

Examen
Cytobactériologique du
Liquide Céphalo-Rachidien
(LCR)

M1 Pharmacie, FMPO/UCAD
Année universitaire 2018

Objectifs

- **Décrire les circonstances cliniques de la demande de l'ECB du LCR**
- **Enumérer les indications de la Ponction Lombaire**
- **Décrire les conditions de réalisation du LCR**
- **Décrire la technique de prélèvement du LCR**
- **Décrire la démarche diagnostique de l'ECB du LCR**
- **Citer trois bactéries responsables de méningite chez les nouveau-nés**

PLAN

Rappels sur la méningite

Contexte de l'ECB du LCR

Démarche diagnostique

Analyse biochimique

Examen macroscopique

Examen microscopique

Mise en culture

Identification bactérienne

Détermination sensibilité aux antibiotiques

Recherche d'antigènes solubles

Biologie moléculaire

Recherche d'antibiotique dans le LCR

Résultats et interprétation

Conclusion

Rappels sur la méningite

Méningite infectieuse

Atteinte du SNC limitée aux méninges par apposition à la méningo-encéphalite touchant parenchyme cérébral

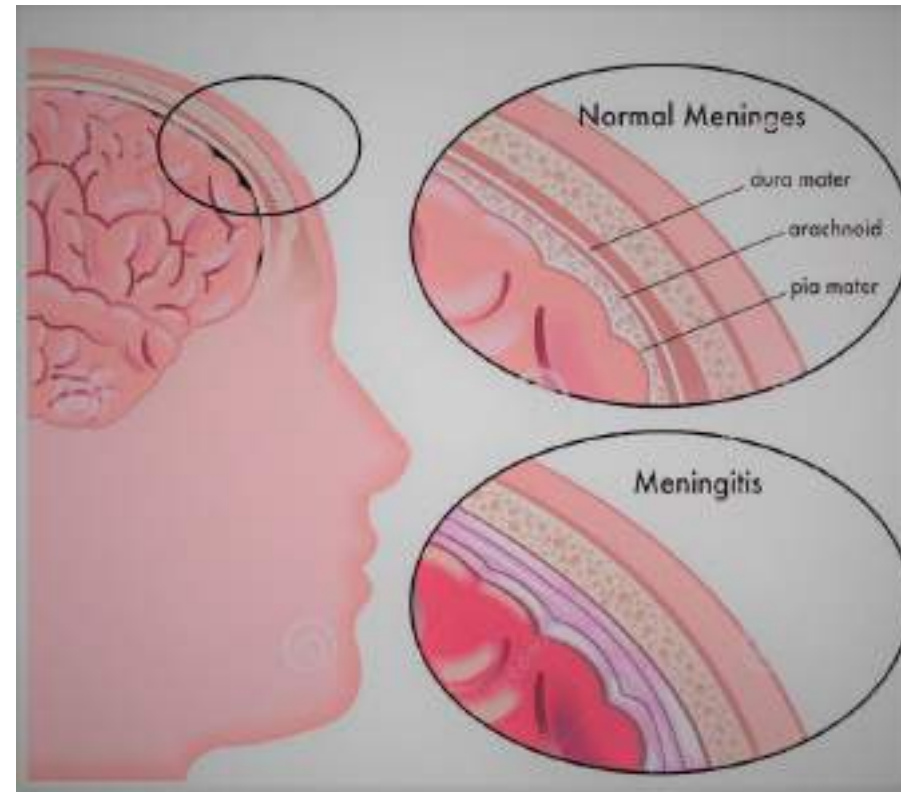
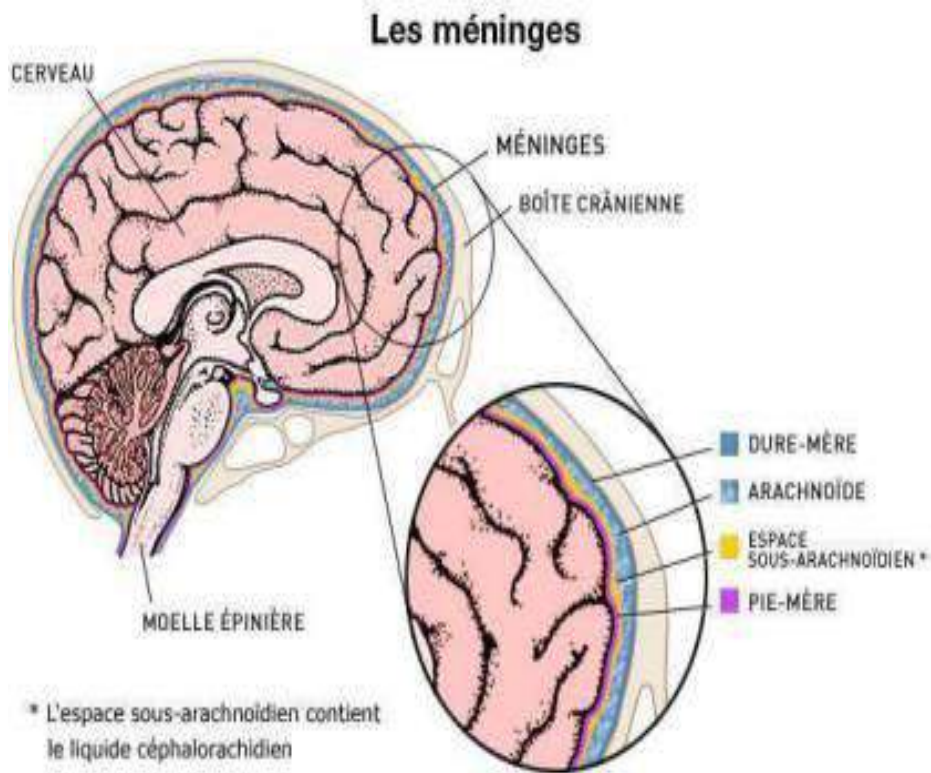
Voies d'invasion des méninges :

- Inoculation **directe**
- Lésions traumatiques
- Malformation SNC ou de ses enveloppes
- Interventions neurochirurgicales

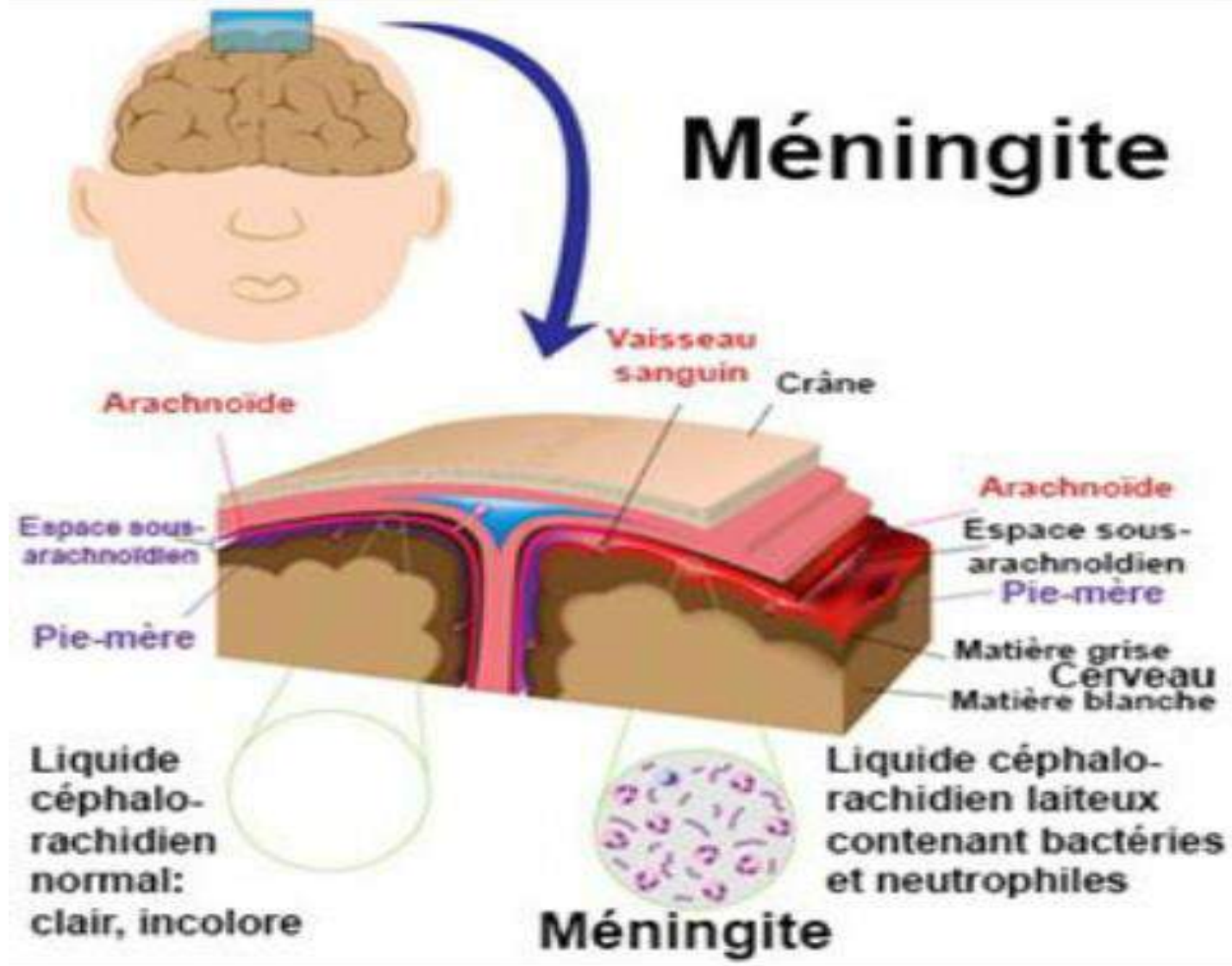
Rappels sur la méningite

Syndrome méningé : est lié à une irritation pathologique des enveloppes méningées (arachnoïde et pie-mère) et inflammation du LCR.

S'accompagne constamment de modifications biologiques du LCR



Rappels sur la méningite



Rappels sur la méningite

Voies d'invasion des méninges

Inoculation des méninges svt *indirecte*, par voie sanguine à partir foyer infectieux situé à distance

Micro-organismes pénètrent dans LCR au niveau plexus choroïdes et leur distribution entraîne infection des méninges et une invasion éventuelle du SNC

Foyer infectieux svt **ORL** (rhinopharyngite, otite, sinusite)
Autres foyers: pulmonaire, pleural, endocardite, intestinal, génital ou foyer osseux en contact étroit avec les méninges (ostéomyélite crânienne ou vertébrale)

Germe va se multiplier activement et provoquer des lésions méningées diffuses avec lésions d'endovascularite et de thrombose des vaisseaux arachnoïdiens

Rappels sur la méningite

Méningites infectieuses subdivisées en 2 groupes en fonction aspect macroscopique LCR:

- *purulentes* / liquide trouble, svt méningites bactériennes
- *à liquide clair* / causées par virus et bacille tuberculose

Méningites purulentes

3 groupes en fonction âge du sujet :

- *Méningites Néonatales* causées /
Entérobactéries (*E. coli K1*), *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*
- *Méningites du Nourrisson* causées /
3 espèces bactériennes responsables Infections ORL
N. meningitidis, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*

Rappels sur la méningite

Méningites purulentes

- *Méningites de l'enfant et de l'adulte*

Pvt être causées par n'importe quelle espèce bactérienne

N. meningitidis / méningite chez enfant âge scolaire et jeune adulte

S. pneumoniae / retrouvé à tous les âges, émergence de souches de sensibilité diminuée aux β -lactamines)

L. monocytogenes / méningite sujet 50 ans, provoque méningite suppurée ou méningo-encéphalite

Rôle immunodépression dans survenue de ce type infection

Rappels sur la méningite

Méningites à liquide clair causées par

- **Virus / *Echo* et *Coxsackie***
- **Bactéries / *Mycobacterium***
plus rarement *Leptospires*, *Brucella*, *Treponema*
- **Champignons / *Cryptococcus neoformans***
Candida albicans
Immunodépression rôle favorisant

Rappels sur la méningite

Aspects cliniques

Association syndr. méningé et syndr. infectieux (39-40°C)

Signes fonctionnels

Les céphalées : signe le + précoce, le + évocateur, le + constant

Intenses, diffuses, violentes, continues avec paroxysmes aggravées par bruit (**phonophobie**), lumière **photophobie**), mouvements, résistantes aux antalgiques classiques associées à **rachialgies** et **hyperesthésie cutanée diffuse**

Les vomissements : signe précoce mais inconstant, faciles, en jet déclenchés par chgt de position, indépendants de la prise d'un repas

La constipation : 3^{ème} élément du **trépied méningitidique**

Rappels sur la méningite

Aspects cliniques

Les signes physiques

→ Conséquences de l'inflammation méningée

La raideur méningée (raideur de la nuque)

Sujet en chien de fusil

Signes d'accompagnement = signes pyramidaux avec augmentation des réflexes ostéo-tendineux

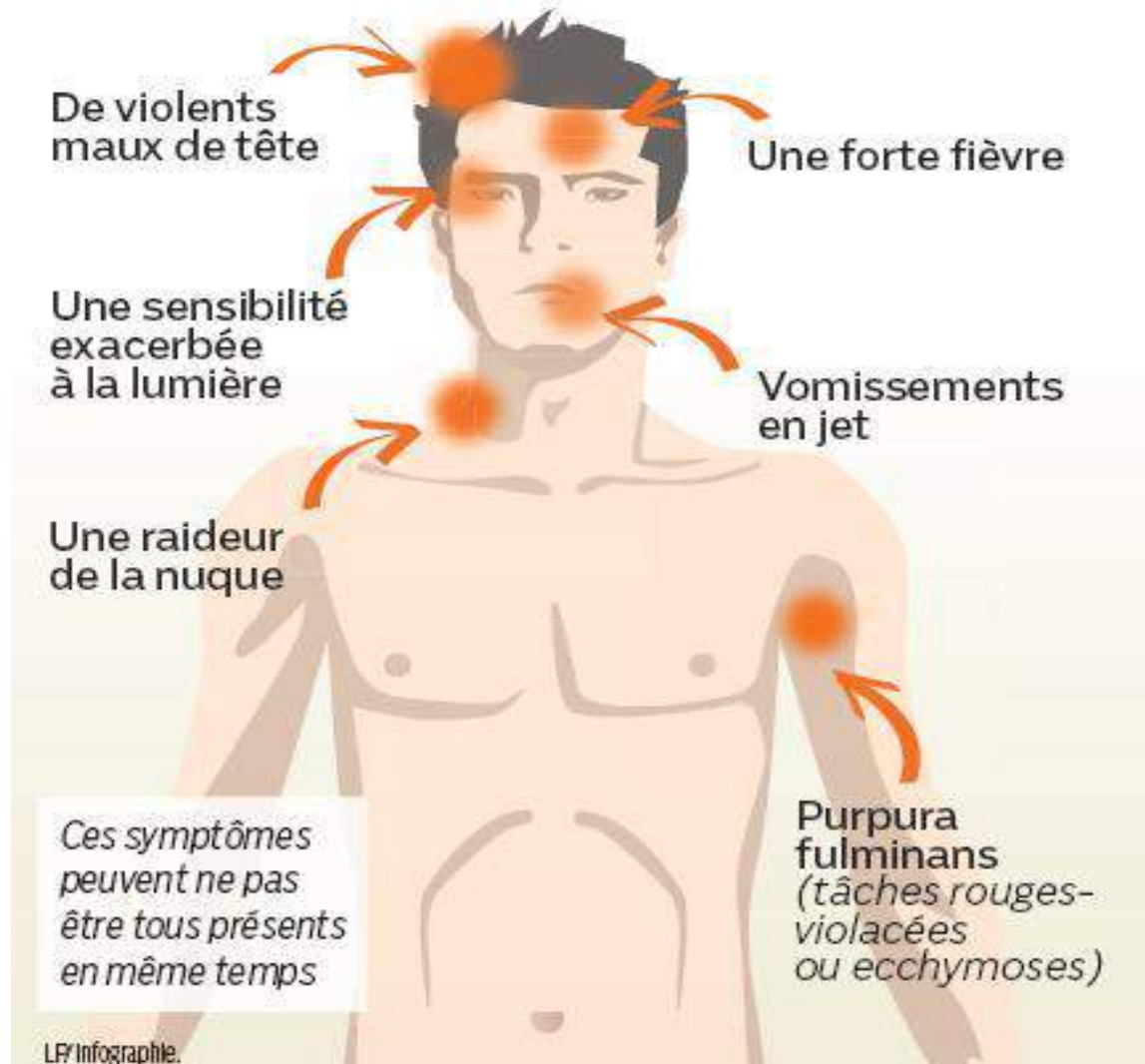
Signes de gravité

Formes suraiguës ou foudroyantes svt associées à un purpura thrombopénique

Signes encéphalitiques : coma, troubles respiratoires, troubles végétatifs, HTIC

Rappels sur la méningite

LES SYMPTÔMES D'ALERTE



Rappels sur la méningite

Purpura fulminans



Rappels sur la méningite

Epidémies de méningites dans le monde



Contexte de l'ECB du LCR

Circonstances cliniques à pratiquer ECB du LCR sont les suspicions:

- de **méningites**
- et **méningo-encéphalites** communautaires ou nosocomiales

Urgence bactériologique en raison de l'importance vitale pour le patient de la précocité diagnostic et traitement antibiotique

Toute suspicion de méningite doit faire procéder sans délai à l'analyse microbiologique du LCR

Contexte de l'ECB du LCR

Analyse cyto bactériologique LCR répond à 4 finalités principales:

- **Orienter** thérapeutique dans mn suivant prélèvement grâce à l'examen microscopique (cytologie et Gram)
- **Affirmer** origine bactérienne par culture et identification colonies (ou PCR à partir extrait ADN)
- **Établir** par ABG le profil sensibilité souche incriminée et réadapter l'antibiothérapie probabiliste préalablement instituée
- **Déclarer** si besoin auprès des autorités sanitaires pour déclencher enquête épidémiologique

Prélèvements

Indication d'une PL

Différents contextes:

- **Syndrome méningé**
- **En cas d'infection materno-foetale, pour éliminer toute atteinte méningée secondaire**
- **PL de contrôle, parfois recommandé 36-48 heures après début antibiothérapie (vérifie efficacité traitement)**
- **PL de contrôle en cas de méningites néonatales, 48 heures après début traitement**

Prélèvements

Technique

- LCR prélevé dans conditions très rigoureuses d'aseptie
- Liquide recueilli svt par ponction lombaire du cul de sac dural entre les espaces vertébraux L4 - L5 ou L3-L4 ou L5-S1
- L'espace L4-L5 se repère sous une ligne horizontale rejoignant les 2 crêtes iliaques
- Malade assis, courbé en avant (dos rond) ou couché
- Ponction réalisée dans un plan sagittal et médian selon une direction légèrement ascendante (30°) entre les apophyses épineuses.
- Après avoir franchi la résistance du ligament vertébral postérieur, l'aiguille à mandrin pénètre dans cul de sac
- Liquide prélevé puis l'aiguille est retirée d'un coup sec

Prélèvements

- Liquide collecté dans **3 récipients stériles sans anticoagulant**
- A l'état normal, liquide s'écoule en gouttes limpides, incolores aspect « **eau de roche** »



PL contre indiquée :

- en cas de traitement anticoagulant qui pourrait créer un hématome extra-dural rachidien
- et en cas de thrombopénie

Prélèvements

Aspect LCR pvt être modifié par diverses étiologies:

- **Hémorragique** : soit hémorragie méningée
soit brèche vasculaire locale lors
du prélèvement

Recueillir LCR dans **3 tubes** permet de les discriminer

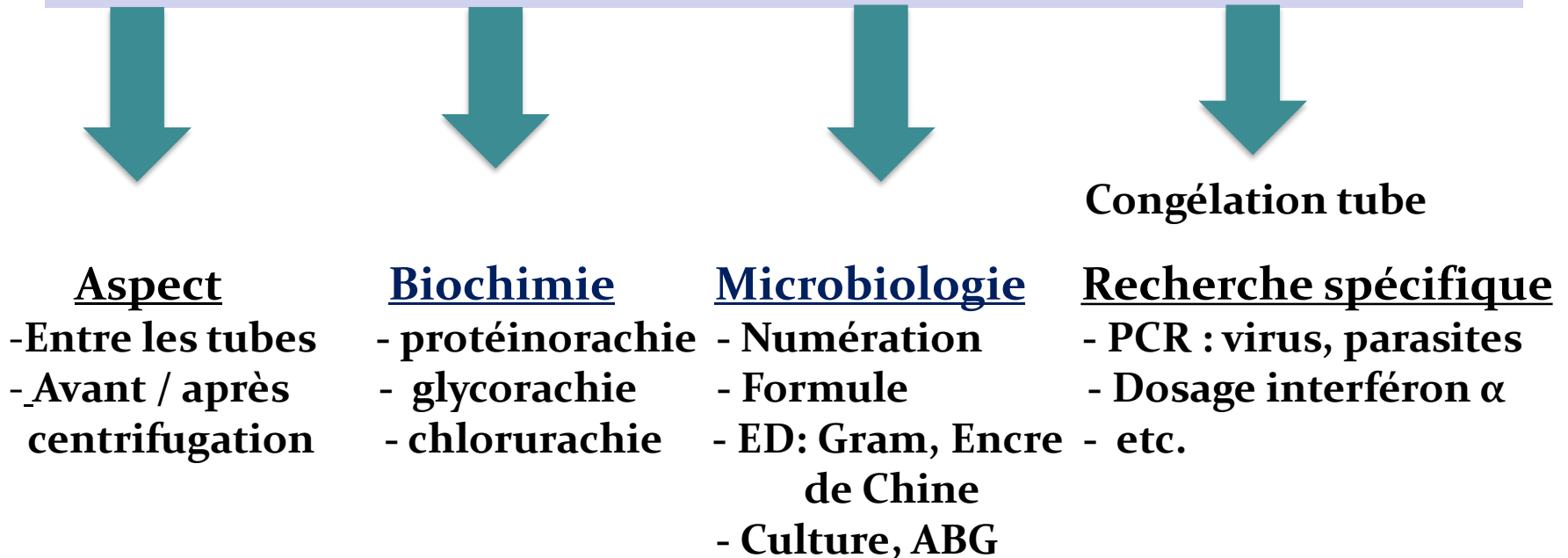
Diminution progressive concentration en GR dans 3 tubes
en faveur d'un traumatisme vasculaire

Aspect LCR identique dans 3 tubes et liquide ne coagule pas
en cas d'hémorragie méningée

- **Xanthochromique**: s'observe en cas d'hémorragie
méningée, compressions médullaires
ou hyperprotéinorachie
- **Trouble** : modification par hyperleucocytose,
évocateur méningite à germes pyogènes

Démarche diagnostique

Recueil du LCR dans tubes stériles



Démarche diagnostique

Analyse biochimique

Paramètres systématiquement dosés dans LCR

glycorachie (en même temps que glycémie), **protéinorachie**
et +/- **chlorurachie**

- Glycorachie = **2/3** glycémie
- **Hypoglycorachie** associée à une **méningite bactérienne**
parfois obs. méningites ourliennes, à entérovirus,
de méningo-encéphalites herpétiques ou CMV etc.

Persistance, mauvais pronostic et témoigner d'une ventriculite

- **Protéinorachie normale** : **0,10 – 0,45** g/l
- **Hyperprotéinorachie** (**1 – 5** g/l) lors de méningites purulentes
Persiste 2-3 sem. après début méningite

Protéinorachie plus longue à se normaliser que glycorachie

Démarche diagnostique

Analyse biochimique

- Dosage chlorures (N: **110 -120** meq/l)

Hypochlorurachie en cas de suspicion **méningite à BK**

- Dosage **Interféron α** (N: **< 2** UI) du LCR

Augmentation dans LCR et présence des signes cliniques en cas suspicion **méningite virale**

(virus Echo, Coxsackie, Oreillons, CMV et VZV) et encéphalite herpétique

Dosage interféron α interprété en fonction du titre sérique

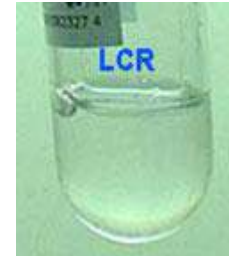
Atteinte virale méningée montre une concentration plus élevée dans LCR que dans sérum

Démarche diagnostique

Examen macroscopique

Noter aspect LCR

LCR normal, limpide « **eau de roche** »



Différents aspects pathologiques pvt être observés:

- *Eau de riz* (ou trouble, à partir 200 éléments/mm³)
- *Xanthochromique*
- *Hématique* (voire hémorragique)

En cas de PL hémorragique, l'aspect xanthochromique du LCR après centrifugation peut témoigner d'une hémorragie méningée ancienne

Démarche diagnostique

Examen microscopique

Numération en **cellule de Malassez**

Permet évaluer nombre de leucocytes et GR /mm³



Formule leucocytaire établie par frottis après cytocentrifugation et coloration **May-Grünwald-Giemsa**

Seuil significatif si **n > 10** éléments / mm³

Démarche diagnostique

Orientation cytochimique des LCR

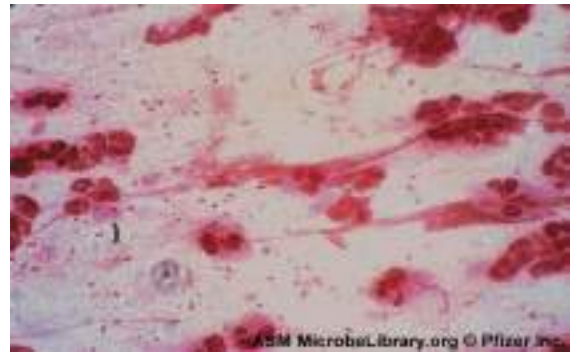
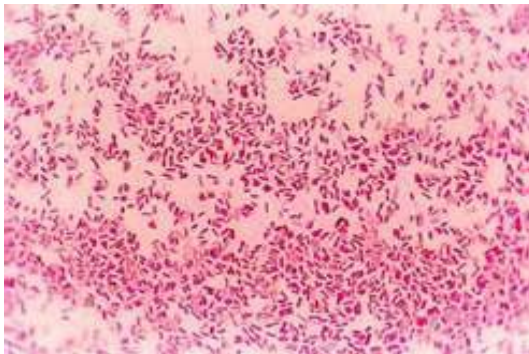
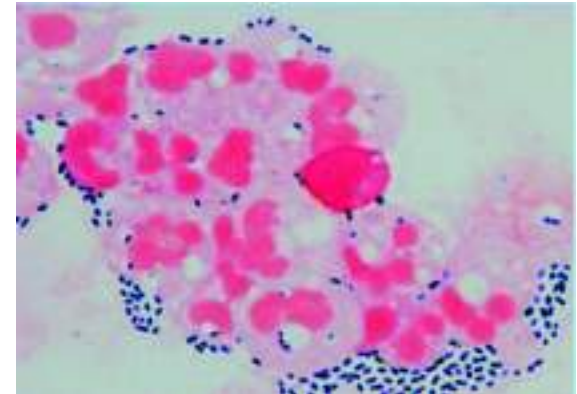
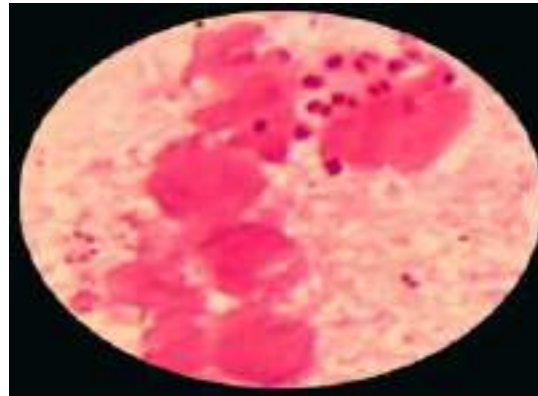
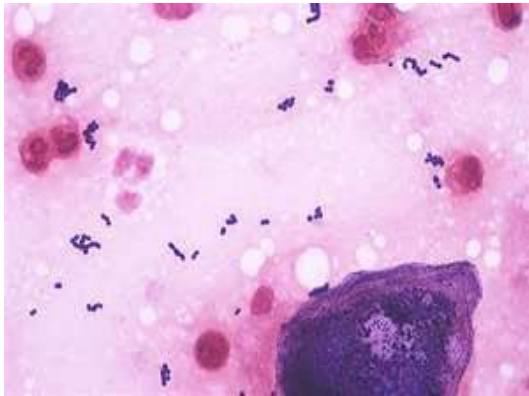
Paramètres	LCR normal	LCR purulent	LCR purulent	LCR panaché	LCR hémorragique sans méningite
Aspect	Clair, eau de roche	Trouble	Clair	Clair	Trouble, sanglant
Éléments cellulaires nucléés /mm ³	< 5 10 - 30 chez Nné	> 20	> 20	> 20	1 élément pour 800 hématies
Type d'éléments	-	> 50 % polynucléaires	> 50 % lymphocytes	50 % polynucléaires 50 % lymphocytes	Rapport polynucléaires/lymphocytes = sang circulant
Protéïnorrhée	< 0,4 g/l	> 0,4 g/l	> 0,4 g/l	< 0,4 g/l	0,4 +/- 0,1 g/l pour 1 000 hématies
Glycorachie/glycémie	> 60 %	< 40 % *	< 40% * (sauf si étiologie virale)	> 60 %	> 60 %
Chlorurorrhée	120 mmol/l	Normale	Normale (sauf méningite tuberculeuse)	Normale	Normale
Orientation	Normal	Méningite bactérienne	.Méningite tuberculeuse . Méningite à Listeria . Origine virale (glycorachie normale < 100 éléments / mm ³) . Spirochètes	. Méningite à Listeria . Méningite purulente ou lymphocytaire débutante . Abscès cérébral	. Hémorragie méningée . Ponction traumatique (éclaircissement sur 3 tubes)

Démarche diagnostique

Examen microscopique

Coloration de Gram

Elément essentiel du diagnostic, permet mise en évidence de bactéries dans LCR, donc orientation étiologique



Démarche diagnostique

Examen microscopique

Méningite à ED + : orientation étiologique selon contexte

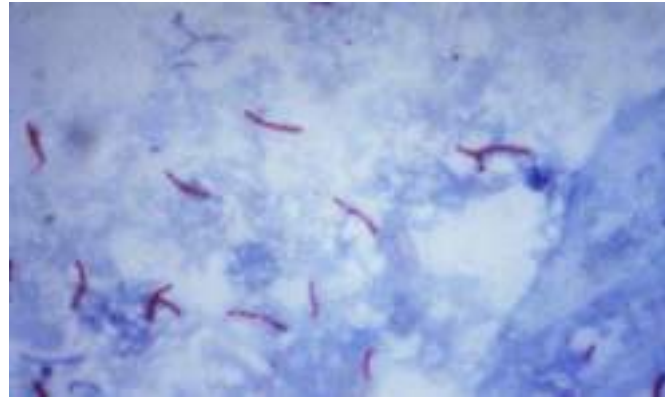
	CGP	BGP	CGN	BGN
NN < 1 mois	1. Strepto B	2. Listeria	-	3. <i>E. coli</i> K1
NRS et enfant < 5 ans	1. Pneumocoque	-	2. Méningocoque	3. <i>H. influenzae</i> b
Enfant 5 ans, Ados et Adultes	2. Pneumocoque	3. Listeria	1. Méningocoque +++	-
Sujets âgés , ID	1. Pneumocoque +++	3. Listeria	2. Méningocoque	-
Infections nosocomiales ou brèches crâniennes	Staphylocoques, Streptocoques	Corynébactéries.	-	Entérobactéries

CGP: cocci Gram + , BGP: bacille Gram + , CGN: cocci Gram -, BGN: bacille Gram -

Démarche diagnostique

Examen microscopique

Coloration de Ziehl-Neelsen : Suspicion de **BK**



Coloration à l'encre de Chine: suspicion **Cryptocoques**



Suspicion **Leptospires**, recherchés par examen au microscope à fond noir

Démarche diagnostique

Mise en culture

Quel que soit le nombre d'éléments , LCRensemencé sur milieux de culture adaptés aux bactéries recherchées

Cultures observées quotidiennement, avec une réponse provisoire à 48 h, et conservées en incubation 5 jrs.

Selon contexte clinique, différents possibilités pvt être envisagés

LCRensemencé sur:

Gélose chocolat +Isovitalex[®] sous 5-10% CO₂

Gélose Columbia au sang sous 5-10% CO₂

Bouillon Cœur-cervelle

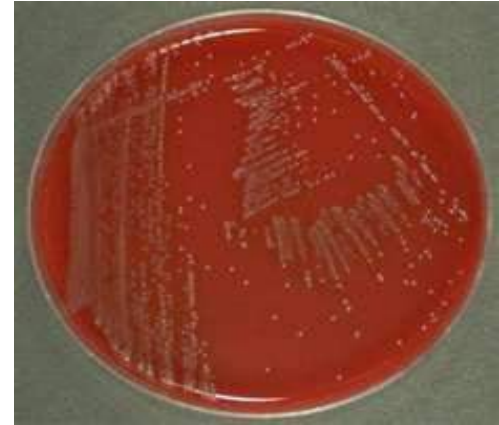
Incubées 5 jrs

à 37°C

En cas d'examen direct positif , ABG et détermination CMI pvt être directement tentés à partir LCR, et sont confirmés secondairement après isolement bactérien

Démarche diagnostique

Mise en culture



Démarche diagnostique

Mise en culture

Contexte particulier

- **Sujet ID: ensemencer gélose Sabouraud sans actidione en cas de suspicion de cryptococcose méningée, réaliser examen direct à l'encre de chine**
- **Suspicion de tuberculose, ensemencer en plus géloses Löwenstein et Coletsos**
- **Contexte neurochirurgical et nosocomial, ensemencer un milieu pour anaérobie incubé en anaérobiose à 37°C**
- **En cas d'antibiothérapie préalable, ensemencer LCR dans un flacon d'hémoculture avec produits absorbants les ATBs : gélose au sang additionnée de Tween 20**

Démarche diagnostique

Mise en culture



Démarche diagnostique

Identification bactérienne

Bactéries isolées font l'objet d'une identification allant jusqu'au séro groupe ou sérotype pour *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *L. monocytogenes* et *S. pneumoniae*

Identification à partir caractères cultureux,
biochimiques
et antigéniques

Caractères biochimiques

Strepto B : hémolyse β , Bile esculine (-), bacitracine (**R**),
hyppurate (+), Optochine (R)

Pneumocoque: Hémolyse α , Bile Esculine (-), Bacitracine (**S**),
Hippurate (-), Optochine (**S**), Capsule (+)

Démarche diagnostique

Identification bactérienne

Caractères biochimiques

Méningocoque : Glucose (+), Maltose (+), Saccharose (-)
Lactose (-), GGT (+), DNase (-)

M. catarrhalis : Glucose (-), Maltose (-), Saccharose (-),
Lactose (-), DNase (+), Nitrites (+),
nitrates (+)

L. monocytogenes: Hémolyse (+), Rhamnose (+), D-xylose (-)
Nitrate Réductase (-)

H. Influenzae : Exigence fact (**X**: hémine et **V**:NAD),
synth. porphyrine (-), oxydase (+),
catalase (+), exigence en CO₂ (-),
hémolyse (-)

Démarche diagnostique

Détermination sensibilité aux ATBs

Repose sur l'ABG standard,

Voire sur la détermination des CMI
(*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*)

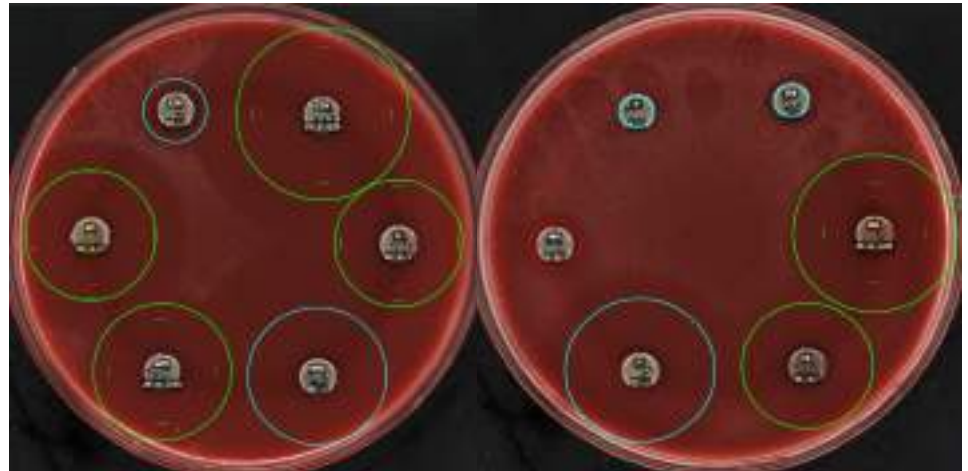
Lecture interprétative suivant recommandations du
CA-SFM/EUCAST

Démarche diagnostique

Détermination sensibilité aux ATBs



S. pneumoniae



H. influenzae

Démarche diagnostique

Recherche d'antigènes solubles

Permet la mise en évidence des polysaccharides capsulaires libérés dans les liquides biologiques au cours des infections

Recherche par agglutination de particules de latex

Sensibilisées pour

- Méningocoque A
- Méningocoque C
- Méningocoque B / E. coli K₁
- Méningocoque Y / W₁₃₅
- *H. influenzae b*
- Pneumocoque
- Streptocoque Groupe B

Démarche diagnostique

Recherche d'antigènes solubles

Mise en évidence de polysaccharide C de pneumocoque par technique immunochromatographique (Binax NOW[®])



Aide à l'orientation diagnostique en cas d'ED négatif, LCR décapité

Prélèvements: LCR et urines

Démarche diagnostique

Biologie moléculaire

- Recherche de gènes spécifiques de certaines bactéries (Méningocoque, Pneumocoque, *H. influenzae*, etc.) voire du sérotype bactérien ou virus peut être effectuée à l'aide de techniques de PCR, réalisées sur LCR.
- PCR utiles lorsque l'examen direct et antigènes solubles sont négatifs ou en cas de méningite décapitée

Démarche diagnostique

Recherche d'antibiotique dans le LCR

- Recherche effectuée en cas de suspicion de méningite décapitée et dans les PL de contrôle
- Procédé microbiologique souhaitable pour éliminer toute cause de cultures faussement négatives
- 1 goutte de LCR déposée surface d'une gélose préalablementensemencée par inondation avec suspension bactérienne germe sensible (Strepto B).
- Après 24 h d'incubation, une zone d'inhibition retrouvée témoigne de la présence effective d'ATB dans le LCR.
- Ensemencement bouillon cœur-cervelle, peut permettre d'éliminer, par effet de dilution, l'inhibition de la croissance bactérienne due à l'ATB

Résultats et interprétation

- **Résultats cytologie et ceux des frottis de Gram sont transmis immédiatement aux cliniciens**
- **Résultats culture doivent être tjrs confrontés aux données biocliniques**
- **La méningite purulente aseptique peut être:**
 - **Méningite bactérienne décapitée par traitement ATB préalable (intérêt PCR, et à défaut des antigènes solubles)**
 - **Méningite due à un germe fragile, difficile à cultiver ou ne se développant pas sur les milieux usuels**

Conclusion

- **Méningite = urgence bactériologique**
- **Prélèvement réalisé dans des conditions aseptiques par spécialiste**
- **Prise en charge immédiate du LCR au laboratoire**
- **Résultats rendus à toutes les étapes du diagnostic biologique**

Merci de votre attention