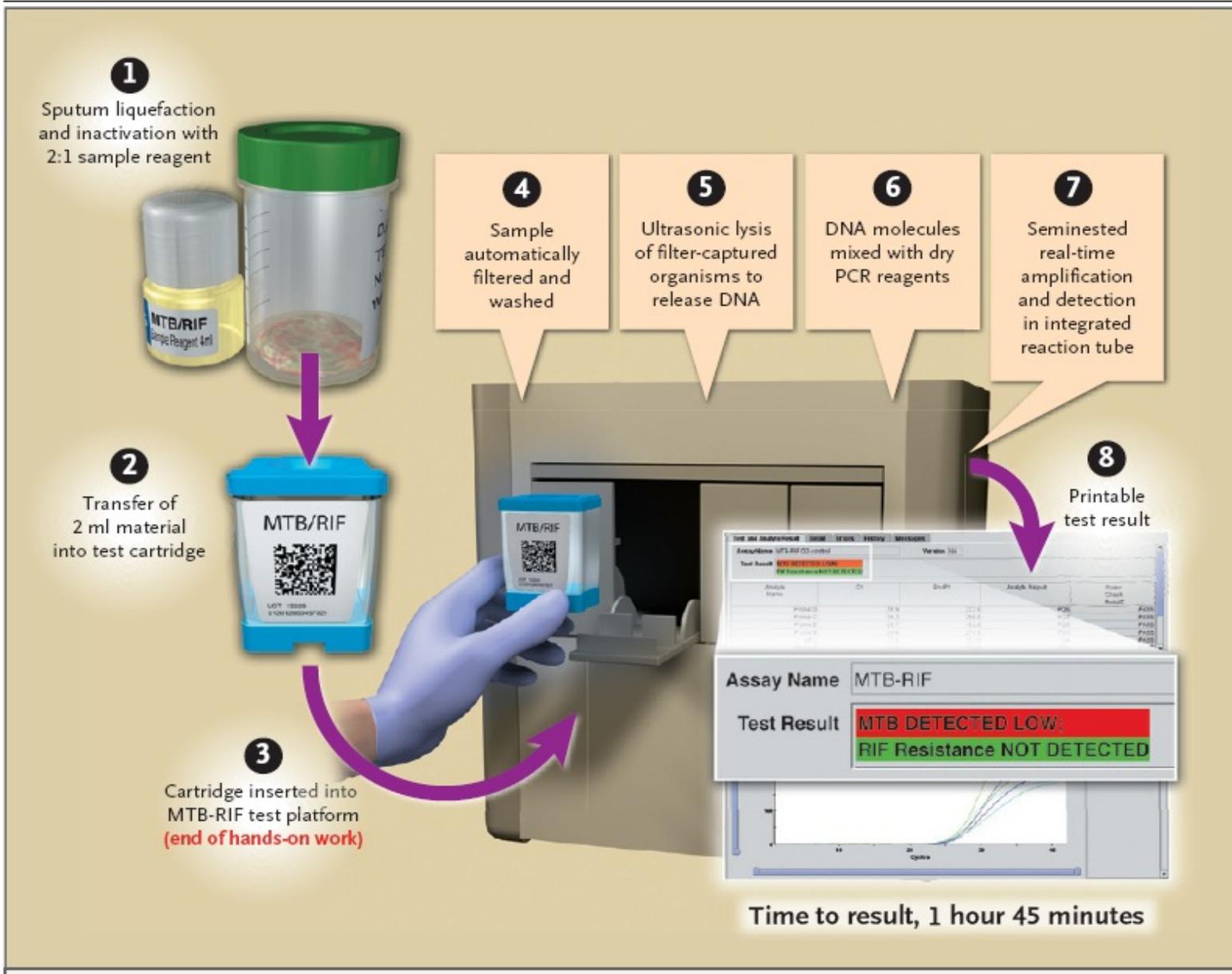
→ Les tests commercialisés ne sont validés que **pour les prélèvements respiratoires !**

1. Enhanced Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (E-AMTDT)
2. Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Test
3. Inno-LiPA-Rif. TB Test
4. GenoType Mycobacteria Direct Test
5. **GeneXpert MTB/RIF(recommandé par l'OMS)**

Principe du test Xpert[®] MTB/RIF



- ✓ Détection du complexe *M. tuberculosis*
- ✓ Détection de mutations dans le gène *rpoB* conférant la résistance à la rifampicine
 - directement à partir d'un prélèvement
 - sans extraction préalable
 - complètement automatisée
- ✓ Extraction, amplification et détection par la technique de PCR en temps réel dans une seule cartouche



n

ns la car-
actifs de

Mais la PCR ne résout pas tout...



Tuberculose	Sensibilité	Spécificité
M+	98%	98%
M-	72%	96%
Extra-respiratoire (M-)	30%	98%

VPP : 98% et VPN : 90%

Une PCR négative ne permet pas d'exclure une tuberculose

Le diagnostic au laboratoire : étapes principales



Méthodes classiques

Méthodes génétiques

- ✓ examen microscopique→ ✓ amplification d'ADN/ARN
- ✓ **culture**→ mycobactérien dans le prélèvement
- ✓ identification→ ✓ identification par sonde génétique
- ✓ antibiogramme→ ✓ identification des mutations conférant la résistance aux antibiotiques dans les gènes cibles

Culture - sur milieu solide

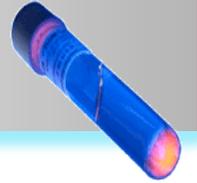


- ✓ Sur milieu de Löwenstein-Jensen
- ✓ Aspect des colonies caractéristique pour certaines espèces
- ✓ sensibilité de 10^2 à 10^3 bacilles/ml
- diagnostic de la plupart des cas (avec orientation sur l'espèce en cause)
- délai moyen de **14-21** jours si BAAR + / **21-42** jours si BAAR -

M. tuberculosis sur Loewenstein-Jensen-Medium

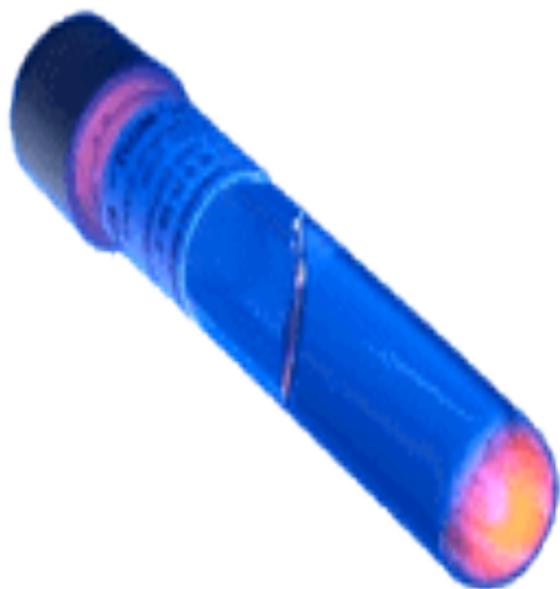
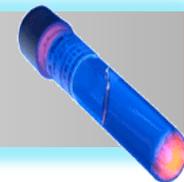


Culture - sur milieu liquide (MGIT[®])



- ✓ Milieu de Middlebrook (7H9 ou 7H10) + supplément OADC (acide oléique, albumine, catalase, dextrose) +/- mélange d'antibiotiques
 - ✓ Croissance détectée grâce à des automates d'incubation à lecture continue
 - ✧ Composé fluorescent sensible à la concentration d'oxygène
 - ✧ La respiration des mycobactéries en croissance consomme l'oxygène du milieu et permet l'activation de la fluorescence
- délai moyen de **5-10** jours si BAAR + / **10-28** jours si BAAR -

La technique MGIT[®]



Conclusions

- ✓ Le contexte clinique et épidémiologique guide les examens à mettre en œuvre
- ✓ Aucun outil microbiologique n'est 100% sensible ni spécifique
- ✓ Obligation de demandes explicites du clinicien pour la recherche de microorganismes atypiques
- ✓ Le diagnostic au laboratoire = examen microscopique + culture
- ✓ Apport majeur des techniques de biologie moléculaire