

# Le diagnostic moderne du liquide céphalo-rachidien (LCR)

21/11/2013

Association des ATM

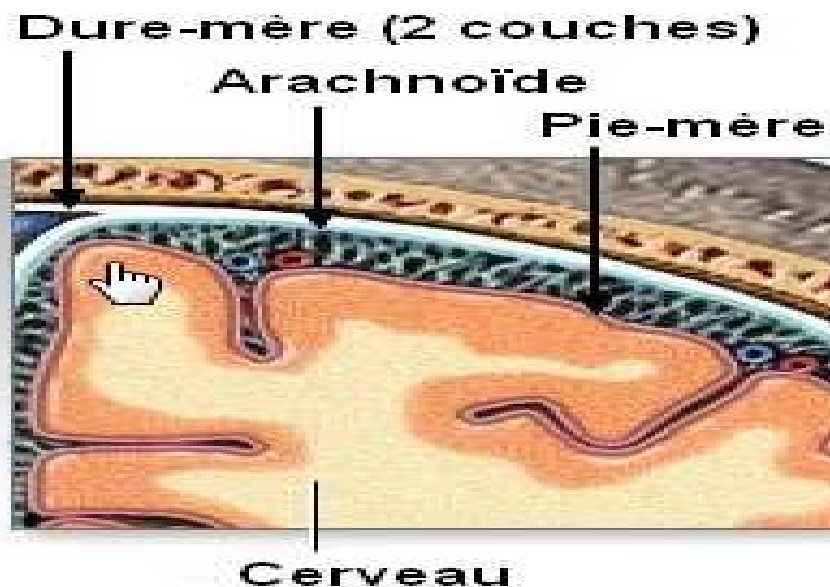
Amphi CHL

1. **Physiologie et aspects biochimiques (Georges Gilson)**
2. **Aspects hématologiques (Vincent Schlessler)**
3. **Aspects microbiologiques (Chantal Tsobo)**

# LCR : Définition

## “water of the brain”

Les méninges sont les enveloppes protégeant le système nerveux central



Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est un liquide biologique transparent dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière. Il est contenu dans les méninges entre la pie-mère (qui recouvre le système nerveux central) et l'arachnoïde (qui tapisse la partie interne de la dure-mère).

# LCR : Historique

- 400 avant JC : Hippocrate décrit des ventricules liquidiens dans le cerveau
- 1891 : Heinrich Irenäus Quincke réalise première ponction lombaire transcutanée
- 1929 : Friedrich Karl Walter décrit la barrière hémato-encéphalique
- 1942 : Elvin A. Kabat décrit dans le LCR la présence de préalbumine et une augmentation des gammaglobulines
- 1965 : isofocalisation utilisée pour détection de bandes oligoclonales dans le LCR

# LCR : Production et résorption

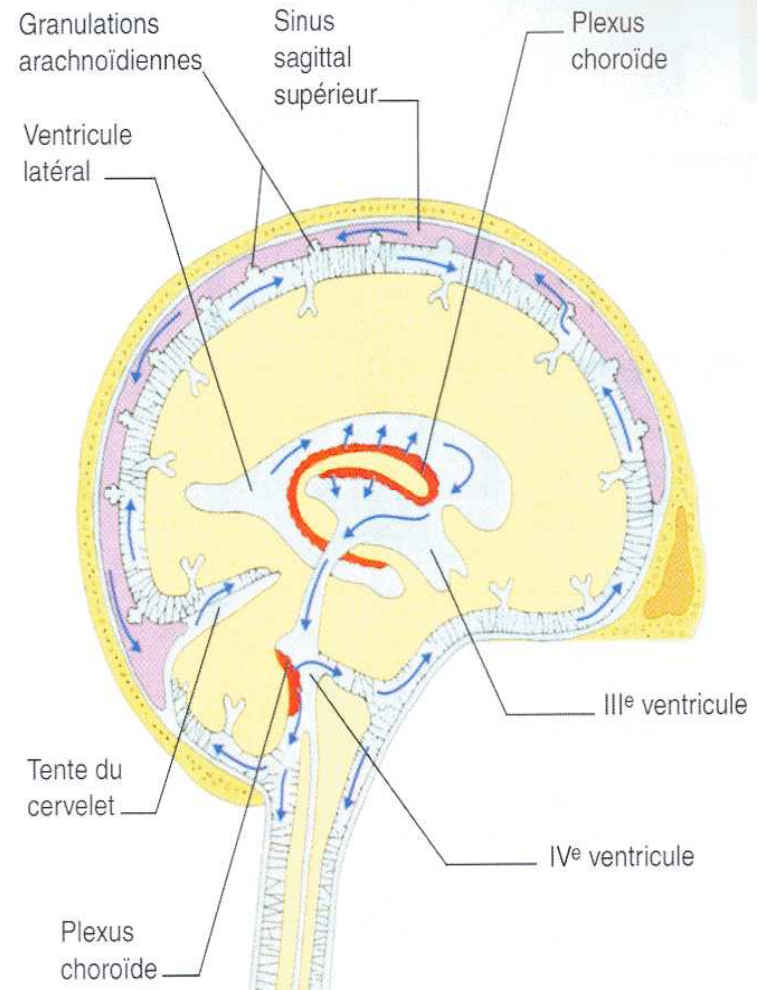
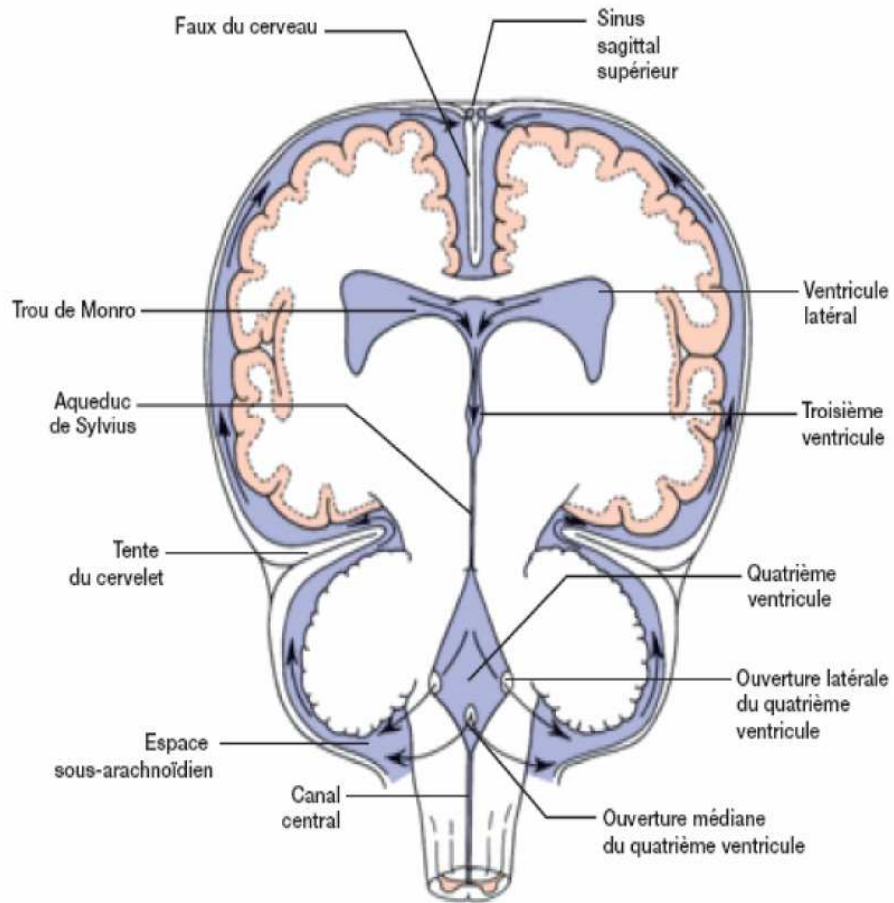
Le LCR est synthétisé majoritairement (80%) au niveau des plexus choroïdes, structures très vascularisées qui pendent du toit des ventricules cérébraux. Le LCR circule librement dans le système ventriculaire et les méninges, à travers un circuit continue et ne représente pas de poche isolée d'un liquide en stagnation. Il est résorbé par le système veineux cérébral au niveau des villosités arachnoïdiennes.

Son volume chez l'humain adulte est d'environ 140-180 ml.

La production de LCR est de l'ordre de 400 – 600 ml/jour càd. chaque jour le LCR est renouvelé 3 à 4 fois en moyenne ou toutes les 6 à 8 heures.



# LCR : Circulation



# LCR : Fonctions

Les rôles principaux du LCR sont :

- La protection mécanique du système nerveux central contre les chocs par l'amortissement des mouvements et allègement de 97% de son poids
- Le maintien de la pression intra-crânienne
- La protection contre les infections car il contient les médiateurs de l'immunité humorale et cellulaire
- Le transport des hormones et nutriments
- L'élimination de substances toxiques dans l'organisme au cours du sommeil

# LCR : Composition

	Plasma	LCR
Na+	150 mmol/l	147 mmol/l
K+	4.6 mmol/l	2.8 mmol/l
Ca++	2.4 mmol/l	1.1 mmol/l
CL-	108 mmol/l	130 mmol/l
HCO3-	26 mmol/l	22 mmol/l
pH	7.4	7.3
Lactate	15 mg/dl	22 mg/dl
Glucose	100 mg/dl	60 mg/dl
Protéines	80 g/l	0.4 g/l

Le liquide intra-ventriculaire est normalement dépourvu de **cellules** et de protéines ; celles-ci sont ajoutées au LCR dans l'espace sous-arachnoïdien par exsudation à partir des vaisseaux méningés et proviennent probablement de cellules désquamées dans l'espace sous-arachnoïdien.

# LCR : Composition

La composition du LCR est le résultat d'une combinaison de différents mécanismes :

-**Transport actif** : Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, glucose

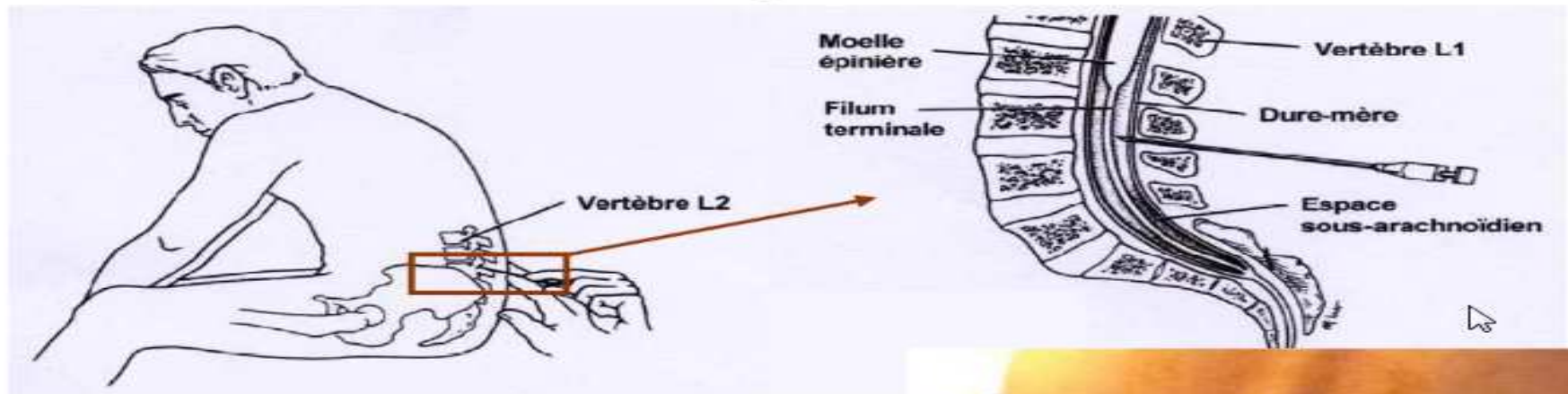
-**Diffusion passive** : H<sub>2</sub>O, Cl<sup>-</sup> et surtout protéines avec grossièrement une vitesse de diffusion qui dépend du poids moléculaire de la protéine

-**Sécrétion** : certaines protéines spécifiques au LCR (p.ex.: beta-Trace Protein, beta-2 Transferrine (tau), majoritairement pour NSE, S100)



# LCR : Prélèvement par ponction lombaire

## Mode opératoire



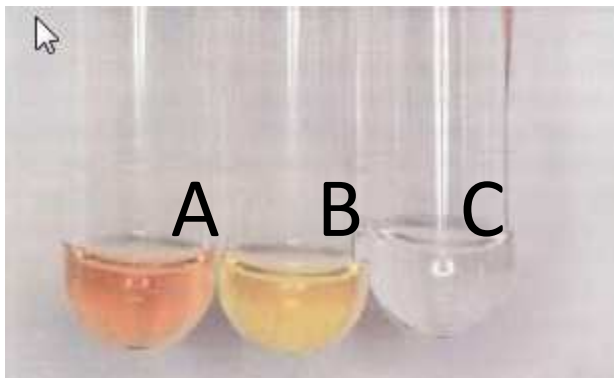
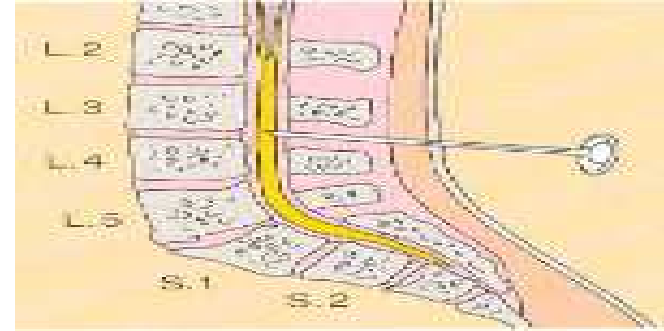
- Geste Médical
- Désinfection
- Progressif (HTIC?)



La pie-mère (= extrémité inférieure de la moelle) se termine à hauteur de la 1ère vertèbre lombaire. Le LCR peut donc être ponctionné dans la région lombaire basse sans risque de provoquer une lésion médullaire.

# LCR : Prélèvement par ponction lombaire

- Ne pas recueillir 3-5 premières gouttes
- Remplir 3 tubes avec +/- 1.5 ml: 1<sup>er</sup> pour chimie
- Cytologie à réaliser 1 à 2 heures après ponction
- Glucose et lactate rapidement (sinon dans les 24 h. après addition d'un inhibiteur de la glycolyse)
- Protéines : stockage à 4°C pendant une semaine, sinon congélation
- Idéalement prélever parallèlement LCR et sang pour analyse



**C** : LCR normal "eau de roche"

**B**: LCR infectieux avec présence de cellules et protéines élevées

**A**: LCR xanthochrome → hémorragie sous-arachnoïdienne

# LCR : ponctions

**lombaire**



**Concentration Protéines:**

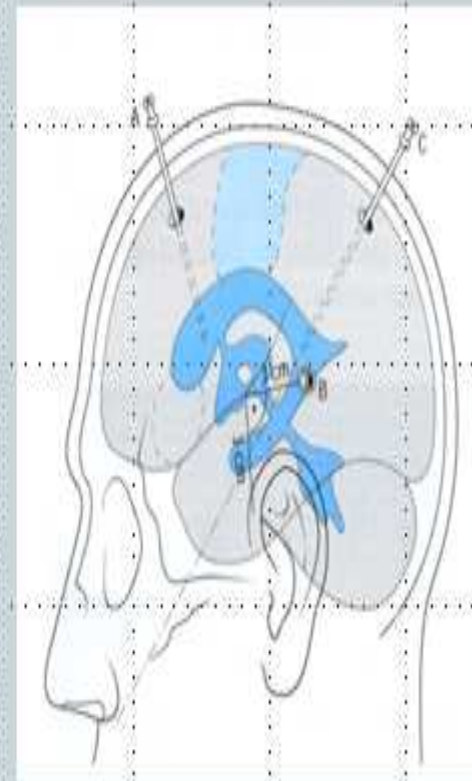
**100%**

**cysternale**



**65%**

**ventriculaire**



**40%**

# LCR et barrières

Les échanges entre ces deux milieux sont régis par un système sélecteur de plusieurs barrières: - barrière hémato-encéphalique

- barrière méningo-encéphalique

- **barrière hémato-méningée:**

-sa perméabilité est faible dans le sens sang → LCR

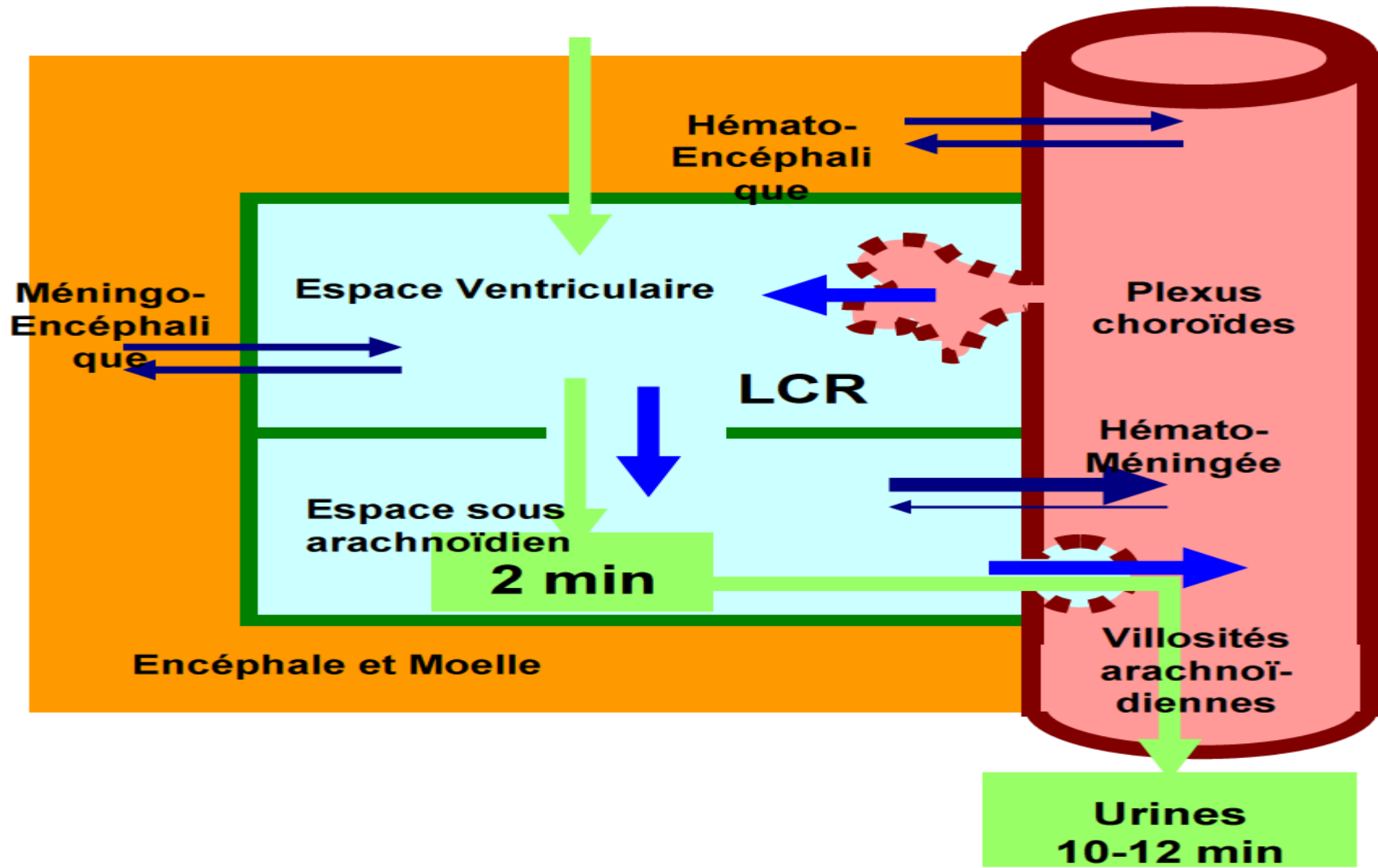
elle ne laisse passer que les petits ions

les antibiotiques ne la franchissent pas, sauf les sulfamides (important pour méningites)

-sa perméabilité est grande dans le sens LCR → sang

ce qui explique p.ex. que les anesthésiques injectés en intrathécal soient rapidement éliminés

# LCR et barrières



# LCR : bilan biochimique de base

## Glucose / lactate

Utilisés dans le diagnostic différentiel **méningite bactérienne vs. virale**

Glucose (hexokinase) et lactate (LDH) sont mesurés avec les mêmes méthodes et applications que dans le sérum:

Glucose < 49 mg/dl

Lactate > 32 mg/dl → méningite bactérienne (spéc. 99%, sens. 70%)

Leucocytose importante

## Protéines

Facteur 1/200 par rapport au taux sérique

Techniques utilisées : colorimétrie (rouge pyrogallol)

turbidimétrie (chlorure de benzothénium)

Taux élevé si atteinte de la barrière, pathologie infectieuse ou inflammatoire

→ Marqueur peu spécifique : **critère d'exclusion**

# LCR et protéines spécifiques

## Albumine

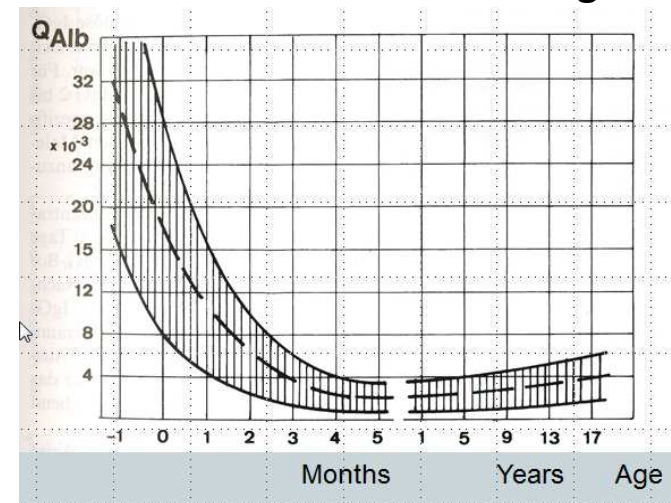
Lieu de synthèse : foie

La totalité de l'albumine présente dans le LCR a son origine dans le sang; elle passe dans le LCR par diffusion: pas de passage actif, pas de sécrétion locale

Le quotient d'albumine  $QA_{lb} = \text{Albumine}_{LCR} / \text{Albumine}_{\text{sérum}}$  est un marqueur de diffusion du LCR qui mesure la fonction de la barrière LCR-sang

Le  $QA_{lb}$  dépend de l'âge car le taux du flux du LCR diminue avec l'âge

→ concentration de Albumine<sub>LCR</sub> diminue avec l'âge



# LCR et protéines spécifiques

**QAlb : marqueur de la barrière LCR-sang**

**Flux du LCR qui diminue :**

**→ Albumine<sub>LCR</sub> augmente**

**→ QAlb augmente**

**La valeur du QAlb donne :**

**-une aide diagnostique**

**-une information sur sévérité de la pathologie**

**→ Importance dans le monitoring**



# LCR et protéines spécifiques

**QAlb : marqueur d'une atteinte de la barrière LCR-sang dans les maladies neurologiques**

## **Atteinte faible : QAlb < 20 x 10<sup>-3</sup>**

- infections virales aiguës et chroniques
- sclérose en plaques et autres maladies autoimmunes chroniques
- neurosyphilis
- polyneuropathies (dans 65% des cas)
- atrophies cérébrales (dans 30% des cas)
- trauma cérébral
- tumeur cérébrale
- stade initial de méningite

## **Atteinte modérée : 20 x 10<sup>-3</sup> < QAlb < 50 x 10<sup>-3</sup>**

- neuroborreliose aiguë
- méningo-encéphalite opportuniste (patients HIV)
- syndrome de Guillain-Barré
- neurosarcoïdose

## **Atteinte sévère : QAlb > 50 x 10<sup>-3</sup>**

- méningite purulente
- encéphalite Herpes simplex
- méningite tuberculeuse

# LCR et protéines spécifiques

**QIgG, QIgA et QIgM : marqueur d'une synthèse intrathécale**

**QIgG = IgG LCR / IgG sérum**

**QIgA = IgA LCR / IgA sérum**

**QIgM = IgM LCR / IgM sérum**

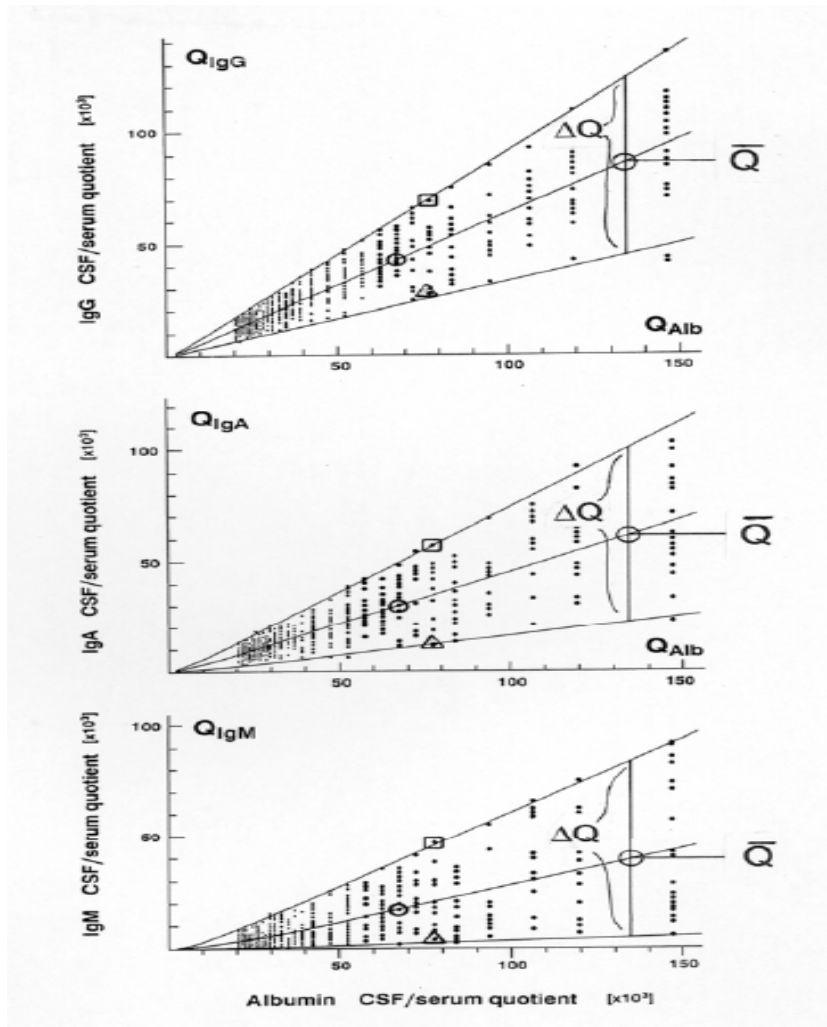
**Lors de pathologies neurologiques inflammatoires des cellules B pénètrent dans le LCR**

**→ Synthèse locale au niveau des ventricules (=intrathécale) d'IgG, IgA et IgM**

**Synthèse intrathécale = pathologique**

**La nature de l'Ig détecté dans LCR n'est pas lié au stade d'une maladie mais est caractéristique du type de maladie**

# LCR et protéines spécifiques



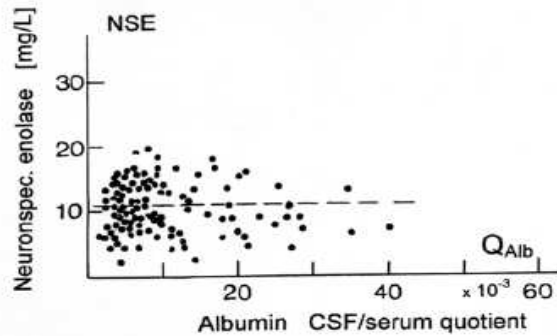
## Protéines sériques

Les concentrations dans LCR dépendent du Q<sub>Alb</sub> c.à.d. du flux du LCR

- la variabilité des concentrations est dépendante des tailles moléculaires
- réaction de diffusion
- pas de "leakage"

# LCR et protéines spécifiques

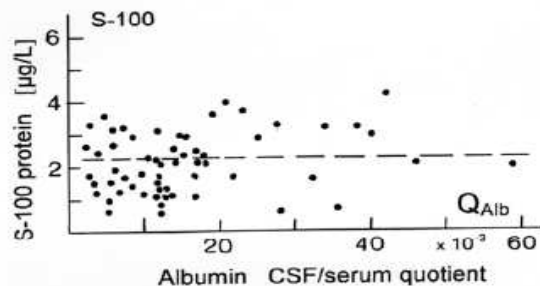
NSE



a

Protéines originaires du cerveau

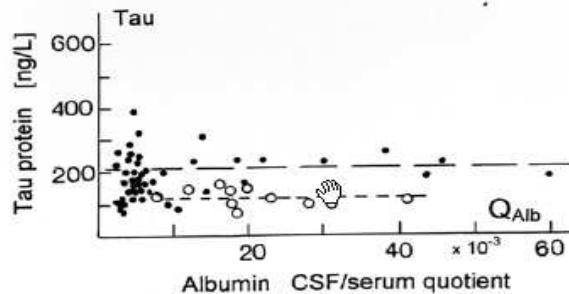
S 100b



b

Les concentrations dans LCR sont indépendantes du  $Q_{Alb}$  càd. du flux du

Tau

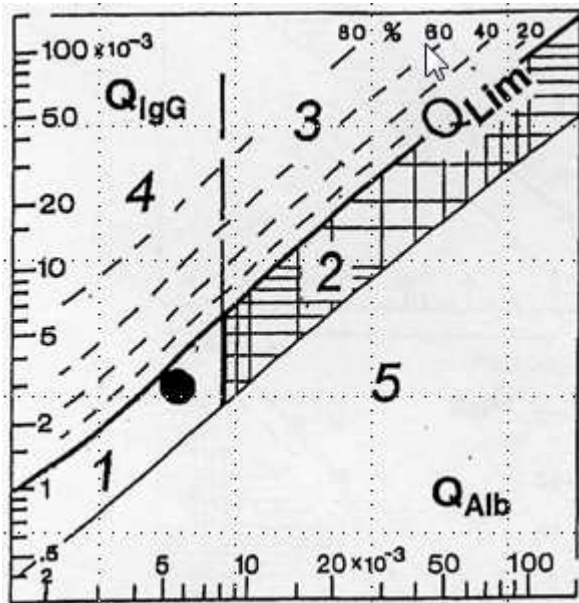


c

LCR

# LCR et protéines spécifiques

## Schéma de Reiber :



- 1 domaine normal
- 2 atteinte barrière hémato-méningée
- 3 atteinte barrière hémato-méningée +  
synthèse IgG intrathécale
- 4 synthèse IgG intrathécale
- 5 erreur dosage

**Le schéma de Reiber devient ininterprétable en cas de présence de > 7000 érythrocytes!**

- Technique :
- néphélométrie
  - analyse parallèle du LCR et du sérum
  - dosages rapportés sur la même courbe de calibration
  - aide par des logiciels d'interprétation (*p.ex.: Protis de Siemens*)

# LCR et protéines spécifiques

## Synthèse intrathécale et maladies neurologiques

### Prédominance IgG (IgA<20%, IgM<50%)

- panencéphalite subaigüe sclérotique
- encéphalite HIV chronique

### Prédominance IgA

- méningite tuberculeuse et autres infections bactériennes

### Prédominance IgM

- neuroborreliose

### IgG et IgM

- sclérose en plaques

### Réponse trois classes (IgG, IgA et IgM)

- neurosyphilis
- encéphalite Herpes simplex
- neurosarcoïdose
- adrenoleucodystrophy
- infections opportunistes

# LCR et protéines spécifiques

## Réponse immunologique intrathécale spécifique

$$\text{Antibody Index (AI)} = \text{QIgG spécifique} / \text{QIgG totaux}$$

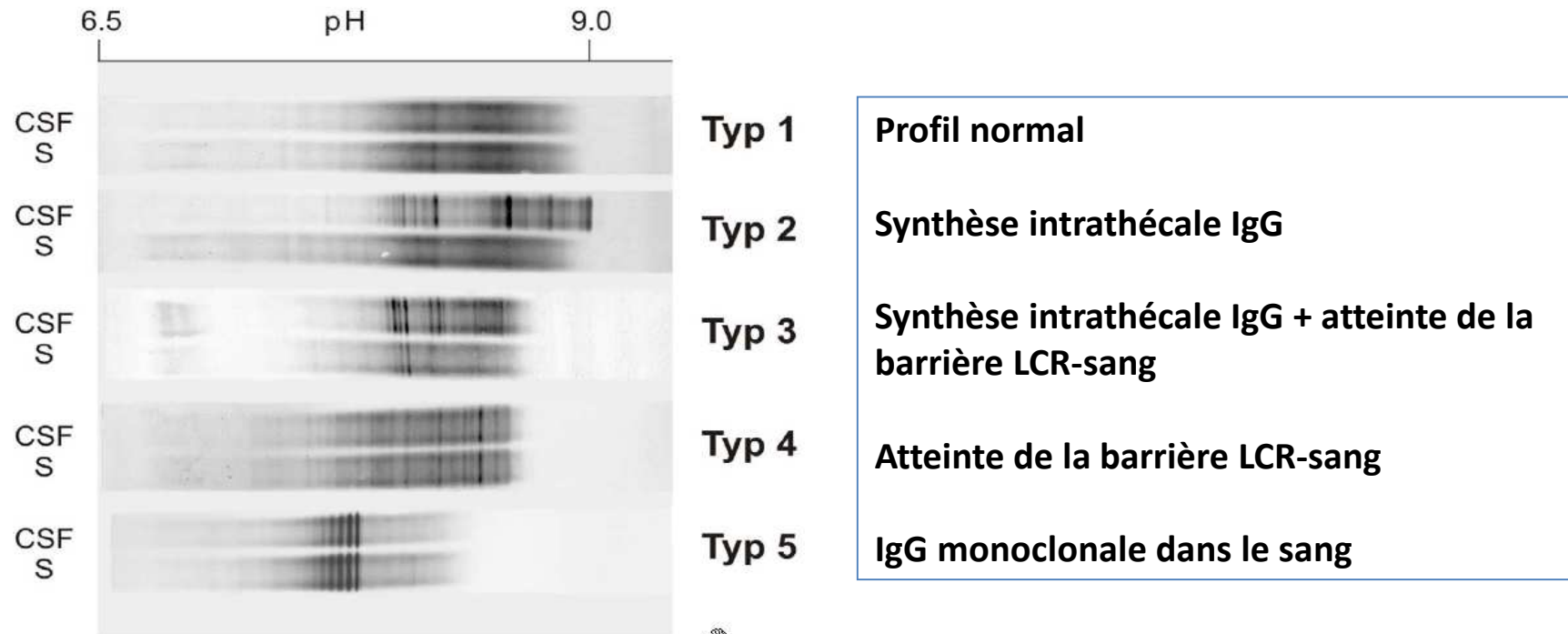
virus : rougeole, rubéole, varicelle, HSV I/II, EBV, CMV, HIV, influenza A/B

bactérie : Borrelia burgdorferia, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis

Toxoplasmose, Chlamydia, Trepanoma pallidum, Mycoplasma pneumoniae, Candida albicans

# LCR et protéines spécifiques

## Isofocalisation des IgG et synthèse intrathécale

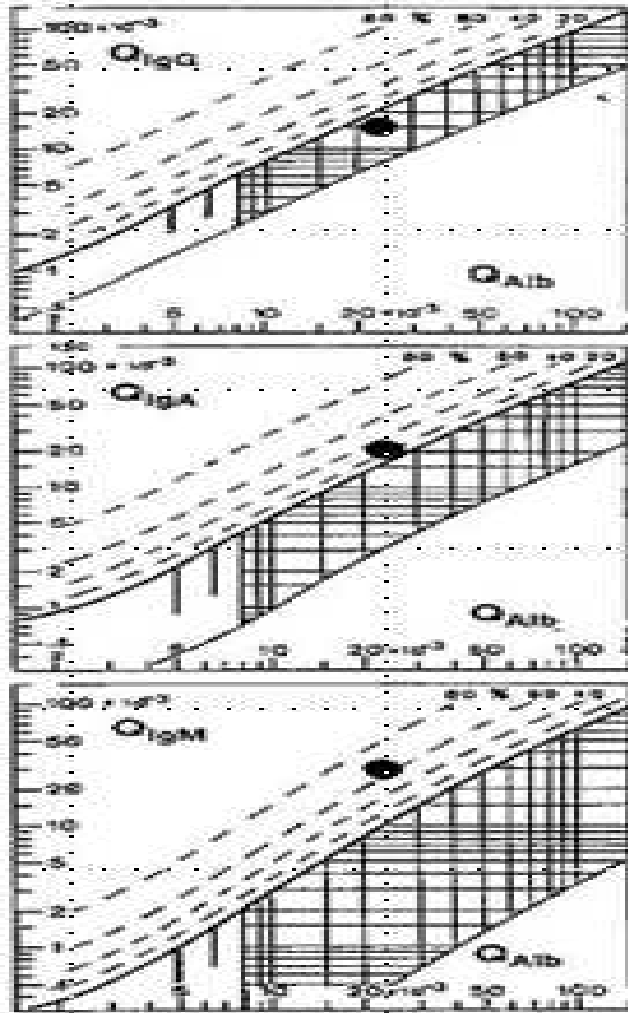


**Technique plus sensible que schéma de Reiber mais se limitant à l'exploration de la synthèse intrathécale des IgG !**

- Technique :
- migration selon gradient de pI (6.5-9.0)
  - révélation par immunfixation avec anti-IgG
  - équipement utilisé : Hydrasys (Sebia)



# LCR et protéines spécifiques



## Neuroborreliose

-QAlb augmenté

-synthèse intrathécale IgM dominante

-bandes oligoclonales peuvent être présentes

-forte leucocytose

→ AI-Borrelia est positif et peut le rester pendant des années même après guérison

# LCR et protéines spécifiques

## Sclérose en plaques

-QAlb normal

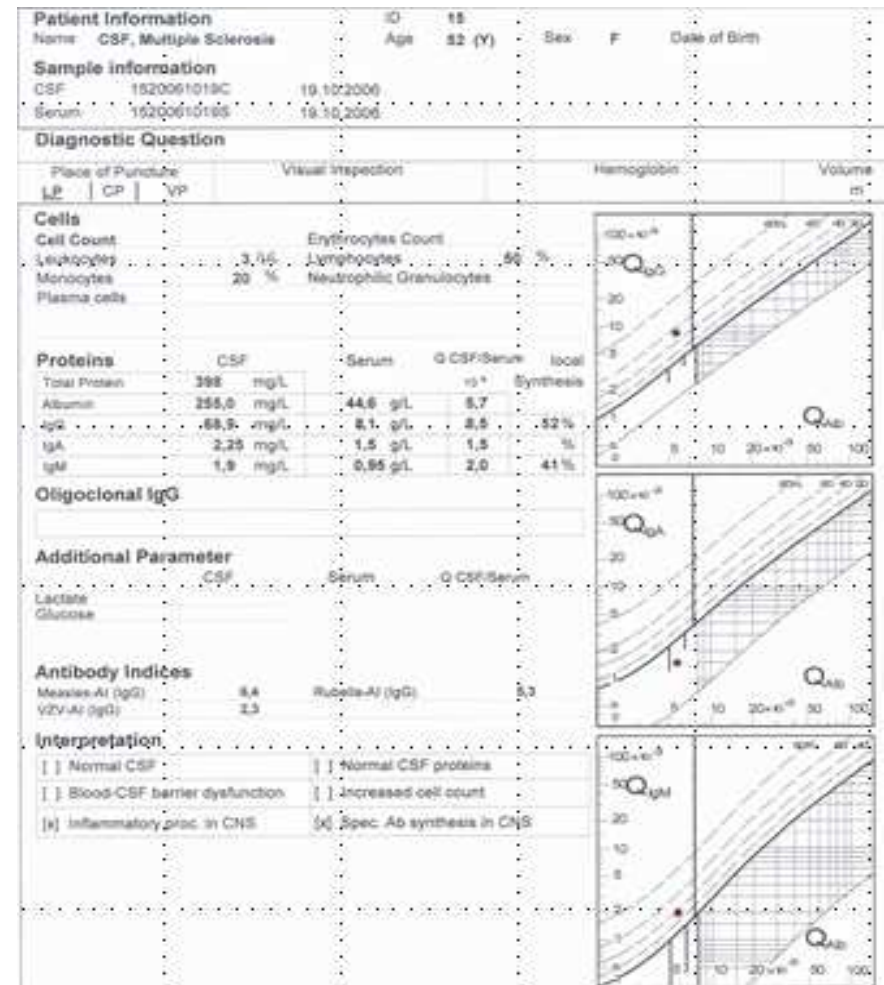
-synthèse intrathécale IgG dominante

-bandes oligoclonales présentes

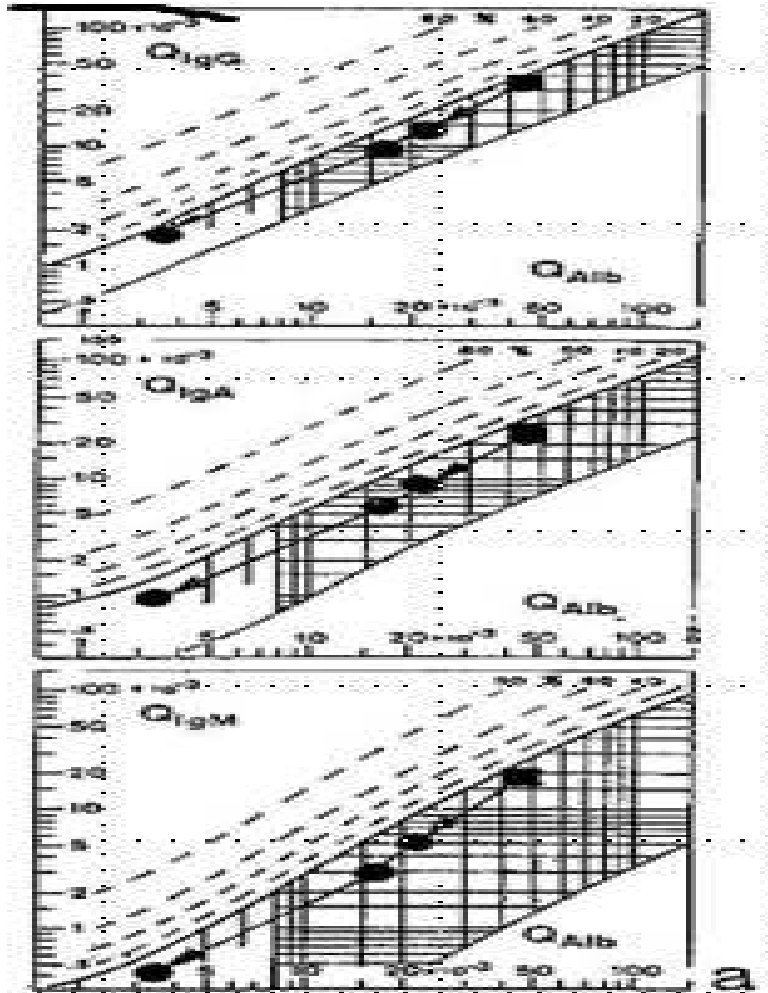
-nombre de cellules normal ou faiblement élevé

-AI positif pour rougeole, rubéole et varicelle

→ processus autoimmun



# LCR et protéines spécifiques



## Méningite bactérienne

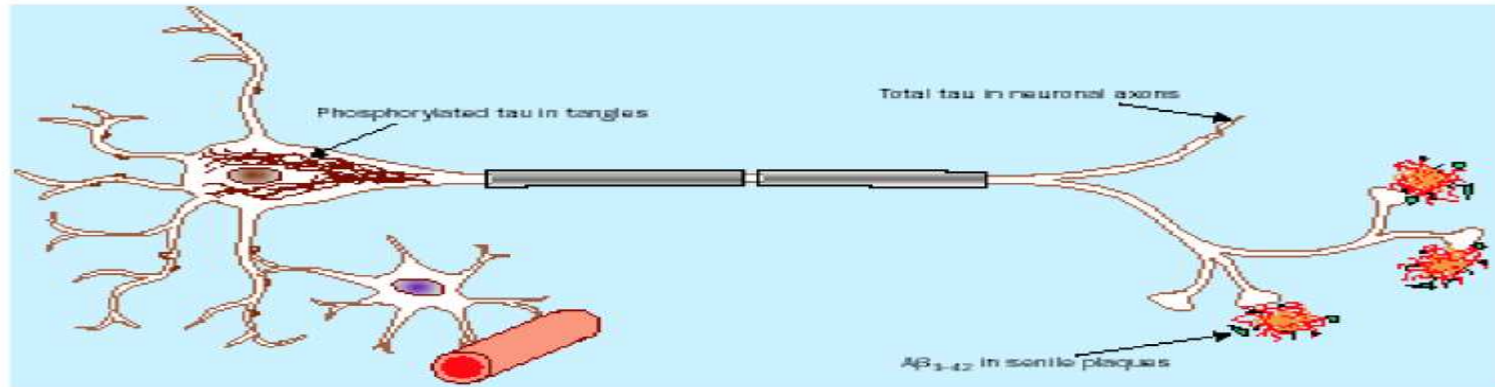
-QAlb très augmenté

-synthèse intrathécale IgA possible

-forte pléocytose granulocytaire

→ antibiothérapie des jours 1, 3, 6 et 13 entraîne une diminution du QAlb et du nombre des cellules

# LCR et maladie d'Alzheimer



## Protéine Tau

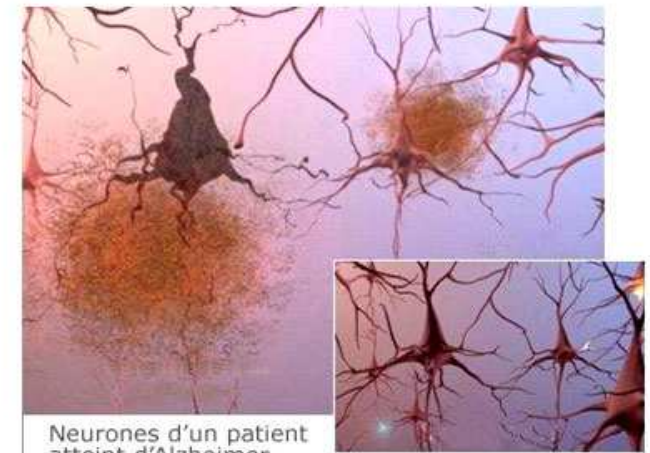
Taux **augmenté** dans le LCR  
Augmentation corrélée à la vitesse d'évolution

## Protéines Tau anormalement phosphorylées

plusieurs phosphorylations anormales: THR 181, 231 et  
SER 199, 235, 396 et 404  
Augmentation Tau phosphorylée en 181 : présence DNF

## β<sub>1-42</sub> Amyloid

Taux **diminué** dans le LCR  
Diminution liée soit à son agrégation dans les plaques,



# LCR et maladie d'Alzheimer

**Combinaison du dosage des 3 protéines dans le LCR pour diagnostic positif**

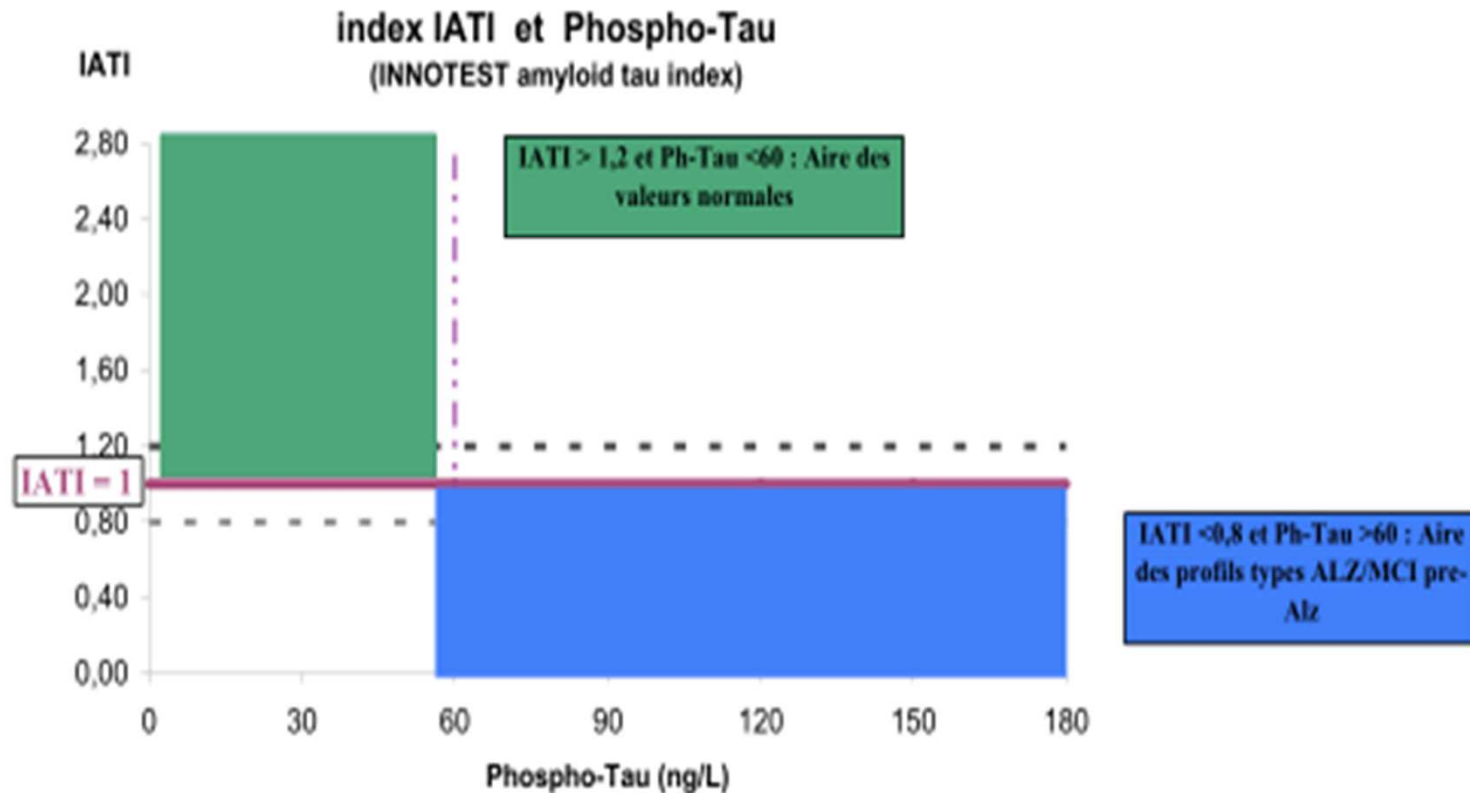
Tau > 350 pg/ml

Tau P181 > 60 pg/ml

B1-42 Amyloid < 500 pg/ml

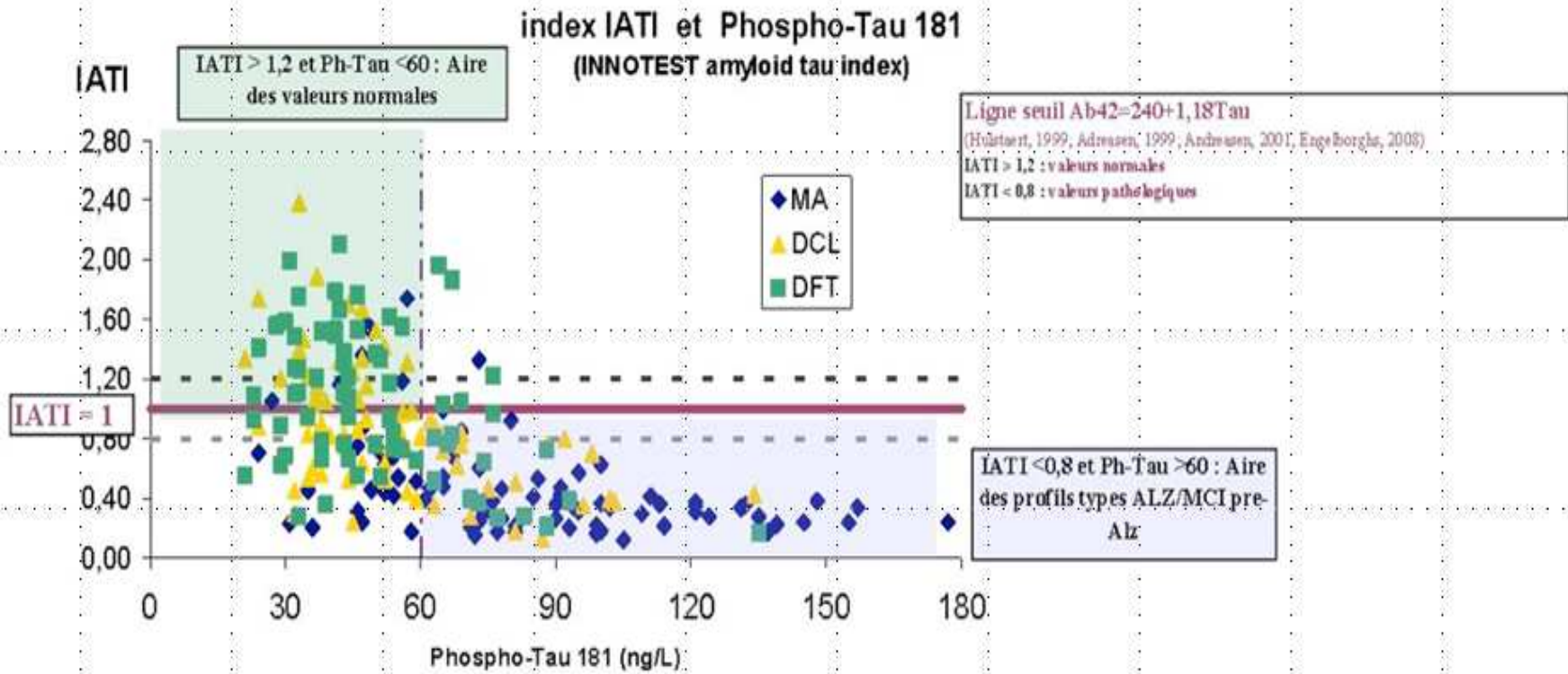
Technique : ELISA de la firme Innogenetics

# LCR et maladie d'Alzheimer



$$\text{IATI} = \frac{\beta 1-42 \text{ Amyloid}}{(240 + 1.18 \text{ Tau})}$$

# LCR et maladie d'Alzheimer



(Cohorte : 84 MA, 76 DCL, 71 DFT)

MA = maladie Alzheimer

DCL = démence à corps de Lewy

DFT = démence fronto temporelle

# LCR et hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA)

HSA = extravasation de sang dans les espaces sous-arachnoïdiens

Principales causes :

- Traumatismes (la plus fréquente)
- Rupture anévrisme (la plus fréquente parmi causes non traumatiques)
- Malformation vasculaire
- Tumeurs

## LCR hémorragique vs. LCR à ponction traumatique

liquide rouge/rosé dans 3 tubes  
liquide incoagulable  
surnageant xanthochromique  
érythrocytes crénelés altérés  
présence de macrophages

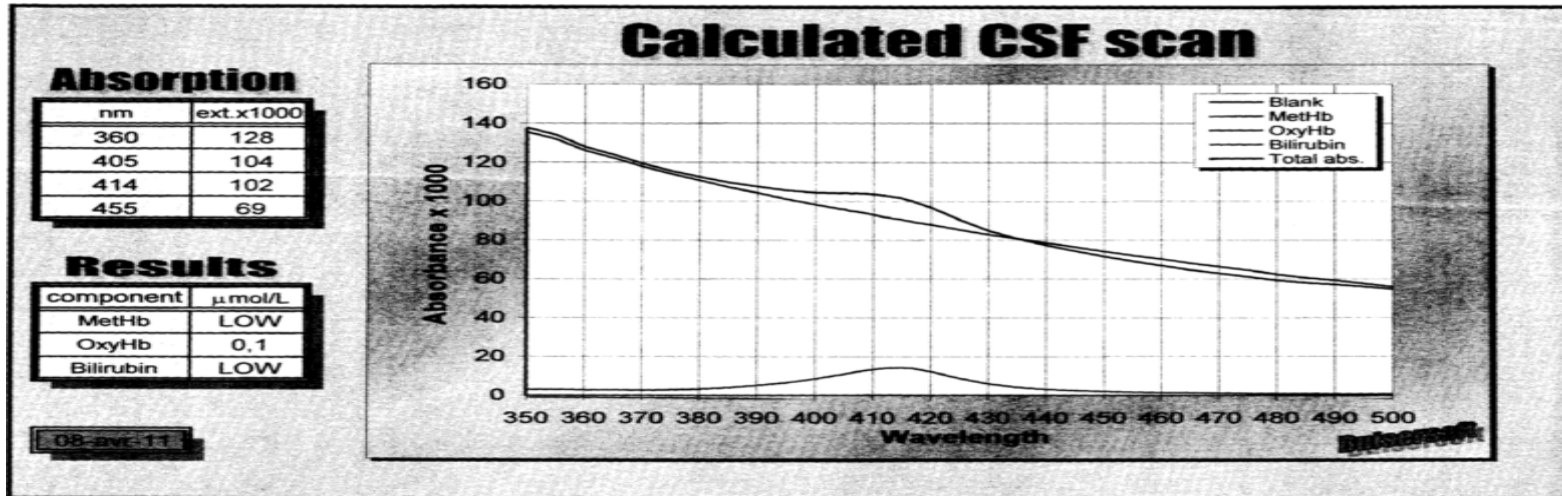
**présence produits de dégradations Hb**

liquide de moins en moins sanglant  
liquide coagulable  
surnageant clair  
érythrocytes non altérés  
absence de macrophages

**absence de pigments sanguins**

Les produits de dégradation de l'Hb (oxyhémoglobine=rougeâtre-rosé métabolisée en bilirubine=jaune) donnent au plus tôt 9-15 heures après l'hémorragie une coloration jaunâtre, xanthochrome du LCR centrifugé.



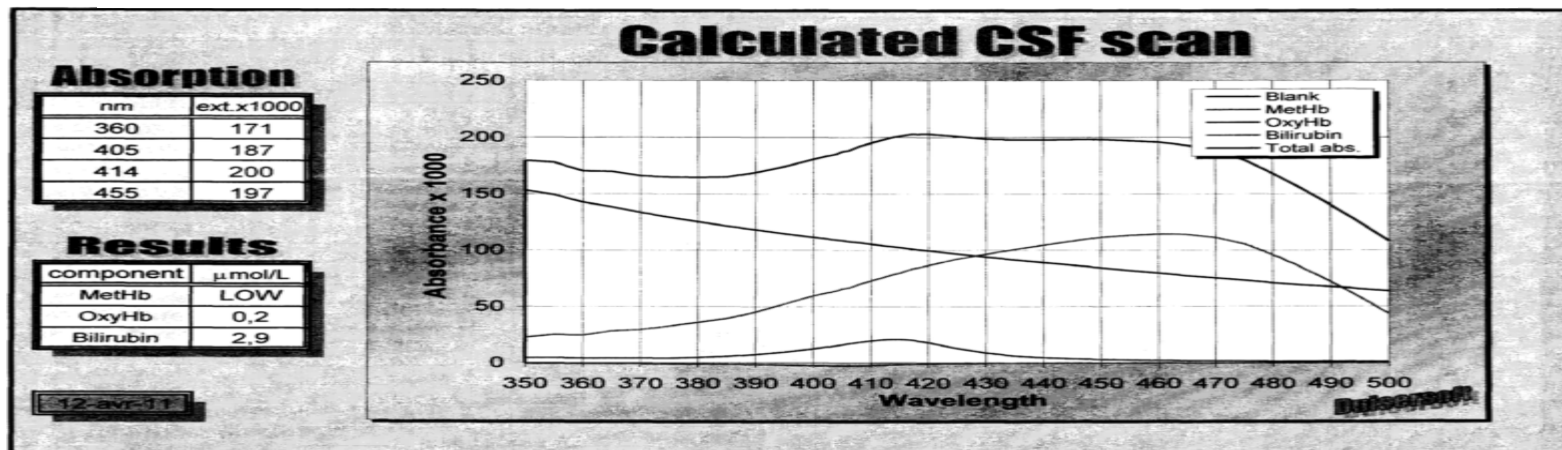


-----  
Analyse du LCR par spectrophotométrie

Tube de prélèvement No.:	3		
Erythrocytes dans LCR	0	/ $\mu\text{l}$	
Méthémoglobine dans LCR	<0.10	$\mu\text{mol/l}$	<0.10
Oxyhémoglobine dans LCR	<0.10	$\mu\text{mol/l}$	<0.10
Bilirubine dans LCR	<0.30	$\mu\text{mol/l}$	<0.30

-----  
Interférences:

- 1) - La présence de sang dans le LCR, démontré par le nombre de globules rouges (GR), entraîne la présence d'hémoglobine.
  - La présence de  $\geq 30.000$  GR est accompagnée immédiatement d'hémoglobine.
  - La présence de 20.000 GR entraîne la présence d'hémoglobine si le liquide n'est pas centrifugé dans 1'heure.
  - La présence de 10.000 GR entraîne la présence d'hémoglobine si le liquide n'est pas centrifugé dans les 2 heures.
- 2) De la bilirubine peut apparaître dans le LCR si un taux élevé est aussi présent dans le sang.



# LCR et hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA)

## Marqueur

## Apparition après

Érythrophages

12-18 heures

Hémosidérine

1-2 jours

Macrophages à hématoïdine  
(= bilirubine cristallisée)

2 semaines

Ferritine augmentée > 18 pg/ml

# LCR dans écoulement nasal ?

Écoulement nasal clair suite à un traumatisme crânien

→ exclure liquorrhée càd. écoulement de LCR dans liquide non sanglant

-Beta 2 transferrine (= protéine tau)

-Beta-Trace (prostaglandine synthase)

< 25 mg/l	participation LCR exclue
0.25 – 1.0 mg/l	zone grise
> 1.0 mg/l	participation LCR vraisemblable

souvent mélange LCR – sécrétion nasale → interprétation difficile

Dosages de paramètres de base comme Glucose et Protéines peuvent aider dans l'orientation du diagnostic

# LCR dans écoulement nasal ?

Beta-Trace (prostaglandine synthase)



## Laboratorium voor Klinische Biologie

Diensthouders: Prof. G. Leroux-Roels Dr. E. De Logt  
 Prof. J. Plum Prof. JM Kaufman  
 DE PINTELAAN 185 B-9000 GENT  
 Nr. 8-44700-73-383

**Volledig**

Het geheel kopiëren van dit protocol is niet toegestaan

Datum : 17/10/2013 15:21

Centre de tri des Laboratoires

4, rue Barblé  
 2288 LUXEMBOURG  
 LUXEMBOURG  
 LUXEMBOURG

Referentienummer : 131016-2678  
 Datum ontvangen : 17/10/13  
 Uur ontvangen : 12:30  
 Datum steelname : 16/10/13  
 Uur steelname : 00:00

Onbekende aanvragende arts

Uw Referentienummer : 131016L0470

*Dossier 131016L0470*

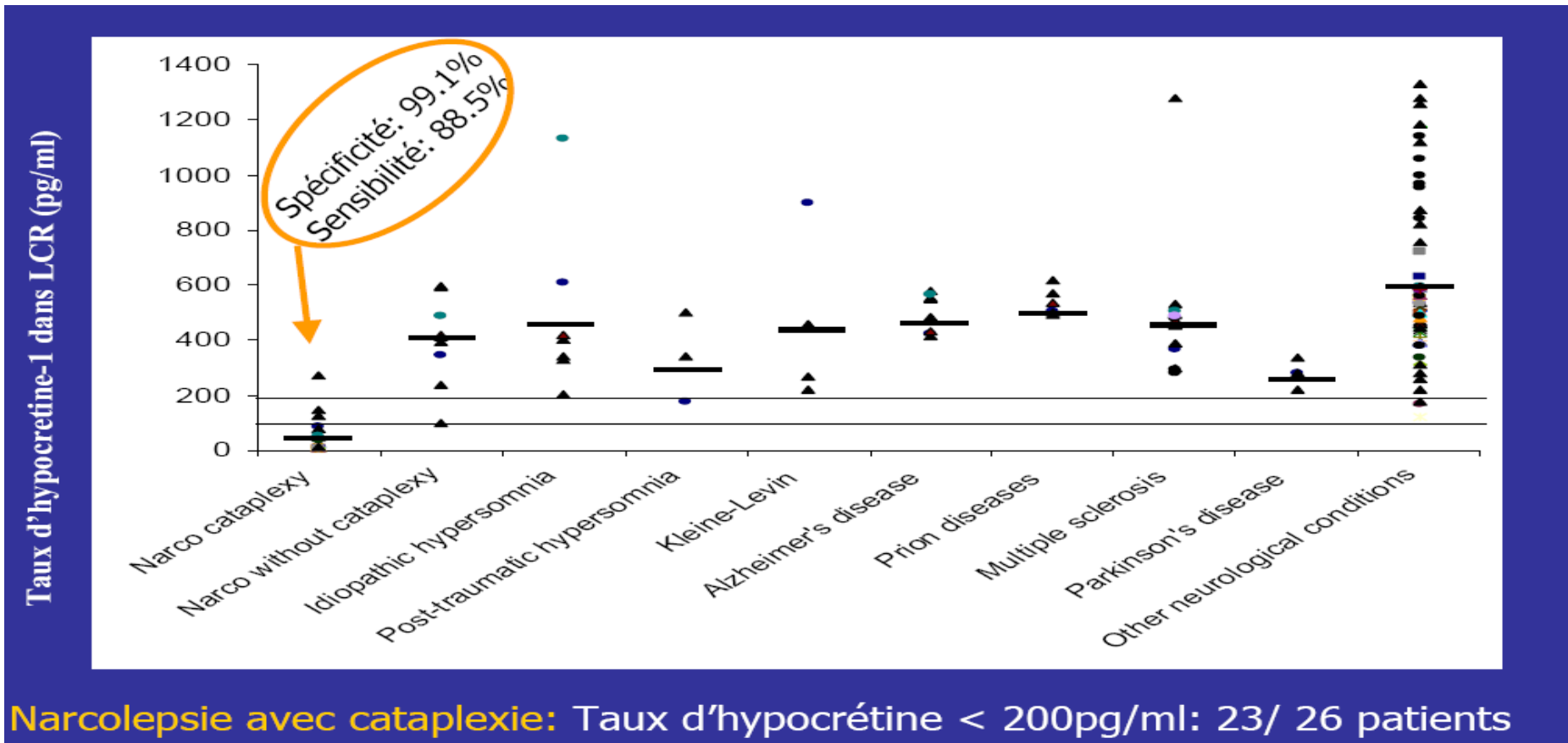
Pag. 1/1

Analyse	Resultaat	Eenheden	Ref. Waard
ANDERE LICHAAMSVOCHTEN			
Neusvocht			
B-trace proteïne	+ 24,20 BTP concentratie CSV: 5,4-23,8 mg/L	mg/L	<1

# LCR et narcolepsie

Narcolepsie : somnolence diurne excessive, cataplexy

→ Déficit en hypocretine = neurotransmetteur impliqué dans la veille qui stabilise sommeil et veille



# LCR et maladie de Creutzfeld-Jacob (MCJ)

La MCJ fait partie des maladies à prions ou encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST).

La protéine 14-3-3 est une protéine ubiquitaire abondante dans les neurones. La forte concentration dans le LCR de patients atteints de MCJ en fait un marqueur reconnu (critères diagnostiques de l'OMS). Son rôle physiologique n'est pas élucidé.

→ concentration LCR élevée due à lyse neuronale ?

	MCJ sporadique	MCJ hormone de croissance	MCJ génétique	nv- MCJ
Sensibilité	95%	70%	variable*	57%
Spécificité	87%	--	--	--
VPP	90%	--	--	--

Sensibilité et spécificité variable selon formes de la maladie et selon les publications

→ toujours associer détermination protéine 14-3-3 au contexte clinique, éventuellement à d'autres marqueurs comme la néoptérine, l'aldolase.

# LCR: aspects cytologiques

21/11/2013

Association des ATM

Amphi CHL

V. Schlessler

# Cytologie du LCR: les enjeux...

## Urgence médicale

⇒ Décisif pour confirmer un **processus infectieux aigu**

⇒ Confirmation d'une **infiltration tumorale** suspectée ou méconnue

⇒ Résultats confrontés et intégrés à ceux de la biochimie, bactériologie, virologie et immunologie ainsi qu'aux **données cliniques**



# Cytologie du LCR: les enjeux

## Préanalytique

**Technique de prélèvement délicate:** irréprochable car risque de contamination sanguine en cas de ponction traumatique

**Prélèvement précieux,** volumes faibles(1,5 ml): choix judicieux des techniques cytologiques à mettre en oeuvre

**Prélèvement fragile:** paucicellulaire avec lyse rapide des éléments cellulaires => « **urgence analytique** »

**!Potentiellement infectieux** (HIV, TBC, virus neurotropes, bactéries, ...) => précautions!!!

## Viabilité des éléments cellulaires dans le LCR

Temps	Déclin de viabilité
30 min	50%
60 min	20%
90 min	10%

Cytolyse → 50% en 2 heures

=> Transport rapide au laboratoire et prise en charge prioritaire!

## LCR: examen cytologique de base

### Numération des éléments

Sur automates d'hématologie ???

Kits disponibles...

LCR normal: < 5 él. nucléés/ microlitre

< 1 hématie/ microlitre

⇒ Pas du tout comparable au sang!

⇒ On atteint les limites en terme de sensibilité

⇒ Risque de carry-over... rinçages prolongés...

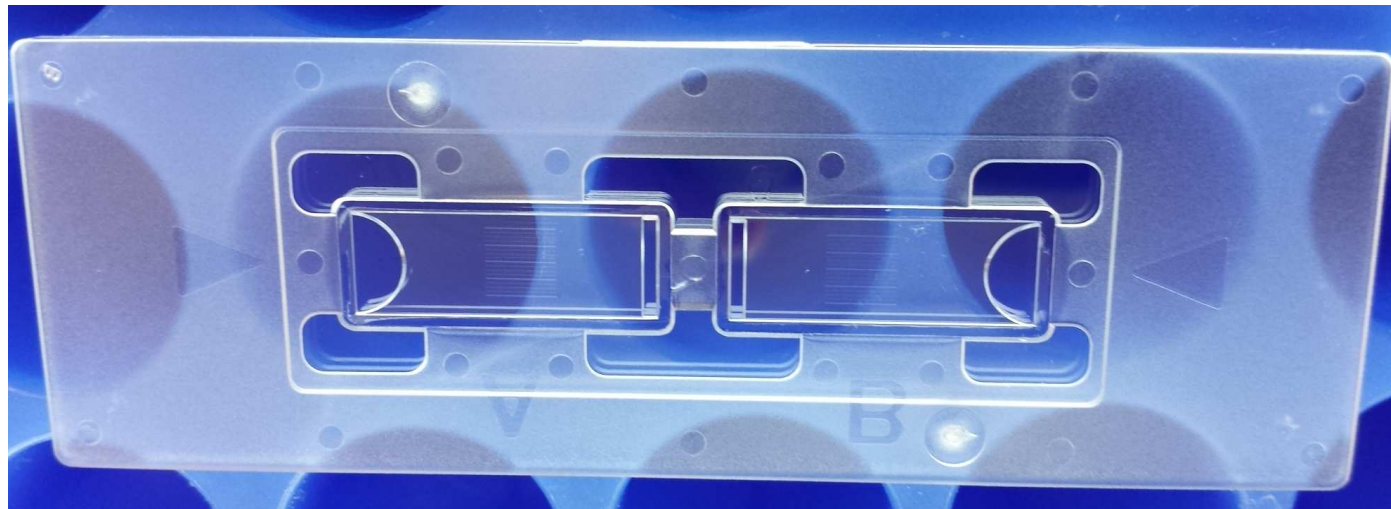
En règle générale, pas/peu adaptés!

# Cellule de Fuchs-Rosenthal

Lame en polycarbonate  
à usage unique pour microscopie

Deux cellules par lame (A et B)

$V = 3,2$  microlitres:

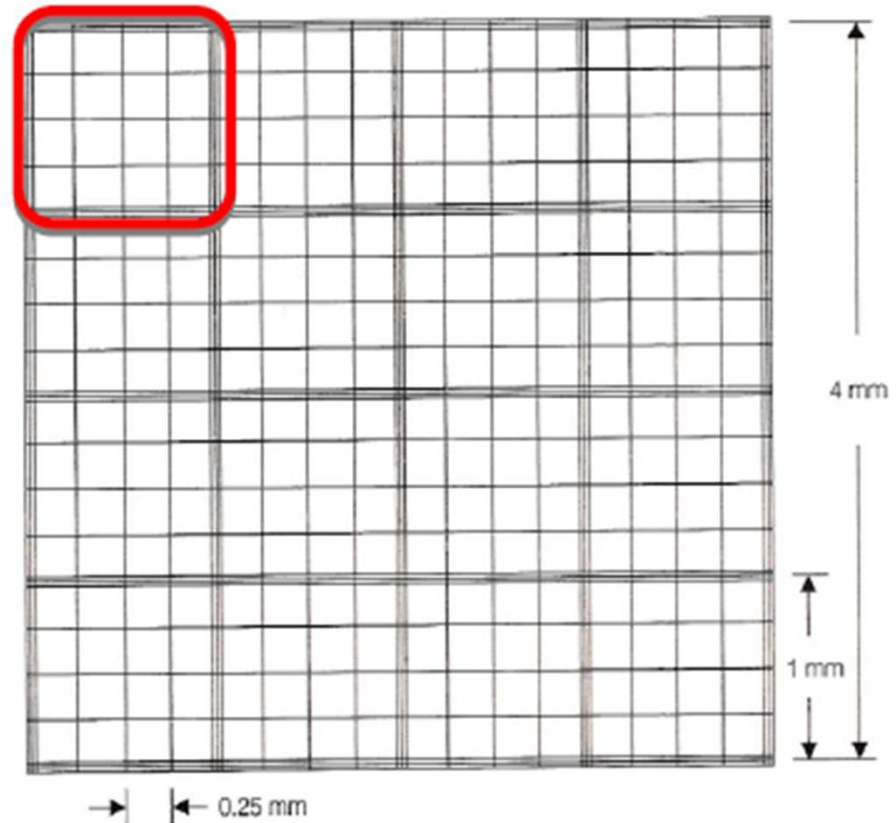


# Cellule de Fuchs-Rosenthal

$V = 3,2$  microlitres:  
16 grands carrés de 0,2 microlitre

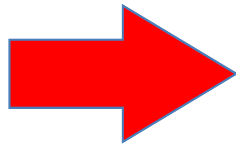
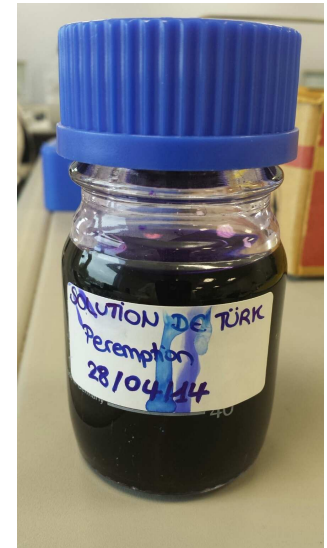
Cellule A: numération hématies  
sur LCR pur

Cellule B: numération leucocytes  
sur LCR dilué 50% avec **solution  
de Türk**



## Solution de Türk

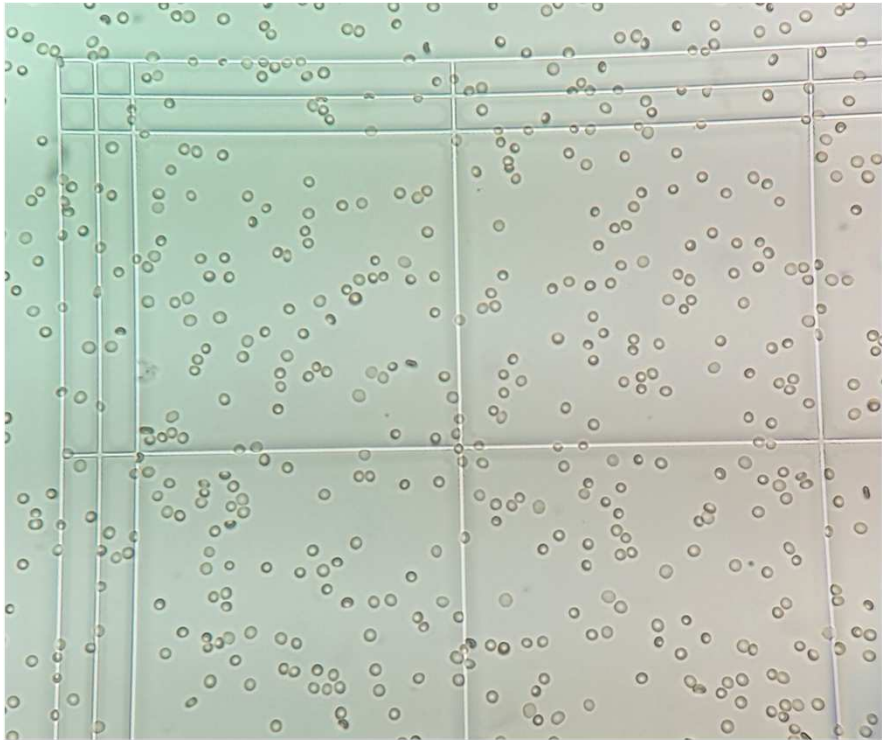
Dans un flacon jaugé de 100 ml (ou une éprouvette graduée de 100ml) ajouter environ 30 ml d'eau distillée puis ajouter **5 ml de solution de cristal violet selon Gram** (contient 50 milligrammes de violet de gentiane) ajouter ensuite **2 ml d'acide acétique** glacial et porter à 100 ml avec de l'eau distillée. Filtrer et conserver la solution dans une bouteille en verre en indiquant le contenu, la date de préparation et la date de péremption. Stabilité de la solution : 6 mois.



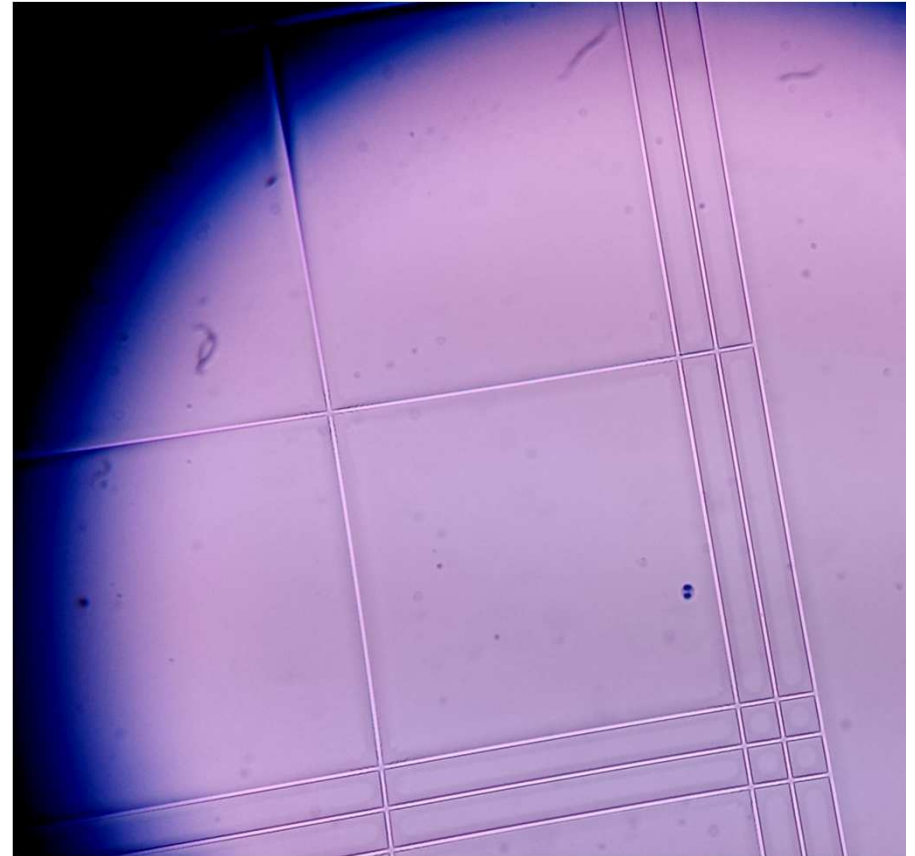
Mélange 50:50 avec LCR

- ✓ Lyse des hématies
- ✓ Coloration des noyaux cellulaires

## Cellule de Fuchs-Rosenthal



Cellule A: numération hématies  
sur LCR pur



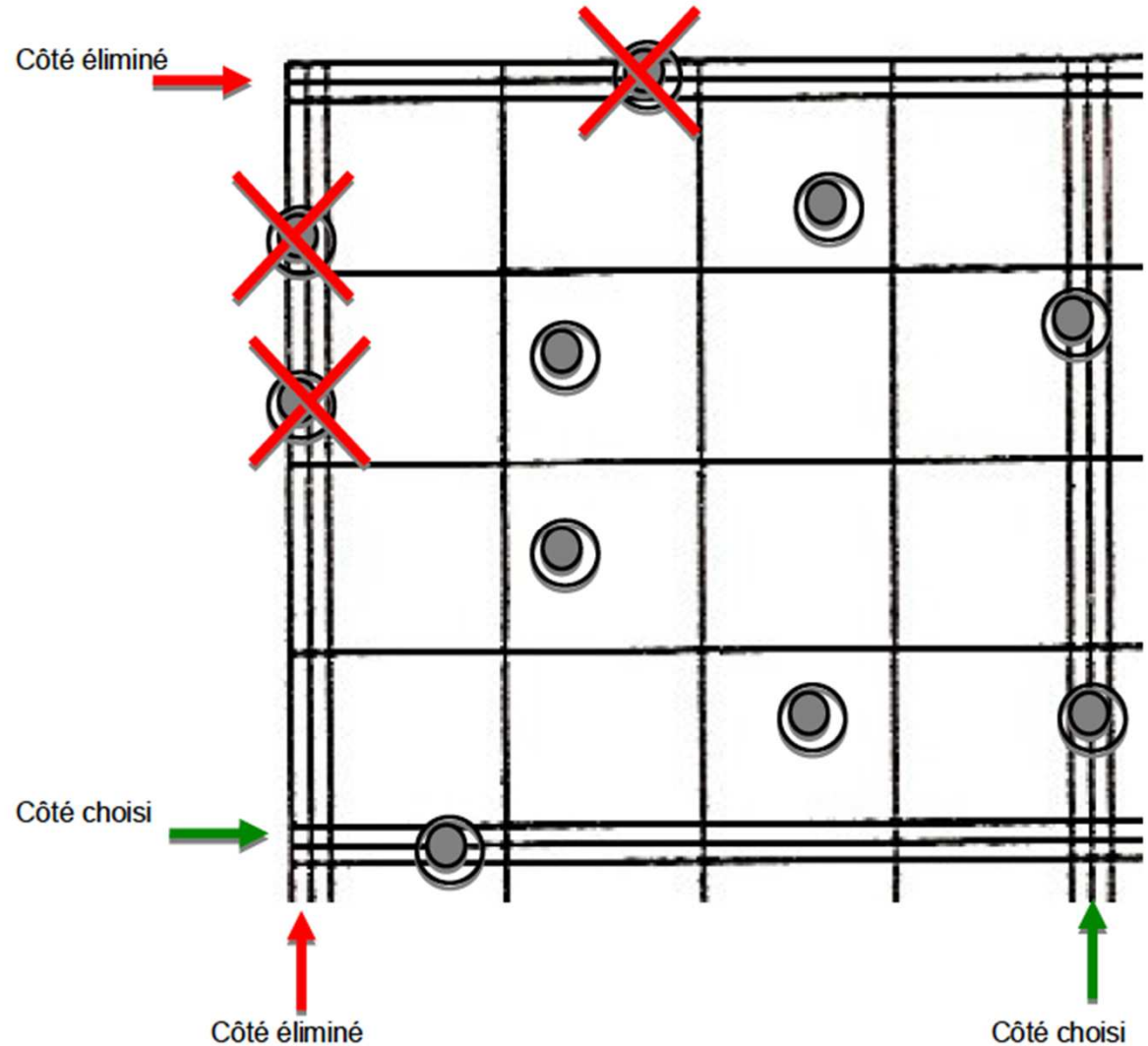
Cellule B: numération des leucocytes  
(noyau AVEC membrane visible)

# Fuchs-Rosenthal: principes de comptage

N'inclure dans le comptage que 50% des cellules à cheval sur la zone de comptage et l'extérieur.

Exemple sur un grand carré (0,2 microlitres)

Q: Nombre de cellules par microlitres dans ce LCR ?





# LCR: examen cytologique de base

## Formule leucocytaire

Automates d'hématologie ?

En règle générale, pas/peu adaptés et ne remplace un examen microscopique!

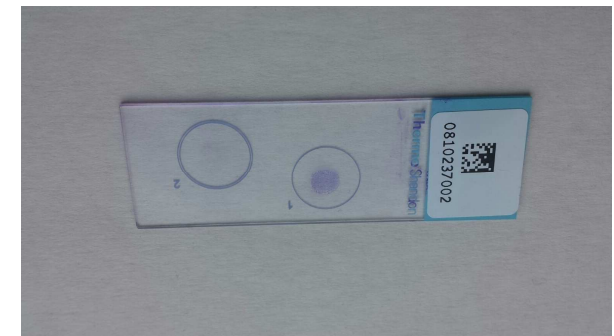
=> Réalisation d'un leucoconcentré déposé sur une lame et coloré pour microscopie

# LCR: examen cytologique de base

## Formule leucocytaire

Réalisation d'un leucoconcentré déposé en spots sur une lame

⇒ 200 microl LCR + 200 microl sol albumine ou RPMI



Coloration MGG

# LCR: examen cytologique de base

## Valeurs de référence

### Numération:

Éléments cellulaires nucléés : Adultes : < 5 /microlitre

Nouveau-nés : <30/microlitre

Hématies : <1/microlitre

### Formule (indicative) LCR normal :

Adultes : Lymphocytes : ~80%

Neutrophiles : absents\*

Monocytes : ~15%

Lymphoplasmocytes : absents

\*Chez le nouveau né, il peut y avoir jusqu'à 50% de polynucléaires neutrophiles

# Cytologie du LCR: les techniques

## Examens cytologiques supplémentaires:

- Cytométrie en flux

!!! Viabilité cellulaire=> RPMI 50:50

- Examen anatomopathologique

=> Immunomarquages/colorations spéciales sur lame. A considérer dès qu'il y a un doute sur les cellules ou un contexte particulier!

# Cytologie du LCR présentation de quelques cas...

# Cytologie du LCR présentation de quelques cas...

**Cas 1: F 47 a, symptômes méningés.  
Aspect: LCR rosé.**

**Hématies: 27000 / microlitre**

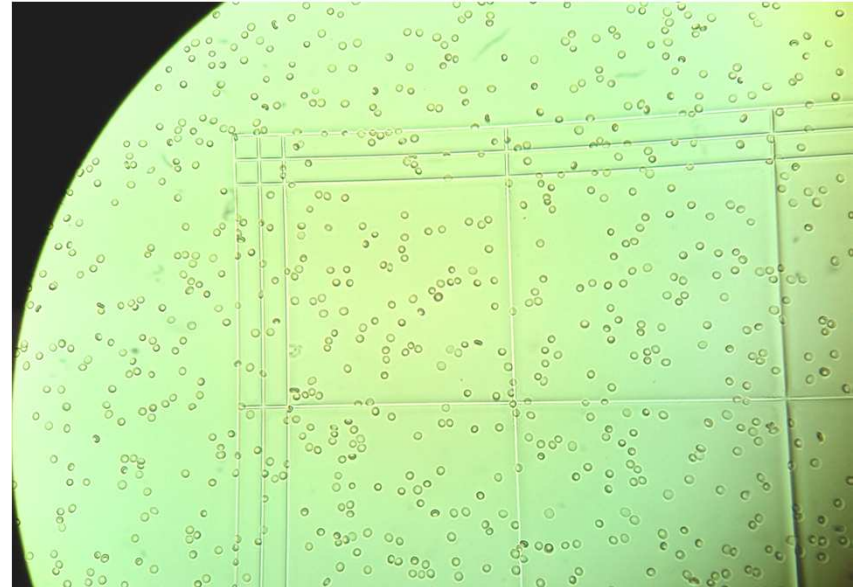
**Leucocytes: 35 / microlitre**

**N: 65 %**

**L: 25%**

**M: 10%**

**Que conclure ?**



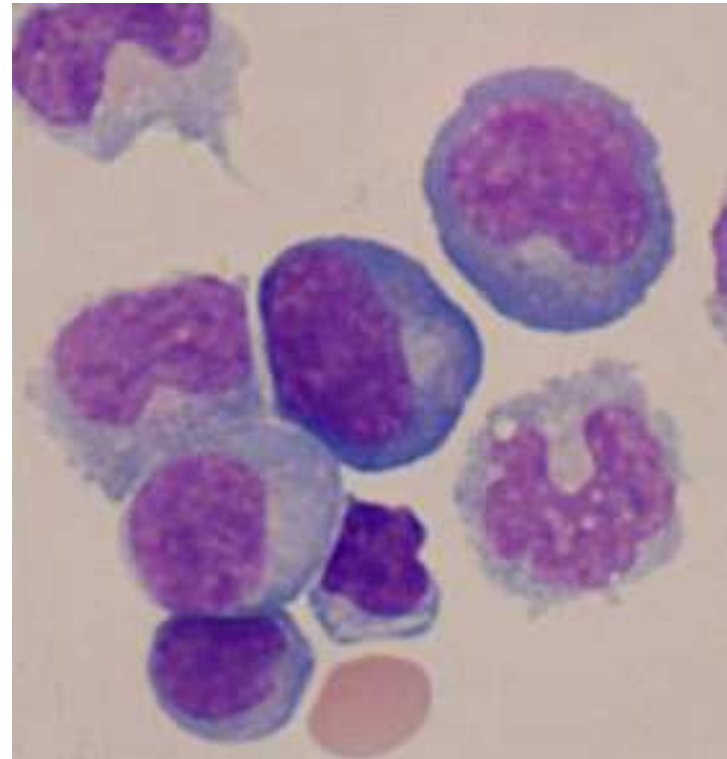
## Cytologie du LCR présentation de quelques cas

**Cas 2: F 18 a, symptômes méningés.**

**Hématies: 2 / microlitre**

**Leucocytes: 42 / microlitre**

**Que conclure ?**

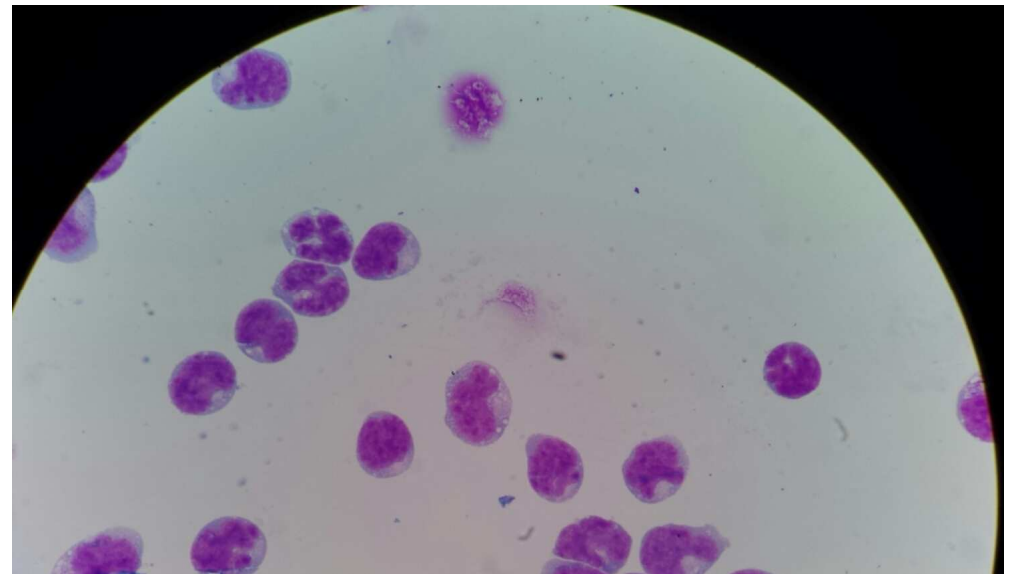
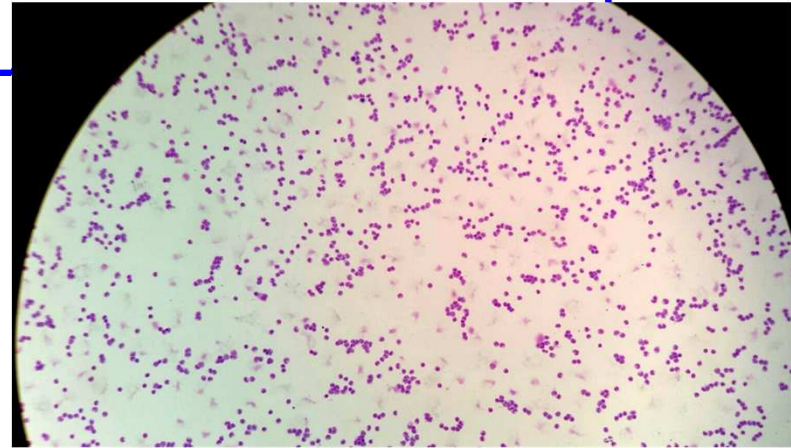


## Cytologie du LCR présentation de quelques cas

**Cas 3: F 19 a, céphalées++.  
ATCD de LAL**

**Hématies: 1000 / microlitre  
Leucocytes: 3490 / microlitre**

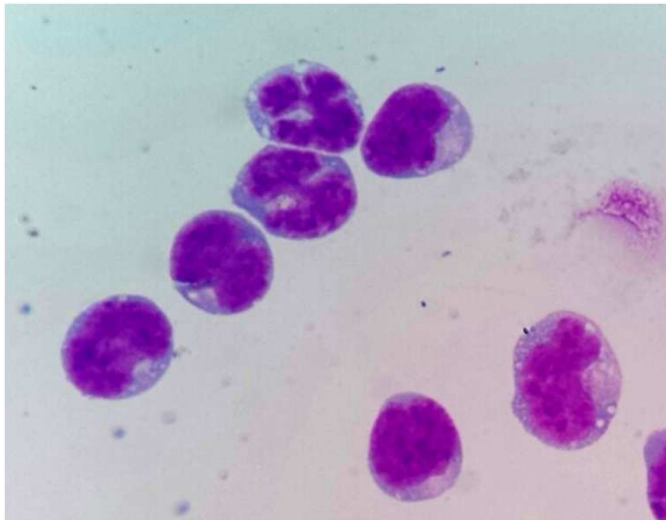
**Que conclure ?**





# Cas 3: F 19 a, symptômes méningés. ATCD de LAL

## Résultat de la CMF:



	<b>CENTRE HOSPITALIER DE LUXEMBOURG</b>		
	HÔPITAL MUNICIPAL * CLINIQUE PÉDIATRIQUE * MATERNITÉ * CLINIQUE D'EICH		
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CLINIQUE 4 rue Barblé L-1210 Luxembourg			
Biochimie : GILSON Georges Docteur en Biochimie- Dr BENKHADRA Farid Médecin Biologiste			
Hématologie : SCHLESSER Vincent Pharmacien Biologiste MAHASSEN Philippe Pharmacien Biologiste			
Microbiologie : Dr TSOBO Chantal Médecin Biologiste ☎ : 45 77 94 ☎ : 4411-2180 📧 : slabo@chl.lu			
Patient:			
Dr 4, RUE BARBLE / CHL			
L-1210 LUXEMBOURG			
Date de naissance : ..... (18 ans) (F)			
Envoyé à :			
<b>Références</b>	Labo : Service : Matricule : Poste : U13/15 - Externe :	Prélèvement du : Date de saisie : Date d'édition : Type d'édition : <b>Complet</b>	
25/06/13 Unités Limites val. préc.			
<b>CYTOMETRIE EN FLUX : Prélèvement de LIQUIDE</b>			
<b>IMMUNOPHENOTYPAGE DES CELLULES BLASTIQUES</b>			
Cellules blastiques ..... 98 %			
Stratégie de repérage : CD45 / SSC. Résultats en % exprimés par rapport à la population blastique.			
<b>Marqueurs d'immatrité</b>			
CD34 ..... 100 %			
<b>Marqueurs lymphoïdes B</b>			
CD10 ..... 94 %			
CD19 ..... 100 %			
CD20 ..... 19 %			
CD22 ..... 100 %			
<b>Commentaire</b>			
CD45 faible intensité sur les cellules blastiques			
Compte-rendu validé par : SCHLESSER Vincent.			

# Cytologie du LCR présentation de quelques cas



**Cas 4: H 27 a, trauma crânien.  
Aspect: LCR rosé.**

**Hématies: >50000 / microlitre**

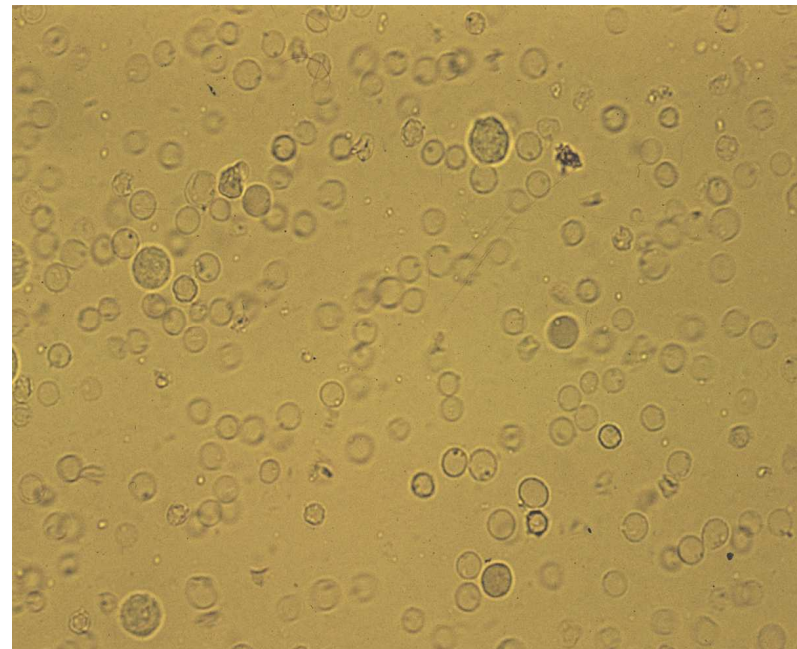
**Leucocytes: 200 / microlitre**

**N: 92 %**

**L: 1%**

**M: 7%**

**Que conclure ?**



# Cytologie du LCR présentation de quelques cas

**Cas 5: H 27 a, trauma crânien.  
LCR du même patient après  
10j .**

**Hématies: >50000 / microlitre**

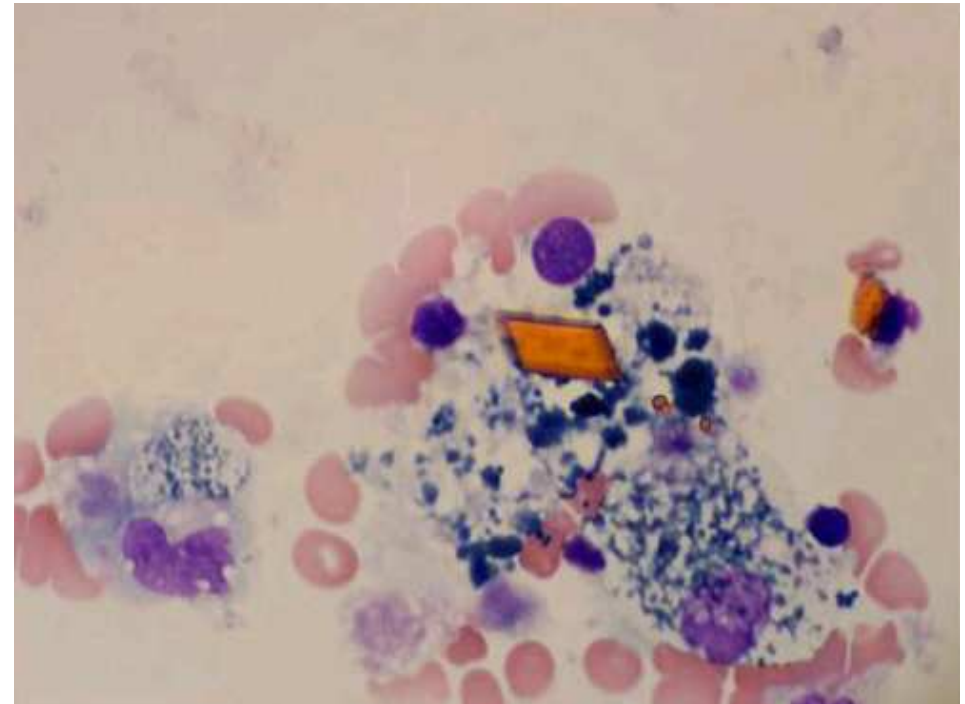
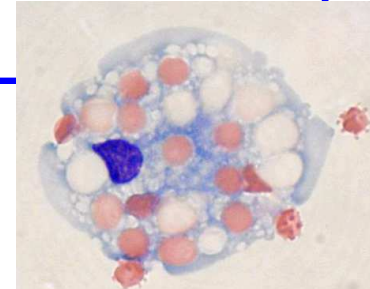
**Leucocytes: 35 / microlitre**

**N: 5 %**

**L:65%**

**M: 30%**

**Que conclure ?**



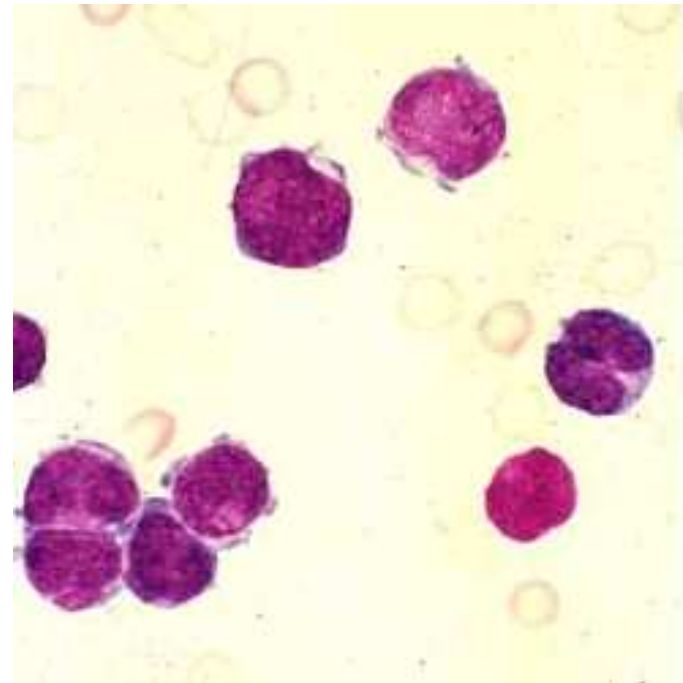
# Cytologie du LCR présentation de quelques cas

**Cas 6: H 65 a, céphalées, diplopie. Tabagique+++**

**Hématies: 15 / microlitre**

**Leucocytes: 35 / microlitre**

**Que conclure ?**



# Aspects Microbiologiques du LCR

# Aspect microbiologique du LCR

## Contexte

- ❑ Suspicion de méningites et méningo-encéphalites communautaires ou nosocomiales
  
- ❑ Réalisation en urgence
  - Précocité du diagnostic
  - Antibiothérapie empirique

# Examen bactériologique du LCR :

## Objectifs

- ❑ Orienter la thérapeutique initiale :
  - cytochimie, ED
- ❑ Affirmer l'origine bactérienne /fongique ou virale
  - ED, Culture et identification...Amplification génique
- ❑ Antibiogramme
  - Sensibilité de la souche incriminée
  - Réévaluation de l'antibiothérapie probabiliste
- ❑ Déclaration auprès des autorités sanitaires
  - Enquête épidémiologique
  - Prise en charge de sujets contacts

# Aspects microbiologique du LCR :

## Prélèvement et transport (1)

### Quand prélever?

#### Dès suspicion du diagnostic


- Si possible avant toute antibiothérapie ou traitement antiviral
- ! Méningo et Herpes ➔ mise en route d'un traitement sans délai.

#### Ponction lombaire au niveau L4-L5

- ! absence de contre indication (HIT, trouble de la coag...etc ...)
- Asepsie chirurgicale
- +/- 2ml de LCR repartis dans au minimum 3 tubes stériles ( Biochimie , Cytologie, bactériologie)
- > 2ml si analyses supplémentaires (Mycobactéries, champignons, borrelia,...etc...)



## Aspects microbiologique du LCR : **Prélèvement et transport (2)**

- ❑ Acheminement rapide du LCR au laboratoire, température 20°C
  - conservation possible à 4°C pour la portion réservée pour l'amplification génique.
- ❑ Prélèvement correctement identifié + renseignements cliniques (état immunitaire, convulsion, contexte de chirurgie ORL ou neurochirurgie, recherche de microorganismes particuliers
  -  Mise en route d'examens microbiologiques adaptés


## Aspects microbiologique du LCR : **Prélèvement et transport (3)**

### ☐ Cas d'une dérivation ventriculaire :

- Dérivation externe : Prélèvement au niveau de l'embout du robinet proximal
  - **Prélèvement au niveau du sachet de collecte est à proscrire!!!!**
- Dérivation interne : Prélèvement au niveau lombaire ou au niveau du réservoir
- Cas de retrait du matériel : le matériel est à envoyé pour analyse en microbiologie.

## Aspects microbiologique du LCR : **Prélèvement et transport (4)**

### ☐ Autres examens associés :

- Hémoculture :
  - Cas de méningite fébrile : Hémocultures sont positives dans 50-75 % des cas
  - Parfois seules positives même si LCR est négative
- Biopsie cutanée
  - Surtout si purpura ! ( culture + PCR  N. Meningitidis)

Aspects microbiologique du LCR :

## Les analyses

- Urgence bactériologique
- Ne jamais mettre le prélèvement pour la bactériologie au froid
- Examen microscopique : examen direct
  - Coloration de Gram
  - Autres colorations...

# LCR : Coloration de Gram

- ❑ Rapide, simple, fiable
- ❑ L'efficacité de l'ED dépend de :
  - L'inoculum bactérien
  - Agent bactérien
  - Traitement ATB précoce
  - Compétence de l'examineur

# LCR : Coloration de Gram(2)

## ❑ Inoculum bactérien :

- <10.3/ml ; sensibilité de la colo Gram 25 %
- 10.3 – 10.5/ml ; Sensibilité de 60 %
- >10.5/ml ; sensibilité de 97 %....

## ❑ L'agent bactérien :

- Sensibilité de l'ED de 100 % si pneumocoque ; 90 % si HI ; 76 % si N.meningitidis ; et 50 % si L. Mocytoyenes...

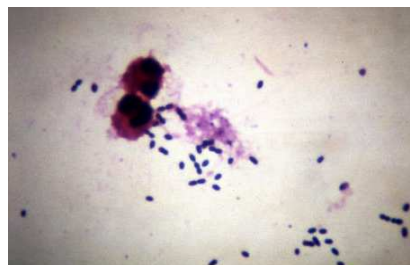
## ❑ Antibiothérapie :

- En l'absence d'1 antibiothérapie , la sensibilité de l'ED varie entre 60-97% et sa spécificité approche les 100%
- La charge bactérienne peut être réduite si antibiothérapie préalable.
- En cas de traitement précoce la sensibilité de l'ED < 60%

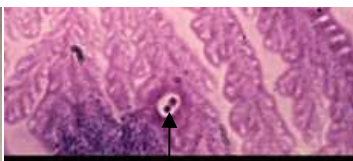
# LCR : Coloration de Gram(3)

- ❑☞ Sensibilité de l'ED est très élevée si **concentration de LCR par cyto centrifugation** ( Cytospin) préalable à la coloration
- ❑Caractère **intracellulaire de cert bactéries** ( méningocoque et de L. monocytogenes )
- ❑L' ED seul ne peut pas signer le Diagnostic !!!
- ❑Mais aide précieuse pour une **orientation diagnostique** ( + arguments cytochimique et clinique...)

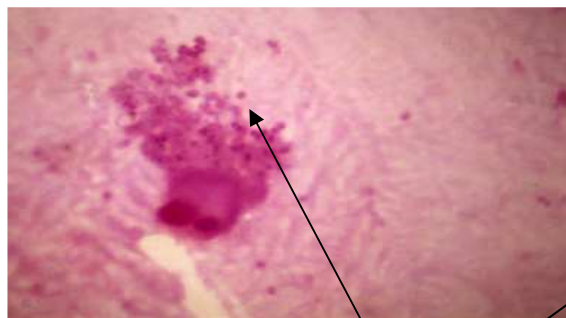
## Exemples d'images après coloration



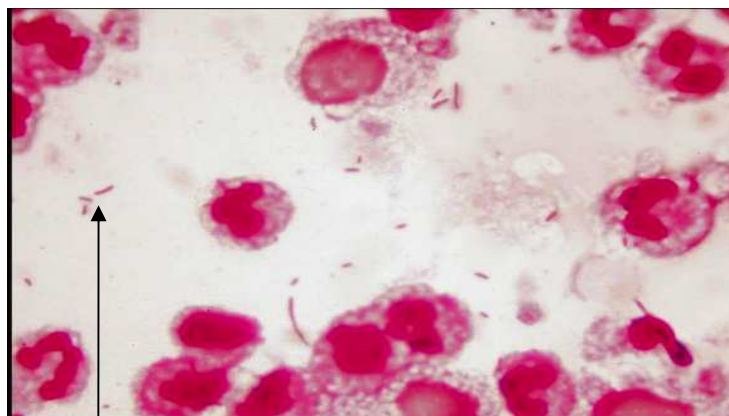
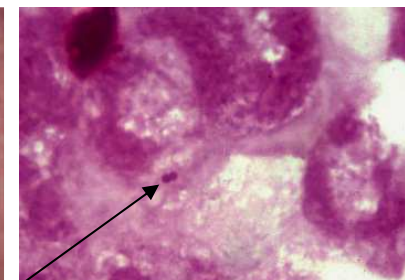
C+ Diplocoque  
(PNO)



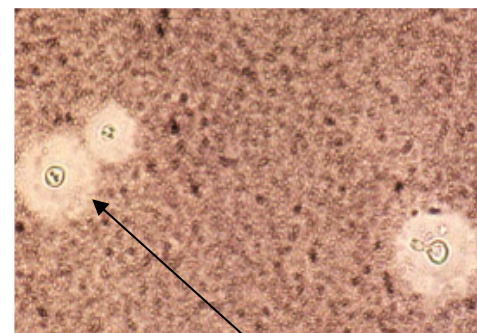
C+diplococoque  
encapsulé



Coques à Gram- diplo  
Aspect grains de café  
intra & extra cellulaire  
(MNO)



Bacille Gram-  
(HI)



cryptococcus neoformans  
- levure encapsulée  
(encre de chine)



# LCR : Autres colorations

- ❑ Coloration à l'encre de chine

Mise en évidence de la capsule ☞ *Cryptococcus* spp.

- ❑ Coloration de Ziehl... ☞ Recherche des mycobactéries.

- ❑ Coloration de Ziehl rapide ☞ Recherche de *Nocardia* spp

( bactérie filamnteux à Gram positif lors de l'ED de Gram)

- ❑ ....

**Contexte spécifique !**

# LCR : Culture

- ❑ **GOLD STANDARD** pour le diagnostic de MB
- ❑ affirme le Diagnostic et Identifie de l'agent étiologique
- ❑ Etudie la sensibilité aux ATB
- ❑ Malgré le délai de 48H..
- ❑ Mais !!! Culture négative :
  - Prise ATB,
  - Délai d'acheminement du PVT trop long incompatible avec la survie du germe
  - Inoculum bactérien trop faible....

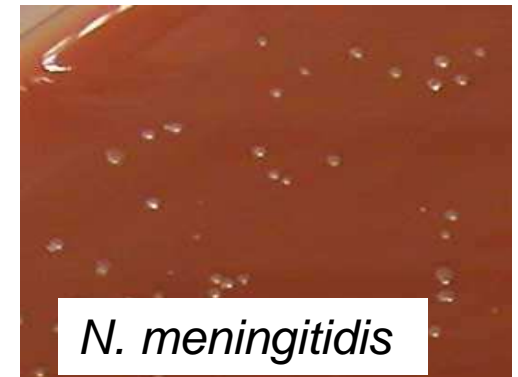
# LCR: Culture (2)

❑ Milieuxensemencés sont sélectionnés pour permettre la croissance de germes exigeants responsables des MB

❑ En général:

- Gélose au sang, Gélose au chocolat +PVX incubés à  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  sous 5 -10%  $\text{CO}_2$
- Milieux liquides (Shaedler, BCC...) incubé à  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en atmph . ambient

❑ **Milieux à observer quotidiennement minimum pendant 5 jours.**



# LCR: Culture (3)

## ☐ Cas particuliers → milieux additionnels

- Méningite lymphocytaire de l'immunodéprimé: Milieux pour culture levures / Champignons: **gélose sabouraud avec ou sans actidione**

Milieux pour culture Mycobactéries: **Loewenstein, MGIT....**

- Contexte neurochirurgicale: **Milieux anaérobie**

☐ Pas de culture virale !!!! Ni parasitaire → cf techniques de biologie moléculaires)

# LCR: Recherche d'antigènes (1)

- ❑ En complément d'analyse: **tests immunochromatographiques ou agglutination au latex**
- ❑ Consiste à rechercher les Ag bactériens dans le LCR
- ❑ Rapide, simple d'exécution
- ❑ Résultat non influencé par une antibiothérapie préalable
  - Tests disponibles pour ***S. pneumoniae*** (PNO) , ***S. agalactiae*** (GBS)  
***H. Influenzae* sérotype b** (HIb) , ***N. meningitidis*** A, B, C, Y, W135, ***E. coli*** K1

# LCR: Recherche d'antigènes (2)

❑ Mais spécificité et sensibilité variable en fonction de germes!!!

☞ **Faux positifs / faux négatifs**

❑ Ces tests devraient être orienté par :

- ED direct (+), leuco (+) surtout si PNN+++, Purpura fulminans...

❑ **Difficulté de lecture** ( variable en fonction du type de Kits):

- tests immunochromatographiques : spécificité  $\pm 100\%$  pour le PNO (mise en évidence du polysaccharide C)
- Tests par agglutination de particules de latex sensibilisées:  
Communauté antigénique pour : ☞ distinction impossible du MNO gpe B / E.coli K1 et du MNO Y/ W135

# LCR: Biologie moléculaire

- ❑ Recherche de gènes spécifiques de cert. bactéries, virus...
- ❑ Technique utile si: ED et/ou culture est Négatif (s), germes non cultivables , en cas de méningite décapitée.
- ❑ PCR universelle:
  - Gène ARNr 16s ( sensibilité +/-59%; spécificité 97%)
- ❑ PCR multiplex : PNO, MNO, Hib
- ❑ PCR spécifique: entérovirus (coxsachies, échovirus), herpes, HIV. MNO, PNO,Hib, Listeria, GBS. Borrelia, leptospire, CMV, Herpes, BK

# LCR: Examens sérologiques

- ❑ Sérologie sur LCR +/- couplé à la sérologie sérique → utile pour le diagnostic des méningites et méningo-encéphalites à cert. virus ou bactéries:  
*Borrelia, Tréponéma pallidum .....*



## Agents étiologiques des **meningites purulentes**

Espèce responsable	Caractéristiques
<i>Streptococcus pneumoniae</i> cocci à Gram +	Resp. de +/-50% de méningites bactériennes (MB) . !!! Souches de PSDP
<i>Streptococcus agalactiae</i> Cocci à gram+	Resp. de +/- 50% de MB
<i>Neisseria meningitidis</i> cocci à Gram -	Resp. de +/-25% de MB, Gravité +++ . !!! Pupura fulminans
<i>Escherichia coli K1</i> bacille à Gram-	Responsable +/-25% de MB néonatales
<i>Haemophilus influenzae</i> bacille à Gram -	Resp. de <5% de MB, Fréquent chez enfant de <15ans. En diminution depuis la vaccination
Staphylocoques coag- ou +, entérobactéries, streptococcus spp, Bactéries corynéformes, Pseudomonas spp...	Souvent resp. des méningites nosocomiales

## Agents étiologiques des **meningites à liquide clair**

Espèce responsable	Caractéristiques
Mycobacterium tuberculosis Bacilles acido-alcolo-résistants	+/-1% de méningites bactériennes, début progressif, état immunitaire diminué ...
Listeria monocytogenes	<5% de méningites bactériennes, 1% de méningites néonatales, !!! Méningite du sujet immunodéprimé ...
Méningites virales	Enterovirus, poliovirus, herpes, CMV,... HIV asymptomatique
Méningites parasitaires ou fongiques	-Toxoplasmose, strongyloïdes - Cryptocoques, candidas, ...

# LCR: Transmission et interprétation des analyses microbiologiques

## ☐ Transmission de résultats

- Les résultats **doivent être** téléphonés/disponibles pour le service clinique
- **Un résultat anormal impose** un contact direct avec le médecin en charge du patient

## ☐ Interprétation des résultats:

- LCR normal ☞ Pas de micro-organismes vivants ni leurs composants.
- Si résultats microbiologiques + : ☞ Témoin d'une infection → → Identification et antibiogramme /antifongogramme
- !! Examens microbiologiques négatifs alors que Nbre leucocytes ☞  
« **méningites aseptique** ». dont les **Causes** sont : -Entérovirus (+++) - méningites bactériennes décapitées- méningites due à un microorganisme fragile/ ou de croissance difficiles sur milieux usuels - vraie méningites aseptique (maladies inflammatoire)

# Déclarations et envoie de souches au CNR

- ❑ **Autorités sanitaires** : Biologiste/ médecin en fonction des récomendations en vigueur dans l'établissement
  - *S.pneumoniae, N.ménigitidis, H. Influenzae, L.mocytogenes*
  - Dans un but épidémiologiques ( Actualisation des données, vaccinations, adaptatiion des souches vaccinales )
- ❑ **Service de l'hygiène** hospitalière: biologiste
  - Précautions standards d'hygiène → éviter dissémination
- ❑ **Traitement préventif de sujet contact** proche: N.meningitidis, Hib...

# Conclusion

- Diagnostic : Faisceau d'arguments
- Confrontation clinico-biologique
- Aucun test à lui seul ne peut poser le diagnostic
- Culture: Gold standard
- 30% des cultures restent négatives
- Intérêt des techniques de biologie moléculaires.