Techniques de réalisation d'un

Examen cytobactériologique du LCR

Mr Khalid MOUSSA

Plan

- Précautions et mise en garde
- Examen macroscopique
- Examen microscopique
- Culture
- Identification et Antibiogramme
- Antigènes solubles

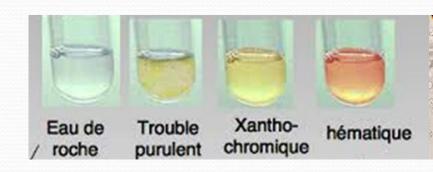
Précautions et mise en garde

- Acheminement rapide pour éviter:
 - La lyse des polynucléaires(jusqu'à 50% en 2H)
- La perte des bactéries fragiles sensibles aux variations de température et à la dessiccation (ex. Pneumocoque, Méningocoque......).
- Vérification de l'identité
- Renseignements cliniques
- Asepsie rigoureuse / PSM
- Travailler avec soin et économie

Eau de roche, clair
 Méningites virales/tuberculeuses

- Légèrement trouble, trouble, eau de riz
- Purulent
- Xanthochromique (jaune):
 - hémorragie ancienne,
 - ictère grave,
 - compression rachidienne.

Méningites bactériennes



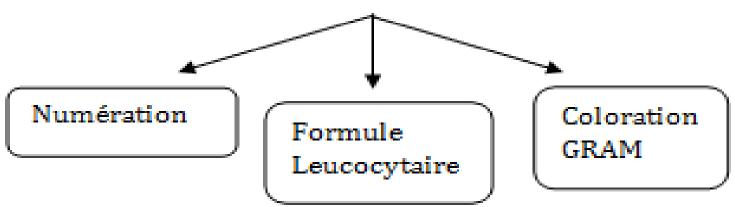
• Rouge hémorragique, hématique :

PL traumatique: piqûre accidentelle d'un vaisseau

- => Le liquide s'éclaircit progressivement et le sang coagule en masse
- => Surnageant clair après centrifugation avec absence de pigments sanguins

Hémorragie méningée: le liquide reste uniformément rouge ou rosé et ne coagule pas

=> Surnageant xanthochromique après centrifugation.



Numération cellulaire

- Peut être réaliser : Malassez, Nageotte, Thoma, Kovaslide ou fastread.
- Homogénéiser LCR
- Recouvrir la cellule d'une lamelle
- Attendre quelques minutes pour permettre aux éléments de sédimenter
- Compter les leucocytes et les hématies par mm³
- LCR normal : GB < 3/mm³

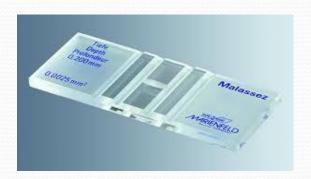
 $GR < 3/mm^3$

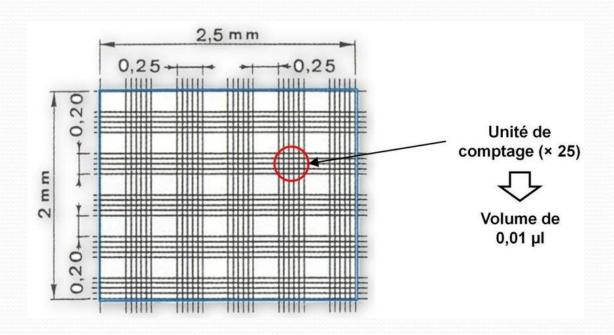
MALASSEZ

1 Rectangle = 0.01 mm^3

1 Bande = **0.1** mm³

La cellule = 1 mm^3





Cas particuliers

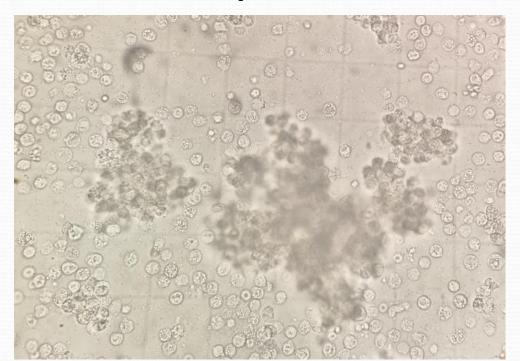
LCR hémorragique non coagulé :

- Calcul après dilution
- Calculer le nombre des hématies et leucocytes et le rapport hématies/leucocytes:
 - → s'il est > 1000, il reflète le rapport sanguin normal : Formule Leucocytaire n'est pas nécessaire
 - → s'il est < 1000, il peut témoigner d'un processus infectieux in situ.

Cas particuliers

LCR purulent:

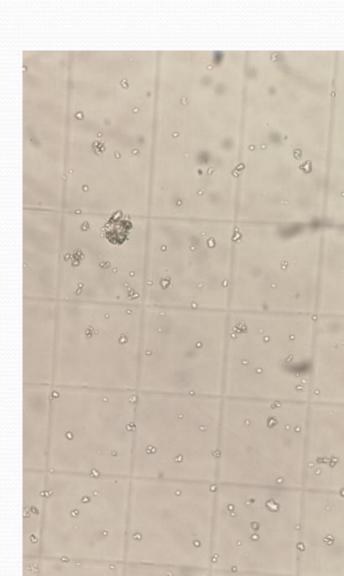
- Comptage des GB après dilution
- Noter la présence des amas leucocytaires



Cas particuliers

LCR reçu sur un tube sec:

- Aspect devient trouble
- Microparticules de silice chevauchent la lecture
- Mouvements browniens de ces microparticules
- Faire attention lors du comptage

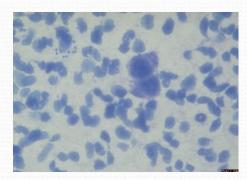


Formule leucocytaire:

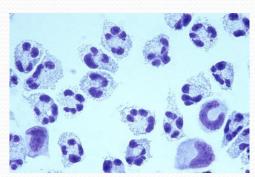
- Adulte $GB > 10/mm^3$

- Nouveau né $GB > 20 / mm^3$

- **Culot de centrifugation** (1500 tr/min pdt 10 min):
- 3 lames :
 - → Bleu de Méthylène et/ou MGG et Gram



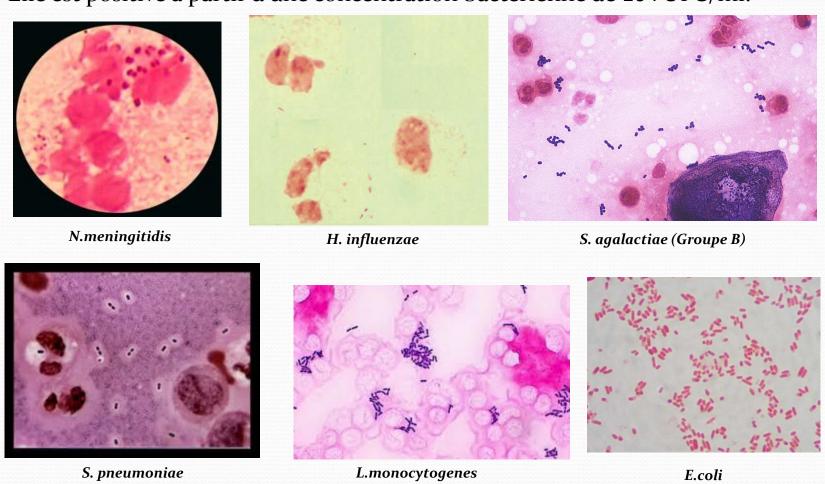
Bleu de méthylène



MGG

Coloration GRAM:

Permet la mise en évidence des bactéries dans le LCR Elle est positive à partir d'une concentration bactérienne de 104 UFC/ml.



Culture

- Première étape à réaliser sur le LCR : garder l'intégrité microbiologique du prélèvement
- Examen de référence pour le diagnostic de méningite bactérienne
- La culture affirme le diagnostic
- Identifie l'agent étiologique
- Étudie la sensibilité aux antibiotiques

Culture

- Les milieux ensemencés sont sélectionnés pour permettre la croissance des germes les plus fréquemment isolés dans les méningites communautaires.
- Gélose au sang + gélose au chocolat avec polyvitex
 => Incubation à 37°c sous 5 à 10% de CO2 pendant 24h à 48h
- Milieu de sabouraud en cas d'ID
- Autres : (Lowenstein-Jensen et Coletsos,...) selon le contexte clinique et épidémiologique

Culture

<u>Les milieux d'enrichissement</u>:

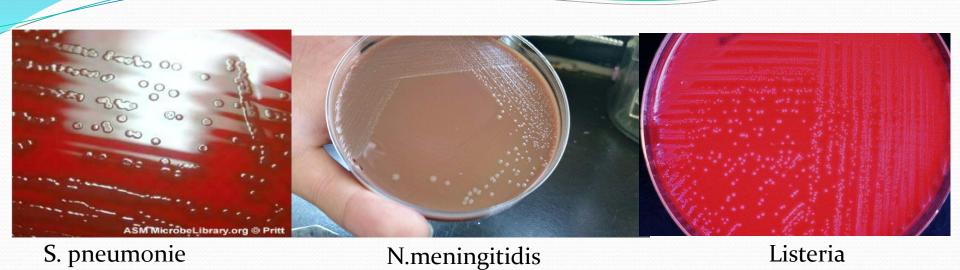
- Utilisés parfois pour permettre la croissance des germes à croissance difficile
- En pratique courante, ils ne sont pas ensemencés systématiquement car peu d'intérêt

Résultat de culture:

- ✓ Culture négative :
 - Prise d'antibiotiques
 - Délai d'acheminement du prélèvement au laboratoire incompatible avec la survie du germe
 - Inoculum bactérien très faible

Identification et Antibiogramme

- ✓ Culture positive :
 - => **Identification du germe** : Gram, catalase, oxydase, Galeries biochimiques, Automates, ID antigénique...
 - => Réalisation de l'antibiogramme indispensable
 - Milieux adaptés
 - Recommandations du CA SFM
 - Catégorisation clinique: Sensible, intermédiaire, résistant
 - Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques









Streptocoque B

E.coli

Antigènes solubles

- Principe
- Recherche des antigènes solubles libérés par le germe au cours de l'infection.
- De nature polysaccharides originaires de la paroi ou de la capsule spécifiques de sérogroupes ou de sérotypes.
- Utilisation des particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques.
- Ces particules s'agglutinent fortement en présence de l'antigène homologue.
- Technique rapide et simple d'interprétation
- Résultats non modifiables par une antibiothérapie préalable

Exemple de Kit des Ag solubles



N. meningitidis
ACY W135

N. meningitidis
B/E. coli KI

Control Latex
If Specimen Positive

Réactifs de latex

Carte de réaction

Germes recherchés: Hib, MNO, PNO, E. coli Kı, Strepto B

Antigènes solubles

- Technique
- Chauffage de l'échantillon 10 minutes à 100°C (incubateur sec ou bain-marie).
- Refroidissement à température ambiante
- Centrifugation 5 minutes à 1500 RPM
- Une goutte (40 à 50 μl) de surnageant dans les cercles de la carte + une goutte réactif latex.
- Mélange 3 minutes
- Lecture à l'oeil nu et sous un bon éclairage

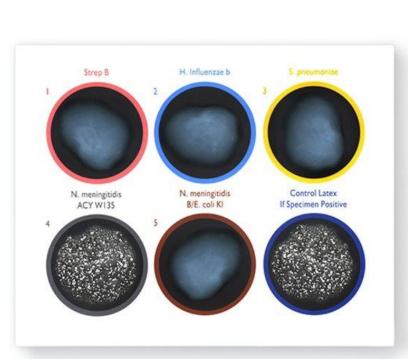
Exemple de réactions positives



Pneumocoque ++



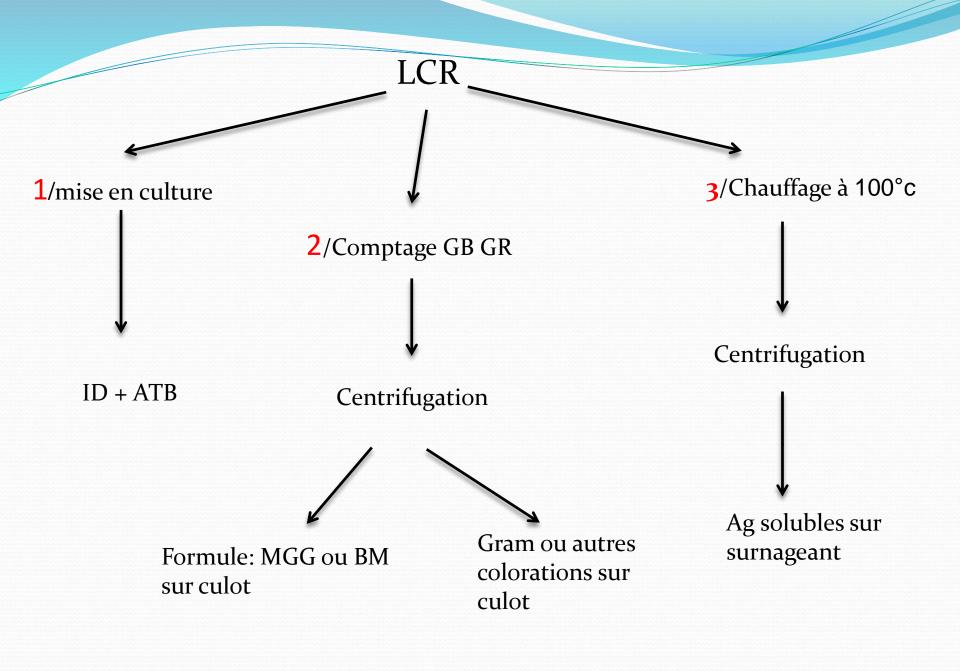
Haemophilus ++



N.Meningitidis ++

Antigènes solubles

- Sérogroupage de *N.meningitidis*
- L'identification des polyosides capsulaires du méningocoque permet de déterminer son sérogroupe.
- Douze sérogroupes sont décrits (A, B, C, E,H, I, K, L, W135, X, Y, Z).
- Seuls les sérogroupes A, B, C, Y, W135 et X sont impliqués dans les infections.
- Technique identique aux Ag solubles avec kit réactif spécifique aux sérogroupes cités ci-dessus.



Merci de votre attention

Documents de référence

- Rémic: Référenciel en microbiologie médicale 5^{ème} édition par la société française de microbiologie.2018
- Bactériologie médicale; Technique usuelles.
 Edition 2016
- Développement et Santé, n°117, juin 1995 Catherine Dupeyron* * Bactériologiste, Hôpital Albert-Chenevier, Créteil, France.