



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

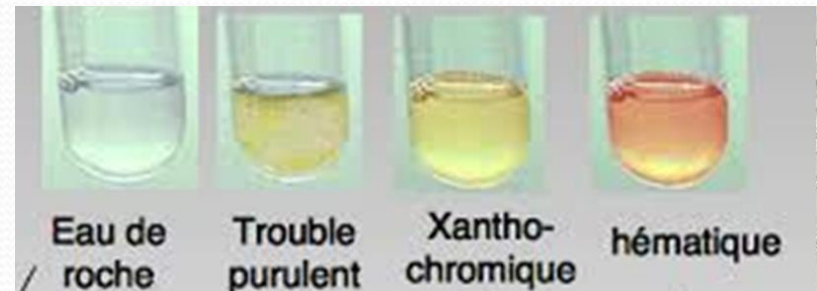
# Précautions et mise en garde

- 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

# Examen macroscopique

- Eau de roche, clair → LCR normal  
Méningites virales/tuberculeuses
- Légèrement trouble, trouble , eau de riz
- Purulent
- Xanthochromique (jaune):
  - hémorragie ancienne,
  - ictère grave,
  - compression rachidienne.

} Méningites bactériennes



# Examen macroscopique

- Rouge hémorragique, hématique :

**PL traumatique:** piqûre accidentelle d'un vaisseau

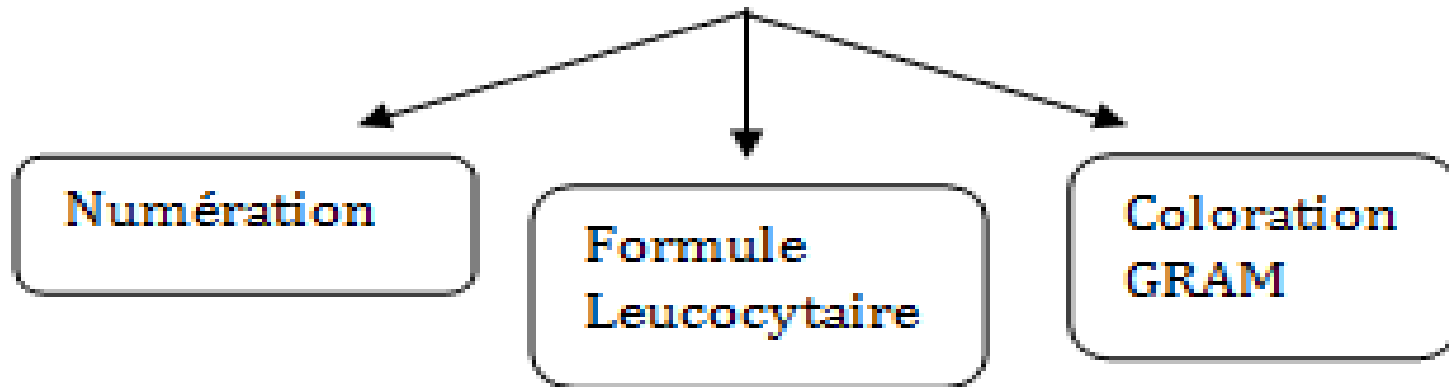
=> Le liquide s'éclaircit progressivement et le sang coagule en masse

=> 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.

# Examen microscopique



# Examen microscopique

## Numération cellulaire

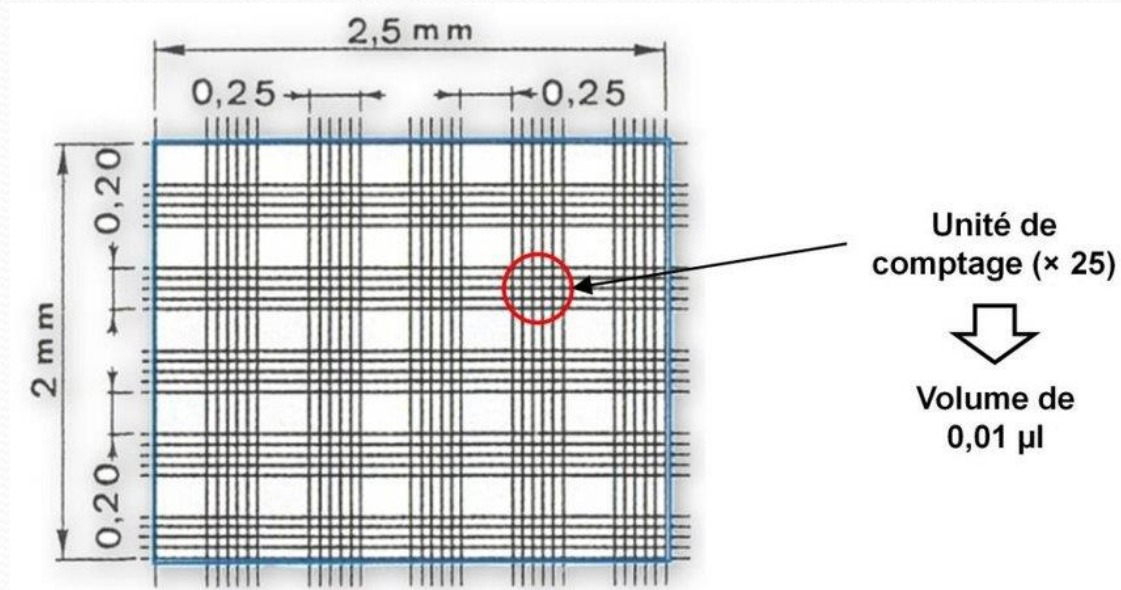
- Peut être réaliser : Malassez, Nageotte, Thoma, Kovaslide ou fastread.
- Homogénéiser LCR
- Recouvrir la cellule d'une lamelle
- Attendre quelques minutes pour permettre aux éléments de sédimenter
- Compter les leucocytes et les hématies par  $\text{mm}^3$
- LCR normal :  
GB  $< 3/\text{mm}^3$   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

- **MALASSEZ**

1 Rectangle = 0.01 mm<sup>3</sup>

1 Bande = 0.1 mm<sup>3</sup>

La cellule = 1 mm<sup>3</sup>



# Examen microscopique

## Cas particuliers

### LCR hémorragique non coagulé :

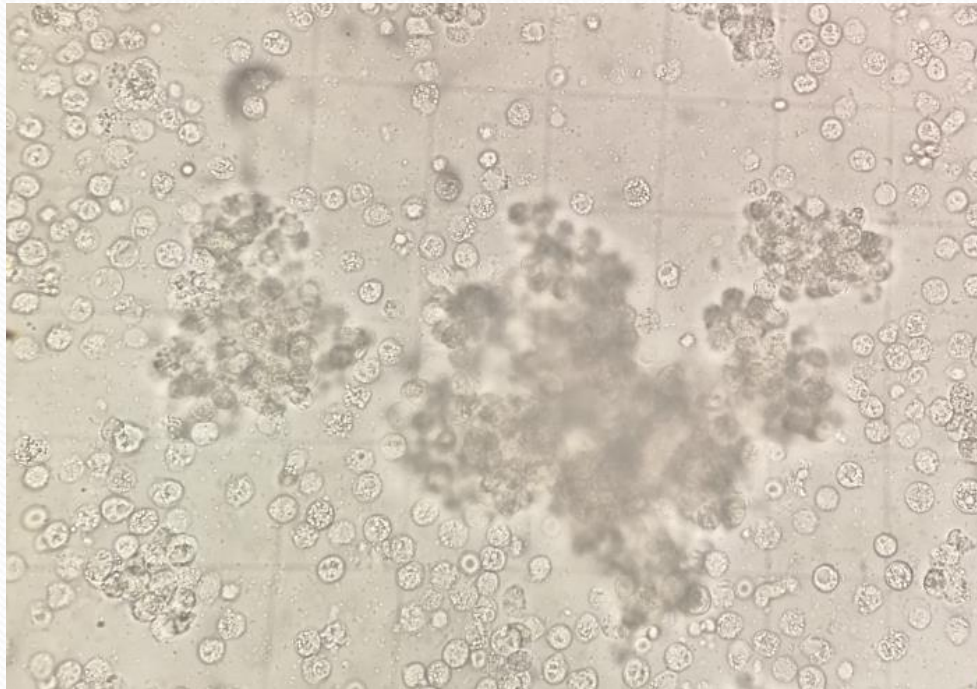
- Calcul après dilution
- Calculer le nombre des hématies et leucocytes et le rapport hématies/leucocytes:
  - s'il est  $> 1000$ , il reflète le rapport sanguin normal :  
Formule Leucocytaire n'est pas nécessaire
  - s'il est  $< 1000$ , il peut témoigner d'un processus infectieux in situ.

# Examen microscopique

## Cas particuliers

### LCR purulent:

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

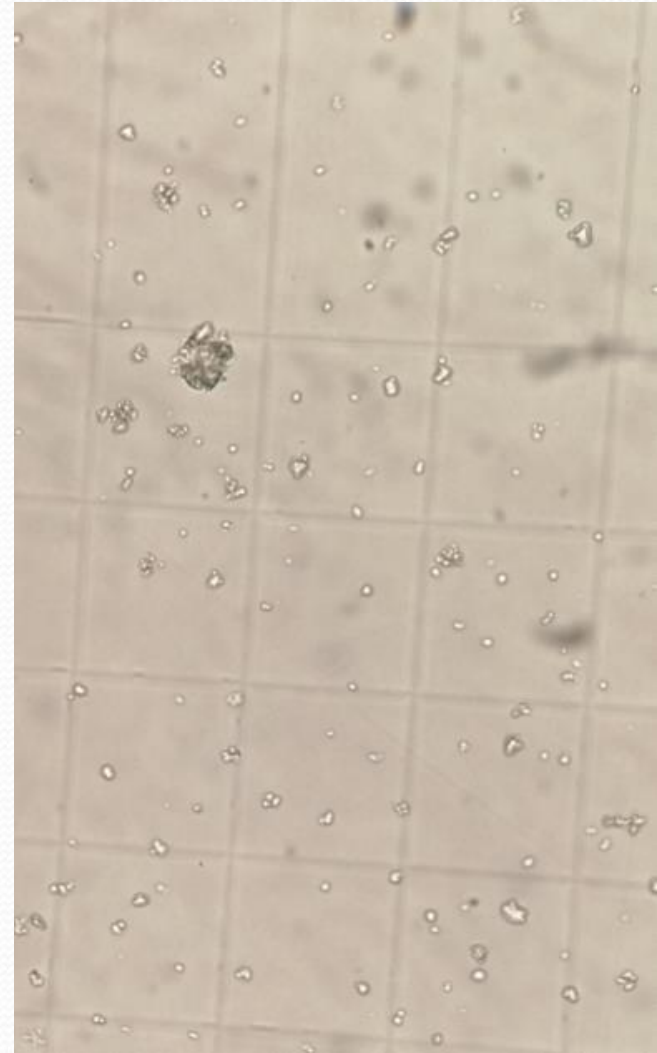


# Examen microscopique

## Cas particuliers

### LCR reçu sur un tube sec:

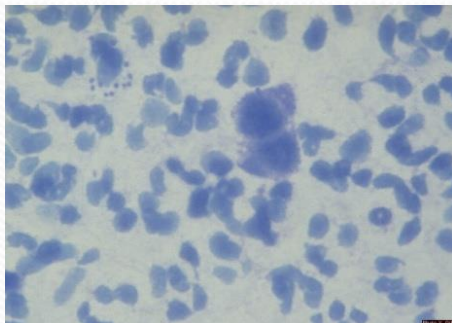
- Aspect devient trouble
- Microparticules de silice chevauchent la lecture
- Mouvements browniens de ces microparticules
- Faire attention lors du comptage



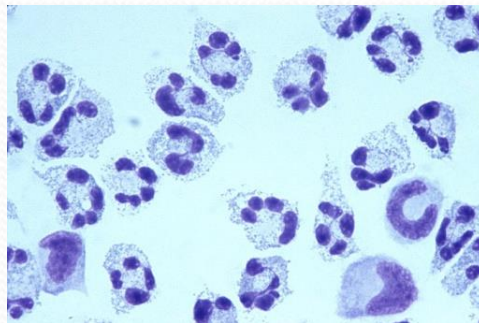
# Examen microscopique

## 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

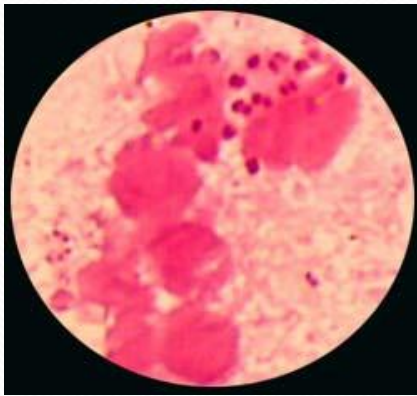


MGG

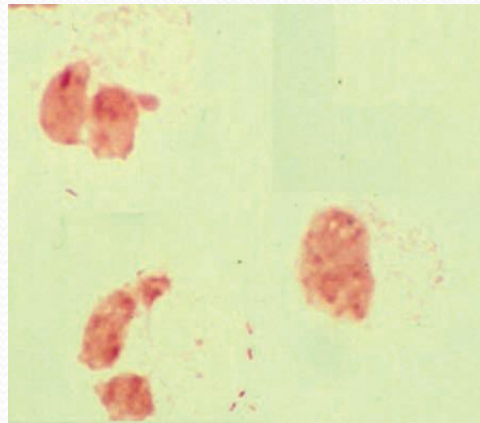
# Coloration GRAM:

Permet la mise en évidence des bactéries dans le LCR

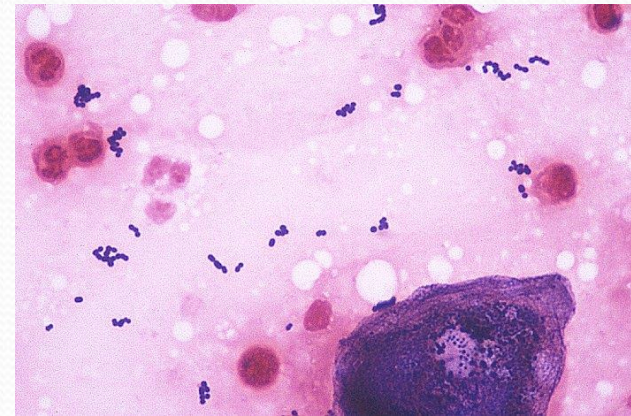
Elle est positive à partir d'une concentration bactérienne de 10<sup>4</sup> UFC/ml.



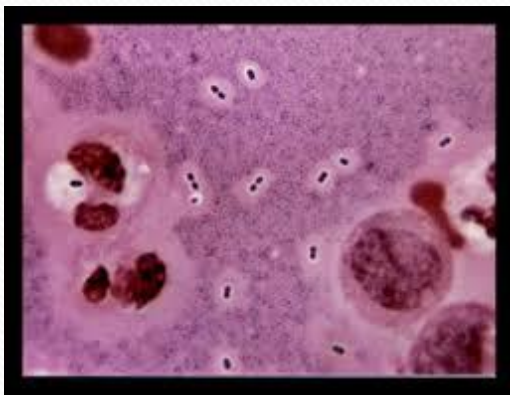
*N. meningitidis*



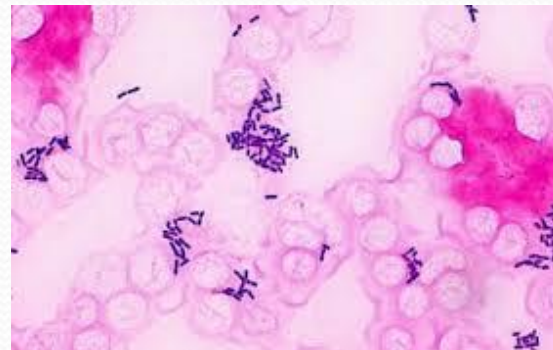
*H. influenzae*



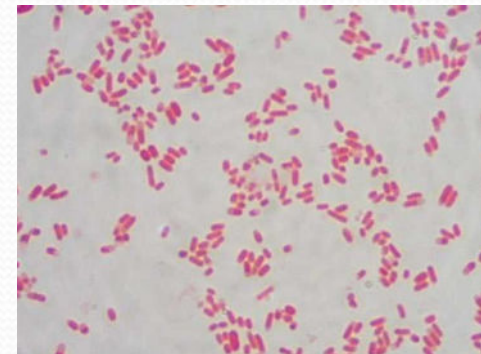
*S. agalactiae* (Groupe B)



*S. pneumoniae*



*L. monocytogenes*



*E. coli*

# 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 CO<sub>2</sub> pendant 24h à 48h
- Milieu de sabouraud en cas d'ID
- Autres : (Lowenstein-Jensen et Coletsos,...) selon le contexte clinique et épidémiologique

# Culture

## Les milieux d'enrichissement :

- Utilisés parfois pour permettre la croissance des germes à croissance difficile
- En pratique courante, ils ne sont pasensemencés 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

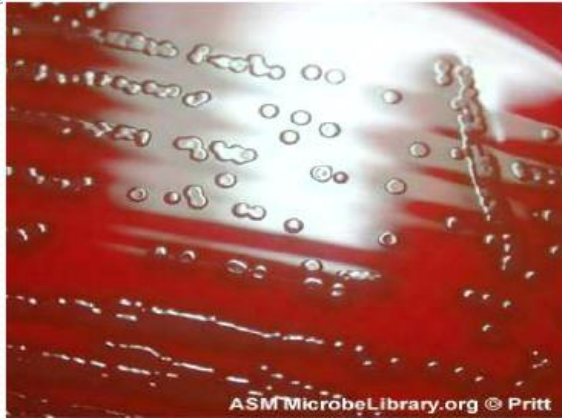
# Identification et Antibiogramme

## ✓ Culture positive :

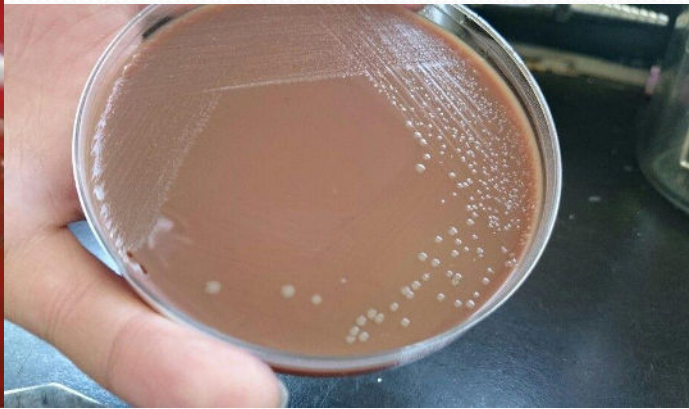
=> **Identification du germe** : Gram, catalase, oxydase, Galeries biochimiques, Automates, ID antigénique...

=> Réalisation de l'**antibiogramme** indispensable

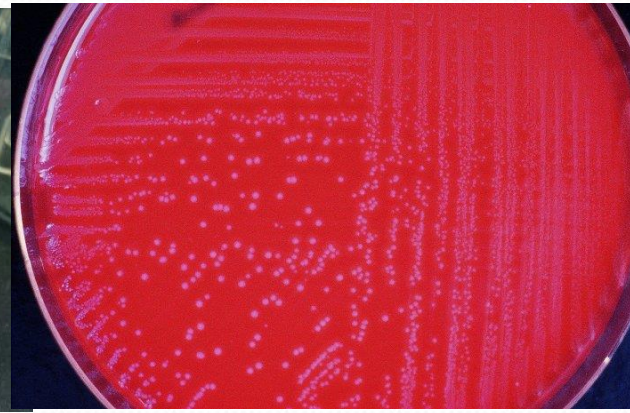
- Milieux adaptés
- Recommandations du CA SFM
- Catégorisation clinique: Sensible, intermédiaire, résistant
- Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques



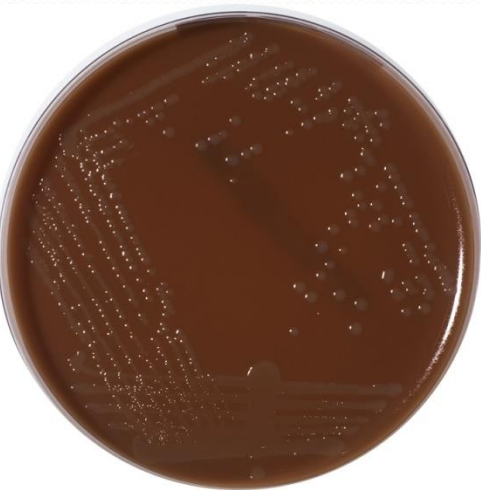
S. pneumonie



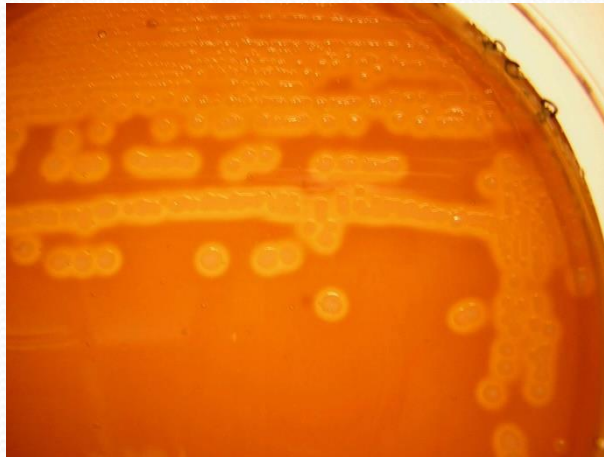
N.meningitidis



Listeria



Haemophilus



Streptocoque B



E.coli

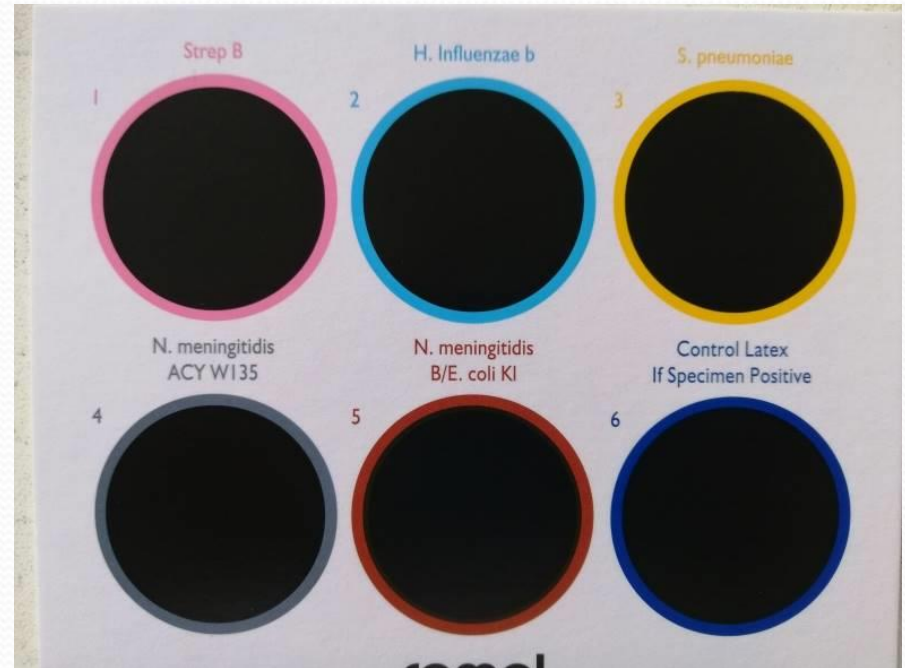
# Antigènes solubles

- 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



Réactifs de latex



Carte de réaction

**Germes recherchés : Hib, MNO, PNO, E. coli K<sub>1</sub>, Strepto B**

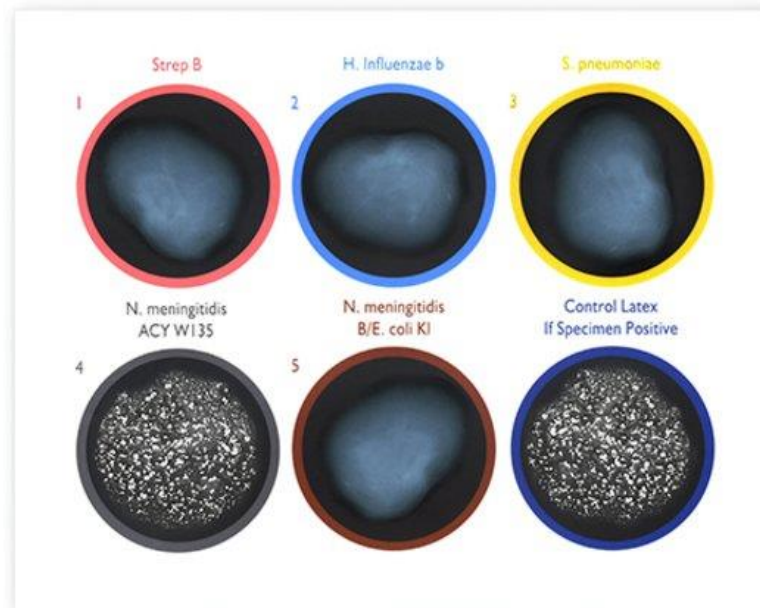
# Antigènes solubles

- **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  $\mu$ l) 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 ++



N.Meningitidis ++



Haemophilus ++

# Antigènes solubles

- Sérogroupage de *N.meningitidis*
- L'identification des polysides capsulaires du méningocoque permet de déterminer son séro groupe.
- Douze sérogroupes sont décrits (A, B, C, E,H, I, K, L, W<sub>135</sub>, X, Y, Z).
- Seuls les sérogroupes **A, B, C, Y, W<sub>135</sub>** et **X** sont impliqués dans les **infections**.
- Technique identique aux Ag solubles avec kit réactif spécifique aux sérogroupes cités ci-dessus.

# LCR

1/mise en culture

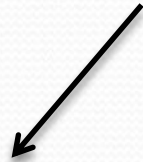


ID + ATB

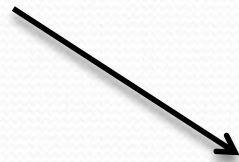
2/Comptage GB GR



Centrifugation



Formule: MGG ou BM  
sur culot



Gram ou autres  
colorations sur  
culot

3/Chauffage à 100°C



Centrifugation



Ag solubles sur  
surnageant



Merci de votre attention

## Documents de référence

- Rémic: Référenciel en microbiologie médicale 5<sup>ème</sup> 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.