

**Journée de formation pour les résidents en Microbiologie
et Maladies Infectieuses
23 Septembre 2011**

Diagnostic virologique des infections cérébro- méningées

Dr Jalel Boukadida - Dr Naila Hannachi
Laboratoire de Microbiologie
CHU F.Hached Sousse

INTRODUCTION

- **Virus : principaux agents des infections du SNC**
- **Les infections virales du SNC:**
 - RARES** comparées à la fréquence des infections virales;
Toutefois **GRAVES**, du fait de la fragilité du SNC.
- **Plusieurs virus peuvent être responsables d'infections du système nerveux central (SNC).**
 - **Neurotropisme**
 - **Neurovirulence**

Herpesviridae

Virus Herpes Simplex (HSV)
Cytomégalovirus (CMV)
Virus de la varicelle et du Zona (VZV)
Virus Epstein – Barr (EBV)
HHV6

Entérovirus (EV)

poliovirus
Echovirus
Coxsachievirus

Arbovirus

West Nile Virus,
Toscana virus
Chikungunya
encéphalite à tiques.....

Virus des oreillons

Virus de la rougeole

Virus de la rubéole

Virus de la rage

Rétrovirus

VIH
HTLV

Virus respiratoires : Virus de la grippe
Adénovirus.....

Virus de la chorioméningite lymphocytaire

Autres

Parvovirus B19
JC virus.....

INTRODUCTION

Gravité : dépend:

- Intéraction virus-cellule
- Titre infectieux
- Variants génomiques
- Facteurs liés à l'hôte: immunodépression...

Fréquence et gravité des encéphalites virales

<i>Agent viral</i>	<i>Sévérité</i>
Rage	Mortalité > 99%
HSV	Mortalité > 70% sans ttt
Arbovirus	Mortalité : 1 - 50%
JE	
Oreillons,	Peu sévère / fréquente
EBV, CMV, Varicelle	Peu sévère / rare
Adénovirus	Très rares, sévères si immunodépression
Grippe	Rare / sévère

Johnson, Clin Inf Dis, 1996, 23:219-24

INTRODUCTION

- **Portes d'entrée** dans l'organisme et **mode de propagation** au SNC sont très variables :
- ❖ Dans la plupart des cas l'atteinte du SNC survient au cours d'une infection systémique, la pénétration dans le SNC : **par voie sanguine.**
- ❖ Parfois l'atteinte neurologique se **fait par voie neuronale** (voie olfactive incluse)

Porte d'entrée	Virus
Inoculation arthropode morsure animale transfusion sanguine transplantation	arbovirus rage CMV, HIV rage, CMV
Respiratoire particules en aérosol et / ou salive	rougeole oreillons influenza parainfluenza adénovirus VZV HSV CMV EBV
Digestive	Entérovirus Adénovirus
Génitale	HSV CMV HIV

Mode d'accès au système nerveux central	Virus
Hématogène	HSV (nouveau-né) CMV EBV entérovirus HIV rougeole oreillons arbovirus
Voie neuronale	HSV rage VZV
Voie olfactive	HSV (?) rage (rare) arbovirus (rare)

INTRODUCTION

Pathogénèse de l'atteinte du SNC :

- **Action directe:** Réplication virale → lésion
→ atteinte primitive
→ HSV, entérovirus (poliovirus), arbovirus
→ immunodéprimé
- **Induction de phénomènes immunitaires, inflammatoires**
→ atteinte post-infectieuse, péri-veineuse
→ Plusieurs virus (virus des éruptions, respiratoires....)

INTRODUCTION

Tableaux cliniques variables :

- **Méningites**

→ Entérovirus++++, oreillons, CMLV, VIH, Arbovirus, HSV2....

- **Encéphalites**

- **Primitive**

→ HSV+++ , HHV6, rage, arbovirus (west-nile), EV (nouveau-né)...

- **Post-infectieuse**

→ Rubéole, rougeole, oreillons, grippe, VZV, EBV...

- **Encéphalopathies subaigües ou chroniques**

→ rougeole (PESS), JC virus (LEMP)...

- **Myélites**

→ poliovirus+++ , VZV, EBV, CMV, HSV2

→ post-infectieuses (rougeole, grippe, post-vaccinales....)

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Souvent → **Urgence thérapeutique**
Méningo-encéphalite ++++

→ Traitement à démarrer avant le diagnostic virologique

→ Ajuster le traitement selon le résultat virologique

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

INDICATIONS

- **Tableau clinique**
 - **Contexte épidémique**
 - **LCR : infection virale :**
 - **Aspect: liquide clair**
 - **> 10 cellules/mm³ avec + de 50% de lymphocytes**
- NB: Formule panachée / prédominance polynucléaire possible
très rarement : normale
- **Hyper-protéinorachie modérée < 1 g/l**
 - **Glycorachie = Normale**

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

PRELEVEMENT

- **LCR +++** → Diagnostic de certitude

Atteinte primitive+++ : virus, interféron alpha

Atteinte post-infectieuse : anticorps

> 0,5 ml (plus si adulte): tube stérile

- **Sang** → Diagnostic d'orientation

Atteinte primitive : +

Atteinte post-infectieuse :+++

3-5 ml de Sang:Tube sec

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

PRELEVEMENT

- **Autres prélèvements : Urines, salive, selles, biopsie**
 - **Diagnostic d'orientation le plus souvent**
 - **Parfois diagnostic de certitude : virus de la rage**

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

TRANSPORT-CONSERVATION

Différent des prélèvements bactériologiques+++

LCR : à **+4°C** : Acheminement **dans de la glace**
Rapide (30 min)

Sinon conservation

- Pour PCR : congélation à **- 20°C** pour les virus à ADN
à **- 80°C** pour les virus à ARN
(laboratoire de microbiologie)
- Pour culture : congélation (**-20/-80°C**) / Azote liquide

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

TRANSPORT-CONSERVATION

- **Transport / conservation inadéquats**
 - **Diminution de la sensibilité**
 - **Dégradation de l'acide nucléique : PCR négative**
 - **Mort du virus : Culture négative**
(virus enveloppés : fragiles)

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Techniques du diagnostic virologique

1- Diagnostic direct

- **Virus** : Culture cellulaire : Isolement viral
Microscopie électronique : abandonnée
- **Constituant virus** :
 - Génome : Biologie moléculaire+++
 - Antigène viral : peu sensible (<50%): non réalisé

2- Diagnostic indirect

Recherche des anticorps : Sérum – LCR
Dosage de l'interféron alpha

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

Techniques du diagnostic virologique

1- Diagnostic direct

- **Virus : Culture cellulaire : Isolement viral**
Microscopie électronique : abandonnée
- **Constituant virus :**
 - **Génome : Biologie moléculaire+++**
 - Antigène viral : peu sensible (<50%): non réalisé

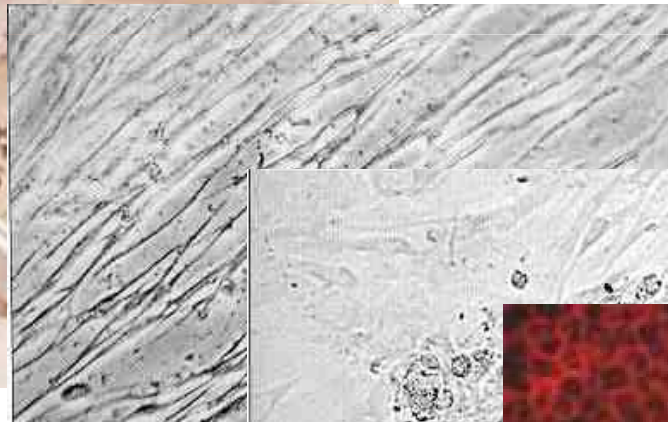
2- Diagnostic indirect

Recherche des anticorps : Sérum – LCR
Dosage de l'interféron alpha

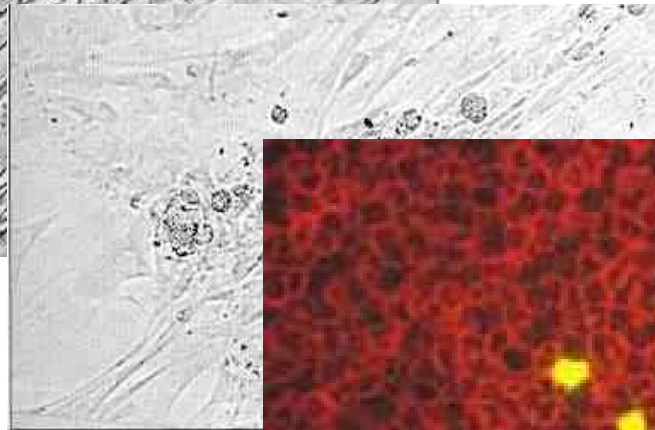
DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

1- Diagnostic direct

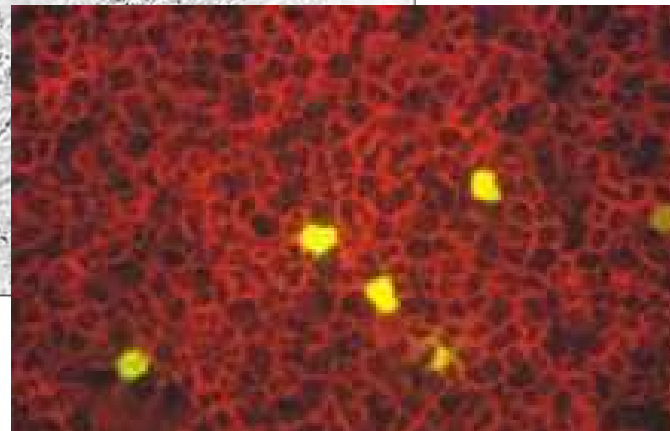
- Virus : Culture cellulaire : Isolement viral
LCR et autres prélèvements



Cellules saines



Effet cytopathogène : ECP



Identification
immunologique
IF/IP/SN....

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

1- Diagnostic direct

■ Virus : Culture cellulaire : Isolement viral

→ Intérêts: avoir la souche virale : Rougeole, entérovirus...

But épidémiologique++++

→ Inconvénients:

Technique lourde, onéreuse, organisation du laboratoire

Virus vivant : conditions strictes de transport / conservation

Délais de positivité de la culture long

Sensibilité limitée

→ De moins en moins utilisée (sauf indication précise)

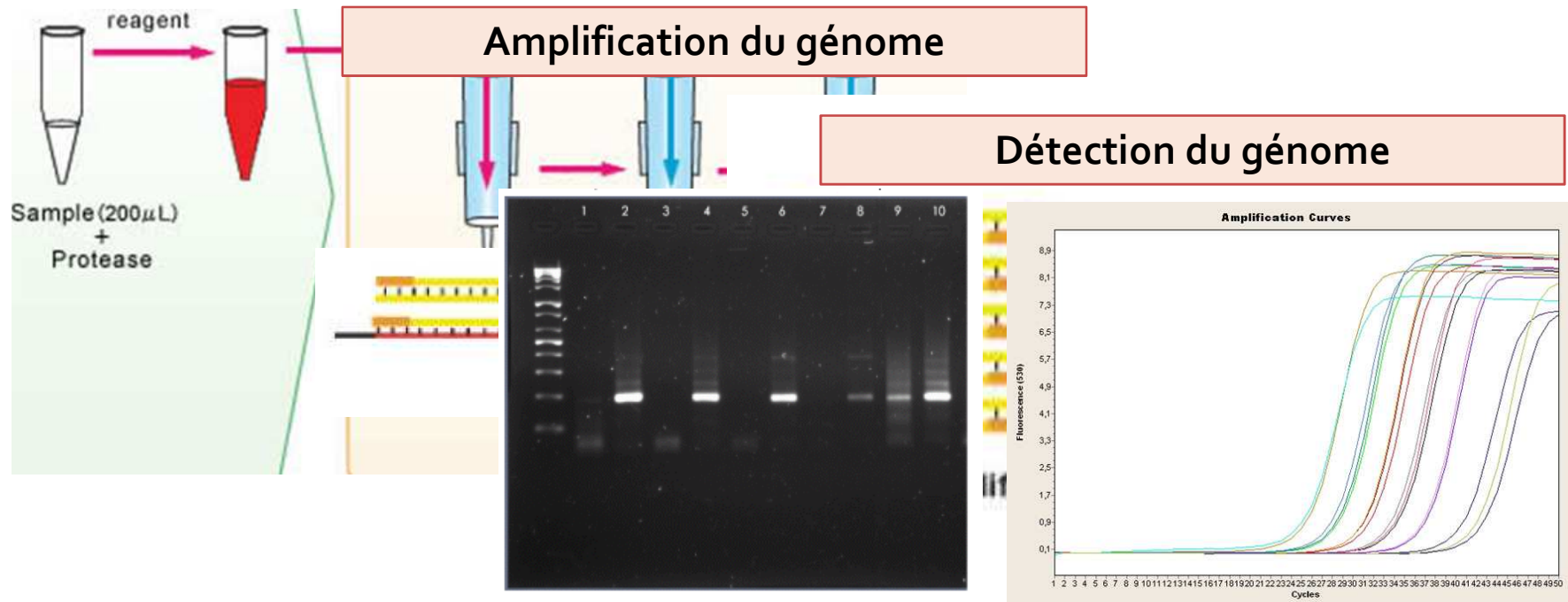
DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

1- Diagnostic direct : Biologie moléculaire : PCR +++

Technique de référence pour les infections du SNC (HSV-EV)

→ LCR, autres prélèvements

Extraction de l'acide nucléique



DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

1- Diagnostic direct : Biologie moléculaire +++

- Intérêt :
- Sensibilité – Spécificité : PCR en temps réel+++
 - Rapidité
 - recherche de plusieurs virus en une PCR:
 - Multiplexe - consensus herpes- consensus entérovirus
 - Quantification : Sévérité- Suivi du traitement
 - résultat positif malgré traitement (1 à 2 semaines: HSV)
 - Caractérisation virale : but épidémiologique

→ Inconvénient :

- Inhibiteurs de la PCR (hématies), Rnases (rares dans le LCR)
- Conditions strictes de transport et de conservation
- prélèvement trop précoce : résultat négatif (72h : HSV)

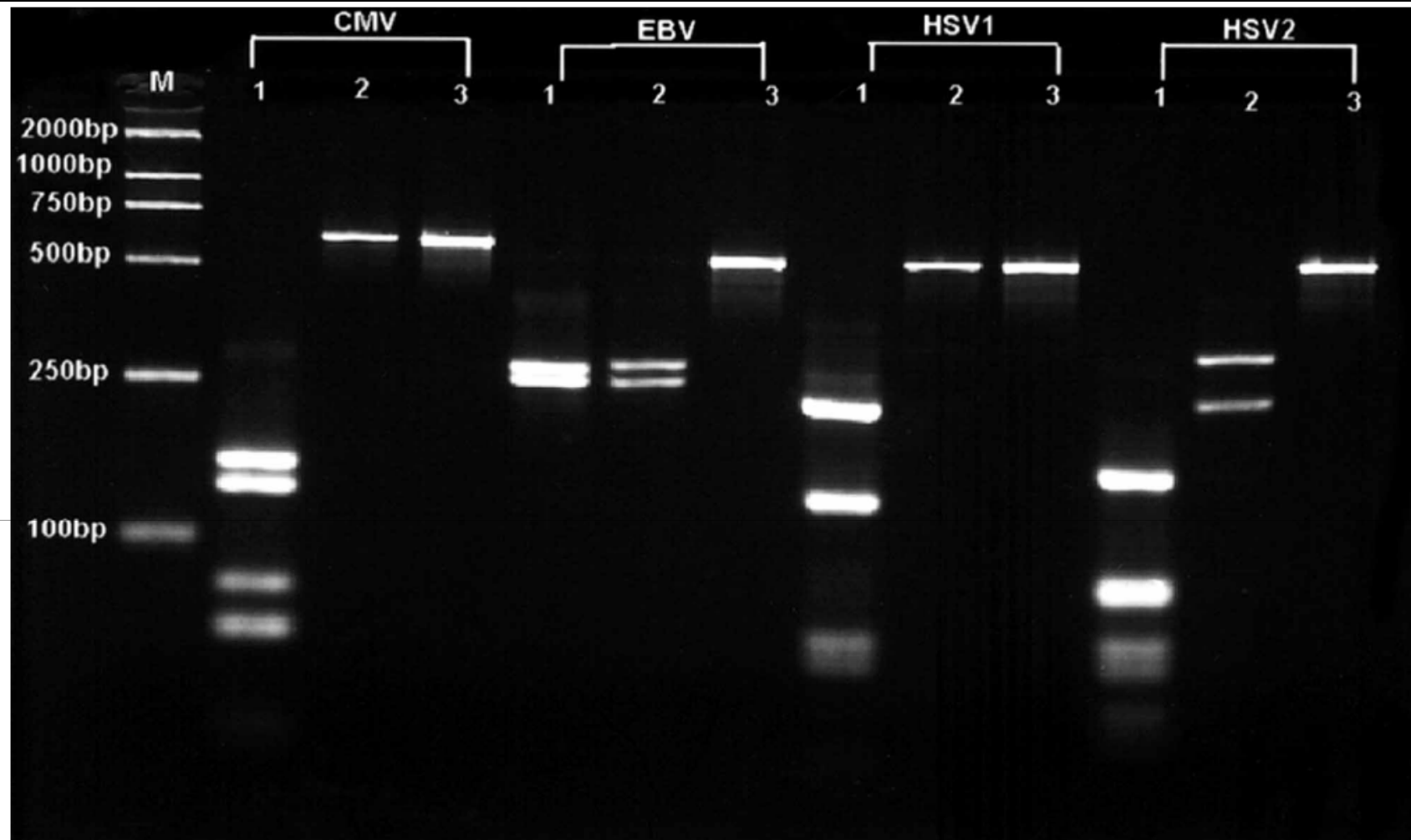
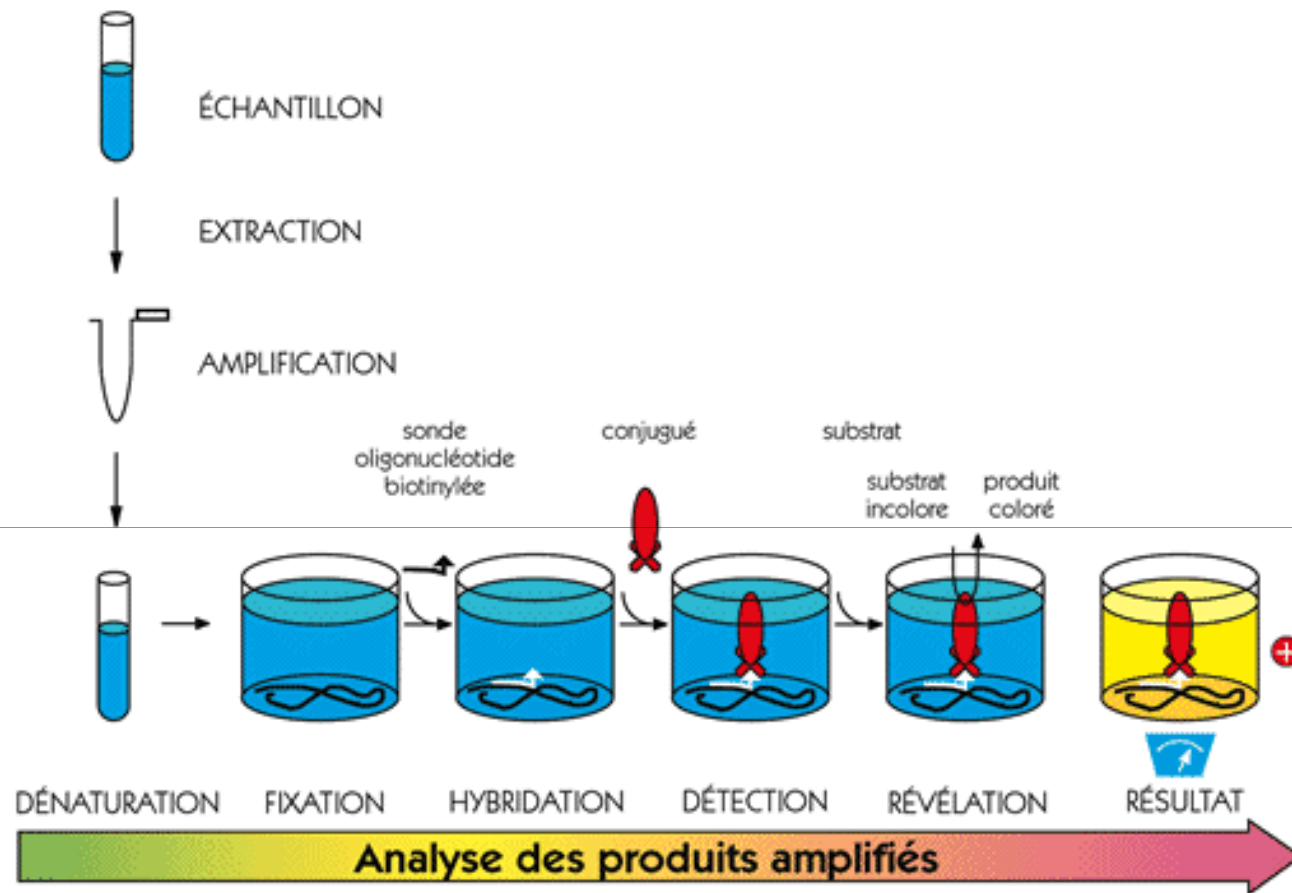


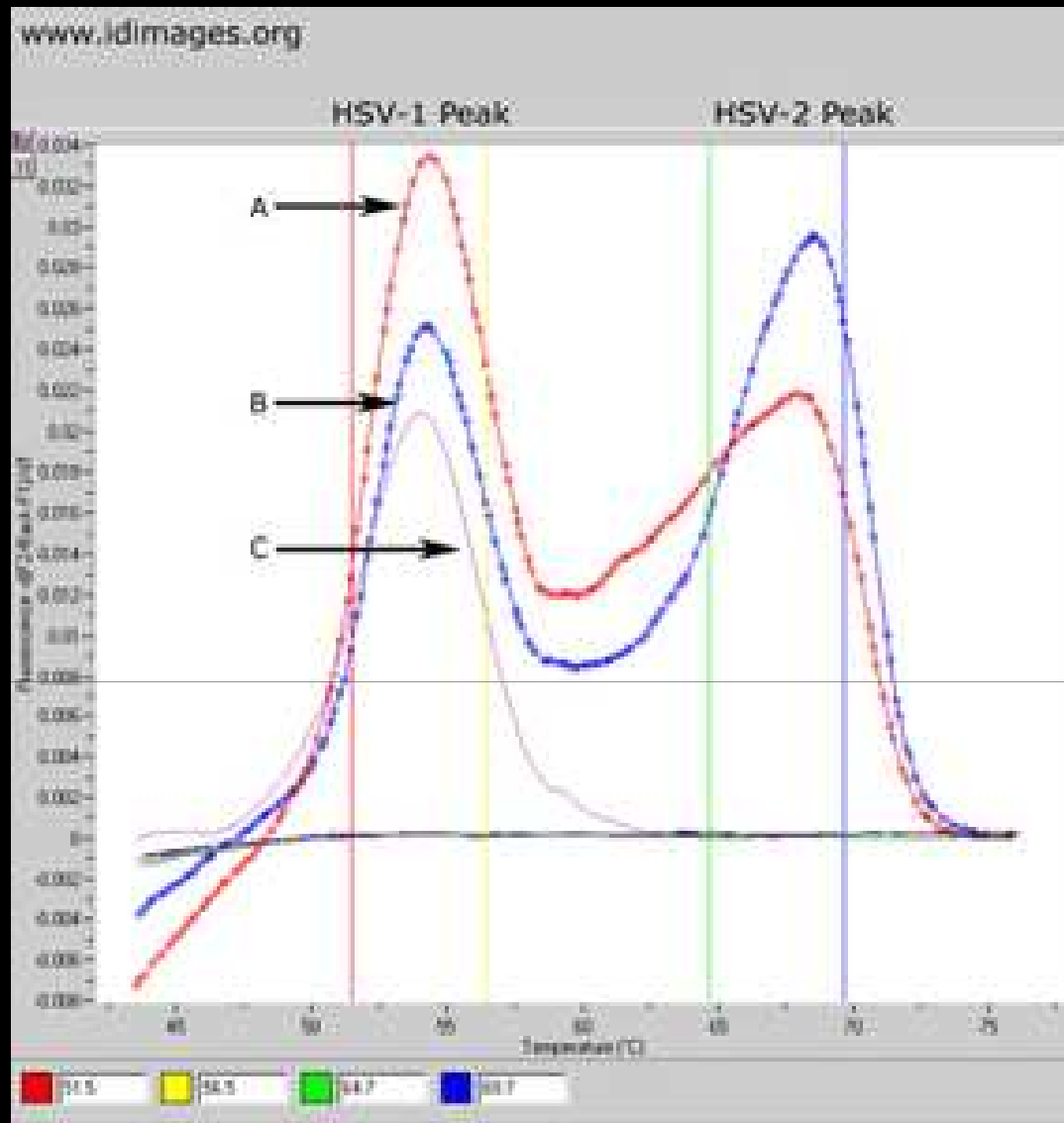
Figure 1. Detection of CMV, EBV, HSV-1 and HSV-2 by restriction enzyme digestion. Lane M: molecular weight standards (2000 bases plus DNA Ladder); lane 1: fragments after digestion with *Bst*UI; lane 2: fragments after digestion with *Bam*HI; lane 3: amplified fragments without restriction enzyme analysis.

G. Dong et al. Determination of the six major human herpesviruses in cerebrospinal fluid and blood specimens of children *Acta Pædiatrica*, 2005; 94: 38-43



Kits commerciaux de détection

HERPES CONSENSUS GENERIQUE trousse complète



PCR en temps réel : courbes de fusion
A-B : témoins positifs pour HSV₁ et HSV₂
C : infection par HSV₁

Table 2: Clinical use of CSF PCR in the diagnosis of herpesvirus-related neurological disease¹

Virus	Clinical diagnosis	Sensitivity and specificity
HSV-1 and 2	Encephalitis, meningitis, recurrent aseptic (Mollaret's) meningitis, neonatal meningoencephalitis and disseminated disease	>95% sensitivity and specificity; quantitative PCR available; potential use in determining course of IV therapy (especially in neonatal disease)
VZV	Zoster sine herpete, aseptic meningitis, encephalitis, transverse myelitis, CNS vasculitis, cerebellitis	Sensitivity and specificity >95%
CMV	Encephalitis, polymyeloradiculitis, ventriculitis, myelitis, inflammatory polyneuropathy (predominantly in AIDS/HIV), congenital CMV	Sensitivity nearly 100% in immunosuppressed patients with neurological symptoms; can be quantitated (range:10–10 ⁴ copies/ml); possible use to monitor therapy. Positive results in 60% of affected infants; correlates with poor neurological outcome
HHV-6	Meningoencephalitis, recurrent febrile seizures of childhood, possible association with multiple sclerosis	Excellent sensitivity, but poor positive predictive value in clinical disease (30–40% of asymptomatic controls positive)
EBV	Meningoencephalitis, acute cerebellar ataxia, aseptic meningitis, transverse myelitis, autonomic neuropathy, primary CNS lymphoma in AIDS	98.5% sensitive and 100% specific as a tumour marker

CSF, cerebrospinal fluid; HSV, herpes simplex virus; PCR, polymerase chain reaction; VZV, varicella zoster virus; CNS, central nervous system; CMV, cytomegalovirus; HHV-6, human herpesvirus type 6; EBV, Epstein–Barr virus. Reprinted with permission from *Arch Neurol* 1999;56:1215–1219. © 1999 American Medical Association. All rights reserved.

Table 2. Methods used to identify and classify enterovirus CNS infections.

Technique	Method of identification	Host isolate	Tools	Specificity
Tissue culture (Leland, 2008)	Presence of cellular cytopathic effect	Cerebral spinal fluid	Selective cell lines	Genus
Reverse-transcription polymerase chain reaction + genomic sequence (Romero, 1999)	Genomic amplification	Cerebral spinal fluid	Enterovirus specific primers — majority amplify 5'UTR (Rotbart, 1990)	Serotype — nucleotide mutations (Mirand, 2008)
Quantitative real time PCR (Dierssen, 2008)	Genomic amplification	Cerebral spinal fluid	Enterovirus specific primers — majority amplify 5'UTR	Genus
Immunohistochemistry	Visualization using virally specific antibodies	Central nervous system tissue	Visualization/microscopy	Cellular localization
<i>In situ</i> hybridization	Visualization using virally specific probes	Central nervous system tissue	Visualization/microscopy	Cellular localization

Rhodes et al; Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*.2011.15;411(2):288-305.

Organism	Sensitivity	Specificity	Comments
Viruses			
Adenovirus	Unknown	Unknown	
Arboviruses WNV	Unknown (not standardized) 60%	Unknown	CSF serology is more sensitive
BK virus	Unknown	Unknown	
Enterovirus	>95%	>95%	
Herpesviruses			
CMV	82–100% in immunocompromised patients, ≥60% in congenital CMV infection	86–100%	Quantitation available to monitor response to therapy and predict disease severity
EBV	98.5% as tumor marker in HIV patients with CNS lymphoma	100%	Predictive value in normal hosts is unclear; quantitation available for monitoring response to therapy and possibly assessing risk of CNS disease in HIV patients
HHV-6	>95%		Poor positive predictive value for disease (30% positivity in normal hosts)
HSV-1 and -2	>95%	>95%	Quantitation available (see text for multiple uses)
VZV	80–95% in immunocompromised patients	>95%	
HIV	HIV RNA is present at all stages	>95%	Quantitation available, correlates with likelihood of neurologic disease, and is useful for monitoring response to antiretroviral therapy
HTLV-1 and -2	90% for HAM/TSP	90%	Quantitation available and may predict risk of neurologic disease
JC virus	50–75% for PML	98–100%	Quantitation available for assessing response to therapy and correlates with prognosis
Measles virus	Unknown	Unknown	Quantitation available to monitor load in SSPE patients in response to therapy
Rabies virus	100%	100%	

Debiasi and Tyler. Summary of PCR testing for viral encephalitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004; 17 [4]: 903–25

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

- 2- Diagnostic indirect

- Recherche des anticorps : Sérum – LCR

- Sérum:

- Intérêt à un stade tardif(> 2 semaines)

- IgM (+) – séroconversion des IgG

- Arbovirus, rougeole, rubéole, oreillons, CMLV, parvovirus B19 ++

- Herpesviridae: +/-

- Entérovirus : +/-

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

2- Diagnostic indirect

■ Recherche des anticorps : Sérum – LCR

- LCR : couplé au Sérum: Synthèse intra-thécale des anticorps
- ELISA : Rapport d'IgG sérum / LCR < à 50
- limites : - Synthèse tardive des Ac (atteintes primitives)
 - Contamination par les anticorps sanguins
- Conditions: - BHE intacte
 - LCR non hémorragique
 - Protéïnorachie : normale

(autres virus témoins, taux albumine...)

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

2- Diagnostic indirect

- Dosage de l'interféron alpha
- Positif > 2 UI/ ml
 - méningites et des encéphalites virales primitives
- absente : Atteintes post-infectieuses.
- Limites : pas d'indication sur le virus en cause
Synthèse est précoce, de brève durée
Technique : culture cellulaire

	Encéphalites primitives	Encéphalites post-infectieuses
Diagnostic direct		
<i>Culture virale</i>		
LCR	rarement positive	négative
Biopsie cérébrale	positive	négative
<i>Antigènes viraux</i>		
LCR	présents (détectables 50% des cas)	non détectables
Biopsie cérébrale	présents	non détectables
Génome viral		
LCR	présent	absent
Biopsie cérébrale	présent	?
Diagnostic indirect		
<i>Interféron alpha</i>		
sérum	< LCR	< 2 u.i./ml ou > LCR
LCR	> 2u.i. / ml synthèse locale	< 2 u.i. / ml
<i>AC spécifiques</i>		
sérum J0 IgM	inconstants	présents
IgG	titre nul ou faible	titre élevé
LCR J0 IgG	titre nul	titre élevé (60% cas)
sérum J15 IgM	inconstants	présents
IgG	titre en augmentation	titre élevé
LCR J15 IgG	synthèse locale	absents ou diminution

Virus	Effectiveness ^b of diagnosis by:								Other specimens
	PCR		Serology ^c		Culture of specimens				
	Serum	CSF	Serum	CSF	Throat	Rectal	Blood	CSF	
Adenovirus	-	+	+/-	+/-	++	+	-	+	Conjunctival swab, stool elector microscopy
Arboviruses	+ ^d	+ ^d	++	++	-	-	++	+/-	Serology preferable
WNV	+ ^d	+ ^d	++	++	-	-	-	-	
Enteroviruses									
Nonpoliovirus	+	++	+	-	+	++	+/-	++	Urine
Poliovirus	+	++	+ ^e	-	+	++	-	-	
Herpesviruses									
CMV	+	++	+	++	+	-	+	Rare	Urine
EBV	+	+	++	++	+/-	-	+/-	+/-	Skin vesicle, brain tissue ^f
HHV-6	+/-	+/-	+/-	-	-	-	+ ^d	+ ^d	
HSV-1, and HSV-2	-	++	+/-	+	-	-	-	-	
VZV	++	+	+ ^e	++	-	-	-	+	
HIV	++	+	+	-	-	-	+/-	-	
Influenza virus	-	-	+/-	-	++ ^f	-	-	-	
JCV	-	++	-	-	-	-	-	-	
Lymphocytic choriomen- ingitis virus	-	+	++	++	+/-	-	+	++	Urine
Mumps virus	-	-	+ ^e	+	++	-	+/-	++	Urine, saliva
Measles virus	-	+ ^d	+ ^e	+	+	-	+	-	Urine
Parainfluenza virus	-	-	+/-	-	++	-	-	-	
Parvovirus	++	-	+	-	-	-	-	-	
Rabies virus	-	+	++	++	-	-	-	+	Saliva, brain tissue, nuchal skin biopsy, corneal impressions ^f

Debiasi and Tyler. Summary of PCR testing for viral encephalitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004; 17 [4]: 903-25

DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE

- **Démarche diagnostique : Orientée**
 - fréquence des pathogènes attendus
 - gravité de certaines infections virales
 - signes cliniques
 - caractéristiques du patient: âge, immunodépression ...
 - caractères épidémiologiques : saison – épidémies - retour de voyage...

Méningite
EV puis HSV
oreillons

Sinon autres selon le contexte

méningo-encéphalite
HSV puis EV
Herpesviridae

Sinon autres selon le contexte

Myélite

EV - Herpesviridae
autres selon le contexte

Encéphalopathie chronique

Rougeole -Rubéole
Sinon autres selon le contexte

- piqûre arthropode / saison des pluies / retour de voyage : *arbovirus*
- morsure animal : *rage*
- immunodéprimé: *VIH, Adenovirus, herpesviridae, JC virus*
- atteinte respiratoire: *grippe – VRS – Para-influenza virus*
- Eruption : *rougeole –rubéole-varicelle-HHV6*
- comportement à risque sexuel: *VIH*
- Nouveau-né: *HSV-entérovirus*

CONCLUSION

- Infections virales du SNC : Graves
- Importance du diagnostic virologique
 - **Qualité du prélèvement- transport+++**
 - Diagnostic direct – interféron alpha
 - **Atteintes primitives** (herpesviridae – entérovirus)
 - Diagnostic indirect : sérologie-synthèse intrathécale
 - **Arbovirus, Atteintes post-infectieuses**
 - **Orienté** : Contexte clinique + épidémiologique

MERCI