

Épidémiologie et diagnostic des méningites à entérovirus

H. PEIGUE-LAFEUILLE^{1,2}, A. MIRAND^{1,2}

RÉSUMÉ

La méningite aseptique aiguë bénigne est l'expression la plus fréquente et la première cause d'hospitalisation due aux entérovirus (EV). En France, il y a environ 1 700 cas de méningite à EV par an. Les adultes représentent 30 % des patients atteints et la maladie survient une fois sur trois en hiver. Son diagnostic est prospectif, par la détection génomique des EV dans le liquide céphalorachidien lors de la ponction lombaire réalisée à l'admission du malade à l'hôpital. Les techniques de RT-PCR en temps réel permettent de confirmer (ou d'infirmer) rapidement l'étiologie de la méningite et leurs résultats aux contrôles de qualité des laboratoires français du réseau national de surveillance qui les pratiquent ont montré leur fiabilité. Elles permettent un diagnostic de certitude, d'autant que l'analyse cytologique du LCR n'est pas suffisamment discriminante (absence possible de pléiocytose ou bien polynucléose neutrophile initiale) pour évoquer le diagnostic d'une méningite à EV et conduit souvent à instaurer une antibiothérapie probabiliste inutile. Dans ce contexte et au regard de l'impact positif de la détection génomique des EV dans le LCR sur la prise en charge du patient, la Haute Autorité de Santé (HAS) a jugé favorablement l'inscription de cet examen à la nomenclature des actes de biologie médicale. Il doit être prescrit d'emblée lors de l'hospitalisation du malade, son résultat doit être disponible en moins de 48 heures et être pris en compte par le clinicien dans le même délai. Biologistes et cliniciens sont les deux pierres angulaires de la réussite de cette démarche.

MOTS-CLÉS : entérovirus, méningite, adultes, détection génomique, épidémiologie, émergence, nomenclature, contrôle de qualité, économies de santé.

I. - INTRODUCTION

Les entérovirus (EV) sont des agents pathogènes humains très communs. Petits virus nus résistants dans l'environnement et excrétés dans le tube digestif où leur présence peut être prolongée, ils contaminent les populations de façon directe ou indirecte. Les infections évoluent sur un mode épidémique et endémique, et plusieurs types co-circulent (1). Le genre *Enterovirus* (famille des *Picornaviridae* ; www.picornaviridae.com) rassemble les espèces *Enterovirus* et *Rhinovirus*. *Enterovirus A* à *D* (116 types) et *Rhinovirus A* à *C* (167 types) sont pathogènes pour l'Homme (Tableau I). Les rhinovirus ayant un tropisme pour l'appareil respiratoire ne seront pas abordés ici. Les EV, à l'instar des autres virus à ARN, présentent une grande variabilité génétique et l'émergence de variants ayant un pouvoir pathogène (ou épidémiogène) élevé est une préoccupation réelle (2). L'espèce type des EV, *Enterovirus C*, comprend les poliovirus 1, 2 et 3. Outre ces derniers, tous les EV ont un tropisme neuro-méningé plus ou moins marqué, mais il faut opposer la fréquence et la

bénignité de la méningite à la rareté des atteintes neuro-méningées graves. La méningite aseptique aiguë bénigne est l'expression la plus commune ; elle est, par ailleurs, la première cause d'hospitalisation due à ces virus. Son diagnostic est prospectif, par détection de l'ARN entéroviral dans le liquide céphalorachidien (LCR) lors de la ponction lombaire pratiquée à l'admission du malade à l'hôpital. Ce test moléculaire a permis d'affiner les données biologiques et épidémiologiques de la méningite à EV et de mieux définir les circonstances de sa prescription. Son inscription à la nomenclature des actes de biologie médicale, que l'on peut enfin espérer prochaine après l'avis favorable du collège de la Haute Autorité de Santé (HAS) émis le 23 juillet 2014, s'inscrit dans ce contexte.

¹ Laboratoire de virologie et laboratoire associé au Centre National de Référence des entérovirus et paréchovirus, Centre de Biologie du CHU de Clermont-Ferrand (63003).

² EA4843, Faculté de Médecine de l'Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand (63001).

Tableau I - Espèces et principaux types d'EV pathogènes pour l'Homme.

Les coxsackievirus A se retrouvent surtout parmi les espèces *Enterovirus A* et *C*, les coxsackievirus B font partie de l'espèce *Enterovirus B*, de même que les échovirus. L'espèce type *Enterovirus C* comprend les trois types de poliovirus. Les types EV-A71, EV-D68 et PV, notés en rouge, font l'objet d'une attention particulière.

Espèces	Types
<i>Enterovirus A</i> (EV-A)	25 types : coxsackievirus A2 (CVA2) à CVA8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16, entérovirus A71 (EV-A71) , EV-A76, EV-A89, EV-A90 à EV-A92, EV-A114, EV-A119, EV-A120, EV-A121
<i>Enterovirus B</i> (EV-B)	63 types : CV-B1 à CV-B6, CVA9, échovirus 1 (E-1) à E-7, E-9, E-11 à E-21, E-24 à E-27, E-29 à E-33, entérovirus B69 (EV-B69), EV-B73 à EV-B75, EV-B77 à EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107
<i>Enterovirus C</i> (EV-C)	23 types : poliovirus (PV)-1, PV-2, PV-3 , coxsackievirus A1 (CV-A1), CVA11, CVA13, CVA17, CVA19, CVA20, CVA21, CVA22, CVA24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 et EV-C118
<i>Enterovirus D</i> (EV-D)	5 types : EV-D68 , EV-D70, EV-D94, EV-D111
<i>Rhinovirus A</i> (RVA)	80 types : rhinovirus (RV) A1, A2, A7 à A13, A15, A16, A18 à A25, A28 à A34, A36, A38 à A41, A43, A45 à A47, A49 à A51, A53 à A68, A71, A73 à A78, A80 à A82, A85, A88 à A90, A94, A96, A100 à A109
<i>Rhinovirus B</i> (RV-B)	32 type : rhinovirus (RV) B3 à B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97, B99, B100 à B106.
<i>Rhinovirus C</i> (RV-C)	55 types : RV-C1 à RV-C55

II. - LES INFECTIONS NEURO-MÉNINGÉES À EV

Durant la vie, chaque individu présente plusieurs infections, asymptomatiques ou bénignes, par l'un des 116 types d'EV-A à D, d'autant qu'il n'y a pas d'immunité croisée entre eux (1). Leurs tableaux cliniques, pléiomorphes, sont à l'origine de nombreux motifs de consultations ambulatoires. Leur traitement est symptomatique. Cependant, la méningite aiguë aseptique, infection bénigne, conduit à l'hospitalisation. Les prodromes surviennent quelques jours avant, au moment de la phase de réplication lymphatique et se traduisent par de la fièvre, un rash, une diarrhée, une pharyngite et/ou une conjonctivite, des myalgies et des signes d'infection des voies respiratoires hautes chez l'enfant comme chez l'adulte. L'interrogatoire peut aussi retrouver ces signes dans l'entourage familial, à l'école ou dans la collectivité, ce qui apporte des éléments importants d'orientation diagnostique.

A) La méningite aseptique aiguë bénigne, l'expression commune de l'infection

Les EV non poliomyélitiques sont, de très loin, la principale cause des méningites aseptiques aiguës. Le tableau clinique est typique, avec une fièvre survenant brutalement et un syndrome méningé plus ou moins net selon l'âge. Malgré un tableau initial bruyant et anxiogène pour le patient et l'entourage, le traitement de l'infection est symptomatique et sa guérison est spontanée, en quelques jours. Avec le recul du diagnostic prospectif moléculaire débuté dans les années 1990 et l'analyse de centaines de publica-

tions, force est de reconnaître que les notions classiques – *les méningites à entérovirus sont des méningites lymphocytaires à liquide clair, survenant chez l'enfant pendant la période estivo-automnale* – sont devenues inexactes car elles ne correspondent qu'à une petite part émergée de cette pathologie. Les données ont montré le caractère peu discriminant de l'examen cytologique et biochimique du LCR. Fait remarquable, la pléiocytose est inconstante dans le LCR. Elle peut même faire défaut dans 30 % des cas alors que la détection génomique des EV est positive, que le virus est isolé (par culture) de la gorge (voire du LCR), et que les signes cliniques et épidémiologiques sont évocateurs. Parmi les facteurs les plus importants associés à l'absence de pléiocytose figurent l'âge des patients, les enfants de moins de 3 mois présentant une leucocytorrhachie très variée (allant de l'absence de leucocytes jusqu'à un nombre élevé de ces cellules orientant faussement le diagnostic vers une cause bactérienne) et le caractère précoce de la ponction lombaire, dès les premières heures de la maladie (3, 4). En cas de pléiocytose, 70 à 100 globules blancs μL^{-1} de LCR sont communément présents, mais des valeurs plus élevées (jusqu'à 4 000 leucocytes μL^{-1}) ont été parfois rapportées. La formule leucocytaire est souvent mixte ou avec une majorité de polynucléaires neutrophiles si la ponction lombaire est faite dès les premiers signes cliniques. La formule s'inverse les jours suivants et devient lymphocytaire, un trait autrefois observé lors de la classique « ponction lombaire de contrôle ». La glycorrhachie et la protéinorrhachie sont dans les limites de la normale selon l'âge, même si une élévation de la protéinorrhachie est fréquemment notée, surtout chez l'enfant (4, 5).

Ainsi, l'analyse cytologique et biochimique du LCR n'est pas assez discriminante pour évoquer le diagnostic d'une méningite à EV, conduisant souvent à instaurer inutilement une antibiothérapie probabiliste. En effet, selon les recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, si une méningite bactérienne est suspectée, « l'antibiothérapie doit être débutée au plus tard dans les 3 heures, idéalement dans l'heure qui suit l'arrivée en structure hospitalière », et l'analyse cyto-bactériologique et biochimique du LCR est l'urgence absolue, « dont les résultats doivent être communiqués à l'équipe en charge du patient dans l'heure qui suit la ponction lombaire » (6). Ceci plaide en faveur de la pratique très large de la détection du génome des EV le plus tôt possible après l'admission. Cette attitude a changé la prise en charge de ces patients, en diminuant les actes et traitements antibiotiques inutiles et en raccourcissant la durée d'hospitalisation (7). La détection génomique des EV est désormais recommandée par les conférences de consensus internationales et nationales, et la HAS l'a validée en 2014 (6, 8-10).

B) EV-A71 et EV-D68, des virus sous surveillance, responsables de rares formes graves

Si les formes graves sont rares, il faut cependant mentionner l'émergence de l'entérovirus 71 (EV-A71), qui a récemment été responsable d'épidémies en Chine et en Asie du Sud-Est de maladies pieds-mains-bouche (PMB) et/ou d'infections neuro-méningées sévères et qui fait l'objet d'une surveillance mondiale ; il occasionne actuellement une épidémie en Espagne (11). Il en est de même pour l'entérovirus 68 (EV-D68), à l'origine d'atteintes neuro-méningées associées aux infections respiratoires (12-13).

Paralysie flasque aiguë

Dans le contexte de l'éradication de la poliomyélite, toute paralysie flasque aiguë (PFA) sans trouble sensitif objectif associée à un syndrome méningé fébrile doit être notifiée immédiatement aux autorités sanitaires et entraîne une conduite médicale à tenir bien codifiée (14). Cependant, de très nombreux EV non poliomyélitiques ont été isolés des selles d'enfants atteints de PFA. Parmi eux, EV-A71 semble plus souvent associé à une encéphalite, mais un tableau de PFA est également constaté (15-16). À l'automne 2014, des infections respiratoires épidémiques en Europe et aux États-Unis, incriminant EV-D68 (17-19) ont été compliqués par une PFA, avec des lésions de la substance grise de la moelle épinière au niveau des cornes antérieures, et parfois du tronc cérébral. Seuls deux parmi 120 patients ont guéri sans séquelles dans l'étude américaine. Enfin, un tableau de PFA a été récemment rapporté chez un enfant lors d'une infection respiratoire à EV-C105, rappelant le potentiel neurotrope de tous les EV (20).

Encéphalite

Malgré leur rareté dans cette pathologie, les EV doivent être recherchés au cours de celle-ci en même temps que les virus herpès simplex 1 et 2 ou le virus varicelle zona (21). Survenant d'emblée ou compliquant une méningite,

son tableau clinique peut mimer celui d'une encéphalite herpétique (1) qui, rappelons-le, est une urgence thérapeutique (acyclovir) (22). En Extrême-Orient, les épidémies de maladie PMB associée à EV-A71 sont marquées par une incidence plus élevée de survenue d'une encéphalite chez les enfants de moins de 5 ans (15). Une étude prospective menée pendant sept ans en Malaisie a montré que 10 à 30 % des enfants atteints d'une maladie PMB avaient manifesté, après 2 à 5 jours d'évolution, une encéphalite (58 % des cas), une méningite (38 % des cas), et/ou une détresse cardio-respiratoire (4 % des cas) (16).

Infection neuro-méningée chez les patients immunodéprimés

Les patients immunodéprimés ou présentant un déficit de l'immunité humorale peuvent développer une méningo-encéphalite chronique (23-24). La vaccination de masse contre la poliomyélite par les virus vivants atténués est également à l'origine d'infections chroniques chez les personnes immunodéprimées et d'une excrétion intestinale prolongée de virus vaccinaux susceptibles de diffuser dans la population (25). Rappelons que, de façon générale, l'administration de vaccins vivants atténués doit être proscrite dans l'entourage de tout patient immunodéprimé.

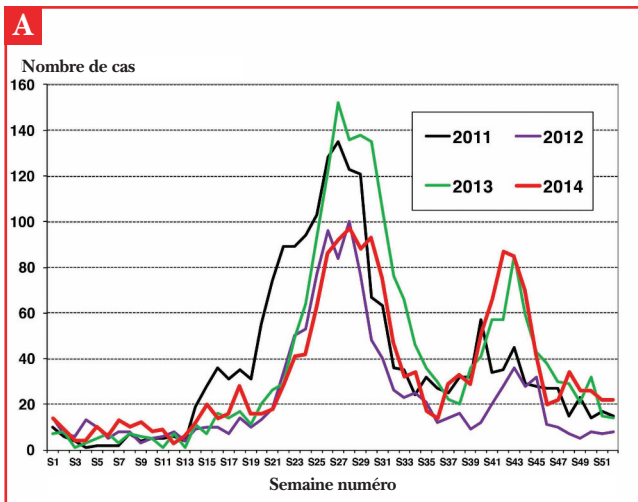
III. - ACTUALISATION DES DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES DES INFECTIONS NEURO-MÉNINGÉES À EV

A) Réseaux de surveillance des infections à EV

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) coordonne les réseaux de surveillance de la poliomyélite, des PFA et poliovirus sauvages et vaccinaux dans les eaux usées (14). Pour les EV non poliomyélitiques, les réseaux de surveillance, lorsqu'ils existent, varient d'un pays à l'autre. Aux États-Unis, la surveillance est passive et centrée sur les hospitalisations et les épidémies (26). En France, sous l'égide de Santé Publique France (auparavant Institut de Veille Sanitaire), le réseau de surveillance des EV avec les deux laboratoires coordonnateur et associé du Centre National de Référence (CNR) entérovirus/paréchovirus (Lyon et Clermont-Ferrand) s'appuie sur une trentaine de biologistes volontaires. Ils transmettent, sur un site web dédié et au fil de l'eau, les données clinico-biologiques des infections à EV diagnostiquées chez les patients hospitalisés. Le nombre de cas de méningite à EV par ville ainsi que le rapport annuel d'activité sont en accès libre sur le site du CNR (27).

B) Quelques chiffres

Aux USA, environ 7 000 cas de méningite aseptique sont rapportés annuellement par les *Centers for Disease Control and Prevention*, mais il est probable que leur nombre soit au moins dix fois supérieur, cette maladie bénigne étant sous-déclarée (1). L'incidence de la paralysie est, quant à elle, estimée à 1 pour 10 000. En comparaison, l'incidence annuelle des cas d'encéphalite herpétique est de l'ordre 1 pour 250 000 à 500 000 (22), soit 300 à 600 cas aux USA.



Année	Principaux entérovirus* identifiés
2005	E-30 (61 %)
2006	CV-B5 (21 %), E-13 (13 %), E-30 (11 %)
2007	E-11 (24 %), E-18 (12 %)
2008	E-30 (35 %), CVA9 (14 %)
2009	E-30 (60 %)
2010	E-6 (12 %), E-11 (10 %)
2011	E-6V (49 %)
2012	CV-B4 (15 %), E-11 (11 %), CV-B5 (11 %)
2013	E-30 (54 %)
2014	E-30 (14 %), E-16 (12 %), EV-D68 (11 %)
2015	CV-B5 (26 %), E-6 (24 %), E-9 (11 %)

* Les autres virus comptaient chaque année pour moins de 10 % du total des entérovirus identifiés.

Fig. 1 - Épidémiologie de la méningite à EV en France. A. Distribution hebdomadaire des cas de méningite à EV de 2011 à 2014. L'allure diphasique est particulièrement nette en 2014, avec un pic en semaine 28 (92 cas) et une recrudescence automnale durant les semaines 42 et 43 (87 et 85 cas, respectivement). **B. Répartition des principaux types d'EV selon les années.** Les années épidémiques sont notées en bleu. Chaque année, co-circulent plusieurs types différents, un type pouvant prendre le pas sur les autres, comme c'est le cas de l'échovirus type 30 (données du CNR). En 2011 a circulé un échovirus 6 variant (27).

En France, le réseau de surveillance des EV a rapporté annuellement (2012-2015) environ 1 700 cas de méningite, 1 à 2 cas d'encéphalite et 2 à 5 PFA (données en cours de publication). Les patients, ayant présenté une encéphalite, avaient souvent des co-morbidités (cancer, traitement immunosuppresseur, maladie métabolique) ou un âge particulier (nouveau-né). La moitié des paralysies étaient faciales et d'évolution favorable. Un seul cas de PFA grave, associée à EV-D68, est survenu chez un enfant de 4 ans et a nécessité un séjour prolongé en soins intensifs ; son évolution a été très lentement favorable (18, 27).

C) La méningite à EV survient une fois sur trois en hiver

Les cas de méningite surviennent, sur un fond endémique, classiquement sous forme d'épidémies estivo-automnales parfois importantes comme en 2000, 2005, 2011 et 2013, mais il convient de souligner que 30 % des cas sont observés en hiver (Figure 1A). Dans notre expérience, les épidémies des étés 2000 et 2005 avaient été précédées d'une circulation hivernale accrue des EV, objectivée par une augmentation du nombre de virus isolés de patients (tous produits biologiques confondus) et du nombre de cas de méningite d'étiologie indéterminée. Ces derniers avaient été considérés comme d'origine bactérienne (d'autant que la polynucléose neutrophile était fréquente) et traités comme tels, mais la recherche *a posteriori* du génome viral dans le LCR (non prescrite à l'admission) était positive (28-29). Le génotypage des EV permet de suivre les types responsables et de déceler l'émergence de certains ayant un pouvoir pathogène particulier comme EV-A71, EV-D68 et bien sûr les poliovirus (une situation devenue rarissime). Plusieurs types co-circulent pendant ces épidémies. Tous les EV peuvent occasionner une méningite, au premier chef ceux de l'espèce B, avec des types majoritaires différents chaque année (Figure 1B).

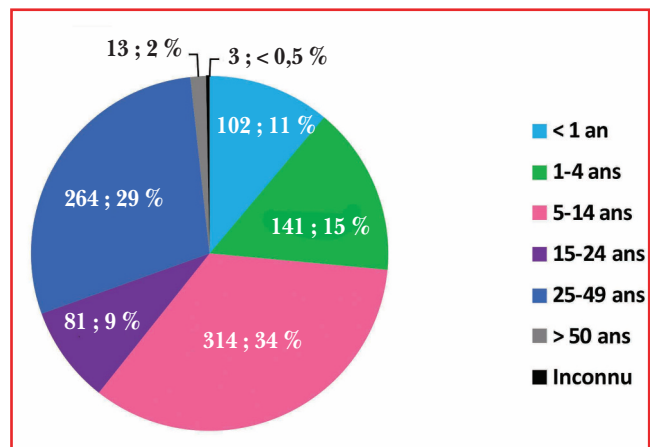


Fig. 2 - Répartition par classe d'âge des patients (n = 918) présentant des signes neurologiques et une détection positive de génome d'EV dans le LCR, en 2014. Les tranches d'âge les plus touchées étaient les enfants de 5 à 14 ans et les adultes de 25 à 49 ans (données du CNR) (27).

D) Trente pour cent des patients présentant une méningite sont adultes

La méningite à EV a longtemps été considérée comme une infection infantile. Les pédiatres ont prescrit la « PCR EV » dès sa mise à disposition et les publications en ont plaidé très tôt les conséquences bénéfiques pour la prise en charge des enfants. Les urgentistes et infectiologues ont pris conscience plus tardivement de cette étiologie virale chez les adultes. Après les années 2000, la pratique de la détection génomique des EV dans le LCR chez ceux-ci a montré la fréquence de la méningite à EV jusqu'à un âge avancé (86 ans !) (30) et ainsi l'intérêt d'une prescription élargie de cette analyse (7, 31). Dans notre étude *princeps* relative au diagnostic prospectif de méningite à EV réalisée

chez 30 adultes, l'enfant de quatre d'entre eux était déjà hospitalisé pour le même motif ; des enfants présentaient des céphalées, de la fièvre et une otite dans l'entourage de six autres, soit un contexte épidémiologique évocateur dans 30 % des cas (31). En effet, la méningite chez les adultes est la conséquence d'une contamination par leurs enfants (32-34). Pour l'adulte, le risque de contracter la maladie est multiplié par quinze lorsqu'un enfant de la famille est malade. Il est corrélé à des activités comme le changement des couches (34) et au non-respect des règles d'hygiène standard. Selon les données du CNR, en 2014, les patients âgés de 25 à 49 ans représentaient 29 % des observations de méningite et ceux âgés de plus de 50 ans, 2 % des cas (Figure 2). Les conférences de consensus recommandent d'ailleurs la détection génomique des EV dans le LCR, sans spécifier d'âge particulier, ni de saison.

E) Le méningocoque, les EV et le virus de la rougeole ... et « la vraie vie » !

Les épidémies se jouent des dogmes et des diagnostics orientés. Entre mars 2001 et début 2002, 17 observations d'infections à méningocoque C dans le Puy-de-Dôme ont donné lieu à une campagne de vaccination massive de 80 000 enfants et jeunes adultes (2 mois - 20 ans) (35). Durant la même période, 51 cas de méningite à EV étaient observés en 2001 et 37 en 2002. Si un tableau de purpura fulminans ne pose pas de problème de diagnostic différentiel, certaines de ces observations se présentaient initialement comme des syndromes méningés isolés, d'où l'intérêt d'argumenter l'étiologie de ces tableaux cliniques et d'éliminer la possibilité d'un EV. Dans un autre exemple, le ministère de la Santé a émis, le 20 juin 2005, un message d'alerte « à l'attention des services d'accueil, services de maladies infectieuses et laboratoires de virologie » (36) sur l'augmentation du nombre de cas de méningite à EV depuis quatre semaines, et la nécessité de rester vigilant vis-à-vis des méningites bactériennes, « bien que cette recrudescence de méningites virales survienne à une époque de l'année moins propice aux infections invasives à méningocoque »... Cependant, depuis 2003, il y avait une situation d'hyperendémicité des infections à méningocoque en Seine-Maritime et dans la zone de Dieppe, avec une incidence annuelle de 21,3 cas pour 100 000 habitants, soit 15 fois la normale, sans saisonnalité particulière. Pendant la même période, en Westphalie du Nord, plusieurs centaines de tableaux de rougeole étaient observés chez des adolescents. On sait quel « bel avenir » connut l'épidémie de rougeole en Europe et en France les années qui suivirent...

Certes, la rougeole typique, le purpura fulminans et la raideur de nuque fébrile dans un état général conservé pour la méningite à EV ne sont en rien comparables. Ces maladies épidémiques n'ont rien en commun sauf parfois l'existence initiale de tableaux neuro-méningés et la perplexité du clinicien devant des cas sporadiques. Le dilemme initial reste le même : faut-il ou non traiter ? ... À l'admission du malade dans l'établissement de soins, certains éléments épidémiologiques peuvent orienter le diagnostic, mais celui-ci est plus facile rétrospectivement

au moment de la phase d'état de la maladie, ou quand l'évolution a été bénigne, au moment de la lettre de sortie. Dans ces contextes, éliminer d'emblée une cause très fréquente et bénigne de méningite grâce à la détection génomique des EV apparaît très pertinent, tant pour le patient que pour la collectivité.

IV. - LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS NEURO-MÉNINGÉES À EV

Le diagnostic des infections neuro-méningées est exclusivement direct et établi avec certitude par détection du génome viral au site de l'infection, dans le LCR prélevé lors de l'admission du malade. La recherche des anticorps sériques anti-EV n'a aucun intérêt.

A) La détection du génome viral par RT-PCR, un diagnostic rapide de genre

La présence de segments conservés dans la région 5' non codante (NC) de l'ARN de tous les EV a permis le développement des tests moléculaires standardisés, accessibles à tous les laboratoires depuis les années 90, et la détection du génome viral est aujourd'hui l'examen de référence pour le diagnostic de genre. La RT-PCR conventionnelle (en temps final) a été supplantée par la RT-PCR en temps réel qui possède deux avantages : elle est plus rapide (moins de 4 heures) et nécessite moins de manipulations, limitant ainsi le risque de contamination. De plus, des trousse de réactifs utilisant un système complètement fermé permettant l'extraction et l'amplification sont disponibles et offrent un résultat en deux heures. Contrairement à une opinion répandue, la RT-PCR en temps réel n'est pas plus sensible que la RT-PCR conventionnelle. Il convient également de souligner que l'analyse des résultats des contrôles de qualité européens (*Quality Control for Molecular Diagnostics, QCMD*) montre que les performances des procédés « maison » ne sont pas inférieures à celles des trousse commerciales, quelles que soient les techniques mises en œuvre.

La rapidité et les performances de la détection génomique autorisent donc sa réalisation dans une démarche diagnostique prospective, en même temps que les examens cyto-bactériologiques et biochimiques. Les tests moléculaires ont supplanté la culture qui nécessite une quantité de LCR suffisante pour son exécution, un délai d'au moins une semaine pour l'isolement du virus et dont la sensibilité est inférieure à 20 %. Le CNR recommande des techniques de RT-PCR en temps réel (qui assurent plus facilement un rendu de résultat dans les 48 heures) évaluées par un programme d'évaluation externe de la qualité (27) (Tableau II).

B) Un diagnostic générique complété par un génotypage

Le diagnostic de genre réalisé en pratique quotidienne peut être complété par la détermination du type d'EV responsable à partir d'extraits d'acides nucléiques ayant servi au diagnostic générique, sauf dans le cas des trousse

Tableau II - Principaux critères de choix d'une technique de détection génomique des EV.

Critères	Recommandations
Région ciblée	Seule la région 5' non codante (NC) du génome présente des séquences nucléotidiques suffisamment conservées pour garantir la reconnaissance du plus grand nombre de types différents d'EV.
Technique	La détection par PCR en temps réel doit être privilégiée pour assurer un rendu de résultat en moins de 48 heures.
Contrôle de qualité	L'inclusion d'un contrôle interne, si possible dès l'étape d'extraction, est recommandée pour détecter la présence éventuelle d'inhibiteurs des polymérases et éviter ainsi un résultat faussement négatif.
Prise d'essai	Pour les trouses de réactifs utilisées dans un système complètement fermé, la prise d'essai du LCR ne doit pas excéder 300 µl pour pouvoir conserver un volume suffisant pour des analyses ultérieures. Pour les autres méthodes, réalisées après extraction du génome viral, le volume d'éluat ne devrait pas excéder 15 µl pour pouvoir rechercher d'autres virus (herpès, etc.).
Validation initiale	Dans l'idéal, la sensibilité (bien que pouvant varier en fonction des types d'EV) et la spécificité de la méthode doivent avoir été évaluées par l'équipe l'ayant mise au point ou par le fabricant dans le cas d'une trousse de réactifs. Celle-ci doit avoir été validée sur le plus grand nombre de types différents d'EV (si possible à partir de souches récentes) et sur un panel d'évaluation externe de la qualité comportant des échantillons de charges virales variables (de faible à forte). Les automates sur lesquels la technique a été développée et validée doivent être précisés.

commerciales utilisant un système fermé. Elle repose sur l'amplification et le séquençage des gènes codant les protéines de capsid, principalement la protéine majeure VP1. L'identification du type n'a pas d'incidence pour la prise en charge du patient mais elle est importante pour argumenter un tableau sévère, une encéphalite, une origine nosocomiale, ou à titre épidémiologique pour surveiller l'apparition d'un type particulier (poliovirus, EV-A71, EV-D68). Elle est réalisée par les deux laboratoires du CNR (gratuitement) et certains autres laboratoires du RSE.

C) Le diagnostic moléculaire dans le LCR est-il fiable ?

Dans la mesure où un résultat positif est déterminant pour arrêter (ou ne pas instaurer) l'antibiothérapie probabiliste, le traitement antiviral anti-herpès, voire pour faire sortir le patient de l'hôpital si son état le permet, la fiabilité du résultat et donc de l'analyse doit être optimale. Celle-ci doit avoir été préalablement validée par le fabricant (dans le cas d'une trousse commerciale) ou par la personne ayant développé l'essai (dans le cas d'une RT-PCR « maison » publiée). Dans le cadre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale suivant la norme NF EN ISO 15189, il est obligatoire, avant la mise en place de la méthode, de vérifier les performances annoncées sur site afin de confirmer la validité des résultats. Le guide technique SH GTA 04, émis par le Cofrac ainsi que le Quamic (sous l'égide de la Société Française de Microbiologie), énonce des recommandations pour la validation de méthode et la mise

en place des processus pré-analytiques, analytiques et post-analytiques (37). Les performances de la méthode devront être également vérifiées régulièrement par la mise en place de contrôles de qualité internes et la participation à des programmes d'évaluation externe de la qualité, tels que les contrôles de qualité européens pour le diagnostic moléculaire ou QCMD (www.qcmd.org). Le CNR met à disposition et gracieusement ces QCMD pour les biologistes qui participent au RSE.

En 2014, 264 laboratoires répartis dans 38 pays ont pris part au QCMD, soit une augmentation de participation comparée à 2009. La technologie « RT-PCR en temps réel » tend à remplacer la « RT-PCR conventionnelle ». Les techniques en temps réel sont désormais employées dans 93,8 % des cas (dont 51,5 % font appel à des trouses commerciales). En 2014, les 140 résultats (sur un total de 290) de RT-PCR en temps réel du QCMD ont été obtenus avec 28 marques différentes de trouses commerciales. Les résultats étaient corrects dans 83,4 % (242/290) des jeux de données pour les 9 échantillons incontournables du « core ». Le taux de résultats faussement positifs a diminué (2,4 %) par rapport à celui observé en 2009 (3,8 %), reflet d'une amélioration technique au cours du temps dans les différents laboratoires.

Le RSE, sous l'égide du CNR, assume une mission de réactio-vigilance des trouses utilisées en France. À titre d'exemple, dans son rapport d'activité de 2014, le CNR présente l'évaluation des techniques de diagnostic molé-

culaire mises en œuvre par les 32 laboratoires du RSE qui ont participé au QCMD. La RT-PCR en temps réel a été utilisée dans tous les cas. Sur neuf échantillons qualifiés « d'incontournables », la réponse était correcte dans 79,4 % des 34 jeux de données transmis par ces 32 laboratoires, dont 26 employaient des trousse commerciales (6 fabricants différents) et 6, des techniques « maison ». Leur performance globale est bonne pour les échantillons du « core » contenant les types EV-D68 ou EV-A71, non détectés par 5,2 % des laboratoires européens. Les rares faux positifs observés étaient obtenus aussi bien avec des trousse commerciales qu'avec des techniques « maison » (27).

La capacité de détection génomique varie selon les types d'EV et probablement selon les techniques. Trois types d'EV sont difficiles à déceler dans le LCR – les responsables des QCMD y attachent d'ailleurs une importance particulière dans la composition des contrôles de qualité : les poliovirus, EV-A71 et EV-D68. Il ne s'agit probablement pas d'authentiques « faux négatifs » liés à un défaut de la méthode utilisée, mais de la présence transitoire ou de l'absence du génome de ces virus dans le LCR. Pour EV-A71, le taux de résultats négatifs à tort peut atteindre 30 % dans le LCR (38), alors même que le dépistage du virus dans la gorge ou les selles est positif. La même constatation est faite pour la détection de EV-D68 dans le LCR (19). Si un patient présente des signes cliniques d'infection neuro-méningée sévère à type d'encéphalite ou de PFA, il faut impérativement réaliser et adresser au laboratoire, en même temps que le LCR, des prélèvements périphériques (gorge, selles, aspiration naso-pharyngée) pour la recherche du génome des EV, le test moléculaire dans le LCR seul pouvant être négatif. D'où l'importance de la revue de prescription par le biologiste et le recueil d'un maximum de renseignements cliniques, notamment sur l'histoire de la maladie et la recherche de prodromes.

V. - MÉNINGITES BACTÉRIENNES ET À EV : LES CO-INFECTIIONS EXISTENT-ELLES ?

La question de l'existence ou non des co-infections est fondamentale pour que la réalisation et l'impact du test moléculaire EV gardent du sens. La veille bibliographique est permanente sur ce sujet. Certaines études publiées s'attachent à rechercher, en remontant aux bases de données et aux biothèques, des agents bactériens ou viraux dans des cas de méningite dûment argumentée « EV ». D'autres sont des cas cliniques (*case reports*) rapportant des détections simultanées de virus et de bactéries. Par principe, la preuve d'une co-infection avec un autre agent infectieux doit être sous-tendue par la mise en évidence de fractions génomiques d'EV dans le LCR et non pas du seul diagnostic de genre. En effet, il n'élimine pas la possibilité – même rarissime – d'un faux positif, d'autant que certaines publications (et donc certaines techniques) sont anciennes. Un autre argument serait de retrouver le génome de l'EV ou le virus par culture dans des prélèvements tels que le sang, la gorge ou les selles.

L'Académie américaine de pédiatrie a publié en 2010 les résultats d'une vaste étude rétrospective, menée chez des enfants âgés de 29 jours à 18 ans et hospitalisés dans 10 établissements de soins différents. Aucune coinfection bactérienne et entérovirale neuro-méningée n'a été mise au jour. Sa conclusion est de considérer les enfants avec une méningite aiguë et une RT-PCR EV positive comme des « sortants » (39). Une étude allemande rétrospective sur une période de 10 ans a fait le même constat (40). La recherche de différents virus par PCR dans des échantillons de LCR de patients d'une cohorte nationale hollandaise avec un diagnostic de méningite bactérienne confirmé s'est avérée négative pour les virus suivants : EV, CMV, EBV, HSV1-2, VZV, adénovirus, paréchévirus (41). Cependant, une équipe française a rapporté deux observations de patients présentant une méningite bactérienne (pneumocoque ou méningocoque) et une RT-PCR positive à EV dans le LCR avec une trousse de RT-PCR dans un système fermé, mais dans aucun cas il n'y a eu de tentative de typage/séquençage à partir des extraits d'ARN du LCR, ni de recherche d'EV dans des prélèvements périphériques (42). Une étude espagnole de 340 cas de méningite a retrouvé des tests moléculaires génériques d'EV et HSV positifs dans trois cas (43), mais aucun génotypage d'EV n'est mentionné dans ces « co-infections » pour cette cohorte (44). Enfin, une investigation rétrospective américaine n'a pas révélé une seule co-infection au sein d'une cohorte de 360 nourrissons ayant présenté une méningite à EV (45). Au total, aucune étude n'a identifié, à ce jour, des séquences génomiques d'EV et un autre agent infectieux dans le même LCR. Ainsi, si les co-infections existent, elles sont rarissimes.

VI. - IMPACT DU DIAGNOSTIC RAPIDE SUR LA PRISE EN CHARGE DES PATIENTS

L'impact de la réalisation de la détection génomique et de son résultat positif sur l'amélioration de la prise en charge du patient a été mis en évidence dès les années 2000 (46) et le rapport de la HAS de 2014 fait état de la bibliographie exhaustive des études sur l'utilité clinique et le gain médico-économique de cette analyse (10, 47). De plus, dans notre expérience (7, 30), en comparant deux périodes proches dans le temps, 2005 et 2008-2009, nous avons constaté une dynamique d'amélioration de la prise en charge des patients (nourrissons, enfants, adultes), objectivée par des réductions significatives à la fois des durées d'hospitalisation (0,7 jours pour les enfants et 2 jours pour les adultes) et d'antibiothérapie probabiliste (1 jour pour les nourrissons et 2 jours pour les adultes). Interviennent aussi la rapidité de remise des résultats de la détection génomique et leur prise en compte par le clinicien, l'état du patient, l'expérience du clinicien et sa réactivité décisionnelle. C'est en effet le clinicien qui prend la décision finale de sortie du patient, selon son état clinique et ses facteurs socio-géographiques. Outre la réduction de l'antibiothérapie probabiliste et de l'hospitalisation, d'autres conséquences sont bénéfiques pour le

patient : le caractère rassurant du diagnostic, la diminution du risque nosocomial par une hospitalisation raccourcie. Par ailleurs, d'autres sont avantageuses pour la santé publique : les économies de santé et la lutte contre l'antibio-résistance. De façon synthétique, pour que la détection génomique ait un impact sur la prise en charge du patient, il est nécessaire que les conditions suivantes soient réunies : a) une détection génomique prescrite d'emblée à l'admission du malade ; b) un résultat disponible en moins de 48 heures après la prescription, nécessitant la maîtrise de toutes les étapes pré-analytiques et analytiques par le biologiste ; c) une prise en compte immédiate du résultat par le médecin également en moins de 48 heures après l'admission. La première et la dernière condition dépendent dans leur réalisation du clinicien, le biologiste jouant sûrement un rôle de conseil.

VII. - LE RAPPORT DE LA HAS ET LE PASSAGE À LA NOMENCLATURE DE LA DÉTECTION GÉNOMIQUE DES EV DANS LE LCR

La HAS a été saisie conjointement par la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés et la Société Française de Microbiologie, pour l'évaluation de la détection du génome d'EV par amplification génique dans le LCR en cas de suspicion de méningite, en vue de son inscription à la nomenclature des actes de biologie médicale (47). L'objectif était de s'assurer que ce test moléculaire appliqué au LCR constituait un outil diagnostique validé dans la prise en charge des cas de suspicion de méningites. En effet, d'après sa synthèse des données : a) « la PCR EV permet de diagnostiquer des cas de méningites qui restent non détectables par les techniques de cultures cellulaires » ; b) « le risque de faux positif est négligeable » ; c) « un résultat positif se traduit habituellement par une réduction des durées d'hospitalisation et/ou de l'antibiothérapie ». Par ailleurs, le rapport de la HAS souligne le fait qu'il y a « homogénéité entre l'analyse de la littérature et le point de vue des parties prenantes » qui plaident aussi pour son utilisation, c'est-à-dire les conseils nationaux professionnels des différentes spécialités médicales concernées par cette demande ou, à défaut, les sociétés savantes de médecine d'urgence, d'infectiologie, de pédiatrie, de neurologie et de biologie clinique ainsi que le CNR des EV. Le collège de la HAS a entériné le rapport, le 23 juillet 2014, avec l'avis suivant : la détection génomique dans le LCR collecté lors de la ponction lombaire initiale est « un outil diagnostique qui peut être utilisé a) dans les méningites aiguës d'étiologie incertaine, b) après examen direct du liquide céphalorachidien et résultats cytologique et biochimique, c) dans un délai de 24h et en tout cas inférieur à 48h. » Il note que « un résultat positif autorise un arrêt de l'antibiothérapie probabiliste et permet une sortie précoce si l'état général du patient le permet. » La HAS est donc favo-

rable à l'inscription de la détection du génome des EV dans le LCR par amplification génique sur la liste des actes et prestations, dans des conditions définies.

VIII. - CONCLUSION

À la lumière des données biologiques, virologiques, cliniques et épidémiologiques apportées par le diagnostic prospectif de la plus fréquente des méningites, les notions classiques doivent être revues et le diagnostic doit entrer dans une démarche moderne et intégrée. La disponibilité d'un test moléculaire diagnostique qui a fait ses preuves, la fiabilité des résultats des laboratoires de biologie qui le pratiquent, doivent permettre de mieux prendre en charge les patients et de réaliser des économies de santé. L'inscription prochaine de ce test à la nomenclature des actes de biologie médicale, avec les conditions d'application en termes de prescription et de rapidité de résultat en est le point d'orgue.

Conflit d'intérêt

Hélène Peigue-Lafeuille : aucun conflit d'intérêt. Membre auditionnée en tant que CNR par la HAS.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement les collègues biologistes participant au RSE. En 2016 : Amiens (D. Hecquet, C. Segard, G. Duverlie), Angers (C.T. Tran, A. Ducancelle, F. Lunel-Fabiani), Bayonne (D. Leyssene), Besançon (A. Coaquette, D. Bettinger), Bordeaux (A. Vilain-Parce, M.E. Lafon, H. Fleury), Brest (L. Pilorge, C. Payan), Cahors (I. Mendes Martin, N. Wilhem), Caen (C. Schanen, J. Petitjean, A. Vabret), Clermont-Ferrand (A. Mirand, C. Henquell, H. Peigue-Lafeuille), Dijon (K. Balay, C. Manoha, J.B. Bour), Fréjus (T. Hubiche, P. del Giudice), Grenoble (C. Morel-Baccard, P. Morand), Haguenau (J. Exinger), Lille (M. Lazrek, D. Hober), Limoges (S. Rogez, S. Alain), Lyon (I. Schuffenecker, L. Josset, G. Billaud, B. Lina), Marseille (L. Ninove, R. Charrel, X. de Lamballerie), Montpellier (V. Foulongne, M. Segondy), Mulhouse (J.M. Delarbre), Nantes (M. Coste-Burel), Nice (A. Caramella, V. Giordanengo), Orléans (A. Guigon, J. Guinard), Paris-Cochin (A.S. L'Honneur, F. Rozenberg), Paris-St Louis (M. Salmona, J. Legoff, P. Lagrange), Paris-Trousseau (K. Saloum, A. Schnuriger, A. Garbarg-Chenon), Poitiers (A. Bourgoin, N. Lévêque), Reims (F. Renois, L. Andréoletti), Rennes (G. Lagathu), Roanne (C. Brechet), Rouen (V. Lémée, M. Gueudin, J.C. Plantier), Saint-Étienne (S. Pillet, B. Pozzetto), Strasbourg (Q. Lepiller), Toulouse (J.M. Mansuy, C. Mengelle, J. Izopet), Toulon-CHI (C. Poggi), Toulon-HIA (F. Janvier), Tours (C. Lier, C. Gaudy, A. Goudeau), Versailles (S. Marque-Juillet, E. Farfour).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In : *Fields virology*, 6th ed. DM Knipe, PM Howley, JI Cohen, DE Griffin, RA Lamb, MA Martin, *et al.* (Eds), *Lippincott, Williams & Wilkins*, Philadelphia ; 2013 : 490-530.
- (2) Peigue-Lafeuille H, Mirand A, Archimbaud C, Bailly JL, Henquell C. Émergence et ré-émergence chez les entérovirus : de la poliomyélite à la maladie pieds-mains-bouche. *Virologie* 2014 ; **18** : 87-104.
- (3) Tan NW, Lee EY, Khoo GM, Tee NW, Krishnamoorthy S, Choong CT. Cerebrospinal fluid white cell count: discriminatory or otherwise for enteroviral meningitis in infants and young children? *J Neurovirol* 2016 ; **22** : 213-7.
- (4) Hysinger EB, Mainthia R, Fleming A. Enterovirus meningitis with marked pleocytosis. *Hosp Pediatr* 2012 ; **2** : 173-6.
- (5) Henquell C, Chambon M, Bailly JL, Alcaraz S, De Champs C, Archimbaud C, *et al.* Prospective analysis of 61 cases of enteroviral meningitis: interest of systematic genome detection in cerebrospinal fluid irrespective of cytologic examination results. *J Clin Virol* 2001 ; **21** : 29-35.
- (6) Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaires (à l'exclusion du nouveau-né). 17^e Conférence de Consensus en Thérapeutique Anti-infectieuse, mercredi 19 novembre 2008. Grenoble: SPILF ; 2008.
http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/consensus/Meningites_consensuslong.pdf
- (7) Archimbaud C, Ouchchane L, Mirand A, Chambon M, Demeocq F, Labbé A, *et al.* Improvement of the management of infants, children and adults with a molecular diagnosis of enterovirus meningitis during two observational study periods. *PLoS One* 2013 ; **8** : e68571.
- (8) Standards Unit Microbiology Services Division. UK standards for microbiology investigations. Investigation of viral encephalitis and meningitis. London: Health Protection Agency; 2011.
http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317131376825
- (9) Steiner I, Schmutzhard E, Sellner J, Chaudhuri A, Kennedy PG ; European Federation of Neurological Sciences ; European Neurologic Society. EFNS-ENS guidelines for the use of PCR technology for the diagnosis of infections of the nervous system. *Eur J Neurol* 2012 ; **19** : 1278-91.
- (10) Haute Autorité de Santé. Détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique dans les méningites ; Juillet 2014 : 67 pages.
http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-07/evaluation_de_la_detection_du_genome_des_enterovirus_dans_le_liquide_céphalorachidien_par_amplification_génique_dans_les_meningites_-_rapport_devaluation.pdf
- (11) European Centre for Disease Prevention and Control. Outbreak of enterovirus A71 with severe neurological symptoms among children in Catalonia, Spain 14 June 2016. Stockholm : ECDC ; 2016.
- (12) Schuffenecker I, Mirand A, Josset L, Henquell C, Hecquet D, Pilorgé L, *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of patients infected with enterovirus D68, France, July to December 2014. *Euro Surveill* 2016 ; **21** (19) : pii=30226.
- (13) Poelman R, Schuffenecker I, Van Leer-Buter C, Josset L, Niesters HG, Lina B, *et al.* European surveillance for enterovirus D68 during the emerging North-American outbreak in 2014. *J Clin Virol* 2015 ; **71** : 1-9.
- (14) Antona D, Guérin N. L'éradication de la poliomyélite : où en est-on en 2010 ? *Bull Epidemiol Hebd* 2010 ; **48** : 489-93.
- (15) Huang CC, Liu CC, Chang YC, Chen CY, Wang ST, Yeh TF. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *N Engl J Med* 1999 ; **341** : 936-42.
- (16) Ooi MH, Wong SC, Podin Y, Akin W, del Sel S, Mohan A, *et al.* Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study. *Clin Infect Dis* 2007 ; **44** : 646-56.
- (17) Messacar K, Schreiner TL, Maloney JA, Wallace A, Ludke J, Oberste MS, *et al.* A cluster of acute flaccid paralysis and cranial nerve dysfunction temporally associated with an outbreak of enterovirus D68 in children in Colorado, USA. *Lancet* 2015 ; **385** : 1662-71.
- (18) Lang M, Mirand A, Savy N, Henquell C, Maridet S, Pérignon R, *et al.* Acute flaccid paralysis following enterovirus D68 associated pneumonia, France, 2014. *Euro Surveill* 2014 ; **19** (44) : pii: 20952.
- (19) Kreuter JD, Barnes A, McCarthy JE, Schwartzman JD, Oberste MS, Rhodes CH, *et al.* A fatal central nervous system enterovirus 68 infection. *Arch Pathol Lab Med* 2011 ; **135** : 793-6.
- (20) Horner LM, Poulter MD, Brenton JN, Turner RB. Acute flaccid paralysis associated with novel enterovirus C105. *Emerg Infect Dis* 2015 ; **21** : 1858-60.
- (21) Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Lauring AS, Sejvar J, Bitnun A, *et al.* Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin Infect Dis* 2013 ; **57** : 1114-28.
- (22) Solomon T, Michael BD, Smith PE, Sanderson F, Davies NW, Hart IJ, *et al.* Management of suspected viral encephalitis in adults - Association of British Neurologists and British Infection Association National Guidelines. *J Infect* 2012 ; **64** : 347-73.
- (23) McKinney RE, Katz SL, Wilfert CM. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* 1987 ; **9** : 334-56.
- (24) Archimbaud C, Bailly JL, Chambon M, Tourmilhac O, Travade P, Peigue-Lafeuille H. Molecular evidence of persistent echovirus 13 meningoencephalitis in a patient with relapsed lymphoma after an outbreak of meningitis in 2000. *J Clin Microbiol* 2003 ; **41** : 4605-10.
- (25) Diop OM, Burns CC, Sutter RW, Wassilak SG, Kew OM ; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update on vaccine-derived polioviruses-worldwide, January 2014-March 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015 ; **64** : 640-6.
- (26) Abedi GR, Watson JT, Pham H, Nix WA, Oberste MS, Gerber SI. Enterovirus and human parechovirus surveillance-United States, 2009-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015 ; **64** : 940-3.
- (27) <http://cnr.chu-clermontferrand.fr>. Rapport d'activité 2014. CNR des entérovirus et paréchéovirus.
- (28) Chambon M, Archimbaud C, Bailly JL, Henquell C, Regagnon C, Charbonné F, *et al.* Circulation of enteroviruses and persistence of meningitis cases in the winter of 1999-2000. *J Med Virol* 2001 ; **65** : 340-7.
- (29) Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C, Mirand A, Regagnon C, Chambon M, Henquell C. Intérêt du diagnostic moléculaire des méningoencéphalites virales. *Spectra Biologie* 2006 ; **154** : 44-55.
- (30) Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, Petit I, Henquell C, Mirand A, *et al.* Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009 ; **81** : 42-8.
- (31) Peigue-Lafeuille H, Croquez N, Laurichesse H, Clavelou P, Aumaitre O, Schmidt J, *et al.* Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management. *J Med Virol* 2002 ; **67** : 47-53.
- (32) Helfand RF, Khan AS, Pallansch MA, Alexander JP, Meyers HB, DeSantis RA, *et al.* Echovirus 30 infection and aseptic meningitis in parents of children attending a child care center. *J Infect Dis* 1994 ; **169** : 1133-7.
- (33) Mohle-Boetani JC, Matkin C, Pallansch M, Helfand R, Fenstersheib M, Blanding JA, *et al.* Viral meningitis in child care center staff and parents : an outbreak of echovirus 30 infections. *Public Health Rep* 1999 ; **114** : 249-56.
- (34) Vieth UC, Kunzelmann M, Diedrich S, Timm H, Ammon A, Lyytikäinen O, *et al.* An echovirus 30 outbreak with a high meningitis attack rate among children and household members at four day-care centers. *Eur J Epidemiol* 1999 ; **15** : 655-68.
- (35) Lévy-Bruhl D, Perrocheau A, Mora M, Taha MK, Dromell-Chabrier S, Beytout J, *et al.* Vaccination campaign following an increase in incidence of serogroup C meningococcal diseases in the department of Puy-de-Dôme (France). *Euro Surveill* 2002 ; **7** : 74-6.
- (36) Ministère de la Santé et des Solidarités, 20 juin 2005, DHOS n° 00937, DGS n° 050195, message d'information à l'attention des Services d'accueil d'urgence, services de maladies infectieuses et laboratoires de virologie.
- (37) Société Française de Microbiologie. Le management de la qualité. In : *Référentiel en microbiologie médicale*, 5^e éd. *Société Française de Microbiologie*, Paris ; 2015 : 81-92.
- (38) Pérez-Vélez CM, Anderson MS, Robinson CC, McFarland EJ, Nix WA, Pallansch MA, *et al.* Outbreak of neurologic enterovirus type 71 disease: a diagnostic challenge. *Clin Infect Dis* 2007 ; **45** : 950-7.
- (39) Nigrovic LE, Malley R, Agrawal D, Kuppermann N ; Pediatric Emergency Medicine Collaborative Research Committee of the American Academy of Pediatrics. Low risk of bacterial meningitis in children with a positive enteroviral polymerase chain reaction test result. *Clin Infect Dis* 2010 ; **51** : 1221-2.
- (40) Vollbach S, Müller A, Drexler JF, Simon A, Drosten C, Eis-Hübinger AM, *et al.* Prevalence, type and concentration of human enterovirus and parechovirus in cerebrospinal fluid samples of pediatric patients over a 10-year period: a retrospective study. *Virol J* 2015 ; **12** : 199.

- (41) Brouwer MC, Jim KK, Benschop KS, Wolthers KC, van der Ende A, de Jong MD, *et al.* No evidence of viral coinfection in cerebrospinal fluid from patients with community-acquired bacterial meningitis. *J Infect Dis* 2013 ; **208** : 182-4.
- (42) Basmaci R, Mariani P, Delacroix G, Azib S, Faye A, Taha MK, *et al.* Enteroviral meningitis does not exclude concurrent bacterial meningitis. *J Clin Microbiol* 2011 ; **49** : 3442-3.
- (43) de Ory F, Avellón A, Echevarría JE, Sánchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M, *et al.* Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol* 2013 ; **85** : 554-62.
- (44) Cabrerizo M, Trallero G, Echevarría JE, Moreno-Docón A, Pena MJ, Pérez-Ruiz M, *et al.* Molecular characterization of enteroviruses associated with neurological infections in Spain, 2008. *J Med Virol* 2013 ; **85** : 1975-7.
- (45) Dewan M, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS. Cerebrospinal fluid enterovirus testing in infants 56 days or younger. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2010 ; **164** : 824-30.
- (46) Nigrovic LE, Chiang VW. Cost analysis of enteroviral polymerase chain reaction in infants with fever and cerebrospinal fluid pleocytosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000 ; **154** : 817-21.
- (47) Avis n°2014.0071/AC/SEAP du 23 juillet 2014 du collège de la Haute Autorité de Santé relatif à l'inscription sur la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale, de la détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique.
http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1757840/fr/avis-n2014-0071/ac/seap-du-23-juillet-2014-du-college-de-la-haute-autorite-de-sante-relatif-a-l-inscription-sur-la-liste-des-actes-et-prestations-mentionnee-a-l-article-l-162-1-7-du-code-de-la-securite-sociale-de-la-detection-du-genome-des-enterovirus-dans-le-liquide-cephalorachidien-par-amplification-genique