

# Diagnostic moléculaire d'une méningoencéphalite amibienne primitive à l'occasion d'un cas fatal en Guadeloupe

## Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies)

M. Nicolas · J.F. De Jonckheere · P. Pernin · H. Bataille ·  
V. Le Bris · C. Herrmann-Storck

Reçu le 26 mai 2008 ; accepté le 11 août 2009  
© Société de pathologie exotique et Springer-Verlag France 2009

**Résumé** Nous rapportons le premier cas de méningoencéphalite amibienne primitive (MEAP), observé en Guadeloupe, chez un jeune garçon âgé de neuf ans. L'évolution de la maladie a été rapidement fatale en sept jours. La possibilité d'une infection par amibes libres a été suspectée, à la fois sur la négativité de l'ensemble des recherches bactériennes et virales effectuées et sur la présence de cellules d'aspect inhabituel lors de l'observation du liquide céphalo-rachidien (LCR) après coloration. Bien que la souche amibienne n'ait pas pu être isolée, *Nægléria fowleri* a pu être identifiée par PCR avec utilisation d'amorces spécifiques à partir de l'ADN extrait du LCR congelé. Le séquençage de l'ADN amplifié a, en outre, permis de démontrer que la souche de *N. fowleri* responsable appartient à un génotype commun, présent à la fois sur les continents américain et européen.

**Mots clés** *Nægléria fowleri* · Méningoencéphalite amibienne primitive · Diagnostic · PCR · Guadeloupe · Antilles françaises · Hôpital

**Abstract** We report the first case of primary amoebic meningoencephalitis in a 9-year-old boy in Guadeloupe. The outcome was rapidly fatal in 7 days. The patient presumably acquired the infection by swimming and diving in a basin supplied by natural thermal water 1 week before onset of the disease. The possibility of a free-living amoeba infection was suspected both on the negativity of all bacterial and viral initial tests and on the observation of peculiar cells in stained cerebrospinal fluid samples. Although the amoeba was not isolated, *Nægléria fowleri* could be identified by polymerase chain reaction with specific primers on DNA extracted from frozen cerebrospinal fluid samples. Furthermore, as the internal transcribed spacer (ITS1) region of DNA is variable in length between the different strains of *N. fowleri*, sequencing of the amplified ITS1 demonstrated that the responsible *N. fowleri* strain belongs to a common genotype present in the American and European continent.

**Keywords** *Nægléria fowleri* · Primary amoebic meningoencephalitis · Polymerase chain reaction · Diagnosis · Guadeloupe · French West Indies · Hospital

M. Nicolas · C. Herrmann-Storck  
Service de microbiologie, CHU de Pointe-à-Pitre,  
BP 465, F-97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

J.F. De Jonckheere  
Unité de recherche sur les maladies tropicales, institut scientifique  
de santé publique, B-1050 Bruxelles, Belgique

P. Pernin (✉)  
Laboratoire de biologie cellulaire, faculté de pharmacie,  
université Claude-Bernard Lyon-I, université de Lyon,  
F-69373 Lyon, France  
e-mail : permin.pierre@wanadoo.fr

H. Bataille · V. Le Bris  
Service de pédiatrie, CHU de Pointe-à-Pitre, BP 465,  
F-97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe

## Introduction

La méningoencéphalite amibienne primitive (MEAP), due à l'amibe libre *Nægléria fowleri*, existe dans le monde entier et a été signalée sur tous les continents, à l'exception de l'Antarctique [7]. L'évolution de la maladie est foudroyante, et très peu de patients survivent à l'infection, d'une part, parce que le diagnostic est difficile et, d'autre part, parce que le traitement spécifique (amphotéricine B) est généralement administré trop tardivement. Nous rapportons ici le premier cas de MEAP aux Antilles françaises (Guadeloupe) chez un garçon de neuf ans, sans antécédent médical, qui a probablement contracté la

maladie à la suite d'une journée de baignade dans un bassin d'eau thermale naturelle, une semaine avant le début de la maladie.

## Observation

Le 20 avril 2008, l'enfant, un garçon âgé de neuf ans, est reçu au service des urgences du CHU de Pointe-à-Pitre pour un syndrome fébrile avec céphalées. Son examen ne révèle alors aucun point d'appel infectieux ni signe de gravité : il n'est pas hospitalisé et regagne son domicile avec un traitement symptomatique. L'apparition d'une aggravation le 22 avril entraîne son hospitalisation, à deux heures du matin, dans le service de pédiatrie. Lors de son admission, sa température est de 40 °C, il présente un état comateux alternant avec des phases d'agitation psychomotrice et un syndrome confusionnel. Son examen clinique ne révèle aucun signe cutané ou respiratoire, son état hémodynamique est stable et il n'existe pas de raideur méningée franche. La tomodensitométrie cérébrale apparaît normale, mais l'IRM révèle une atteinte cérébelleuse.

Sur le plan biologique, la numération formule sanguine effectuée à l'admission révèle une hyperleucocytose à 13,2 G/l, dont 82 % de polynucléaires neutrophiles, les plaquettes sont à 237 G/l et l'hémoglobine à 11,8 g/dl. Le taux de protéine C réactive est de 44,6 mg/l. La ponction lombaire ramène un liquide trouble avec des leucocytes à 3,7 G/l, dont 91 % de polynucléaires neutrophiles et des hématies à 1,9 G/l, une hyperprotéinorachie à 5,7 g/l et une hypoglycorachie à 0,75 mmol/l. Malgré ces signes évocateurs d'une méningite

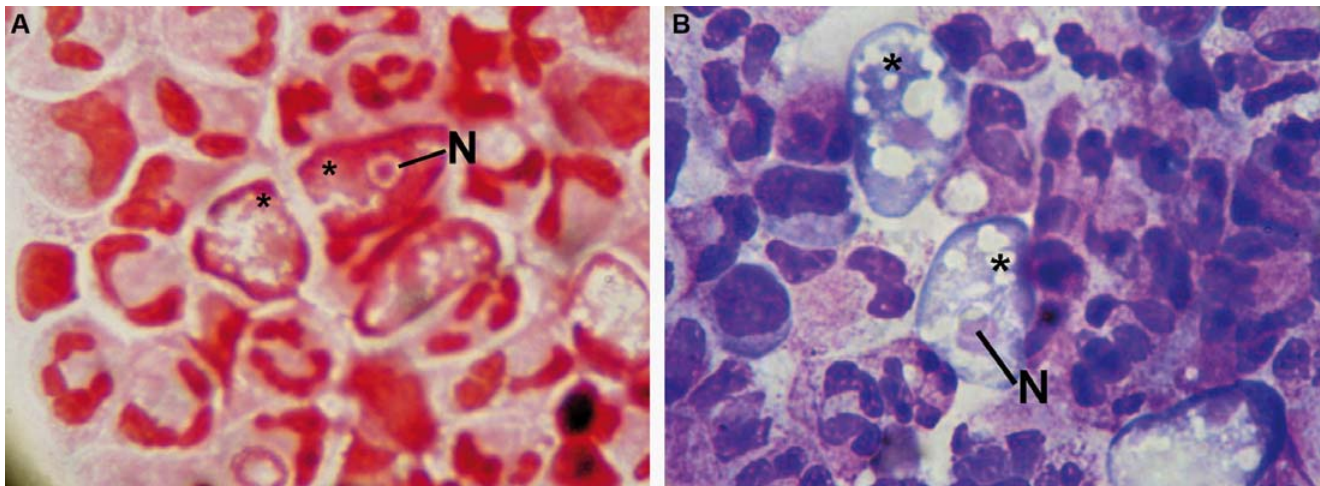
bactérienne, la recherche des antigènes solubles bactériens (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus B*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* A, B, C et W 135) dans le liquide céphalorachidien (LCR) demeure négative. De même, la mise en culture du LCR et l'hémoculture restent négatives. L'examen des colorations du LCR au MGG et au Gram ne révèle ni bactéries ni champignons, mais permet de mettre en évidence la présence de nombreux éléments cellulaires inhabituels qui, lors de l'examen direct du LCR, n'ont pas pu être différenciés au sein des très nombreux leucocytes. Ces éléments suspects apparaissent comme des cellules polymorphes, de 15 à 20 µm, avec un cytoplasme très vacuolisé, et dans certaines de ces cellules un nucléole peut être distingué au centre du noyau (Fig. 1).

Malgré la mise en place d'une antibiothérapie par céfotaxime (Claforan®), l'état de l'enfant se détériore rapidement, et celui-ci décède 12 heures après son retour à l'hôpital.

La présence de ces cellules inhabituelles dans le LCR, conjuguée à la négativité de l'ensemble des cultures et des PCR mises en œuvre pour le diagnostic, aussi bien des virus que des bactéries habituellement responsables de méningites, oriente alors le diagnostic vers la possibilité d'un cas de MEAP. Malheureusement, l'évolution clinique foudroyante ne permet pas d'instaurer le traitement spécifique.

## Diagnostic moléculaire

La confirmation moléculaire de la MEAP est obtenue par PCR à partir de l'ADN extrait initialement du LCR en vue de détecter *N. meningitidis* (CNR des méningocoques — Institut



**Fig. 1** LCR coloré au Gram (1a : agrandissement = × 1 100) et au May-Grünwald-Giemsa (1b : agrandissement = × 1 300) montrant la présence des trophozoïtes amibiens (astérisques) au sein de nombreux polynucléaires : remarquer le cytoplasme très vacuolisé ainsi que l'existence d'un nucléole central bien visible chez certaines amibes (N : noyau). *Gram (1a: magnification = × 1 100) and May-Grünwald-Giemsa (1b: magnification = × 1 300) colorations of CSF showing amoebic cells (asterisks) among numerous polynuclear leukocytes: note the vacuolated cytoplasm and the presence of a conspicuous central nucleolus in some amoebas (N: nucleus)*

Pasteur, Paris). Les amorces spécifiques du genre, utilisées pour l'amplification des espaceurs transcrits internes ITS1 et ITS2, y compris l'ADNr 5,8S, des différentes *Nægléria* spp. sont : ITSFW : AACCTGCGTAGGGATCATTT et ITSRV : TTTCCCTCCCCTTATTAATAT. Les amorces utilisées pour l'amplification spécifique de *N. fowleri* incluant l'ADNr 5,8S sont : NFITSFW : TGAAAACCTTTTTCCATTACA pour l'ITS1 et NFITSRV : AATAAAAGATTGACCATTGAAA pour l'ITS2. La PCR effectuée sur l'ADN du LCR est positive avec les deux types d'amorces. Le produit PCR amplifié avec les amorces spécifiques d'espèce confirme donc l'implication de *N. fowleri* et exclut la possibilité d'une infection par l'une des deux autres espèces pathogènes de *Nægléria* : *N. australiensis* et *N. italica* [7]. La région ITS1 variant en longueur entre les différentes souches de *N. fowleri* [6], le type de *N. fowleri* en cause chez ce patient a pu être déterminé par séquençage du produit PCR spécifique du genre. La séquence ITS1 du produit PCR obtenu a une longueur de 86 pb et s'avère totalement identique à celle de la souche LEE (numéro d'accèsion GenBank X96562) du continent américain et à celle de la souche KUL (numéro d'accèsion GenBank X96561) du continent européen (Tableau 1).

## Discussion

Plusieurs jours après le décès de l'enfant, l'interrogatoire de la famille par la Direction de la santé et du développement social (DSDS) révèle une forte présomption d'exposition et de contamination par les amibes libres. L'entretien rapporte, en effet, qu'une semaine avant le début de la maladie, le 13 avril 2008, l'enfant a nagé et plongé avec des amis, la journée entière, dans un bassin constitué d'une réserve naturelle d'eau thermale au sud de la Guadeloupe (bains de Dolé). Le bassin alimenté par une source d'eau douce, naturellement chaude, est riche en sédiments et entouré de végétation tropicale : il constitue un lieu de baignade très populaire et très fréquenté.

Par conséquent, le 16 mai 2008, des investigations environnementales ont été entreprises sur ce bassin, et différents types de prélèvements (eau, biofilm, produit de raclage des surfaces) ont été réalisés pour rechercher la présence d'amibes. Bien que l'espèce pathogène *N. fowleri* n'ait pas pu être isolée à partir de ces prélèvements, des souches appartenant à deux autres espèces de *Nægléria* thermotolérantes, *N. lovaniensis* et *N. australiensis*, identifiées par typage isoenzymatique [16,17], ont été isolées à plusieurs reprises à partir de différents volumes d'eau allant de 250 ml à seulement 10 ml. L'isolement de ces deux autres *Nægléria* thermotolérantes constitue un argument en faveur de la présence très probable de l'espèce pathogène *N. fowleri* un mois auparavant, au moment de la baignade. En effet, *N. lovaniensis* est

**Tableau 1** Séquences ITS1 des différents génotypes de *N. fowleri*. ITS1 sequences of different *N. fowleri* types

Origine ou type	ITS1 séquence	Acc. N°
Cas guadeloupéen	ATGGTAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTTATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAAT	ND
Euro-américain 1	ATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTTATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAAT	<u>X96561</u>
Cas italien	ATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAAT	ND
Euro-américain 2	ATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAAT	<u>X96564</u>
Australien-Néo-Zélandais-Japonnais	ATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAAT	<u>X96565</u>

ND: non déposé



l'espèce la plus étroitement apparentée à *N. fowleri*, bien qu'elle ne soit pas pathogène, et elle est considérée comme un indicateur de la présence possible de *N. fowleri* [7]. *N. australiensis* est pour sa part pathogène pour la souris [4,5,15], mais n'a encore jamais été détectée dans les infections humaines [7].

La MEAP a une répartition ubiquitaire, et ce premier cas de MEAP en Guadeloupe ainsi que les cas précédemment rapportés en Grande-Bretagne [2,20], en Nouvelle-Zélande [13], au Japon [9] et, plus récemment, à Madagascar [11] confirment l'existence d'une distribution insulaire pouvant paraître paradoxale pour un protozoaire qui ne peut se développer qu'en eau douce. Cette répartition soulève la question du mode de dispersion de cette amibe pathogène déjà évoquée par Jadin [10]. La MEAP existe essentiellement dans des régions de climat chaud, car les collections d'eau chaude représentent les conditions optimales pour le développement de l'amibe libre pathogène *N. fowleri*. Dans les régions tempérées, les infections à *N. fowleri* peuvent néanmoins se produire, parce que l'amibe est capable de proliférer dans des eaux réchauffées pour des raisons naturelles ou artificielles (eaux de piscine ou eaux de refroidissement de diverses industries ou de centrales nucléaires [21]). Bien que dans de très rares cas la baignade ne semble pas être en cause [2,12], la plupart des cas de MEAP sont contractés à la suite de baignade dans des eaux de surface, comme cela semble très probablement être le cas dans notre observation. Par conséquent, la baignade dans des eaux chaudes naturelles, aux environs de 25–30 °C, ne devrait pas être pratiquée sans le port d'un masque de plongée ou de pincés nasales, lorsque la chloration de l'eau n'est pas possible.

À notre connaissance, c'est seulement la deuxième fois que le typage de la souche de *N. fowleri* est réalisé dans un cas de MEAP, alors que l'amibe responsable n'a pas été isolée. La première fois, lors d'un cas italien, l'ADN avait été extrait à partir du tissu cérébral congelé [3], alors que dans notre cas l'ADN a été extrait à partir du LCR congelé du patient. Le type de *N. fowleri* identifié (ITS1 de 86 pb) est commun, à la fois, sur les continents américain et européen, mais il est différent de celui retrouvé chez le patient italien, puisque chez ce dernier l'ITS1 avait une longueur de seulement 42 pb correspondant à un autre génotype également présent aux États-Unis et en Europe [3] (Tableau 1). Alors qu'il existe encore d'autres types présents aux États-Unis et en Europe, il est intéressant de souligner que toutes les souches de *N. fowleri* provenant d'Australie appartiennent encore à un type différent [6]. Ce type australien diffère non seulement de l'un des deux types euro-américains précédents par une délétion de 2 pb dans la séquence de l'ITS1 (84 pb), mais il se différencie en plus par la substitution d'une paire de base (transition C/T) au niveau de l'ADNr 5,8S (Tableau 1). Le variant australien est également le seul retrouvé sur les îles du Japon et de la Nouvelle-Zélande, ce qui semble indiquer une certaine restriction du mode de

dispersion de ces amibes : la forme kystique pourrait alors être transportée par le vent ou par les oiseaux.

Dans les autres infections dues aux amibes libres, telles que les Acanthamoeba, la PCR a également été utilisée récemment avec succès pour identifier l'agent pathogène dans les prélèvements biologiques, alors qu'aucune culture n'était disponible [14].

## Conclusion

Cette observation souligne une fois encore que, bien que rare, la MEAP doit être systématiquement évoquée dans le cadre du bilan diagnostique de troubles neurologiques fébriles, en particulier chez l'enfant ou les jeunes adultes. Le contexte épidémiologique d'exposition à une eau de baignade chaude, naturelle ou artificielle doit alors être recherché. La MEAP est une infection dont le pronostic est redoutable, puisqu'on estime actuellement que seulement 5 % des patients dont l'observation est rapportée ont survécu [18]. Le diagnostic biologique repose essentiellement sur l'examen direct à l'état frais du LCR, maintenu à température ambiante, si possible, avec un microscope à contraste de phase équipé d'une platine chauffante, car le froid diminue la mobilité des formes végétatives. Les amibes peuvent alors être reconnues au milieu des polynucléaires grâce à leur plus forte réfringence et surtout grâce à l'émission de pseudopodes lobés très actifs chez les *Nægleria* ainsi que par la présence d'une vacuole pulsatile. C'est à cette étape du diagnostic que la décision thérapeutique pourra intervenir. Le traitement spécifique ayant abouti aux rares cas de guérison repose toujours sur l'administration d'amphotéricine B par voie parentérale, pouvant être associée au fluconazole et à la rifampicine per os [1,18,19,22]. Malheureusement, ce traitement reste souvent inefficace sans doute parce que mis en œuvre trop tardivement [8,11,21], ce qui confirme l'absolue nécessité d'un diagnostic précoce. L'examen direct peut également être complété par une mise en culture du LCR sur gélose simple à 15 %, recouverte d'une fine pellicule d'*E. coli* : dans ces conditions la culture peut être positive en 24–36 heures.

Cette observation confirme, en outre, que le diagnostic de MEAP à partir de l'ADN extrait du LCR est possible, même lorsque l'examen à l'état frais du LCR, comme c'est le cas ici, n'a pas permis de repérer les amibes ou lorsque l'isolement de celles-ci par culture n'a pas pu être réalisé. Par conséquent, le recours à la PCR avec des amorces spécifiques dès les premiers stades du diagnostic des méningites à LCR purulent peut permettre de détecter ces amibes pathogènes et d'instaurer immédiatement le traitement spécifique, seul susceptible d'assurer la guérison du patient avant l'apparition de lésions irréversibles.

**Conflit d'intérêt :** aucun.

## Références

- Anderson K, Jamieson A (1972) Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* 1:902–3
- Apley J, Clarke SK, Roome AP, et al (1970) Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br Med J* 1:596–99
- Cogo PE, Scaglia M, Gatti S, et al (2004) Fatal *Nægléria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg Infect Dis* 10:1835–7
- De Jonckheere JF (1981) *Nægléria australiensis* sp. nov., another pathogenic *Nægléria* from water. *Protistologica* 17:423–9
- De Jonckheere JF, Aerts M, Martinez JA (1983) *Nægléria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77:712–6
- De Jonckheere JF (1998) Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacer, including 5.8S, of *Nægléria* spp. *Protist* 149:221–8
- De Jonckheere JF (2002) A century of research on the amoeboid flagellate genus *Nægléria*. *Acta Protozool* 41:309–42
- Duma RJ, Rosenblum WI, McGehee RF, et al (1971) Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Nægléria*. Two new cases, response to amphotericin B and a review. *Ann Intern Med* 174:923–31
- Hara T, Fukuma T (2005) Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Nægléria fowleri*. *Parasitol Int* 54: 219–21
- Jadin JB (1974) De la dispersion et du cycle des amibes libres. *Ann Soc Belg Med Trop* 54:371–85
- Jaffar-Bandjee MC, Alessandri JL, Molet B, et al (2005) Ménin-gocéphalite primitive à amibes libres : premier cas observé à Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot* 98:11–3 [<http://www.pathexo.fr/pages/articles/2005/2005-T98-1/2590.html>]
- Lawande RV, John I, Dobbs RH, Egler LJ (1979) A case of primary amoebic meningoencephalitis in Zaria, Nigeria. *Am J Clin Pathol* 71:591–4
- Mandal BN, Gudex DJ, Fitchett MR, et al (1970) Acute meningoencephalitis due to amoebae of the order myxomycetale (slime mould). *N Z Med J* 71:16–23
- Meersseman W, Lagrou K, Scirot R, et al (2007) Rapidly fatal *Acanthamœba encephalitis* and treatment of cryoglobulinemia. *Emerg Infect Dis* 13:469–71
- Pernin P, De Jonckheere JF (1984) Isolement et identification de deux nouvelles souches pathogènes de *Nægléria australiensis*. *Ann Parasitol Hum Comp* 59:133–42
- Pernin P, Cariou M, Jacquier A (1985) Biochemical identification and phylogenetic relationships between free-living amoebas of the genus *Nægléria*. *J Protozool* 32:592–603
- Pernin P, Grelaud G (1989) Application of isoenzymatic typing to the identification of non-axenic strains of *Nægléria* (Protozoa, Rhizopoda). *Parasitol Res* 75:595–8
- Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34:1001–27
- Seidel JS, Harmatz P, Visvesvara GS, et al (1982) Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis. *N Engl J Med* 306:346–8
- Symmers WC (1969) Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br Med J* 4:449–54
- Van Den Driessche E, Vandepitte J, Van dijck P, et al (1973) Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water. *Lancet* 2:971
- Vargas-Zepeda J, Gomez-Alcala AV, Vazques-Morales JA, et al (2005) Successful treatment of *Nægléria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. Case report. *Arch Med Res* 36:83–6