



**UNIVERSITÉ
JEAN MONNET**
SAINT-ÉTIENNE



GIMAP
Groupe sur l'Immunité des
Muqueuses et Agents Pathogènes
EA • 3064 • SAINT-ETIENNE



**FACULTÉ
DE MÉDECINE**

JACQUES LISFRANC | SAINT-ÉTIENNE

Diagnostic microbiologique des encéphalites virales de l'enfant

Pr. Bruno Pozzetto

Laboratoire des Agents infectieux et d'Hygiène, GIMAP EA3064

CHU et Université de Saint-Étienne, France

bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr



Plan de la présentation

- Contexte
- Prélèvements
- Méthodes microbiologiques
- Interprétation
- Perspectives d'avenir

Plan de la présentation

- Contexte
- Prélèvements
- Méthodes microbiologiques
- Interprétation
- Perspectives d'avenir

- Le diagnostic repose sur un trépied clinique, biologique et électro-radiologique :
 - dysfonction aiguë du système nerveux central + syndrome infectieux (fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ notamment)
 - réaction inflammatoire au niveau du LCS
 - anomalies électroencéphalographiques et de l'IRM
- Le diagnostic différentiel reste très complexe du fait de la multiplicité des facteurs confondants.
- Deux grands groupes d'étiologies :
 - infectieuses, dominées par les causes virales
 - immunes
- Au plus 60% d'étiologies identifiées

• **Diagnostic différentiel**

- Méningites (bactériennes, virales, tuberculeuse, cryptococcique)
- Encéphalopathies d'origine infectieuse (encéphalopathie septique, encéphalopathie nécrosante aiguë ...)
- Affections vasculaires (AVC, vascularite cérébrale ...)
- Affections néoplasiques (primaire ou métastatique)
- Encéphalopathies toxiques (alcool, autres drogues)
- Encéphalopathies métaboliques (hépatique, rénale, hypoglycémie, amino-acidopathies, maladies mitochondriales, aciduries organiques ...)
- Epilepsies

ETIOLOGIES INFECTIEUSES

• VIRUS

- *Herpesviridae* (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6, HHV-7)
- Enterovirus (EV-A71, EV-D68 notamment)
- Parechovirus
- Virus influenza
- Paramyxovirus (rougeole, oreillons)
- Nombreux arbovirus :
 - *Flavivirus* (WNV, JEV, DenV, TBEV, Saint-Louis EV, Murray Valley EV, Kunjin virus, Powassan virus, Kasyanur Forest Disease virus, Omsk Fever virus ...)
 - *Alphavirus* (ChikV, EEEV, WEEV, VEEV ...)
 - *Bunyavirus* (LACV, TOSV, Jamestown virus, California EV, CCFV, RVFV ...)
 - *Reovirus* (CTFV)
- Henipavirus (hendra, nipah)
- Lyssavirus (rage ...)
- HIV
- JC virus ...

• BACTERIES

- *Listeria monocytogenes*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Borrelia sp.* (Lyme)
- *Treponema pallidum*
- *Burkholderia pseudomallei*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Leptospira spp.*
- *Brucella spp.*
- *Bartonella spp.*
- *Rickettsia spp.*
- *Ehrlichia spp.*
- *Coxiella burnetii* (fièvre Q)
- *Anaplasma spp.*

• PARASITES

- *Toxoplasma gondii*
- *Angiostrongylus cantonensis*
- Neurocysticercose
- Amibiases
- Trypanosomiasis

ETIOLOGIES IMMUNES (1)

- **ADEM (acute disseminated encephalomyelitis)**
 - Démyélinisation inflammatoire multifocale disséminée du SNC
 - Enfants de 5-8 ans (0,07/100.000 enfants / an)
 - Petite prédominance masculine
 - Post-infectieux ou exceptionnellement post-vaccinal
 - Diagnostic par IRM
 - Ac anti-MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) dans 1/4 des cas
 - Traitement par corticoïdes
 - Evolution en général très favorable



Sonneville & Wolf,
Réanimation, 2007)

Infections	Vaccinations
Virus	Rage
Rougeole (1/1000) ^a	Vaccin neural type Simple (1/300–1/7000) ^a
Rubéole (1/20 000) ^a	Vaccin non neural (<i>human diploid cell</i>) (<1/75 000) ^a
Varicelle (1/10 000) ^a	Diphtérie–tétanos–coqueluche (0,9/100 000) ^a
Oreillons	Polio
Influenza A ou B	Variole (3/665 000) ^a
HIV	Rougeole (vaccin vivant) (0,1/100 000) ^a
HTLV-1	Encéphalite japonaise (0,2/100 000) ^a
Hépatites A ou B	VHB (dix cas décrits) ^a
HSV, EBV, CMV, HHV6	influenza
Coxsackie	Fièvre jaune
Coronavirus	
Bactéries	
Streptocoque	
Chlamydiae	
Campylobacter	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Legionella	
Leptospira	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	
<i>Rickettsia rickettsii</i>	

^a La fréquence est indiquée entre parenthèses quand elle est connue.

- **Basal ganglia encephalitis**

- Mouvements désordonnés, chorée, troubles psy.
- IRM normale ou images de lésions des ganglions de la base (ex-noyaux gris centraux)
- Présence fréquente d'Acs anti-récepteur de la dopamine 2
- Traitement immuno-modulateur

- **Anti-NMDAR encephalitis**

- NMDAR : N methyl D-aspartate receptor (Acs dans sang ou LCS)
- Troubles psy., perte de mémoire, convulsions, mutisme
- Rare chez l'enfant
- Peut compliquer l'évolution des encéphalites herpétiques
- IRM souvent normale
- Traitement immuno-modulateur

- **Anti-VGKS encephalitis**

- VGKS : voltage-gated potassium channel-complex
- Convulsions, mal épileptique, troubles cognitifs et du comportement
- Diagnostic : Ac anti-VGKS dans le sérum
- Traitement immuno-modulateur

Niveau de causalité entre encéphalite et agent infectieux

- Relation « confirmée »
 - Identification de l'agent infectieux dans le SNC (culture, PCR, histopathologie ...) ± synthèse intrathécale d'anticorps
- Relation fortement probable
 - Identification de l'agent infectieux dans un site stérile (LCS, sang) + réponse humorale spécifique dans le sérum
- Relation modérément probable
 - Identification de l'agent infectieux dans un site périphérique (portage possible) + réponse humorale spécifique dans le sérum
- Relation possible
 - Identification de l'agent infectieux dans un site périphérique (portage possible)

Importance du contexte géographique ...

Genre	Géographie	Mortalité
<u>Alphavirus</u>		
virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV)	côte est USA, Caraïbes	50%
virus de l'encéphalite équine de l'ouest (WEEV)	côte ouest USA	10% nourrissons
virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEEV)	Amérique centrale et du sud	-
<u>Flavivirus</u>		
virus de l'encéphalite japonaise (JEV)	Japon, Asie, Australie	5-40%
virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV)	USA	20%
virus de l'encéphalite à tiques (TBEV)	Europe de l'Est	1 %
virus West Nile (WNV)	Afrique, Asie, Europe Amérique du Nord	rare
<u>Bunyavirus</u>		
virus La Crosse (LACV)	centre des USA	< 1%

Plan de la présentation

- Contexte
- **Prélèvements**
- Méthodes microbiologiques
- Interprétation
- Perspectives d'avenir

Prélèvements de première intention à visée étiologique

PRELEVEMENTS

Prélèvement	Type de recherche
LCS (5 à 10 ml selon l'âge)	Pression à la ponction Examen au gram – Coloration de Ziehl Recherche d'antigènes bactériens par immuno-chromatographie et d'antigène cryptococcique par ELISA Cultures bactériologiques et fongiques Cytologie : numération et formule Dosage des protéines et du glucose Recherche du génome de HSV, VZV et entérovirus Recherche de sécrétion intrathécale d'anticorps si sérologie +
Sérum (5 à 20 ml selon l'âge)	Sérologies en fonction du contexte clinique et épidémiologique (EBV, <i>M. pneumoniae</i> , arbovirus, rougeole, oreillons ...) Sérothèque pour recherches complémentaires
Sécrétions respiratoires	Si symptômes respiratoires associées Recherche de génomes viraux (grippe, enterovirus/rhinovirus, adenovirus ...) et bactériens (<i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> ...) Cultures bactériennes et fongiques
Selles	Recherche du génome des entérovirus Recherches ciblées si gastro-entérite associée
Biopsie cérébrale	A titre rétrospectif en cas de décès

Plan de la présentation

- Contexte
- Prélèvements
- Méthodes microbiologiques
- Interprétation
- Perspectives d'avenir

- **Examen direct du LCS** : la coloration de gram permet d'exclure une méningite bactérienne (sensibilité de l'ordre de 50%)
- **Détection d'antigènes bactériens** (pneumocoque +++, méningocoque ...) et fongiques (cryptocoque)
- **Cultures bactériennes et fongiques**
- **Sérologies et dosages d'anticorps dans LCS**
- **Tests moléculaires (+++)** « maison » ou commerciaux
 - Tests monoplex (PCR, qPCR, TMA, LAMP ...)
 - Tests multiplex
 - Métagénomique (ARN 16S, NGS)

Nouvelle génération de technologies d'amplification génique

- Techniques plus rapides (moins de 2 heures pour certaines d'entre elles)
- Automatisation et couplage des étapes d'extraction et d'amplification
- Possibilité de réalisation par des expérimentateurs « tout venant »
- Exemples de technique monoplex :
GeneXpert EV, GeneXpert MTB/RIF
- Exemple de technique biplez « maison » : détection de l'ADN de HSV et VZV sur BD-Max (Pillet et al., JCM, 2015)
- Exemple de technique multiplex : FilmArray Meningitis/Encephalitis panel de bioMérieux
- Inconvénient : coût encore élevé des tests commerciaux

Commercially available FDA-cleared or FDA-approved assays for pathogen detection in the CNS (*T. He et al. Curr Infect Dis Rep, 2016*)

Manufacturer	Assay name	Organism	Technology	Specimen type	Comments
Cepheid	Xpert EV Assay	Enteroviruses	Real-time PCR	CSF	Target is the 5' untranslated region; fully integrated and random access; 2-h 30' TAT
bioMérieux	NucliSENS EasyQ Enterovirus assay	Enteroviruses	NASBA	CSF	Target is the 5' untranslated region; separate nucleic acid and amplification/detection steps, automated; 5-h TAT
Focus Diagnostics	Simplexa HSV-1&2 Direct	HSV-1, HSV-2	Real-time PCR	CSF; genital lesions	Target is the DNA polymerase; semi-automated; no extraction; 1-h TAT
bioMérieux	FilmArray Meningitis/Encephalitis panel	Eck1, Hi, Lm, Nm, Sa, Sp, CMV, enterovirus, HSV-1, HSV-2, HHV-6	Multiplex PCR followed by solid array	CSF	Fully integrated and random access; approximately 1-h TAT

NASBA nucleic acid sequence-based amplification, HSV herpes simplex virus, CMV cytomegalovirus, HHV-6 human herpesvirus 6, CSF cerebrospinal fluid, TAT test turnaround time, Eck1 *E. coli* K1, Hi *Haemophilus influenzae*, Lm *Listeria monocytogenes*, Nm *Neisseria meningitidis*, Sa *Streptococcus agalactiae*, Sp *Streptococcus pneumoniae*

GeneXpert EV™: characteristics

- **140 μ L of CSF as sample**
- **Two-step real time PCR**
- **Targets a 146nt sequence in the 5' NTR of enterovirus RNA**
- **Internally controlled – Armored CIC RNA (Ambion) included in all runs as sample preparation/internal control**
- **Time to result is 2h 29 minutes**



GeneXpert EV™: protocol

1. Dispense Binding Reagent into port 1



2. Dispense Wash Reagent into port 2



3. Dispense Elution Reagent into port 3



4. Add 140µl of Lysis Reagent into port 4S



5. Add 140µl of Sample into port 4S

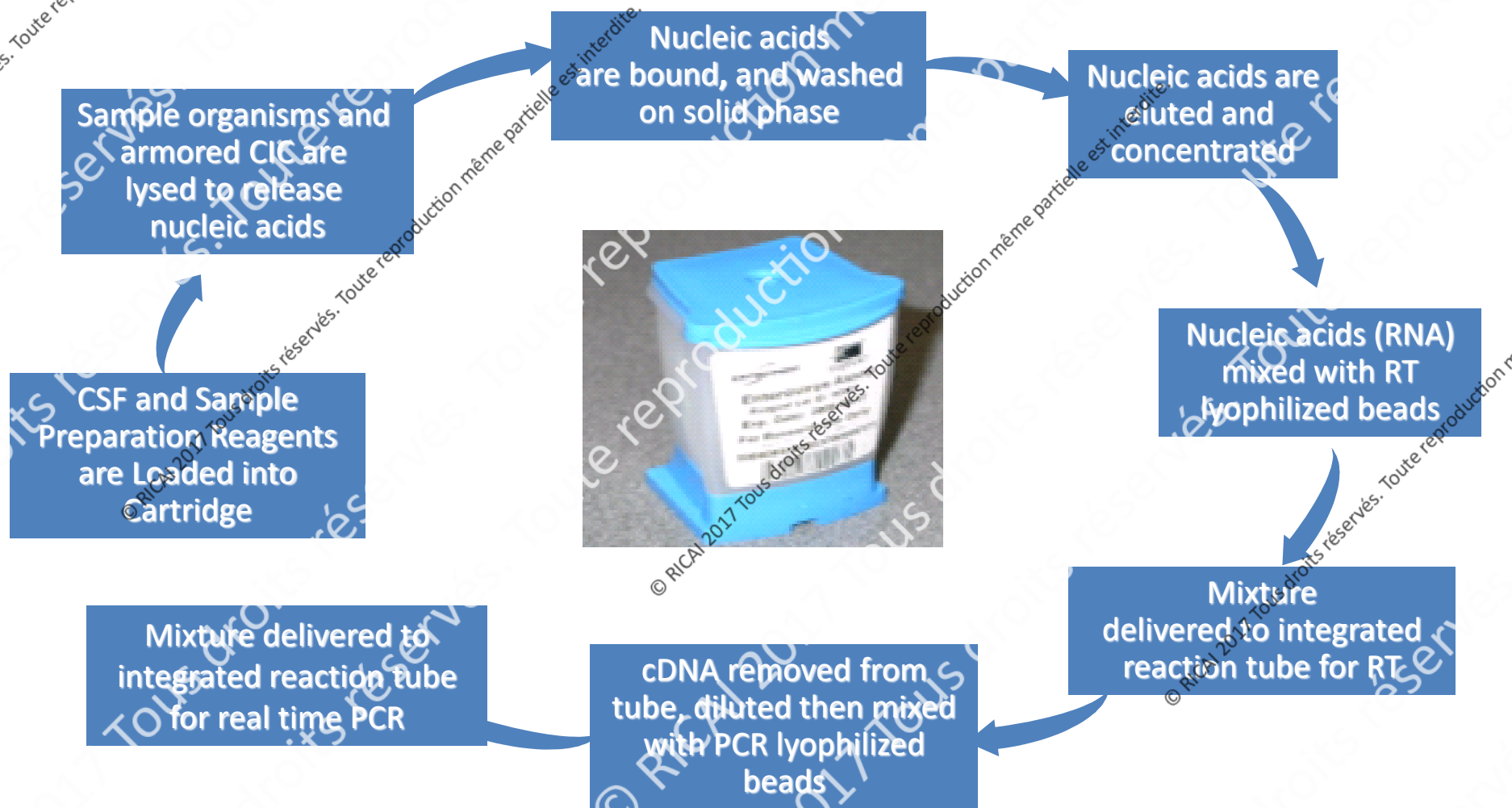


Total hands-on time = 5 minutes



6. Insert cartridge and start assay

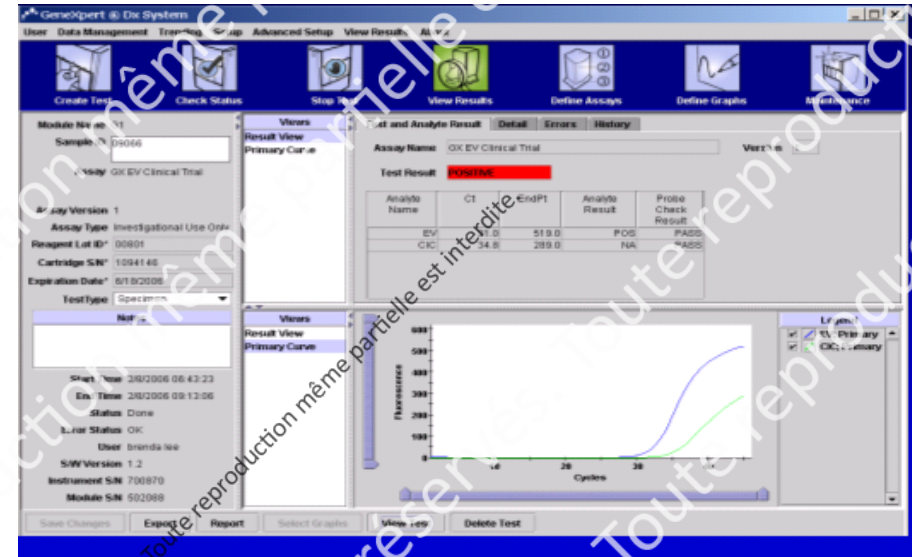
GeneXpert EV™: cartridge protocol



GeneXpert EV™: tests results

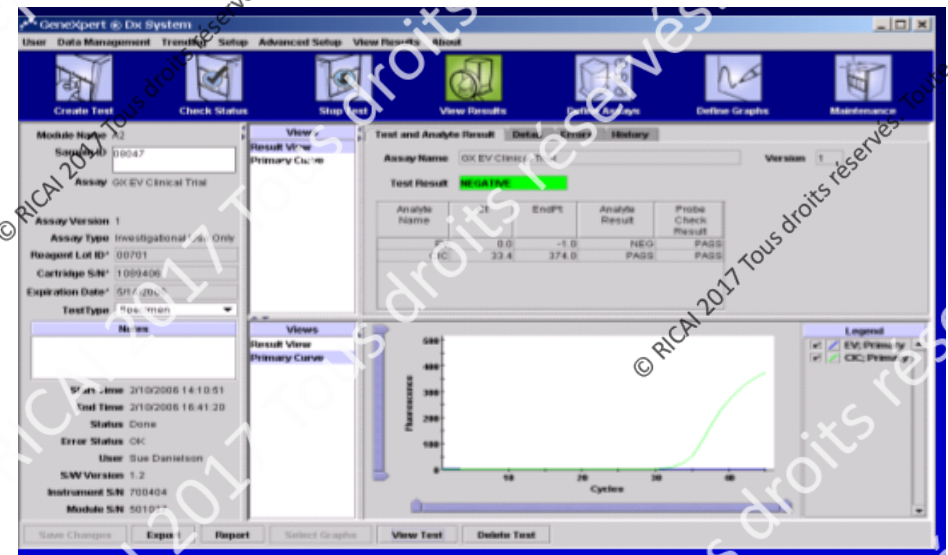
➤ POS

- **EV - POS (valid Ct range 3-45)**
- **Controls - NA**
- **Probe Checks - PASS**



➤ NEG

- **EV - NEG**
- **Controls - PASS**
- **Probe Checks - PASS**



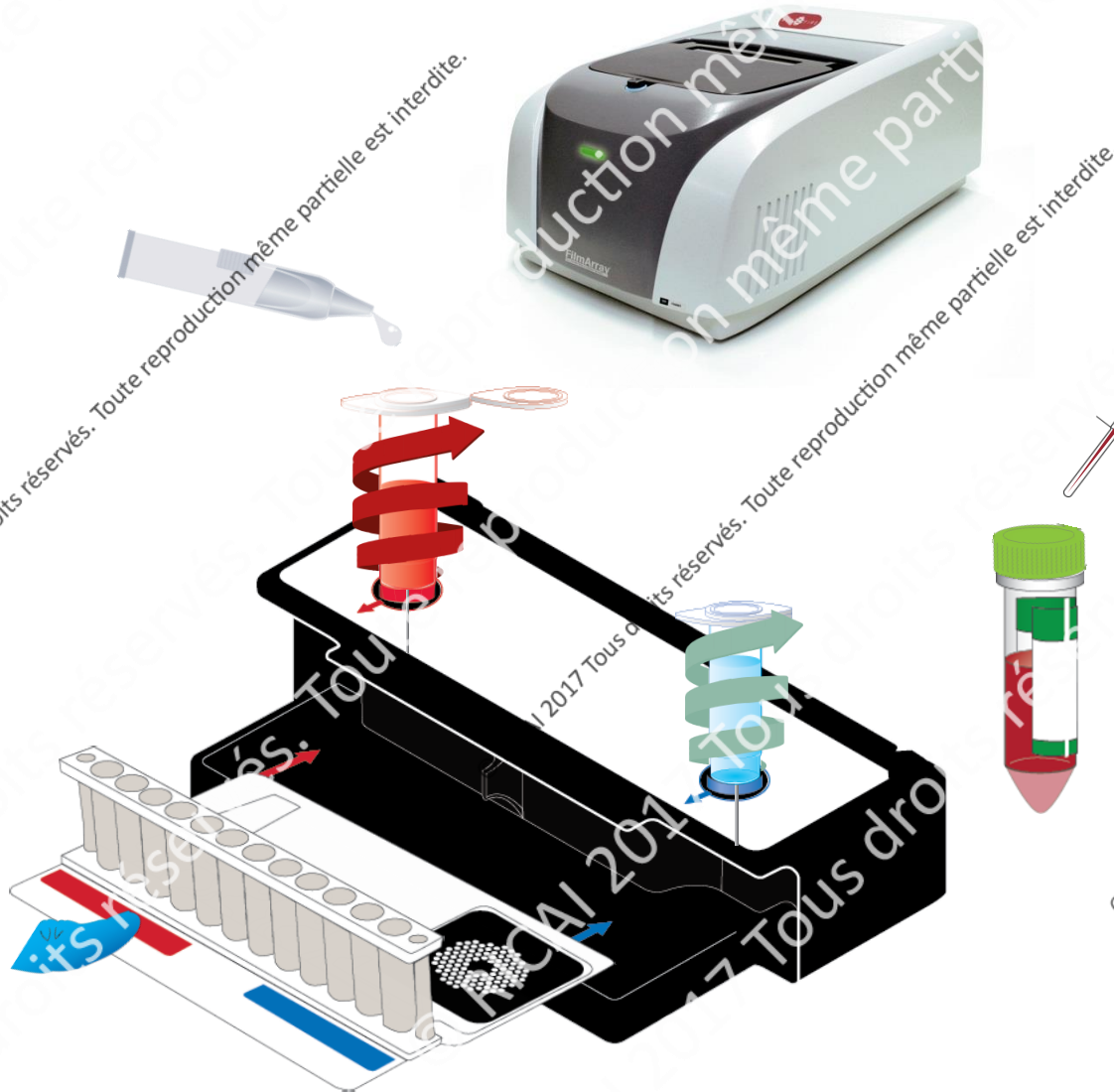
➤ INVALID

- **EV - INVALID**
- **Controls - FAIL**
- **Probe Checks - PASS**

Technologie FilmArray

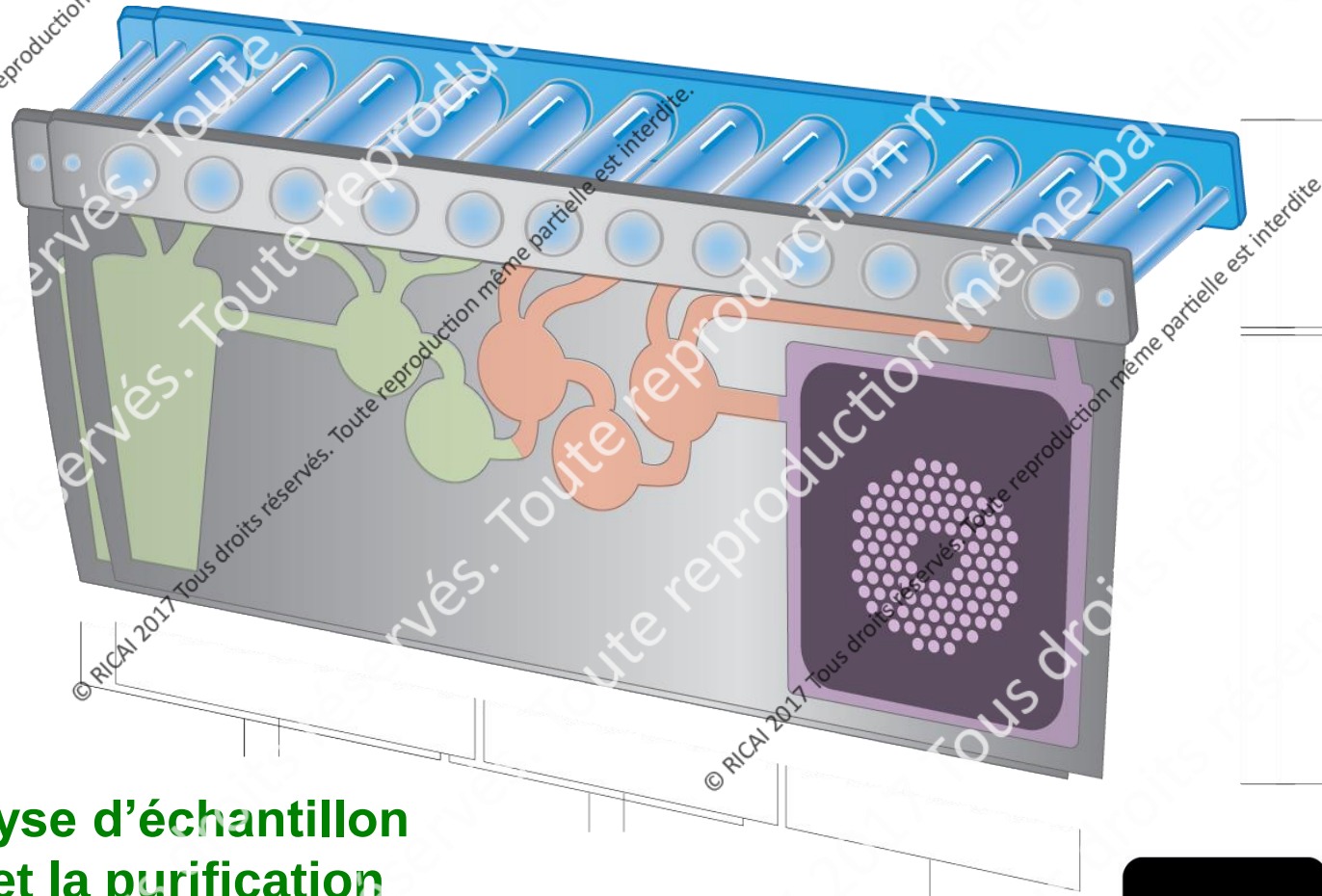


Temps de
manipulation:
2 minutes



© RICAI 2017 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Technologie FilmArray



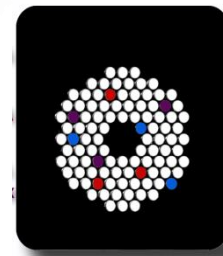
Réactifs
lyophilisés

Circuit
réactionnel

Lyse d'échantillon
et la purification
des Acides
Nucléiques

1^{ère} PCR

2^{ème} PCR
+ hybridation



65 minutes

Technologie FilmArray : panel méningo-encéphalite

- *E. coli* K1
- *H. influenzae*
- *L. monocytogenes*
- *N. meningitis*
- *S. agalactiae*
- *S. pneumoniae*
- Cytomegalovirus
- Enterovirus
- Human parechovirus
- HSV-1 et HSV-2
- HHV-6
- VZV
- *C. neoformans*/*C. gattii*

Plan de la présentation

- Contexte
- Prélèvements
- Méthodes microbiologiques
- **Interprétation**
- Perspectives d'avenir

Caractéristiques du LCS dans les méningo-encéphalites virales

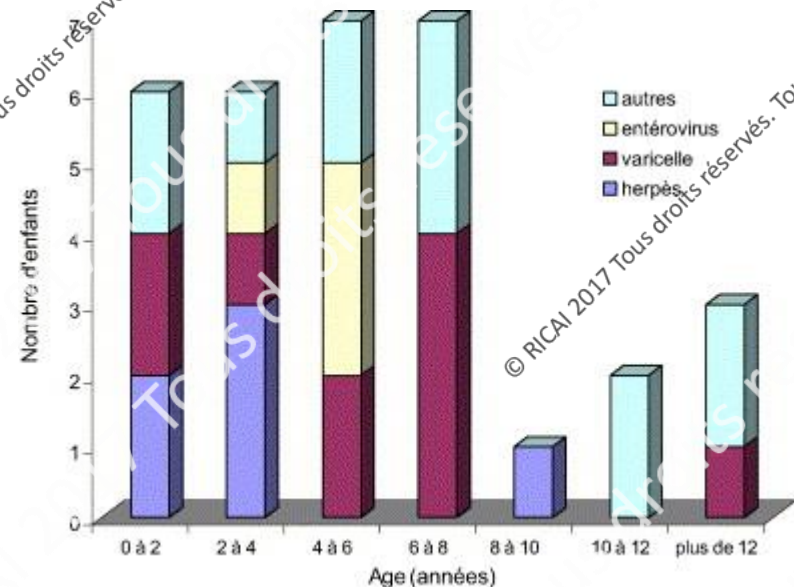
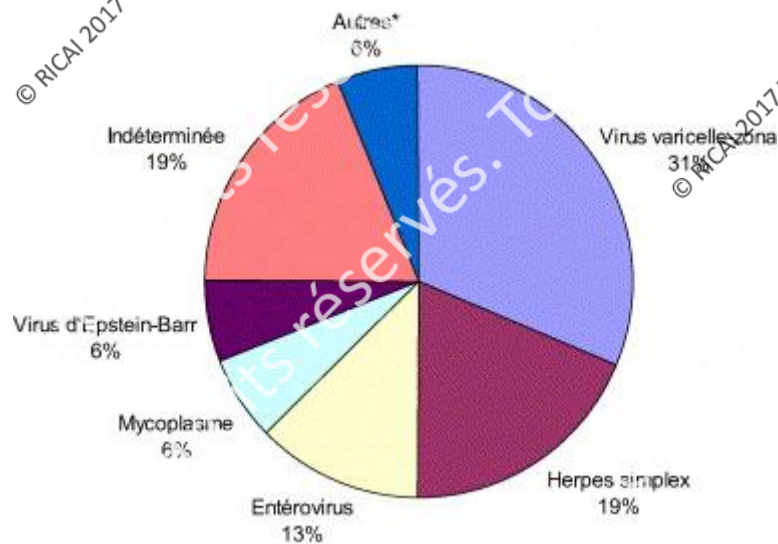
	Normal	Viral meningo- encephalitis	Bacterial meningitis	Tuberculous meningitis	Fungal meningitis
Opening pressure	<25cm H ₂ O	Normal-high	High	High	Very High
Cell count (uL or 10 ⁶ /L)	<5	5–1000	100–50 000	5–500	5–1000
Cell type	Lymphocyte/m onocytes, no neutrophils or RBC	Lymphocytes predominate (neutrophils if early)	Neutrophils predominate	Lymphocytes predominate	Lymphocytes predominate
Glucose (CSF:plasma) (mmol/L)	>0.5	Normal	Low (<0.4)	Very Low (<0.3)	Normal-low
Protein (g/L)	<0.5	0.5–1.0	>1.0	1.0–5.0	0.2–5.0

Résultats des grandes cohortes nationales

	California Encephalitis Project (Glaser, CID, 2006)	French National Encephalitis Study (Mailles, CID, 2009)	UK National Encephalitis Study (Granerod, LID, 2011)
Lieu / Date	Californie 1998-2005	France 2007	UK – 24 hôpitaux 2005-2006
Nbre patients	1570	253	203
% enfants	45	10	34
Cas confirmés ou probables	248 (16%) 170 viral (25% EV, 24% HSV-1, 14% VZV, 11% WNV, 10% EBV) 78 non viral (24% TB, 17% <i>Bartonella</i>)	119 (47%) 83 viral (66% HSV, 19% VZV) 36 non viral (44% TB, 33% <i>L. monocytogenes</i>)	128 (63%) 57 viral (67% HSV, 18% VZV, 5% EV) 25 non viral (40% TB, 16% streptocoques) 42 immune (55% ADEM, 38% Ac)
Cas possibles	<i>M. pneumoniae</i>	VZV et TB	-
Pas d'étiologie	63%	48%	37%
Décès	162 (11%)	26 (10%)	24 (12%)

Expérience stéphanoise en pédiatrie : Vial et al., Med Mal Inf, 2007

- Etude rétrospective portant sur 32 cas pédiatriques consécutifs (1991-2002) au CHU de Saint-Etienne
- 26 étiologies identifiées probables ou possibles (81%)
- 1 décès (3%)



Etude à Tbilisi, Géorgie : Akhvldiani et al., PlosOne, 2014

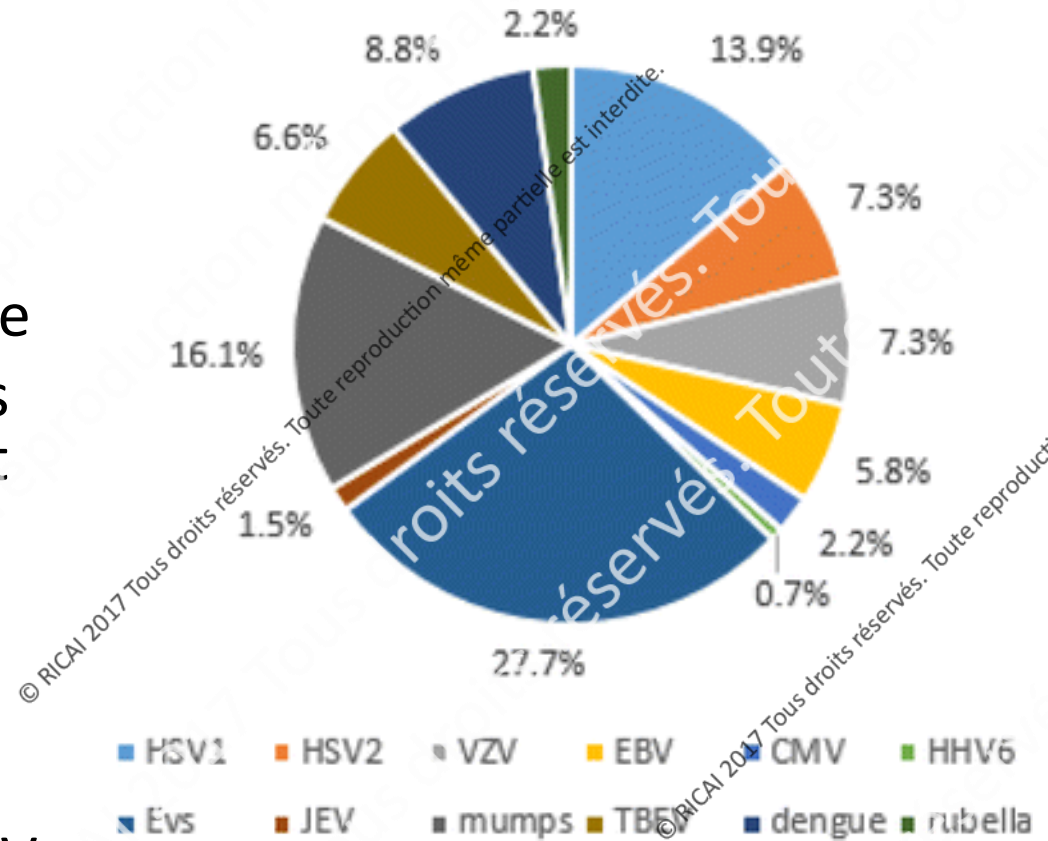
- Etude prospective portant sur 140 sujets fébriles (2010-2012) hospitalisés dans 4 hôpitaux de Tbilisi
- Agents testés : HSV, oreillons, EV, VZV, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* b and *N. meningitis*
- 58% d'enfants
- 12 encéphalites dont 1 HSV-1 et 1 VZV

Etude pédiatrique à Padoue, Italie : Parisi et al., Eur J Ped Neurol, 2016

- Etude rétrospective portant sur 304 cas pédiatriques consécutifs (2012-2015) à l'hôpital universitaire de Padoue
- 14 virus testés par PCR (HSV, VZV, EV, Parechovirus, CMV, EBV; ADV, HHV-6, HHV-7, HHV-8 and parvovirus B19 – pas de bactériologie)
- 64 étiologies identifiées (21%) : 35 EV, 5 HHV-7 et 7 HHV-8

Etude pédiatrique dans 4 provinces chinoises : Ai et al., BMC Infect Dis, 2017

- Etude prospective portant sur 260 cas consécutifs d'enfants (2009-2012) hospitalisés dans 5 provinces de Chine et présentant une encéphalite
- Agents testés : herpesvirus (multiplex Seegene testant 6 virus) et EV par PCR + sérologies virales (arbovirus, oreillons, rubéole)
- Etiologie dans 52,5% des encéphalites dont 28% d'EV
- Mortalité de 0,8%



Plan de la présentation

- Contexte
- Prélèvements
- Méthodes microbiologiques
- Interprétation
- Perspectives d'avenir

- Diagnostic étiologique encore difficile à établir, même chez l'enfant
- Prédominance des causes virales (HSV, VZV, EV ...) et de *M. pneumoniae*
- Importance du contexte géographique et des causes immunes de mieux en mieux reconnues
- Place des tests multiplex à mieux définir (en remplacement de quoi ?)
- Nécessité de constituer des cohortes avec des biobanques
- Importance d'établir des algorithmes avec des stratégies à plusieurs niveaux
- Intérêt dans le futur des techniques moléculaires non ciblées permettant l'identification *de novo* de pathogènes connus ou non

MERCI POUR VOTRE ATTENTION