

Faculté de Médecine
Année universitaire 2015/2016.
Module de Pneumologie
Cours de Bactériologie.

**DIAGNOSTIC
MICROBIOLOGIQUE DES
PNEUMOPATHIES**

DR BECHIR

GENERALITES :

- 80 à 90% des pneumopathies infectieuses sont dues à 5 agents pathogènes: le pneumocoque+++, *Mycoplasma pneumoniae*, HI, et plus accessoirement les virus de la grippe et *Legionella pneumophila*.
- le *Staphylocoque* et les *entérobactéries* forment moins de 10% des étiologies. La fréquence des *anaérobies* est probablement sous-estimée.
- Le **terrain** favorise un germe plutôt qu'un autre (le pneumocoque est toujours prédominant!):
 - Chez l'enfant de moins de 2ans, les virus prédominent.
 - Chez l'adolescent et adultes jeunes, on observe une fréquence accrue de *Mycoplasma pneumoniae*.
 - Chez les sujets âgés, entérobactéries et staphylocoque doré.
 - Chez l'éthylique, les anaérobies et *Klebsiella pneumoniae*.
 - Chez le diabétique, le staphylocoque doré.
- **Les associations sont possibles mais rares, en dehors de la fréquente surinfection bactérienne d'une pneumopathie virale: pneumocoques + *hémophilus-influenzae* ou *Legionella***

• **Rappels anatomo-cliniques**

- Il est important de distinguer les voies aériennes inférieures (basses) et supérieures (hautes).
- Les voies aériennes sous-glottiques (bronches et alvéoles) sont normalement stériles grâce à différents mécanismes de défense mécanique (réflexe de toux, division bronchique, mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire), humorale (IgA sécrétoires, IgG, lysozyme, surfactant, antiprotéases) et cellulaire (macrophages, lymphocytes, polynucléaires).
-

A-PNEMOPATHIES BACTERIENNES :

A-1 GERMES EN CAUSE :

1-Le pneumocoque : (Gram+) réalise la forme typique de la pneumonie franche lobaire aiguë, mais les formes frustes, atypiques sont nombreuses. Une *réurrence d'herpès*

labial concomitante est en faveur d'une pneumococcie. Les sujets âgés, alcooliques et les splénectomisés sont particulièrement exposés

- Dg –mise en évidence a partir des prelevement par culture
- Sensibilité à l'optochine. Recherche d'ag solubles. Hemolyse type alpha ,

2- Staphylocoque doré :

(Gram+) se présente sous un tableau de *bronchoalvéolite à foyers multiples*, extensive et nécrosante, avec possibilité de *bulles chez le nourrisson ou le jeune enfant*. Ces bulles sont parfois compressives. Le diabétique, le sujet âgé et le toxicomane sont plus exposés que le reste de la population.

- Dg –mise en évidence a partir des prelevement par culture.

3-La pneumopathie à hémophilus-influenzae :

- (Gram-) se présente sous la forme d'une
 - pneumopathiesystématisée (*hémophilus-influenzae capsulé*)
 - bronchopneumonique (*hémophilus-influenzae non-capsulé*).
- Le tabac est un facteur favorisant puisqu'elle est fréquente chez le fumeur et le bronchitique chronique.

4-En ce qui concerne les entérobactéries,

- il s'agit surtout de **Klebsiella pneumoniae** (Gram-) et accessoirement d'*E Coli* ou de *Proteus*.
- Le terrain est débilité par un éthylisme ou une pathologie chronique.
- La pneumopathie très exsudative (scissurite fréquente) .et le tableau de bronchopneumonie est fréquent.

5-Les pneumopathies à anaérobies sont la conséquence d'un *mauvais état dentaire* et d'une *cause favorisant l'aspiration* de germe vers les poumons (maladie neurologique, coma, alcoolisme aigu). Les agents sont principalement les *pepto-streptocoques*, les *fusobacteriums* et les *bactéroïdes*. Les lésions prédominent sur les parties déclives

B-DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DES PNEUMOPATHIES

110-25-02001

B -1-DIAGNOSTIC DIRECT PAR CULTURE = EXAMEN CYTOBACTÉRIOLOGIQUE DES SÉCRÉTIONS BRONCHO-PULMONAIRES (ECBSBP)

L'objectif est double :

- Identifier par culture la ou les bactérie(s) en cause parmi la flore commensale oropharyngée éventuellement présente

- Etudier la sensibilité de cette ou ces bactérie(s) aux antibiotiques

Il existe plusieurs types de prélèvement dont le choix dépend de l'importance clinique, du terrain du patient (immunodépression, intubation, ambulatoire...), et du résultat attendu (bactéries atypiques, pneumocoque, légionelles...). En ambulatoire, un recueil correctement exécuté des expectorations peut fournir des informations suffisantes et de bonne qualité. En revanche, dans le cas de pathologies plus graves, la réalisation d'un prélèvement plus fiable et également plus invasif (mini-LBA, brossage distal protégé) s'avère nécessaire.

Dans tous les cas, ces prélèvements sont à **acheminer le plus rapidement possible au laboratoire** en raison de la fragilité de certains pathogènes (*S. pneumoniae* par exemple) et pour éviter la multiplication des bactéries commensales de la flore oropharyngée.

a) Expectorations/crachats

Il s'agit d'un prélèvement non invasif, réalisé par le patient lui-même.

Le recueil doit se faire le matin, au réveil, à jeun, après rinçage buccodentaire à l'eau distillée stérile et lors d'un effort de toux (+/- aidé par kinésithérapie).

Un examen microscopique sera systématiquement réalisé pour évaluer le nombre de leucocytes ainsi que le degré de contamination du prélèvement par la flore oropharyngée.

L'interprétation se fera selon la classification de Murray et Washington.

Classe	Cellules épithéliales	Leucocytes	Interprétation
1	> 25	<10	Salivaire
2	> 25	10 - 25	Salivaire
3	> 25	> 25	Douteux
4	1 - 25	> 25	Douteux
5	< 10	> 25	Purulent

Seules les expectorations des classes 4 (acceptable) et 5 (la plus appropriée) doivent être mis en culture. Les autres prélèvements doivent être refusés car trop contaminés par la flore commensale.

Les prélèvements acceptés seront fluidifiés et ensemencés après dilution sur des milieux de cultures appropriés. Le seuil de positivité pour les expectorations est fixé à 10^7 UFC/mL.

– Interprétation valide si:

- • PNN > 25/champ (microscope objectif X10)
- • Cellules épithéliales < 10/champ (microscope objectif X10)
- • Flore dominante à examen direct +++
- • Culture: Flore monomorphe > 10^7 UFC/ml .

b) Aspiration endo-trachéale (AET)

Il s'agit d'une aspiration des sécrétions broncho-pulmonaires à l'aide d'une sonde d'intubation. Elle est surtout réalisée chez des patients atelectasiques, intubés ou trachéotomisés.

C'est un prélèvement non invasif, ne nécessitant pas de fibroscope. En revanche, le prélèvement est réalisé à l'aveugle et présente un risque important de contamination par la flore commensale.

L'examen microscopique, la mise en culture et les critères d'acceptabilité des prélèvements sont les mêmes que pour les expectorations.

Le seuil de positivité est cependant plus bas : 10^5 UFC/mL.

– Interprétation valide si:

- • PNN nombreux
- • Cellules épithéliales < 10/champ
- • Flore dominante à examen direct
- • Culture: Flore monomorphe > 10^5 UFC/ml

c) Lavage broncho-alvéolaire (LBA) et mini-LBA

Il s'agit d'injecter puis de ré-aspirer du sérum physiologique (100 à 200 mL) directement dans la bronche à explorer.

Ce prélèvement est réalisé chez des patients en soins intensifs et/ou immunodéprimés.

Son principal avantage est de pouvoir explorer un vaste territoire pulmonaire (bronchioles distales et alvéoles). En revanche, c'est un prélèvement invasif obligatoirement réalisé sous fibroscopie et mal supporté par le patient.

Le mini-LBA est une alternative au LBA qui consiste à injecter puis ré-aspirer un volume plus faible de sérum physiologique (seulement 20 mL). L'injection se fait à l'aide d'un double cathéter protégé (dans la sonde d'intubation)

C'est un prélèvement réalisé surtout pour des patients hospitalisés en soins intensifs.

Son avantage principal est d'être un prélèvement « protégé » de la flore salivaire sans besoin de fibroscopie. Mais, il est réalisé à l'aveugle dans l'arbre trachéo-bronchique.

Tous les prélèvements sont acceptés etensemencés (pas de critères d'acceptabilité).

Pour les LBA, l'examen microscopique et la mise en culture sont réalisés sur la fraction alvéolaire car elle présente moins de risque de contamination par la flore ORL supérieure.

Le seuil de positivité est de 10^4 UFC/mL pour le LBA.

Le seuil de positivité est de 10^3 UFC/mL pour le mini-LBA.

d) Brossage bronchique protégé (BBP)

C'est la méthode de référence.

Il s'agit d'une brosse de nylon placée à l'intérieur d'un double cathéter qui va permettre d'explorer le foyer infectieux avec précision. L'extrémité de la brosse est ensuite sectionnée et placée dans du sérum physiologique avant d'être envoyée au laboratoire.

Ce prélèvement présente plusieurs avantages : il permet de localiser précisément le foyer infectieux par fibroscopie et est protégé de la flore commensale par le double cathéter. Cependant, c'est un prélèvement invasif, nécessitant un fibroscope et ne permettant de recueillir qu'une faible quantité de sécrétions respiratoires.

Le seuil de positivité est de 10^3 UFC/mL.

Seules les expectorations des classes 4 (acceptable) et 5 (la plus appropriée) doivent être mis en culture. Les autres prélèvements doivent être refusés car trop contaminés par la flore commensale.

Les prélèvements acceptés seront fluidifiés et ensemencés après dilution sur des milieux de cultures appropriés. Le **seuil de positivité** pour les expectorations est fixé à **10⁷ UFC/mL**.

– **Interprétation valide si:**

- • **PNN > 25/champ** (microscope objectif X10)
- • **Cellules épithéliales < 10/champ** (microscope objectif X10)
- • **Flore dominante à examen direct +++**
- • **Culture: Flore monomorphe > 10⁷ UFC/ml** .

b) Aspiration endo-trachéale (AET)

Il s'agit d'une aspiration des sécrétions broncho-pulmonaires à l'aide d'une sonde d'intubation. Elle est surtout réalisée chez des patients atelectasiques, intubés ou trachéotomisés.

C'est un prélèvement non invasif, ne nécessitant pas de fibroscope. En revanche, le prélèvement est réalisé à l'aveugle et présente un risque important de contamination par la flore commensale.

L'examen microscopique, la mise en culture et les critères d'acceptabilité des prélèvements sont les mêmes que pour les expectorations.

Le **seuil de positivité** est cependant plus bas : **10⁵ UFC/mL**.

– **Interprétation valide si:**

- • **PNN nombreux**
- • **Cellules épithéliales < 10/champ**
- • **Flore dominante à examen direct**
- • **Culture: Flore monomorphe > 10⁵ UFC/ml**

	Expectoration / Crachat	Aspiration endotrachéale (AET)	Lavage broncho-alvéolaire (LBA)	Mini-LBA	Brossage bronchique protégé (BBP)
Seuil de positivité	10 ³ UFC/mL	10 ³ UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ⁴ UFC/mL	10 ³ UFC/mL
Avantages	Facile, non invasif Par le patient lui-même	Non invasif	Exploration d'un large territoire pulmonaire	Mieux supporté que le LBA Pas de fibroscope Prélèvement protégé	Précision du prélèvement (fibro) Prélèvement protégé
Inconvénients	Contamination importante	A l'aveugle Risque de contamination	Invasif (fibro) Mal supporté Contamination possible	A l'aveugle	Faible quantité de prélèvement Invasif

La culture de tous ces types de prélèvements respiratoires se fait systématiquement sur des milieux riches (gélose au sang, gélose au sang cuit) et des milieux sélectifs (milieux spécifiques des bacilles à Gram négatif, milieux avec antibiotiques...). Cependant, certaines bactéries (*Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Nocardia spp.*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*...) ne sont pas recherchées

- AUTRES METHODES :

- Détection des antigènes : * polysaccharidiques bactériens

- Techniques de biologie moléculaire ++

- Diagnostic sérologique

B- PNEUMOPATHIES ATYPIQUES :

sont le fait des germes intracellulaires dont le diagnostic est souvent sérologique

(Leur point commun est une possibilité de diagnostic sérologique tardif:)

- **Mycoplasma pneumoniae** est parfois responsable d'épidémies dans les collectivités d'adultes jeunes.
- On observe parfois la présence d'agglutinines froides dans le sérum. La séroconversion signe le diagnostic.
- **Chlamydia psittaci** provient des oiseaux, principalement pigeons et perroquets.
- Une contamination interhumaine est possible .
- Le diagnostic est sérologique.

Legionella pneumophila (Gram-) se développe préférentiellement chez l'homme de 50ans fumeur atteint d'une pathologie chronique. Des facteurs favorisants extrinsèques sont un milieu hydrique de proximité, un circuit de climatisation défectueux ou un site de construction. La symptomatologie

progressive contraste avec une fièvre élevée. Une bradycardie, des signes digestifs ou neurologiques, une insuffisance rénale, ou une hyponatrémie fréquente caractérisent la P. La *séroconversion* (en 4 à 8 semaines), l'examen direct en *immuno-fluorescence directe* (faux - fréquents), et surtout la *culture* (positive en 3 à 8j) permettent le diagnostic.

- Méthodes de diagnostic:
 - – **Direct: Mise en évidence du pathogène:**
 - • Culture
 - • Techniques moléculaires
 - • Recherche d'Ag de *Legionella* dans les urines
 - – **Indirect: Sérologie**
 - – **Maladie à déclaration obligatoire +++**
 - * ***Coxiella burnetti***, agent de la fièvre Q, la transmission se fait par les insectes, les rongeurs ou les animaux domestiques. A la différence des autres rickettsioses, il n'y a pas de signes cutanés. Le diagnostic est sérologique.

C-PNEMOPATHIES VIRALES

- réalisent aussi un tableau de pneumopathie atypique
- Les virus principalement impliqués sont les *virus de la grippe* (*Myxovirus influenzae A, B et C*), les *Myxovirus parainfluenzae I, II, III et IV*, les *Adénovirus* et le VRS. De nombreux autres virus peuvent être impliqués occasionnellement. Les méthodes de mise en évidence ne sont pas d'usage courant et le dg est serologique
- Fréquentes, elles sont le plus souvent bénignes.
- Elles peuvent être graves chez l'immunodéprimé voire même chez l'adulte sain si elles sont source d'un oedème lésionnel; cela peut être le cas pour la grippe, dans certaines épidémies
- **Les virus en causes**
 - 1 - *Myxovirus et paramyxovirus*
La grippe est due à un *Myxovirus influenzae*.
Elle entraîne rarement, par rapport à sa fréquence, une broncho-pneumonie avec atteinte interstitielle pure, guérissant en 8 à 20 jours. Exceptionnellement, elle est source d'une oedème alvéolaire lésionnel diffus mortel. Les surinfections sont toujours possibles, en particulier à *Hémophilus*.
-*Myxovirus para influenzae* est source d'une pneumopathie proche de la grippe.

- *La rougeole* (paramyxovirus) et *les oreillons* (Myxovirus) sont responsables des séquelles bronchiques à type de dilatations bronchiques.
- *Le VRS, virus respiratoire syncytial* (paramyxovirus) est responsable de bronchites et de broncho-pneumonies chez l'enfant et le nourrisson. Un risque vital et en jeu.
- 2 - *Les adénovirus* sont rarement responsables de broncho-pneumonie
- 3 - *Herpès virus (HV)*
- *La varicelle* (HV varicellae) entraîne rarement de problème chez l'enfant sauf s'il est immunodéprimé. Chez l'adulte, elle est source dans 75% des cas d'une atteinte pulmonaire par voie hématogène responsable d'image des microcalcifications parenchymateuses.
- *Cytomégalovirus (CMV)* est responsable, chez l'immunodéprimé et en particulier chez le greffé de moelle osseuse, d'une pneumopathie interstitielle diffuse grave, à type d'oedème lésionnel. L'aspect est celui d'images alvéolaires diffuses et bilatérales.
- *Epstein Barr Virus (EBV)* responsable de la mononucléose infectieuse, peut être source chez l'adulte jeune d'adénopathies hilaires et médiastinales. Chez l'immunodéprimé; on pourrait observer une pneumopathie grave
- *Coronavirus; sars-virus* très virulent

CONCLUSION

Le diagnostic de pneumopathie repose d'abord sur la clinique et l'imagerie. La place des examens microbiologiques dépend des situations :

Pneumopathie acquise en ville (pas d'hospitalisation)	Pneumopathie avec hospitalisation hors-Réa	Pneumopathie avec hospitalisation en Réa
Pas de prélèvement	Hémocultures + Plvts respiratoires bactériologiques +/- Ag urinaires <i>Legionella</i>	Hémocultures + Plvts respiratoires bactériologiques + Ag urinaires <i>Legionella</i> + Ag urinaires <i>S. pneumoniae</i>