

P-176

Bactériologie – Méthodes de Diagnostic

Détection systématique des bactéries entéropathogènes par PCR Multiplexe

G.Potiron, F.Tomasi, G.DeGastines, Secteur de Bactériologie, LBM Biorylis, Laborizon, La Roche Sur Yon, France
gregoire.potiron@laborizon.fr, 0251385700

Introduction

Selon le REMIC 2018, la prescription d'une coproculture ne doit intervenir que dans des contextes bien spécifiques, la plupart des gastro-entérites aiguës (GEA) n'étant pas d'origine bactérienne (étiologies virales, causes non infectieuses principalement). La flore fécale étant riche et complexe, l'isolement de pathogènes par culture conventionnelle peut parfois s'avérer long et difficile.

Depuis peu, des panels de PCR multiplexe permettent la recherche d'ADN de ces pathogènes, directement à partir du prélèvement mais leur place reste à définir.

Objectifs

Nous avons souhaité évaluer les performances d'un coffret de PCR multiplexe temps réel (Bactéria 1 Seegene-Eurobio) permettant la détection d'ADN de bactéries entéropathogènes et les confronter à celles de la culture conventionnelle, en englobant également le délai de rendu des résultats et le coût au test.

Seules les selles présentant un aspect macroscopique préférentiellement évocateur de GEA bactérienne (selles liquides, glaireuses, sanguinolentes) ont été sélectionnées pour cette étude, parmi les selles réceptionnées (Période du 01/05/18 au 15/08/18).

Méthodes

- 214 selles diarrhéiques ont été inclus (975 selles reçues au laboratoire sur cette période).
- A partir du milieu de transport, nous avons réalisé en parallèle :
 - un ensemencement des milieux de culture spécifiques recommandés (BCP, Hektoen, Bouillon Sélénite, milieux sélectifs *Yersinia/Campylobacter/ChromID Salmonelle*-REMIC 2018)
 - une PCR multiplexe – Bacteria 1 Seegene – assurant la détection d'ADN de *Salmonelle*, *Shigelle/EIEC*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, Toxine B de *Clostridium difficile*, avec co-amplification d'un contrôle interne (Extracteur Nimbus Hamilton, Thermocycleur CFX96 Biorad) et d'un contrôle positif et négatif pour chaque série (série un jour sur deux, hors jours fériés, 41 séries réalisées sur la période).

Pathogènes	Selles liquides	Selles glaireuses	Selles sanguinolentes	Total
Salmonelle	11	3	1	15
Shigelle	1	-	-	1
Yersinia	-	2	-	2
Campylobacter	34	25	-	59
Aeromonas	3	1	-	4
Vibrio	1	-	-	1
C. difficile	6	4	-	10
Aucun	84	34	4	122
Total	140	69	5	214

Descriptif des pathogènes identifiés en fonction de l'aspect macroscopique des selles

Résultats

Confrontation des résultats des recherches de bactéries entéropathogènes en fonction du type de méthode utilisé

Comparaison de méthode		PCR Multiplexe Temps Réel		
		Positive	Négative	Total
Culture initiale	Positive	73*	***1	74
	Négative	8**	122	130
	Total	81	123	204

* Cultures non réalisées pour *Clostridium difficile* (10 prélèvements)

** 6 *Campylobacter* (Ct Moyen = 32,74), et un *Aeromonas* (Ct = 32,85) non obtenus par culture, confirmés positifs par autre méthode PCR Multiplexe, un *Vibrio cholerae* (Ct = 28,31) non détecté initialement sur primocultures

*** Positif sur réanalyse secondaire (même technique)

- Détection correcte du contrôle interne dans tous les puits patients.
- 92 échantillons positifs sur 214 (43%), avec détection de l'ensemble des pathogènes du panel de PCR multiplexe.
- La PCR multiplexe présente une sensibilité de 98.8 % (81 positifs détectés sur 82, contre 90.2 % pour la culture : 74 positifs détectés sur 82), une spécificité de 100 %, et un coefficient de corrélation kappa de 0.91 avec la culture (hors *C. difficile*).
- Le délai moyen de rendu des résultats positifs est de 1.8 jours par PCR Multiplexe versus 3.4 jours pour par culture (Carte ID GN Vitek 2 et gram pour *Campylobacter*).
- Le coût de la culture conventionnelle par échantillon est estimé à 13.18 (temps technique : 9.06 pour 20 minutes ensemencement/lecture, géloses : 4.12).
- Celui de la PCR multiplexe est évalué à 12.30 (temps technique : 1.70 selon 90 minutes pour 24 échantillons en moyenne, coût réactifs extraction - amplification : 10.6).

Conclusion

Dans cette étude, la sensibilité du panel Bactéria 1 Seegene-Eurobio est supérieure à celle de la culture standard pour la détection des bactéries entéropathogènes, dans le cadre de l'exploration de syndromes diarrhéiques (détection notamment d'un *V. cholerae*, non retrouvé initialement par culture, confirmé ensuite par le CNR).

Ces techniques de PCR permettent d'avoir des résultats plus rapidement (5h30 pour extraction puis amplification dans notre étude) directement à partir du prélèvement primaire. Ces données pourraient conduire à ne plus réaliser de cultures initiales systématiquement en première intention, quelque soit l'aspect macroscopique des selles, mais à opter pour un repiquage ciblé des échantillons positifs en PCR pour identification (détermination de l'espèce) et antibiogramme, avec pour finalité une amélioration de la prise en charge des patients (rapidité, sensibilité, orientation précoce vers une autre étiologie si négatifs) à coût maîtrisé (gain économique tous aspects macroscopiques confondus).

Ces éléments constituent autant de pistes d'étude pour essayer d'améliorer l'efficacité de cet examen, une des plus mauvaises de la bactériologie à l'heure actuelle (Source : REMIC 2018).

Mots - Clés

PCR Multiplexe – Approche Syndromique – Syndrome diarrhéique