

5. Examen cyto- bactériologique et biochimique du liquide céphalo- rachidien (LCR)

L'examen du liquide céphalorachidien (LCR) est une urgence dans laquelle le rôle du laboratoire est fondamental: il permet très rapidement de confirmer un diagnostic de méningite, de reconnaître une cause bactérienne et d'orienter un traitement antibiotique. En effet, la méningite bactérienne est une maladie grave, et c'est seulement un traitement précoce et efficace qui peut conduire à une guérison sans séquelles.

L'analyse biologique du liquide céphalorachidien comporte trois étapes:

- L'examen direct avec l'étude macroscopique et microscopique pour la recherche des cellules et bactéries ;
- L'examen biochimique : dosage des protéines, du glucose et des chlorures ;
- La mise en culture suivie le lendemain de l'identification et de l'antibiogramme du micro-organisme isolé.

5.1.Examen macroscopique

Après homogénéisation par une légère agitation, on note le degré de limpidité du liquide et sa coloration.

- **Un liquide clair** (appelé souvent eau de roche) correspond soit à un liquide normal, soit à un liquide pathologique: les liquides clairs peuvent se rencontrer dans les méningites virales, tuberculeuses, ou mycosiques.
- **Un liquide trouble** ou franchement purulent (eau de riz) correspond à une réaction leucocytaire marquée, traduisant généralement une méningite bactérienne.
- En cas de **piqûre d'un vaisseau** au cours de la ponction, on note une coloration rouge du liquide, plus marquée dans le premier tube que dans le dernier, avec souvent formation d'un petit caillot.
- **Les liquides sanglants ou jaunes** (appelés xanthochromiques) dans les trois tubes évoquent plutôt une hémorragie méningée.

5.2. Examen microscopique

Les examens microscopiques sont des examens d'urgence. Ils permettent l'orientation du diagnostic d'une méningite. Ils doivent être communiqués au clinicien dès leur réalisation. Il comporte :

5.2.1. Examen cytologique (qualitatif et quantitatif)

Les examens cytologiques sont importants, ils permettent d'orienter vers la méningite purulente ou lymphocytaire et permettent également de suivre l'évolution de l'infection.

➤ Examen quantitatif (Numération des cellules)

La numération cellulaire est un examen d'urgence. Elle permet l'orientation du diagnostic. C'est une étape très importante dans l'ECB du LCR. Après homogénéisation du liquide céphalorachidien, la numération des leucocytes et des hématies est effectuée en cellule de Malassez. La cellule de Malassez contient 1 mm^3 . Elle est divisée en dix bandes de $1/10 \text{ mm}^3$. Chaque bande est divisée en dix rectangles de $1/100$ de mm^3 (quadrillés ou non). Cet examen consiste à compter le nombre de leucocytes sur plusieurs champs ou bandes en fonction de la richesse de la cellule. Pour faciliter l'examen, on peut ajouter une trace de colorant (solution de bleu de méthylène) à quelques gouttes du liquide céphalorachidien. Un LCR normal contient moins de 5 leucocytes / mm^3 chez l'adulte et entre 10 et 30 leucocytes / mm^3 dont 50% de polynucléaires neutrophiles chez le nourrisson.

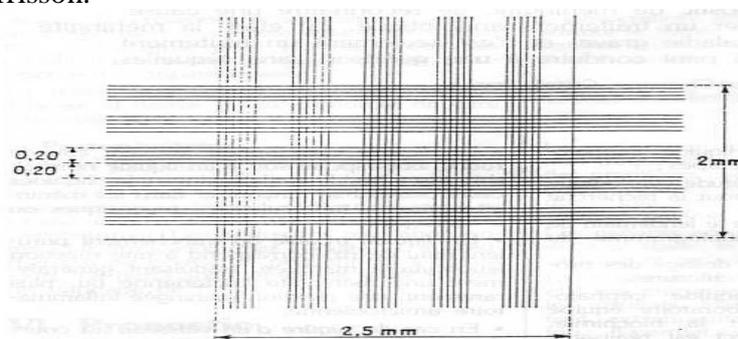


Figure 10 : Cellule de Malassez.

➤ Examen qualitatif des éléments

Il doit être fait dès que le nombre de cellules dépasse dix par mm^3 . Centrifuger le liquide céphalorachidien à 5 000 tours/mn pendant cinq à dix minutes dans un tube conique stérile.

Décantier le surnageant (dans un récipient contenant de l'eau de Javel). Maintenir le tube incliné à 45°, la partie effilée dirigée vers le haut. Introduire une effilure de pipette Pasteur au contact du culot: celui-ci monte spontanément par capillarité. Le répartir sur deux lames à raison d'une goutte par lame (**Fig. 11**). Étaler de façon à ne pas disperser les éléments. Dans le cas d'un culot important, étaler en couche mince, dans le cas contraire, concentrer l'échantillon sur une petite surface. Laisser sécher. Colorer la première lame avec du bleu de méthylène, ou du colorant de May Grünwald Giemsa. Etablir une formule en pourcentages respectifs des polynucléaires, et des lymphocytes (compter au moins 100 éléments).

Les liquides clairs contiennent en général une majorité de lymphocytes, alors que les liquides troubles sont le plus souvent à prédominance de polynucléaires. On trouve:

- une majorité de polynucléaires dans les méningites bactériennes ;
- une majorité de lymphocytes dans les méningites virales, tuberculeuses, ou mycosiques;
- parfois des formules mixtes, en particulier dans les formes de début et au cours des méningites à *Listeria*.



Figure 11

-Coloration au bleu de méthylène : La coloration au bleu de méthylène permet de faire la différence entre les polynucléaires et les lymphocytes. Elle permet également de voir l'aspect morphologique des bactéries (bacilles, Cocci, diplocoques, chainettes...etc.)

-Coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) : Cette coloration permet d'établir l'équilibre leucocytaire dans le LCR (Exemple : 80% de PNA, 20% de lymphocytes).

La coloration de May-Grünwald-Giemsa (MGG) est la coloration de référence pour l'analyse des cellules en hématologie cellulaire. Elle colore les éléments acidophiles ainsi que les granulations neutrophiles des leucocytes et des lymphocytes. La technique de coloration est :

- Couvrir le frottis avec 1 mL de May-Grünwald en solution pendant 3 minutes.
- Ajouter avec précautions 1 mL de Tampon en solution pour hématologie et réaliser le mélange sans débordement. Laisser le mélange en contact 1 minute.
- Rejeter l'excès de colorant par égouttage ou rinçage rapide.
- Couvrir le frottis avec le Colorant de Giemsa R diluée au 1/30 dans un Tampon en solution pour hématologie pendant 10 minutes.
- Rinçage rapide à l'eau courante ou dans un Tampon en solution pour hématologie pendant 10 secondes.

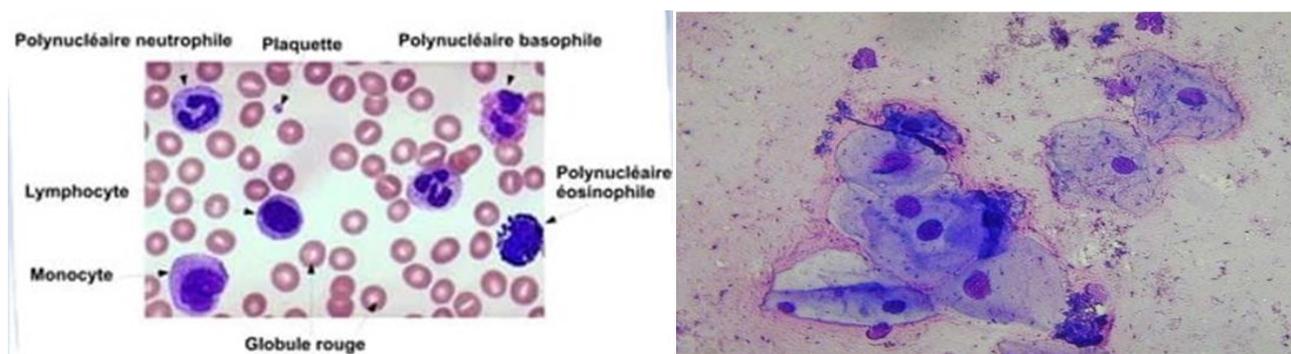


Figure 09 : Observation après coloration MGG.

5.2.2. Examen bactériologique : L'examen bactériologique est basé sur la recherche des bactéries dans le LCR en utilisant les colorations suivantes :

- **Coloration de Gram :** La coloration de Gram permet d'avoir l'aspect morpho-tinctorial des bactéries.
- **Coloration de Ziehl neelsen :** La coloration de Ziehl neelsen permet la recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR).

5.3. Examens biochimique

En plus de l'ECB du LCR, des examens de biochimie sont également effectués à partir du LCR. Cet examen permet d'identifier essentiellement les mesures de la protéinorachie et Glycorachie :

- Protéinorachie : les valeurs normales se situent entre 0,10 et 0,45 g/L. Une protéinorachie très élevée oriente vers une méningite bactérienne. Elle varie de 1 à 5 g/L lors de méningites purulentes.
- Glycorachie doit toujours être exprimée en fonction de la glycémie. Une Glycorachie normale est égale à 65% de la glycémie (valeur normale = 0,6 g/L). Une hypoglycorachie oriente vers une méningite bactérienne.
- Chlorurorachie : Taux normal : 110-120 meq/L. En cas de de suspicion de méningite tuberculeuse, le dosage des chlorures montre une hypochlorurachie.

5.4. Mise en culture

Dans les méningites bactériennes, la culture est obligatoire. Au laboratoire, une culture est réalisée immédiatement en fonction de l'orientation des examens microscopiques ou de l'orientation clinique :

- **Cytologie normale** : Quelque soit le nombre d'éléments, le LCR est ensemencé sur milieux de cultures adaptés aux bactéries recherchées. En effet, au tout début d'une méningite bactérienne, il est possible de constater un nombre normal. Donc, le LCR est ensemencé en quadrant sur gélose chocolat, incubée 5 jours à 37°C sous 5% de CO₂ et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose.

- **Cytologie anormale et absence de germes à l'examen direct** : La mise en culture du LCR sur gélose chocolat, incubée 5 jours à 37°C sous 5% de CO₂ et sur gélose Columbia au sang incubée en anaérobiose, et complétée par l'ensemencement d'un bouillon cœur-cerveille. Ces deux milieux sont incubés 5 jours à 37°C.

- **Présence de germes à l'examen direct** : La morphologie, le groupement et la coloration de Gram permettent d'orienter le diagnostic. L'examen direct par coloration de Gram est généralement positif à partir 10⁴- 10⁵ UFC/ml. En conséquence, en plus de l'ensemencement classique, une culture quantitative doit être réalisée par ensemencement au râteau de 100µL de LCR pur, et de dilutions au 1/10 et 1/100 du LCR, sur gélose chocolat incubée à 37°C sous de CO₂ (**Fig. 10**).

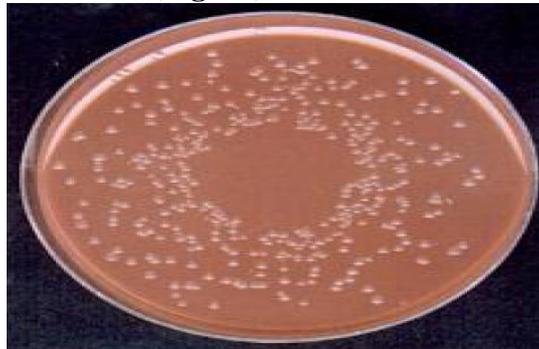


Figure.10: Numération de germes dans le LCR après ensemencement au râteau (méningite à *E.coli* 10⁵UFC/ml)

5.5. Lecture et interprétation

Le tableau n°06 montre les résultats normaux et les résultats pathologiques du LCR :

Tableau 06 : Tableau de lecture des résultats du LCR.

| Paramètres | LCR normal | LCR purulent | LCR lymphocytaire |
|--------------------------|------------|--------------------------|--|
| Aspect | Claire | Trouble | Clair |
| Eléments/mm ³ | < 5 | >10 | >10 |
| Type d'éléments | | 50% Polynucléaires | 50% Lymphocytes |
| Protéinorachie | <0,4 g/l | >0,4 g/l | >0,4 g/l |
| Orientation | Normal | Méningite bactérienne | Méningite virale Méningite à <i>Listeria</i> Méningite tuberculeuse |