

9• Examen cytochimique et bactériologique d'un liquide céphalo-rachidien (LCR)

Plan du chapitre

1• Contextes

2• Objectifs

- 1-Ensemencer d'urgence systématiquement
- 2- Classer le LCR en fonction de la cytochimie
- 3-Donner une orientation étiologique rapide
- 4-Ensemencer les milieux de cultures complémentaires
- 5-Interpréter les résultats de culture
- 6- Réaliser dans un second temps certains examens complémentaires

3• Méthodes microbiologiques

- 1- Le prélèvement
- 2- Réalisation des cultures
- 3- Examen cytologique
- 4- Identification et étude de la sensibilité

1• Les contextes conduisant à l'examen d'un LCR

En raison de l'importance de la précocité du diagnostic et du traitement d'une méningite aiguë, toute suspicion de méningite doit faire procéder sans délai à l'examen du LCR.

L'examen cytochimique du LCR permet de reconnaître ou de suspecter une étiologie bactérienne justifiant un traitement antibiotique immédiat.

Schématiquement, les méningites peuvent être classées en méningites communautaires et en méningites nosocomiales.

Au cours des méningites communautaires, la fréquence respective des différentes espèces bactériennes est fonction de l'âge. Trois tranches d'âge sont à distinguer :

- Adultes et enfants de plus de 5 ans
- Nourrissons et enfants de moins de 5 ans
- Nouveau-nés

Les méningites nosocomiales peuvent survenir chez des malades immunodéprimés ou des malades de neurochirurgie et être en relation avec un traumatisme ou un acte technique.

L'examen d'un LCR en relation avec une maladie neurologique inflammatoire ou une hémopathie ne sera pas envisagé.

2• Les objectifs

☛ Ensemencer systématiquement d'urgence les milieux de culture permettant la croissance des bactéries les plus souvent responsables de méningites.

• Méningites communautaires

Adultes et enfants > 5 ans

- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*
- *Listeria monocytogenes*

Nourrissons et enfant < 5 ans

- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*
- *H. influenzae*

Nouveau-né

- *Streptococcus agalactiae*
- *Escherichia coli*
- *Listeria monocytogenes*

• Méningites neuro-chirurgicales

- *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas* et apparentés

☛ Classer le LCR en fonction de la cytochimie.

Cela permet de reconnaître les catégories suivantes : LCR normal, purulent, lymphocytaire, panaché, hémorragique et d'orienter vers une étiologie bactérienne ou virale. Pour cela, procéder à l'examen macroscopique, cytologique et biochimique du LCR. Il est à noter que la formule leucocytaire est irréalisable en dessous de 10 éléments cellulaires par mm³ et difficilement réalisable en dessous de 20.

• **LCR normal**

- Aspect macroscopique : « eau de roche »
- Moins de 5 éléments/mm³
- Protéïnorachie et glycorachie normales.

La protéïnorachie est normalement inférieure à 0,4 g/l. La glycorachie est normalement supérieure à 60 % de la glycémie. Le dosage de la chlorurorachie, peu informatif, tend à être abandonné.

NB : chez le nouveau-né : 10 à 30 éléments / mm³ (50 % de polynucléaires neutrophiles).

- **LCR «purulent»**

L'aspect macroscopique du LCR peut orienter d'emblée vers une méningite purulente lorsque le liquide est trouble ; ce caractère apparaît à partir de 200 globules blancs par mm³.

- Plus de 10 éléments/mm³ dont plus de 50 % de polynucléaires.
- Protéïnorachie > 0,40 g/l.
- Hypoglycorachie < 40 % de la glycémie.

La méningite est à considérer comme bactérienne.

- **LCR lymphocytaire**

- Plus de 10 éléments/mm³ dont plus de 50 % de lymphocytes.
- Protéïnorachie supérieure à 0,4 g/l.
- Si hypoglycorachie < 40 % de la glycémie : étiologie bactérienne probable (*Listeria*, BK accompagné d'une hypochlorurorachie).
- Si normoglycorachie > 50 % de la glycémie et moins de 100 éléments/mm³ : étiologie virale probable.

- **LCR panaché**

- Plus de 10 éléments/mm³ ; égalité polynucléaires/lymphocytes.
- Protéïnorachie et glycorachie normales.

Ce peut être : une listériose, une méningite purulente ou une méningite lymphocytaire au début, un abcès cérébral.

- **LCR hémorragique**

La contamination du LCR par des globules rouges fait discuter un traumatisme lors de la ponction lombaire ou une hémorragie sous-arachnoïdienne (associée à une pléiocytose et parfois une hypoglycorachie). La protéïnorachie devient alors difficilement interprétable puisque la présence de 1000 globules rouges augmente la protéïnorachie de 0,1 g/l. Une diminution progressive des globules rouges constatée sur un compte séquentiel des cellules dans 3 tubes de LCR est en faveur d'un traumatisme vasculaire lors du prélèvement.

➤ **Donner une orientation étiologique rapide.**

Elle est en fonction de la morphologie des micro-organismes mis en évidence par l'examen microscopique après coloration de Gram et éventuellement la détection d'antigènes solubles.

Selon les auteurs, entre 60 et 90 % des examens directs sont positifs au Gram en l'absence de traitement antibiotique préalable.

Du fait de la plus grande densité bactérienne, le pourcentage d'examens directs positifs au Gram serait plus important pour *S. pneumoniae* et *H. influenzae*, plus faible pour *N. meningitidis*, et surtout pour *L. monocytogenes*. L'examen direct permet de préciser la présence ou l'absence de bactéries, leur aspect (cocci ou bacilles, Gram positif ou négatif), la présence éventuelle d'une capsule, la situation intra ou extra leucocytaire.

Néanmoins, cette caractérisation peut s'avérer difficile, soit du fait du faible nombre de bactéries, soit en raison de leur aspect polymorphe. Devant ces situations, il peut être utile pour confirmer l'orientation diagnostique obtenue par examen microscopique et coloration de Gram d'un LCR pathologique, de rechercher des antigènes solubles dans le LCR.

La technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées est généralement utilisée. Les antigènes recherchés sont choisis en fonction de l'orientation diagnostique.

- Méningite communautaire de l'adulte ou de l'enfant
 - Cocci à Gram positif : *S. pneumoniae*
 - Bacilles à Gram négatif : *H. influenzae*
 - Cocci à Gram négatif : *N. meningitidis*
- Méningite du nouveau-né
 - Cocci à Gram positif : *S. agalactiae*
 - Bacilles à Gram négatif : *E. coli* K1
- Méningite lymphocytaire de l'immunodéprimé (SIDA)
 - *Cryptococcus neoformans*

Les résultats de ces examens microscopiques, biochimiques et éventuellement la détection d'antigènes solubles sont transmis immédiatement au clinicien.

L'observation de bactéries après coloration de Gram permet de réaliser directement un antibiogramme à partir du LCR s'il est en quantité suffisante. Ces résultats obtenus en 18 h seront ensuite confirmés par un antibiogramme selon la méthode classique.

➤ Ensemencer les milieux de cultures complémentaires appropriés.

Un LCR lymphocytaire (cellularité modérée de 10 à 500 éléments/mm³) avec hyperprotéinorachie, hypoglycorachie et hypochlorurachie doit faire évoquer une méningite tuberculeuse. Il convient :

- de rechercher des BAAR par examen microscopique (recherche pratiquement toujours négative)
- d'ensemencer les milieux de culture permettant la croissance de *M. tuberculosis*
- éventuellement de mettre en œuvre une technique d'amplification génique.

➤ Interpréter les résultats des cultures.

Dans le cas d'un LCR hypercellulaire avec majorité de polynucléaires, la croissance d'une bactérie pathogène sur les milieux de cultures vient étayer le diagnostic. Mais la culture peut rester négative. On parle alors de méningite purulente aseptique. Il peut s'agir :

- d'une méningite bactérienne décapitée par un traitement antibiotique préalable
- d'une méningite due à une bactérie fragile ou difficile à mettre en évidence.

Dans le cas d'une cytologie et d'une biochimie normales, la présence de quelques colonies isolées de cocci à Gram positif suggère fortement une contamination du LCR au moment du prélèvement. Néanmoins, les colonies seront identifiées mais leur faible nombre signalé.

L'interprétation des résultats tiendra compte de la présence éventuelle d'un shunt de dérivation du LCR favorisant l'infection par des bactéries opportunistes, y compris anaérobies (*Propionibacterium*).

➤ Réaliser dans un second temps ou sur indications cliniques certains examens complémentaires

- La recherche d'amibes libres (*Naegleria fowleri*) se fait en microscopie à contraste de phase ou après coloration de Giemsa.
- L'examen à l'état frais « à l'encre de Chine » permet la mise en évidence de la capsule de *Cryptococcus neoformans*.
- Détection par amplification génique de bactéries à croissance lente ou difficile : *M. tuberculosis*, *Leptospira*, *Borrelia*. Le LCR est à adresser directement du lit du malade au laboratoire de microbiologie.

- L'examen virologique du LCR est moins sensible que l'examen virologique du sang, de la gorge ou des selles.

- L'étude des lactates et des différentes activités enzymatiques du LCR ne sont pas des examens usuels.

3 • Méthodes microbiologiques

1- Le prélèvement

La ponction lombaire est réalisée avec une aseptie rigoureuse. La quantité moyenne de LCR suffisante pour la majorité des examens à réaliser est de 3 ml, recueillie dans 3 tubes stériles numérotés 1, 2, 3 servant respectivement à l'examen biochimique, microbiologique et cytologique.

L'acheminement du LCR vers le laboratoire doit se faire sans délai (moins de 30 minutes) en raison de la lyse rapide des polynucléaires (jusqu'à 50 % en 2 heures), et à l'abri du froid en raison de la fragilité de certaines bactéries, notamment les méningocoques. Un minimum de renseignements cliniques, (en particulier l'âge, la présomption diagnostique, les traitements antibiotiques antérieurement reçus par le malade), doit être transmis au laboratoire.

2- Réalisation des cultures

C'est le premier temps, **systématique** pour tout LCR.

Dans tous les cas sont ensemencés des milieux permettant la croissance des bactéries exigeantes responsables de méningites purulentes. A titre indicatif :

- Gélose au sang cuit, supplémentée en facteurs de croissance, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂.
- Gélose au sang, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂.
- Un milieu pour anaérobies incubé à 37°C en anaérobiose.
- Un bouillon à l'extrait globulaire (facultatif) permet de diluer les antibiotiques éventuellement présents dans le LCR.

Ces milieux sont observés après 18 h et 48 h d'incubation à 37°C et conservés 5 jours.

Selon les circonstances des milieux additionnels sont ensemencés :

- Méningite lymphocytaire chez un immunodéprimé (SIDA)
 - Gélose de Sabouraud sans actidione
- Méningite lymphocytaire, hypoglycorachie, et suspicion de tuberculose

- Milieu de Löwenstein-Jensen (3 tubes ensemencés richement si possible) ou autre milieu spécifique.

3- Examen cytologique

Le LCR est utilisé directement pour l'analyse biochimique et la numération des éléments.

La numération des éléments est effectuée dans une cellule de Nageotte ou une cellule de Malassez.

L'établissement de la formule leucocytaire (non réalisable si moins de 10 éléments/mm³) sera effectué après centrifugation dans des tubes coniques stériles, (ou mieux, après cyto-centrifugation) et après coloration de May-Grünwald-Giemsa ou éosine-bleu de méthylène.

La coloration de Gram, étape essentielle et rapide, est réalisée sur une préparation obtenue de préférence par cyto-centrifugation. Celle-ci augmente les performances de l'examen. Ces performances dépendent de la densité bactérienne, elle-même variable selon l'espèce en cause, la durée d'évolution de la méningite, l'existence d'une antibiothérapie préalable.

L'examen à l'état frais en présence d'encre de chine permet de mettre en évidence de micro-organismes capsulés (pneumocoque, cryptocoque).

4- Identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques

L'examen des colonies, le Gram, l'oxydase et la catalase permettent de préciser l'orientation diagnostique qui détermine le choix de la galerie d'identification à ensemercer, les choix des techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques et les méthodes de typage à mettre en œuvre.

- *H. influenzae*
Rechercher une bêta-lactamase
- *N. meningitidis*
 - Rechercher une bêta-lactamase (exceptionnelle)
 - Rechercher une sensibilité diminuée à la pénicilline G par mesure du diamètre d'inhibition obtenu avec un disque d'oxacilline et détermination de la CMI.
 - Procéder au groupage antigénique
 - Adresser la souche au centre de référence

- *S. pneumoniae*

Détecter la résistance aux bêta-lactamines à l'aide d'un disque d'oxacilline et détermination de la CMI de la pénicilline G, de l'amoxicilline et du céfotaxime ou ceftriaxone.

Bibliographie

- Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse « les méningites purulentes communautaires ». Saint-Etienne, 7 février 1996, Méd. Mal. Infect., 1996, N° spécial : 944-1124.
- GRAY, L.D., FEDORKO, D.P. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. Clin. Microbiol. Rev., 1992, 5 : 130-145.
- LAMBERT-ZECHOVSKY, N., BINGEN, E. Epidémiologie et bactériologie des méningites bactériennes néonatales. Rev. Fr. Lab., 1991, 220 : 21-27.
- MEREDITH, F.T., PHILLIPS, H.K., RELLER, L.B. Clinical utility of broth cultures of cerebrospinal fluid from patients at risk for shunt infections. J. Clin. Microbiol., 1997, 35 : 3109-3111.
- PERKINS, M.D., MIRRETT, S., RELLER, L.B. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. J. Clin. Microbiol., 1996, 33 : 1486-1491.

