Problème médical

Infections respiratoires basses

- ✓ Bronchites : surinfection des bronchites aiguës, bronchites chroniques (BPCO)
- ✓ Pneumonies : acquises en ville, nosocomiales
- ✓ Exacerbation des bronchites chroniques

Cas particuliers : mucoviscidose, pneumopathies de l'immunodéprimé

Problème de Santé Publique (1)

Les infections respiratoires basses représentent

- 5ème cause des décès en France
- 2ème cause des infections nosocomiales et 1ère cause des décès par infection nosocomiale
- mortalité chez 7% des patients hospitalisés
- augmentation de l'incidence et de la mortalité avec l'age
- 1ère cause des décès infectieux chez le sujet âgé

Maladies à déclaration obligatoire:

- Légionellose (1987)
- Tuberculose (1964)

Problème de Santé Publique (2)

Résistances aux antibactériens

- Pneumocoques (sensibilité diminuée à la pénicilline)
- ***Haemophilus influenzae*** (β lactamases)
- ***Pseudomomas aeruginosa*** (Mucoviscidose)
- ***Mycobactérium tuberculosis*** (multirésistances)

Vaccination

- Pneumocoque: Pneumo23® et Prévenar®
  Vaccin ayant une indication dans les infections respiratoires
- ***Haemophilus***: INFANRIX PolioHib®
  pas d'indication dans les infections respiratoires

Pneumopathies acquises en ville (1)

- Etiologie virale la plus fréquente, bactéries souvent responsables de surinfections
- ECBC rarement réalisé (sauf signe de gravité)
- Le diagnostic biologique ne doit pas retardé le traitement
- Traitement antibiotique initial très souvent probabiliste
  1ère intention : amoxicilline
  2ème intention : macrolide

Pneumopathies acquises en ville (2)

- Principaux agents isolés :

  - ✓ ***Streptococcus pneumoniae*** le plus fréquemment rencontré, (50 à 90%)
  - ✓ Bacilles Gram négatif (2 à 18 %) : ***Haemophilus influenzae***
    Klebsiella pneumoniae
  - ✓ **Branhamella catarrhalis**
  - ✓ Germes juxtacellulaires ou intracellulaires (10% des cas) :
    Mycoplasma pneumoniae (enfants, immunodéprimés)
    Legionella pneumophila
    Chlamydia pneumoniae

- Autres germes moins fréquemment retrouvés :

  - ✓ ***Staphylococcus aureus*** (<5%)
  - ✓ ***Mycobacterium tuberculosis***
  - ✓ Anaérobies (alcoolisme, pneumopathies d'inhalation)

Infections respiratoires chroniques (1)

Bronchopathies chroniques

- ✓ Colonisation permanente de l'arbre respiratoire
- ✓ Sélection de souches résistantes par traitements itératifs

♦ **Germes en cause** :

- ✓ ***Pseudomonas aeruginosa***
- ✓ ***Staphylococcus aureus***
- ✓ ***Haemophilus influenzae***

Infections respiratoires chroniques (2)

Exacerbation aiguë de bronchites chroniques

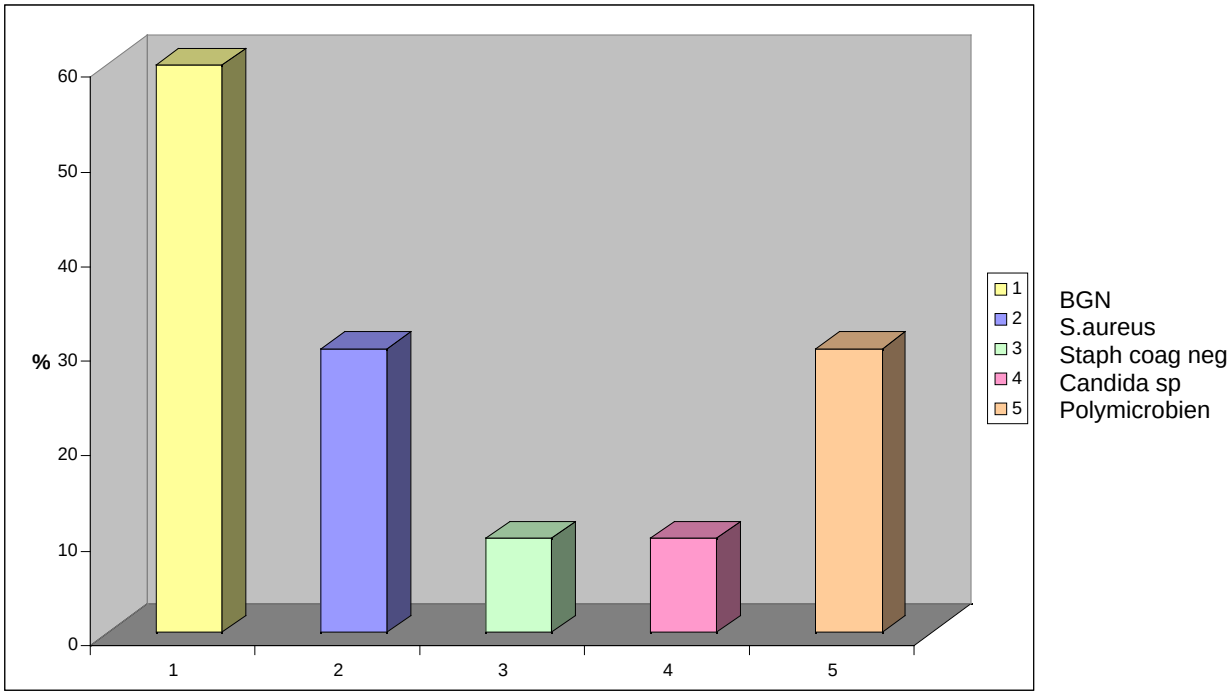
- Bactéries le plus souvent isolées:
  - ✓ ***Haemophilus influenzae***
  - ✓ ***Streptococcus pneumoniae***
  - ✓ ***Branhamella catarrhalis***
  - ✓ ***Staphylococcus aureus***
- Diagnostic différentiel difficile entre infection et colonisation chronique

Pneumopathies nosocomiales (1)

- Etiologies bactériennes les plus fréquentes
- Bactéries résistantes souvent en cause
- Fréquence importante en réanimation : 20 à 40% des patients ventilés
- Infections graves : mortalité de 20 à 50%
- Antibiothérapie au départ probabiliste et à large spectre, puis adaptée en fonction des cultures et des résultats de l'antibiogramme.

Pneumopathies nosocomiales (2)

Agents pathogènes isolés d'après le REMIC (1998)



Pneumopathies nosocomiales (3)

Deux types de pneumonies nosocomiales

Précoces < 5jours

flore oropharyngée commensale

- ✓ Staphylocoque metiS
- ✓ Pneumocoque
- ✓ ***Haemophilus***
- ✓ ***E.coli*** (germes sous-dominant de la flore oropharyngée)

Tardives > 5jours

Germes hospitaliers résistants

- ✓ ***Pseudomonas aeruginosa***
- ✓ ***Acinetobacter***
- ✓ ***Klebsiella, Entérobacter, Serratia***
- ✓ Staphylocoqu***e*** métiR

Flore commensale de l'oropharynx

Voies respiratoires basses stériles

Très grande diversité des espèces commensales de l'oropharynx

- ✓ ***Staphylococcus epidermidis*** et autres Staphylocoques à coagulase négative
- ✓ ***Staphylococcus aureus***
- ✓ Corynébactéries diverses
- ✓ Branhamella catarrhalis
- ✓ Streptocoques alpha-hémolytiques
- ✓ Pneumocoque (15 à 30% de porteurs sains)
- ✓ ***Neisseria*** commensales (***N.meningitidis*** compris)
- ✓ ***Haemophilus sp***
- ✓ ***Branhamella catarrahalis***
- ✓ **Nombreux germes anaérobies** (85% de la flore commensale)

Certains germes issus de la flore commensale peuvent être impliqués dans le processus infectieux :

déséquilibre de la flore polymicrobienne et dominance d'un germe

Examen cytobactériologique des crachats (ECBC) (1)

Place de L'ECBC dans le diagnostic

- ✓ Utilité dans les pneumopathies non compliquées, les pneumopathies impliquant des germes à croissance classique, des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives.
- ✓ Prélèvement non recommandé dans certaines infections : Légionellose
- ✓ Si signes de gravité
- ✓ Si patient ventilé ou intubé

  } Prélèvement plus invasif nécessaire
- ✓ Diagnostic des mycobactéries exclus de cet exposé

ECBC (2)

Objectifs de l'ECBC

- ✓ Identifier la ou les bactéries responsables de l'infection
- ✓ Rechercher les bactéries potentiellement pathogènes au sein d'une flore commensale riche
- ✓ Pouvoir étudier la sensibilité aux antibiotiques en vue d'adapter le traitement

Objectifs sans grandes difficultés

La difficulté de L'ECBC réside dans la différentiation entre colonisation par un germe et responsabilité de ce germe dans le processus infectieux

Nécessité d'un examen semi-quantitatif et de l'instauration d'un seuil de pathogénécité

ECBC (3)

Prélèvement

En théorie

- ✓ Le matin, à jeun
- ✓ Avant toute antibiothérapie
- ✓ Après un rinçage buccodentaire soigneux avec de l'eau distillée stérile
- ✓ Lors d'un effort de toux spontanée ou aidée d'une kinésithérapie
- ✓ Recueil dans un poudrier stérile

Eviter une contamination salivaire

[dilution de la flore pathogène
[contamination par les germes commensaux

Cas particulier : 3 jours consécutifs pour la recherche de Mycobactéries

ECBC (4)

Prélèvement

En pratique

- ✓ 45% des prélèvements sont rejetés car présentant une contamination salivaire
- ✓ Nécessité d'apprendre aux patient à cracher (surtout enfant atteint de mucuviscidose), ou de les aider à cracher (clapping)
- ✓ Manque d'explication concernant le prélèvement aux patients

Transport

- ✓ Très rapide, dans les deux heures
- ✓ Conservation préférable à +4°C

Eviter la pullulation des bactéries commensales au dépens des bactéries pathogènes

Objectifs et moyens de l'ECBC

	Objectifs	Moyens
Prélèvement du crachat	✗ éviter une contamination salivaire ✗ éviter une pullulation des germes commensaux aux dépens des germes pathogènes	➡ Rinçage soigneux de la bouche avant prélèvement + kinésithérapie ➡ Transport au laboratoire et ensemencement rapide
Examen cytologique	✗ éliminer les crachats salivaires ou sans signes d'infection	➡ Critères de Bartlett adaptée par Murray et Washington : dénombrement des PN et des cellules épithéliales
Ensemencement	✗ Choix de milieux de cultures permettant la croissance des germes les plus fréquents et les plus fragiles	➡ Respecter les exigences et les besoins des germes fragiles, utiliser des milieux riches et sélectifs
Lecture des cultures	✗ Pouvoir différencier une colonisation d'une infection ✗ Savoir reconnaître les germes pathogènes présents au milieu d'une flore commensale plus ou moins abondante	➡ Ensemencer une quantité précise du crachat permettant un dénombrement des colonies bactériennes Fixer un seuil significatif de pathogénécité (10^7 bactéries/ml)

Les différentes étapes de l'ECBC selon la SFM

Recueil du crachat

EXAMEN DIRECT
Gram x10
= appréciation de la qualité du prélèvement

Tableau de Barlett Murray et Washington

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

Cellules épithéliales = signes de contamination salivaire
PNN = signes d'infection

Classe 1, 2, 3

Classe 4, 5

CONTAMINATION SALIVAIRE

Demander un autre prélèvement

Fluidification

MISE EN CULTURE :
- gélose sang
- gélose chocolat enrichie (5 à 10% CO2)
- gélose sélective pour BGN

LECTURE
- seuil de pathogénicité = 10^7 bact/ml
- flore dominante/culture pure

ANTIBIOGRAMME
si nécessaire pour les agents pathogènes

Comparaison des procédures GBEA pour la réalisation de l'ECBC entre les différents laboratoires de bactériologie

	Hôpital cardiologique	Hôpital Croix-Rousse	C.H.L.S	H.E.H CNR-L	Hôpital Debrousse	Hôpital Bellevue
Examen cytologique	ED fait à partir d'une **partie purulente du crachat** Réalisation d'un **Gram** **Calcul du degré de contamination** selon les critères de Bartlett, Murray et Washington Evaluation semi-quantitative des germes	ED fait à partir d'une **partie purulente du crachat** Réalisation d'un **Gram** et d'un **bleu de méthylène** Evaluation semi-quantitative des PN, cellules et des germes	ED fait après **fluidification** du crachat au 1/2 Réalisation d'un **Gram** **Calcul du degré de contamination** selon les critères de Bartlett, Murray et Washington Evaluation semi-quantitative des germes	ED fait à partir d'une **partie purulente du crachat** Ecrasement avant coloration de **Gram et bleu de méthylène** **Calcul du degré de contamination** selon les critères de Bartlett, Murray et Washington Evaluation semi-quantitative des germes	ED fait après **fluidification** du crachat au1/2 Réalisation d'un **Gram** Evaluation semi-quantitative des PN, cellules et des germes	ED n'est réalisé que sur les prélèvement d'aspect purulent (aspect de salive= prélèvement rejeté) Réalisation d'un **Gram** Evaluation semi-quantitative des germes Dénombrement des PN (seuil à 25), des cellules épithéliales (seuil à 10)
Ensemence-ment	Crachats de classe **3,4 ou 5** Prélèvement au moyen d'une pastette. Méthode d'isolement par cadrans	Systématique de **tous les crachats** Méthode de l'öse calibrée (10µl) et isolement en cadrans	Crachat de **classe 5** après fluidification au1/2 (Sauf muco, classe 3,4 5) Méthode de l'öse calibrée (10µl) et isolement en cadrans	Crachats de classe **3,4 ou 5** après fluidification au1/2 Dilution au1/1000. Méthode de l'öse calibrée de 10µl et isolement par stries	Systématique de **tous les crachats** Dilution du crachat au1/2. Méthode de l'öse calibrée de 1µl pour 1 des 2 GC (stries) Isolement en cadrans pour les autres milieux	Méthode de l'öse calibrée (10µl) et isolement en cadrans

	Hôpital cardiologique	Hôpital Croix-Rousse	C.H.L.S	H.E.H CNR-L	Hôpital Debrousse	Hôpital Bellevue
Milieux de culture systématique	GS ANC+Opto GC polyvitex (CO_2) BCP	GS GC Haemophilus (CO_2)	GS (CO_2) GC polyvitex (CO_2) Mac Conkey	ANC GC polyvitex (CO_2) Mac Conkey	1 GS de cheval (CO_2) 2 GC polyvitex (CO_2) Albicans ID	GS GC PVS (Lewinthal) (CO_2) Chapman
Milieux de cultures rajoutés	Sabouraud si levure	Albicans ID si levures	Albicans ID si levures Sabouraud si Mycélium	Albicans ID si levures		Sabouraud si levures
Demandes spécifiques	***Legionella (***BCYE + GVPC) + Ag urinaires	***Legionella*** (IF + BCYE +GVPC + BMPA) + Ag urinaires + Ag urinaire	Mycobactéries ***Legionella (BCYE + BMPA) +*** Ag urinaire	***Legionella*** (BCYE + BKAB) +Ag urinaire		***Legionell***a (milieu CYE) + Ag urinaire
Identification	Germes pathogènes du 3ième cadran: Entérobactéries ***Pseudomonas*** Quelque soit le nombre de colonies: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques Dans le 2ième cadran et dominant: ***Haemophilus***	Quelque soit le nombre de colonies: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques Autres germes pathogènes présents dans le 3ième cadran	Quelque soit le nombre de colonies: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques Autres germes pathogènes présents dans le 2ième cadran	Germes pathogènes > 50 colonies : ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques ***Haemophilus*** ***Branhamella*** BGN	Germes dominants $>10^5$ (numération obtenue sur la GS ensemencer en stries) Pas de liste de pathogènes	Quelque soit le nombre de colonies: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques BGN
ATB	ATB systématique: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques Germes du 3ième cadran ou vu à ED: Entérobactéries ***Pseudomonas*** Céfinase®: ***Haemophilus +***ATB	ATB systématique: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques Germes pathogènes présents dans 3ième cadran	ATB systématique: ***S.aureus*** Pneumocoques Germes pathogènes présents dans le 3ième cadran	Germes pathogènes > 50 colonies : Pneumocoques ***S.aureus*** ***Strepto A*** BGN Céfinase®: ***Haemophilus*** ***Branhamella***	Germes dominants $>10^5$ Céfinase®: ***Haemophilus*** ***Branhamella***	Quelque soit le nombre de colonies: ***Strepto*** β ***S.aureus*** Pneumocoques Autres germes pathogènes si dominants

LABM BATISSON/VILLET
associée à une clinique

Analyse biologique des expectorations (1)

Recueil du crachat

→ Demande spécifique → Voir 2

↓

Demande non spécifique

↓

FLUIDICATION
Dilution au 1/2

↓

EXAMEN DIRECT
Gram x10, recherche de leucocytes et cellules épithéliales :critères de Bartlett, Murray et Washington

Classe 1.2.3

↓

CONTAMINATION SALIVAIRE

↓

Demander un autre prélèvement

Classe 4. 5

MISE EN CULTURE

- ✓ Dilution au 1/1000 dans de l'eau peptonée
- ✓ Isolement en stries (öse 10µl) suivant schéma en annexe n°8

- ✓ Milieux de culture
- gélose sang (5 à 10% de CO2)
- gélose chocolat polyvitex (5 à 10% CO2)
- Mac Conkey
- +/- Albicans ID si levures à l'examen direct

↓ 18 à 24h, 37 °C

LECTURE

- ✓ seuil de pathogénicité = 10^7 bact/ml
- ✓ germes pathogènes :
- ***S.pneumoniae***
- ***S.aureus***
- ***Streptocoque ß hémolytique***
- ***Haemophilus influenzae***
- ***Branhamella catarrhalis***
- BGN : ***Pseudomonas,*** Entérobactéries
- Autres germes à pouvoir pathogène

en culture pure ou codominant

} > 50 colonies

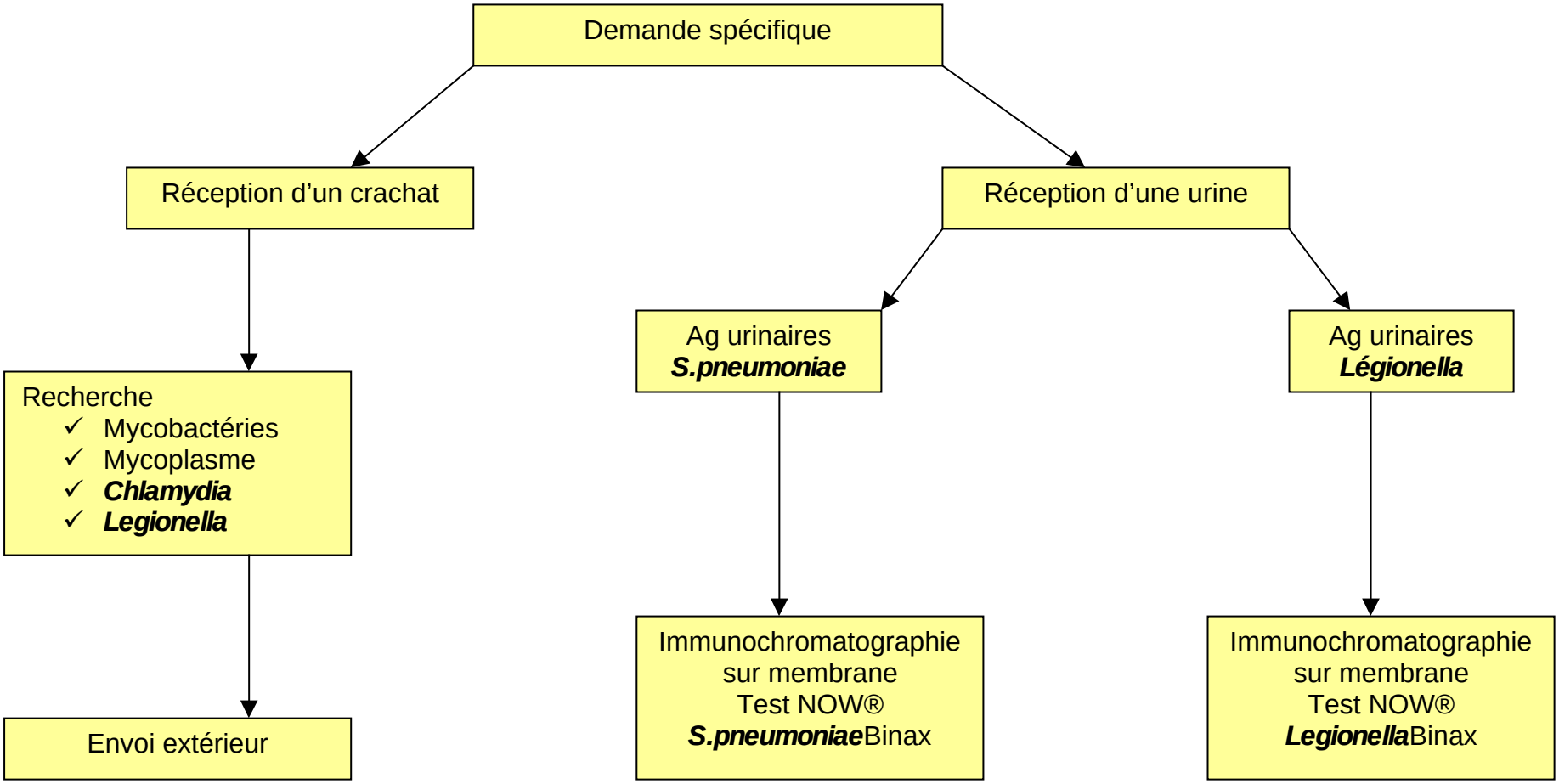
↓

ANTIBIOGRAMME

si nécessaire pour les agents pathogènes

LABM BATISSON/VILLET
associée à une clinique

Analyse biologique des expectorations(2)



Conclusion ECBC

- Examen non invasif, facilement réalisable chez un malade conscient et coopératif

Mais prélèvement **victime de son apparente simplicité** et très souvent de mauvaise qualité

- **Prélèvement controversé** et souvent difficilement interprétable à cause des mauvaises conditions de recueil

- **Examen mal codifié** mais qui peut être **informatif à plusieurs conditions** :

1. Recueil effectué dans de bonnes conditions

2. Qualité du prélèvement confirmé par l'ED

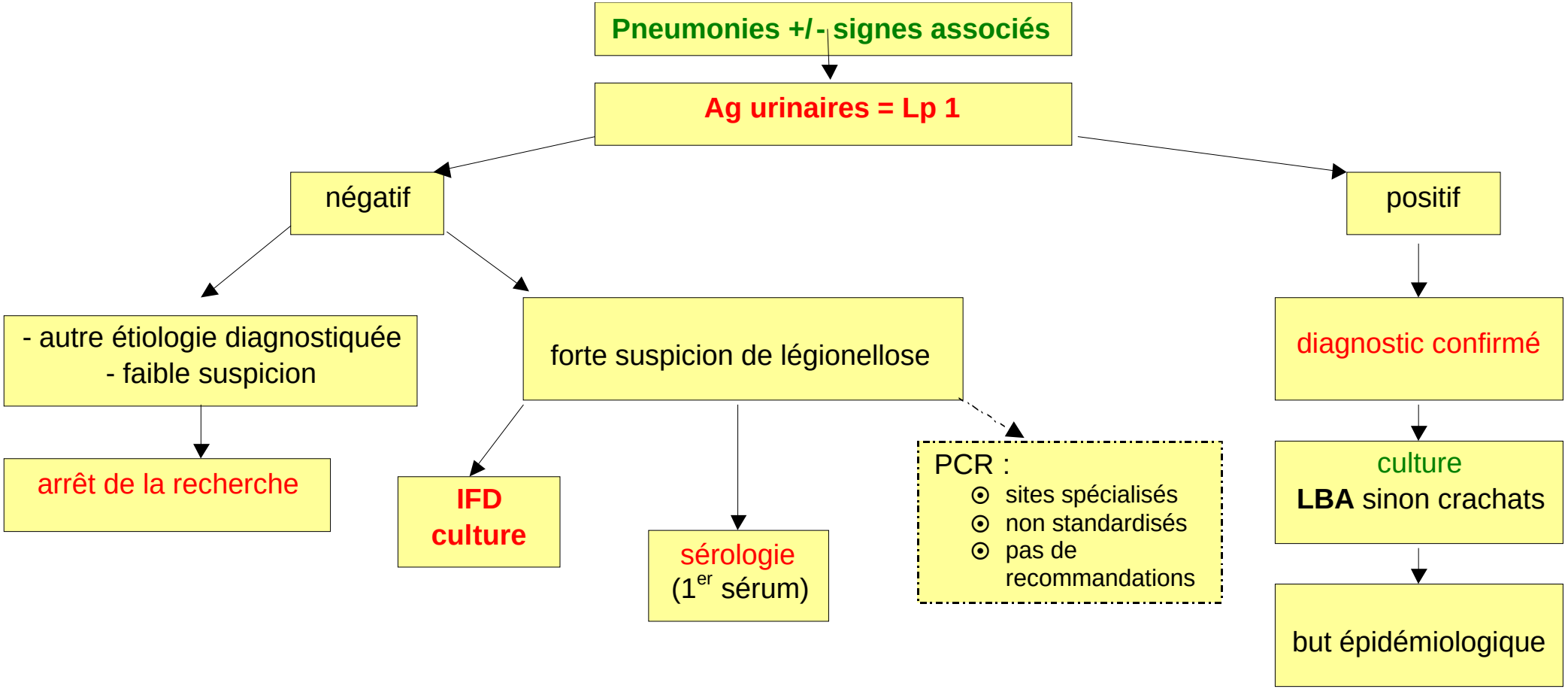
3. Rejet des prélèvements jugés contaminés ou sans signe d'infection

4 Signification clinique apportée à l'espèce prédominante si elle atteint ou dépasse un seuil de 10^7 bactéries/ml

Annexe 1 : Mucoviscidose

- ✓ colonisation évolutive au fil des années
- ✓ au départ : ***Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae***
- ✓ Puis installation du ***Pseudomonas aeruginosa (*** rarement avant 5 ans), ***Stenotrophomonas maltophila et Alcaligenes xylosoxidans***
- ✓ Développement de résistance et colonisation par du ***Pseudomonas*** muqueux
- ✓ Stade terminal de la maladie : ***Burkholderia cepacia***

Annexe 2 : Démarche diagnostique des légionelloses aiguës



diagnostic= association de signes cliniques et de résultats biologiques

NB : si suspicion de légionellose non Lp1, la culture, l'IFD et la sérologie sont réalisés d'emblée

Annexe 3 : Diagnostic de la *Legionella pneumophila* (Lp)

	Techniques	Avantages	Inconvénients
Ag urinaires	· Elisa (non utilisée à cause du coût) · Immunochromatographie sur membrane avec concentration des urines par ultrafiltration recommandée	· Diagnostic **précoce** : apparition dès le 3ème jour · **Rapide** · **Très spécifique** · Pas d'influence de l'antibiothérapie · Sensibilité moyenne	· Détection seulement de **Lp sérogroupe 1** (80%cas)
IF directe	2 types : · détection de Lp (monofluo kit) · Immunsérums spécifiques de sérogroupe	· **Rapide** (2h) · Détection possible de tous les sérogroupes	· Spécificité moyenne : - quelques **réactions croisées** · Sensibilité faible
Culture	· Prélèvements LBA, sinon crachats · Utilisation de 2 **milieux spécifiques** - milieu de base BCYE - milieux supplémentés en antibiotiques et facteurs de croissance (BKAB) · Décontamination à J1 si nécessaire · Identification Absence de croissance sur GS Loupe binoculaire (aspect en verre frité) · Puis identification de l'espèce et de la sous espèce (IF, latex, biologie moléculaire)	· **Epidémiologie** · Diagnostic de certitude · Excellente spécificité	· Croissance lente, difficile · Sensibilité faible · Avant une antibiothérapie
Sérologie	· IF indirecte · Elisa	· Quand les Ag urinaires ou culture négatifs · Diagnostic tardif	· Nombreuses réactions croisées · Pas de diagnostic précoce · Grande variabilité suivant les malades
PCR	· Prélèvements : **LBA**, urines, sérum · Amplification : gènes ***mip,*** ARN 5 ou 16S	· Rapide · Détection de toutes les espèces · Intérêt quand les autres examens sont négatifs	· **A standardiser** · Problèmes d'extraction