

L'intérêt de la PCR multiplexe dans le diagnostic étiologique d'une diarrhée insolite

G. POTIRON¹

RÉSUMÉ

Un cas d'infection intestinale aiguë causée par une souche de *Vibrio cholerae* non O1/non O139 (vibron dit « non cholérique ») est rapporté. Survenue chez un sujet bénéficiant d'une corticothérapie, la vibriose est restée limitée au tractus digestif mais a causé une débâcle diarrhéique ayant nécessité, en raison de l'hypovolémie résultante, l'hospitalisation du patient dans une unité de soins intensifs. Le vibron a été décelé dans les fèces du malade, initialement par PCR multiplexe en temps réel, puis a été retrouvé *a posteriori* après leur culture sur un milieu gélosé.

MOTS-CLÉS : PCR multiplexe, gastro-entérite, *Vibrio cholerae*, vibron non cholérique.

I. - CAS CLINIQUE

Mr A., âgé de 77 ans (108 kg ; 1,70 m), vit seul et de façon autonome à son domicile situé au bord du littoral atlantique. Ce patient a été opéré en 2014 d'un adénome hypophysaire non sécrétant, suivi d'une radiothérapie en 2015. Son traitement médicamenteux comprend de l'hémisuccinate d'hydrocortisone (25 mg/jour), du rivaroxaban, de l'hydrochlorothiazide, de l'irbésartan, de la lercandipine et du lévothyrox.

Le 19 juillet 2018, Mr A. est trouvé allongé sur le sol de son domicile par sa fille ; il est alors transporté vers l'hôpital le plus proche. Conscient à son arrivée dans le service des urgences, il dit se sentir fatigué, avoir des diarrhées fréquentes mais sans nausées ni vomissements, et ne plus s'être alimenté depuis deux jours. De la fièvre (38,6° C) associée à un taux sérique

élevé (254 mg/L) de protéine C réactive est constatée par le médecin, ainsi qu'une hypotension artérielle (100/65 mmHg), une insuffisance rénale méconnue jusqu'alors (créatininémie = 295 µmol/L ; débit de filtration glomérulaire = 17 mL/min) consécutive à une rhabdomyolyse (taux sérique de créatinine phosphokinase = 12 000 UI/L). Un examen cytobactériologique des urines, des hémocultures et une coproculture sont prescrits par le médecin. Le patient est perfusé par du chlorure de sodium isotonique (2,5 litres) et une antibiothérapie associant la ceftriaxone (1 g), le métronidazole (500 mg) et la gentamicine (6 mg/kg en dose unique) est initiée dans le service des urgences. Le constat d'une oligurie (50 mL d'urines émises en 3 heures, sans obstacle observé par tomo-

¹ Laboratoire Biorylis, Laborizon, 68, boulevard Léon-Martin, 85000 La-Roche-sur-Yon.

densitométrie des voies urinaires) et la persistance d'une hypotension artérielle malgré le remplissage vasculaire conduisent à l'administration de noradrénaline (0,2 µg/kg/min) et au transfert du patient, le jour même, dans l'unité de réanimation médicale du centre hospitalier le plus proche en raison d'une insuffisance rénale aiguë, avec défaillance hémodynamique, dans un contexte de diarrhée fébrile. L'évolution clinique du patient est favorable avec un sevrage progressif de noradrénaline en raison du rétablissement d'une diurèse correcte et de la régression de l'insuffisance rénale. L'administration de ceftriaxone et de métronidazole est arrêtée au cinquième jour de l'hospitalisation après vérification de la négativité des hémocultures et en raison de l'absence d'émission de selles diarrhéiques depuis le début de l'hospitalisation du malade. Le patient sort de l'unité de réanimation médicale le 24 juillet. Finalement, le diagnostic retenu pour expliquer sa chute à son domicile est une hypovolémie consécutive à une débâcle diarrhéique.

À partir des selles (macroscopiquement molles) collectées lors de l'admission du patient à l'hôpital, sont effectuées une coproculture standard et la recherche d'ADN de huit bactéries entéropathogènes : *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* pathovar entéro-invasif (EIEC) / *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Aeromonas* spp. Cette détection par PCR multiplexe en temps réel est réalisée à l'aide du panel *Allplex GI Bacteria I*® selon les recommandations de son fabricant (Seegene-Eurobio) sur la plateforme Nimbus™ Thermocycleur CFX 96. Afin de valider les conditions analytiques de la PCR et de s'assurer de l'absence d'inhibiteurs de la réaction, un fragment du gène codant la bêta-globine (contrôle interne) est co-amplifié pour chaque échantillon de selles. Un signal positif (cycle seuil Ct = 28,31) est décelé pour la cible *Vibrio* spp. Les recherches de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* entéropathogènes et *Campylobacter* spp., par culture des selles sur les milieux gélosés *ad hoc* sont négatives, confirmant ainsi les données précédentes. Compte tenu du résultat obtenu par biologie moléculaire, les vibrions sont recherchés *a posteriori* dans le prélèvement initial. À cette fin, les selles sont cultivées sur une gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) et une gélose de Müller-Hinton et, après incubation des milieux en aérobiose et à 37° C, un dépistage de colonies bactériennes donnant une réaction positive pour l'oxydase est réalisé. De très rares colonies présentant cette caractéristique sont décelées et sont identifiées comme *Vibrio cholerae* par la galerie ID GN Vitek 2. Ce diagnostic est validé par le Centre National de Référence des vibrions et du choléra (responsable : Docteur Marie-Laure Quilici, Institut Pasteur) et la souche isolée des selles de Mr A., n'appartenant ni au séro-groupe O1 ni au séro-groupe O139, est donc un vibron « non cholé-

rique ». Suite à cette donnée microbiologique, l'interrogatoire ultérieur du patient révélera qu'il avait mangé des palourdes, pêchées par son beau-frère, 72 heures avant son hospitalisation.

II. - COMMENTAIRE

Bacilles à Gram négatif de la famille des *Vibrionaceae*, les vibrions sont des hôtes naturels des eaux côtières et estuariennes, et leur nature ainsi que leur densité dans ces environnements varient en fonction de la salinité (halotolérance), de la température et de la concentration en matière organique de ces milieux hydriques. Cent-dix espèces ont été répertoriées, en 2016, dans le genre *Vibrio* (1), mais seulement une douzaine peut être à l'origine d'infections humaines. La plus virulente est *Vibrio cholerae*. Cette espèce, qui s'est adaptée à l'Homme, comprend environ deux cents sérogroupes définis par la nature de la fraction oligosaccharidique (antigène O) du lipopolysaccharide (LPS) de l'enveloppe bactérienne : les sérogroupes O1 et O139, responsables du choléra et les autres sérogroupes, dits non O1 et non O139 et qualifiés de « non cholériques ». Ces derniers vibrions sont susceptibles d'occasionner chez l'Homme principalement une gastro-entérite, mais également des infections cutanées (plaies) et des tissus mous voire une bactériémie, les sujets immunodéprimés et ceux atteints d'une hépatopathie constituant les populations les plus sensibles. Ces vibrioses « non cholériques » surviennent surtout durant les mois chauds de l'année, mais leur incidence humaine en France reste relativement imprécise car ces infections sont sous-diagnostiquées. L'Homme se contamine avant tout lors de la consommation de divers produits de la mer souillés par ces microorganismes, notamment des mollusques bivalves (palourdes, huîtres, pétoncles, moules...) qui ont physiologiquement des capacités élevées de filtration de l'eau de mer. Ces vibrions ne produisent pas, habituellement, les deux attributs essentiels au pouvoir pathogène des vibrions cholériques : le fimbriae TCP (*Toxin-coregulated pilus*) impliqué dans la colonisation bactérienne de l'intestin grêle et l'exotoxine cholérique CT (*cholera toxin*) responsable de la fuite intestinale d'eau et d'électrolytes. En revanche, ils synthétisent d'autres facteurs de virulence, et sécrètent notamment d'autres exotoxines (toxine thermostable NAG-ST, hémolysine, toxine Chx...) (2).

Le diagnostic de vibriose non cholérique est aisé lorsque l'infection se manifeste par une bactériémie ou une infection de plaie car l'hémoculture est communément mono-microbienne, à l'instar, le plus souvent, de la lésion cutanée ; de plus, *V. cholerae* pousse facilement sur des milieux de culture usuels. En revanche, il est difficile en cas de gastro-entérite car *V. cholerae* n'est pas recherchée systématiquement

dans les selles par culture de celles-ci sur un milieu *ad hoc* (thiosulfate citrate bile saccharose (TCBS), CHROMagar Vibrio ou, plus simplement, une gélose nutritive alcaline, moins onéreuse), hormis lors d'une prescription médicale justifiée par des arguments cliniques et épidémiologiques (3). Dans le cas présent, l'étiologie de l'infection intestinale survenue chez Mr A. a été précisée en recourant à un panel de PCR multiplexe (Allplex™ Gastro-intestinal) commercialisé par Seegene-Eurobio. Ce fournisseur propose quatre panels permettant la détection d'agents entéropathogènes viraux (*Norovirus*, *Rotavirus*, *Adenovirus*, *Astrovirus*, *Sapovirus*), parasitaires (*Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Blas-tocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis*, *Cyclospora cayetanensis*) et bactériens (panel Bacteria 1 et 2, pathovars STEC, EPEC, ETEC, EAEC, EIEC de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Clostridium difficile*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica* et *Aeromonas* spp.) Une telle approche diagnostique à l'aide de panels, modulaires ou non, est en pleine expansion (4-11) et elle peut permettre d'établir en quelques heures (5 heures, au plus) la nature de l'agent responsable d'une gastro-entérite, guidant ainsi rapidement le clinicien dans sa prise en charge d'un patient. Automatisée (totalement ou partiellement), très sensible comparée aux méthodes micro-

biologiques conventionnelles, cette approche révèle souvent des co-infections digestives. Dans la présente observation, seul un panel bactérien a été utilisé et l'hypothèse d'une co-infection, notamment par un virus (en particulier par un *Norovirus*) ne peut pas être exclue eu égard à la fréquente contamination virale des mollusques bivalves (12).

III. - CONCLUSION

Les gastro-entérites dues à des vibrions non cholériques sont sous-estimées en France car l'analyse bactériologique réalisée lors d'une coproculture standard ne permet pas leur diagnostic en l'absence d'éléments cliniques spécifiques conduisant à leur recherche. L'accroissement de la fréquence de ces vibrioses est probable à l'avenir, en raison d'une part du réchauffement climatique susceptible de retentir sur les concentrations marines des populations de vibrions et d'autre part, de l'évolution de nos habitudes alimentaires. Dans la présente observation, la PCR multiplexe a été déterminante pour établir l'étiologie du choc hypovolémique survenu chez Mr A.

CONFLIT D'INTÉRÊT : aucun.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Euzéby JP. Genus *Vibrio*. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (<http://www.bacterio.net/vibrio.html>).
- (2) Quilici ML, Robert-Pillot A. *Vibrio*. In Précis de Bactériologie Clinique (3^e édition), J. Freney & P. Riegel (Eds). Editions ESKA, Paris ; 2018 : 1066-91.
- (3) Denis F, Ploy MC, Martin C, Cattoir V. Bactériologie médicale - techniques usuelles, 3^e édition. Elsevier Masson, Issy-les-Moulineaux ; 2016 : 600 pages.
- (4) Zhang H, Morrison S, Tang YW. Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clin Lab Med* 2015 ; **35** (2) : 461-86.
- (5) Rintala A, Munukka E, Weintraub A, Ullberg M, Eerola E. Evaluation of a multiplex real-time PCR kit Amplidiag® Bacterial GE in the detection of bacterial pathogens from stool samples. *J Microbiol Methods* 2016 ; **128** : 61-5.
- (6) Piralla A, Lunghi G, Ardissino G, Girello A, Premoli M, Bava E, et al. FilmArray™ GI panel performance for the diagnosis of acute gastroenteritis or hemorrhagic diarrhea. *BMC Microbiol* 2017 ; **17** (1) : 111.
- (7) Simner PJ, Oethinger M, Stellrecht KA, Pillai DR, Yogev R, Leblond H, et al. Multisite evaluation of the BD Max Extended Enteric Bacterial Panel for detection of *Yersinia enterocolitica*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vibrio*, and *Plesiomonas shigelloides* from stool specimens. *J Clin Microbiol* 2017 ; **55** (11) : 3258-66.
- (8) Amrud K, Slinger R, Sant N, Desjardins M, Toye B. A comparison of the Allplex™ bacterial and viral assays to conventional methods for detection of gastroenteritis agents. *BMC Res Notes* 2018 ; **11** (1) : 514.
- (9) Calderaro A, Martinelli M, Buttrini M, Montecchini S, Covan S, Rossi S, et al. Contribution of the FilmArray® Gastrointestinal Panel in the laboratory diagnosis of gastroenteritis in a cohort of children: a two-year prospective study. *Int J Med Microbiol* 2018 ; **308** (5) : 514-21.
- (10) Huang SH, Lin YF, Tsai MH, Yang S, Liao ML, Chao SW, et al. Detection of common diarrhea-causing pathogens in Northern Taiwan by multiplex polymerase chain reaction. *Medicine (Baltimore)* 2018 ; **97** (23) : e11006.
- (11) Martín A, Pérez-Ayala A, Chaves F, Lora D, Orellana MÁ. Evaluation of the multiplex PCR Allplex-GI assay in the detection of bacterial pathogens in diarrheic stool samples. *J Microbiol Methods* 2018 ; **144** : 33-6.
- (12) Romalde JL, Rivadulla E, Varela MF, Barja JL. An overview of 20 years of studies on the prevalence of human enteric viruses in shellfish from Galicia, Spain. *J Appl Microbiol* 2018 ; **124** (4) : 943-57.