

Apport de la collaboration entre urgentistes et microbiologistes dans le diagnostic des méningo-encéphalites de l'enfant

F. MOULIN

La distinction entre méningite virale et bactérienne chez l'enfant n'est pas toujours possible dès la prise en charge aux urgences sur les seuls critères cliniques. La démarche diagnostique habituelle inclut les examens microscopiques et la culture du liquide céphalorachidien ainsi que le prélèvement d'hémocultures. Le rendement de ces méthodes conventionnelles est limité en certaines circonstances, en particulier lors de l'administration d'antibiotique préalablement à la ponction lombaire, conduisant à des hospitalisations et des traitements antibiotiques inutiles pendant les 48 premières heures.

L'introduction récente des techniques moléculaires, faisant appel notamment à l'amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), permet de rechercher spécifiquement les différents agents pathogènes avec une grande sensibilité théorique. De plus l'automatisation et la praticabilité de certains de ces tests permettent d'obtenir les résultats en quelques heures. Cette approche est particulièrement pertinente dans le cas des méningites communautaires de l'enfant compte tenu du nombre restreint de germes impliqués. Si l'un des inconvénients de ce type d'examen est le coût important engendré, les analyses coût-bénéfice montrent le potentiel économique de la PCR notamment pour le diagnostic des entérovirus. Une autre restriction à l'utilisation de ces tests est leur absence de validation au moyen d'études prospectives, liée en partie à l'hétérogénéité des protocoles de PCR développés localement. Mais avant tout, ces méthodes de diagnostic sans culture se rajoutent aux techniques conventionnelles mais ne doivent pas se substituer à l'isolement de la bactérie, quand cela est possible, l'établissement d'un antibiogramme restant essentiel pour la détection des résistances.

Correspondance : Service d'Accueil des Urgences, Hôpital Saint Vincent de Paul, 82, avenue Denfert Rochereau, 75014 Paris. Tél. : 01 40 48 86 34. Fax : 01 40 48 86 05.
E-mail : florence.moulin@svp.aphp.fr

1. Méthodes conventionnelles

1.1. Examen microscopique du LCR : coloration de Gram

La coloration de Gram permet la mise en évidence des bactéries dans le LCR. Si l'examen direct a une spécificité de 97 %, la sensibilité varie en fonction des micro-organismes, d'un traitement antibiotique préalable et des conditions de transports. La concentration initiale des germes influence fortement les résultats de l'examen direct. Ainsi le pourcentage d'examens positifs est inférieur à 25 % quand la concentration initiale des bactéries dans le LCR est inférieure à 103 UFC/ml et s'élève à 60 % pour des concentrations comprises entre 103 et 105 UFC/ml. La sensibilité de l'examen direct varie également en fonction de l'espèce bactérienne : 90 % pour le pneumocoque, 86 % pour *Hemophilus influenzae*, 75 % pour le méningocoque, et seulement 30 % pour *listeria monocytogenes*.

1.2. Cultures bactériennes

Quel que soit le nombre d'éléments, le LCR est ensemencé sur milieu de culture adapté, une réponse provisoire est donnée à 48 h et les cultures sont conservées en incubation 5 jours.

1.3. Antigènes solubles

La recherche d'antigènes solubles permet la mise en évidence des polysaccharides capsulaires de différentes bactéries, libérés dans les liquides biologiques au cours des infections. Cette recherche s'effectue par agglutination de particules de latex sensibilisées. Elle permet la détection des antigènes solubles de streptocoques du groupe b, de *N meningitidis*, d'*E coli* sérotype K1, *Hemophilus influenzae* type b et de *S pneumoniae*. Les résultats sont disponibles dans l'heure. De plus, l'antibiothérapie préalable n'inhibe pas cette immunodétection. Cependant, la quantité d'antigène présent et la qualité des réactifs limitent la sensibilité de cette technique. Ainsi, en fonction de l'espèce la sensibilité varie de 50 à 100 % quand l'examen direct est positif et tombe à 5-20 % en cas de direct négatif. Leur spécificité est par ailleurs médiocre (1). Cette technique tend donc à être abandonnée au profit des techniques d'amplification génique, quand elles sont disponibles. Une technique immuno-chromatographique sur membrane, reposant sur la mise en évidence du polysaccharide C de *S pneumoniae* (Binax now®) récemment développée montre toutefois une meilleure valeur prédictive positive.

2. Dosage de l'interféron alpha dans le LCR

La réplication virale s'accompagne d'une sécrétion locale d'interféron alpha. Un dosage biologique spécifique est possible sur culture cellulaire. En cas d'infection virale du système nerveux central, méningite à entérovirus, oreillons, CMV, VZV

ou encéphalite herpétique, il y a une augmentation intrathécale de l'interféron alpha (normal < 2 UI/l) (2). Ce dosage doit être interprété en fonction des taux sériques, une atteinte virale méningée montrant une concentration dans le LCR plus élevée que dans le sérum. Cependant, en raison d'un délai d'obtention des résultats de 48 h, ce dosage ne peut être utilisé pour discriminer aux urgences les méningites virales des méningites bactériennes.

3. Techniques de biologie moléculaire

La recherche d'antigènes spécifiques des micro-organismes peut être réalisée par technique d'amplification génique notamment à l'aide de technique d'amplification en chaîne (PCR) directement réalisée sur le LCR. Ces techniques spécifiques et rapides sont utiles pour rechercher dans le LCR les gènes spécifiques de certains virus, au cours des méningites ou méningo-encéphalites. La PCR est devenue ainsi, la méthode diagnostique de référence pour les infections virales du système nerveux central. Mais ces techniques peuvent également être employées pour rechercher la présence d'ADN spécifique bactérien en cas de méningite décapitée ou d'examen direct négatif.

3.1. PCR et méningites bactériennes

Deux stratégies peuvent être utilisées pour identifier l'agent pathogène : PCR spécifique ou PCR à large spectre. Il est possible de réaliser une PCR spécifique ciblée compte tenu nombre limité de germes à l'origine des méningites communautaires de l'enfant : essentiellement méningocoque et pneumocoque chez l'enfant depuis la généralisation de la vaccination anti-hémophilus, streptocoque B et *E coli* K1 chez les nouveau-nés. La PCR en temps réel est un artifice de la technique faisant appel à des sondes fluorescentes permettant l'amplification et la détection du fragment d'acide nucléique-cible en une seule étape, réalisant ainsi un gain de temps notable et limitant les risques de contamination entre les différents prélèvements. La sensibilité et la spécificité des PCR spécifiques varient selon les études, en fonction des protocoles de PCR utilisés. Globalement, la sensibilité est bonne aux alentours de 90 % avec une excellente spécificité de 98 à 100 % (3-5). Le DNA peut être détecté jusqu'à 72 h après l'administration d'antibiotique, mais la sensibilité de l'examen est d'autant plus grande qu'il est réalisé précocement.

L'autre option est d'effectuer une PCR à large spectre c'est-à-dire d'amplifier des gènes universels présents chez toutes les espèces bactériennes. C'est le cas de l'amplification des gènes codant pour l'ARN ribosomal 16S et 23S. Des amorces correspondant à des régions conservées (universelles) dans le gène de l'ARNr 16S, sont désignées et permettent la détection de l'ADN bactérien dans le prélèvement biologique. Ensuite, l'espèce bactérienne est identifiées soit en utilisant des amorces spécifiques qui vont s'hybrider avec des régions variables entre les différentes espèces mais conservées au sein d'une même espèce, soit

en séquençant les amplicons obtenus lors de PCR. La limite de détection des bactéries dans le LCR par cette technique est de l'ordre de 100 UFC/ml. Développée depuis la fin des années 1980, cette technique a été utilisée au cours de nombreuses études. Ses principaux inconvénients sont d'une part un risque accru de contamination par rapport à une PCR spécifique, d'autre part, l'absence à l'heure actuelle de protocole d'extraction de l'ADN qui ait une efficacité équivalente chez les bactéries Gram positif et Gram négatif. La sensibilité et la spécificité de cette technique ont également été évaluées (avec des protocoles non uniformisés) en comparaison avec la culture. La sensibilité varie de 86 à 100 % avec une spécificité de l'ordre de 98 %. La valeur prédictive positive s'étend de 80 à 95 % selon les séries et surtout la valeur prédictive négative est élevée, de 98 à 100 % (6-8).

Quelle que soit la technique employée, PCR spécifique ou à large spectre, les faux positifs retrouvés correspondent à des contaminations, d'où l'importance de l'interprétation des résultats définitifs entre le clinicien et le microbiologiste. Les quelques faux négatifs rapportés dans la littérature pourraient être dus aux limites de détection de la technique. Ce problème se pose quand les germes sont en très faible concentration dans le LCR, ce qui est le cas notamment avec *listeria monocytogenes*. Les faux négatifs peuvent également être secondaires à une quantité insuffisante de LCR. Les recommandations sont de 1 ml d'échantillon pour la PCR mais souvent des quantités inférieures sont utilisées. Si ces faibles quantités sont suffisantes pour mettre en évidence un méningocoque, elles ne permettent pas de détecter les bactéries en plus faible concentration. La sensibilité du test peut être augmentée en utilisant une PCR nichée (nested-PCR). Cette technique consiste à réaliser deux PCR successives, l'amplicon obtenu après la première PCR étant amplifié à l'aide d'un second couple d'amorces.

En cas de suspicion de méningite bactérienne, la PCR trouve donc son intérêt dans les limites de la technique de référence qu'est la culture. Ces limites sont chez l'enfant, essentiellement, un traitement antibiotique préalable, plus rarement des micro-organismes à croissance lente et de culture difficile.

3.2. PCR et méningite ou méningo-encéphalite virale

C'est surtout dans le diagnostic des méningo-encéphalites virales que les techniques de biologie moléculaire ont pris toute leur place. Chez l'enfant, les entérovirus sont la première cause de méningites notamment lors d'épidémies printanières. Les critères de l'examen clinique et les résultats du LCR ne sont pas toujours suffisants pour distinguer une méningite à entérovirus d'une méningite bactérienne ou d'une autre infection du système nerveux central. En effet, à la phase initiale, l'examen cytologique du LCR montre dans plus de la moitié des cas une prédominance de polynucléaires neutrophiles orientant faussement vers une étiologie bactérienne. Avant l'avènement des outils moléculaires, le diagnostic de méningite à entérovirus reposait sur la stérilité du LCR mise en évidence après 48 h de culture et sur l'isolement viral sur culture cellulaire, technique longue et peu sensible (ne dépassant 20 % de positivité selon les études).

Actuellement la technique de RT-PCR est devenu l'examen de référence pour le diagnostic de méningite à entérovirus. Sa limite de détection basse, de l'ordre de 0,01 particule virale par millilitre en fait une méthode particulièrement sensible (9). De plus, les progrès de l'automatisation de la phase d'extraction de ces tests permet d'obtenir des résultats dans les trois heures avec un véritable impact sur le nombre d'hospitalisations et sur les prescriptions d'antibiotiques. Plusieurs études ont confirmé que le diagnostic de certitude précoce de cette infection virale fréquente et bénigne entraîne une diminution des traitements antibiotiques et de la durée d'hospitalisation, avec un impact économique prouvé (10, 11).

Dans la prise en charge initiale, la question de traiter ou pas concerne aussi l'hypothèse d'une méningo-encéphalite herpétique, infection plus rare mais représentant une urgence thérapeutique. Si, chez le grand enfant, le tableau clinique se superpose rarement à celui d'une méningite à entérovirus, en période néonatale les deux infections peuvent se confondre, justifiant jusqu'à l'âge de 2 mois, la réalisation concomitante d'une PCR herpès et entérovirus en présence d'une pléiocytose sans germe à la coloration de Gram. Les recommandations de bonne pratique du diagnostic des encéphalites préconisent en raison de l'urgence thérapeutique de pratiquer en premier lieu une PCR HSV, VZV et *Mycoplasma pneumoniae*, la recherche d'entérovirus n'étant faite que dans un second temps (12). Cependant, comme dans le cas des méningites bactériennes, on peut penser que l'utilisation d'une PCR entérovirus en temps réel va permettre d'arrêter précocement le traitement antiviral, aucun cas d'infection concomitante HSV et entérovirus n'ayant été rapporté.

4. Propositions pour l'utilisation des outils moléculaires au cours des méningites de l'enfant

Le recours aux techniques de PCR lors d'une méningite de l'enfant répond à deux objectifs : ne pas omettre une urgence thérapeutique (méningite bactérienne ou méningo-encéphalite herpétique) et limiter les hospitalisations et prescriptions antibiotiques inutiles. La stratégie des tests moléculaires repose sur les ressources locales, tant matérielles qu'humaines, la plupart de ces techniques étant consommatrices de temps.

La première situation est celle d'un enfant présentant une méningite sans signe d'orientation clinique mais avec une pléiocytose à prédominance de polynucléaires à l'examen cytologique du LCR avec un examen direct négatif. Si le laboratoire dispose d'une technique de PCR en temps réel à entérovirus, celle-ci sera effectuée. En cas de négativité (résultats obtenus en 3 h), alors des PCR spécifiques au méningocoque, pneumocoque, et streptocoque du groupe B en période néonatale, seront faites.

En cas de forte suspicion clinique de méningite bactérienne avec un traitement antibiotique préalable et un examen microscopique direct négatif, une PCR méningocoque et pneumocoque seront effectuées d'emblée.

Dans tous les cas, si ces examens de même que la culture sont négatifs, alors une PCR 16S suivi d'un séquençage sera effectuée afin de rechercher un germe rare.

En cas de tableau de méningo-encéphalite ou de méningite lymphocytaire, la réalisation d'une PCR rapide entérovirus effectuée de façon concomitante ou avant la PCR HSV, peut permettre d'arrêter précocement un traitement par acyclovir.

En conclusion, les techniques diagnostiques moléculaires développées en microbiologie répondent à plusieurs situations d'urgence dans le cas des méningo-encéphalites de l'enfant.

D'une part, l'obtention rapide de résultats, permet d'instituer précocement un traitement adapté et de protéger l'entourage, c'est le cas des PCR spécifiques méningocoque et pneumocoque. À l'inverse, la PCR en temps réel à entérovirus entraîne une limitation des examens, des hospitalisations et des prescriptions d'antibiotiques, d'où un impact économique. D'autre part, ces techniques ont tout leur intérêt dans les situations où les limites de la culture sont connues, notamment en cas de prise préalable d'antibiotiques. Enfin, avec la PCR 16S, ces tests permettent un screening systématique des cultures négatives. Toutefois ces tests ne sont interprétés qu'en collaboration entre le clinicien et le microbiologiste et surtout, ils ne remplacent pas les méthodes conventionnelles de culture qui seules permettent l'établissement d'un antibiogramme, et au niveau de la collectivité la surveillance des résistance et des différentes souches circulantes ou émergentes.

Références bibliographiques

1. Camargos P, Almeida M, Cardoso I, et al. Latex particule agglutination test in the diagnosis of Haemophilus influenzae type b, Streptococcus pneumoniae and Neisseria meningitidis A and C meningitis in infants and children. J Clin Epidemiol.1995 ; 48 :1245-50.
2. Dussaix E, Lebon P, Ponsot G, et al. Intrathecal synthesis of different alpha-interferons in patients with various neurological diseases. Acta Neurol Scand 1985 ; 71 : 504-9.
3. Corless CE, Guivier M, Borrow R, et al. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. J Clin Microbiol 2001 ; 39 : 1553-8.
4. Van Gastel E, Bruynseels P, Vrestrepen W, et al. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of pneumococcal and meningococcal meningitis in a tertiary care hospital. Eur J Clin Microbiol Infect dis 2007 ; 26 : 651-3.
5. Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V, et al. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). FEMS Immunol Med Microbiol 2003 ; 39 : 31-6.

6. Zucol F, Ammann R, Berger C, et al. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 2750-9.
7. Saravolatz L, Manzor O, VanderVelde N, et al. Broad-range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. *CID* 2003 ; 36 : 40-5.
8. Schuurman T, de Boer RF, Kooistra-Schmid A, et al. Prospective study of use of PCR amplification and sequencing of 16S ribosomal DNA from cerebrospinal fluid for diagnosis of bacterial meningitis in a clinical setting. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 734-40.
9. Petitjean J, Vabret A, Dina J. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay on the LightCycler for the rapide detection of enterovirus in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol* 2006 ; 35 : 278-84.
10. Ramers C, Billman G, Hartin M, et al. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *JAMA*. 2000 ; 283 : 2680-5.
11. Nigrovic LE, Chiang V. Cost analysis of enteroviral polymerase chain reaction in infants with fever and cerebrospinal fluid pleocytosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000 ; 154 : 817-21.
12. SPILF. [http://www.infectiologie.com /site/medias/documents/2006-encephalites.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/documents/2006-encephalites.pdf)

