



PCR multiplexe digestive en ville: trop d'info tue l'info?

Dr Bruno Delpéuch – Laboratoire Biogroup - Médipôle

Dr Emmanuel Forestier - Service de Maladies infectieuses - CHMS



Votre laboratoire innove et met en place la PCR MULTIPLEXE en temps réel

Recherche de *Salmonella spp*, *Shigella spp* / EIEC, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter spp*, *Vibrio spp*, *Clostridium difficile* toxine B et *Aeromonas spp*.

Recherche de PROTOZOAIRES :

Giardia intestinalis, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp*, *Blastocystis hominis*, *Dientamoeba fragilis* et *Cyclospora cayetanensis*.

Recherche d'HELMINTHES et de MICROSPORIDIES :

Strongyloides spp, *Hymenolepis spp*, *Ascaris spp*, *Taenia spp*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma spp*, *Enterobius vermicularis* (oxyure), *Necator americanus* et, *Enterocytozoon spp* / *Encephalitozoon spp*.





Cas clinique 1

- **Me Eva Drouille, 26 ans**
- **Pas d'antécédent**
- **Rentrée il y a 2 jours d'un road trip de 3 mois en Asie du Sud-Est.**
- **Il y a 1 mois, épisode de gastroentérite aiguë avec fièvre et diarrhée aqueuse ayant duré 24 heures. Amélioration spontanée pendant quelques jours, puis réapparition de douleurs abdominales modérées avec diarrhée non sanglante (4 à 5 selles par jour) et sans fièvre. Amaigrissement de 4kg en 1 mois. Elle a pris 4cp d'azithromycine en une prise, sans effet.**
- **Examen clinique normal**



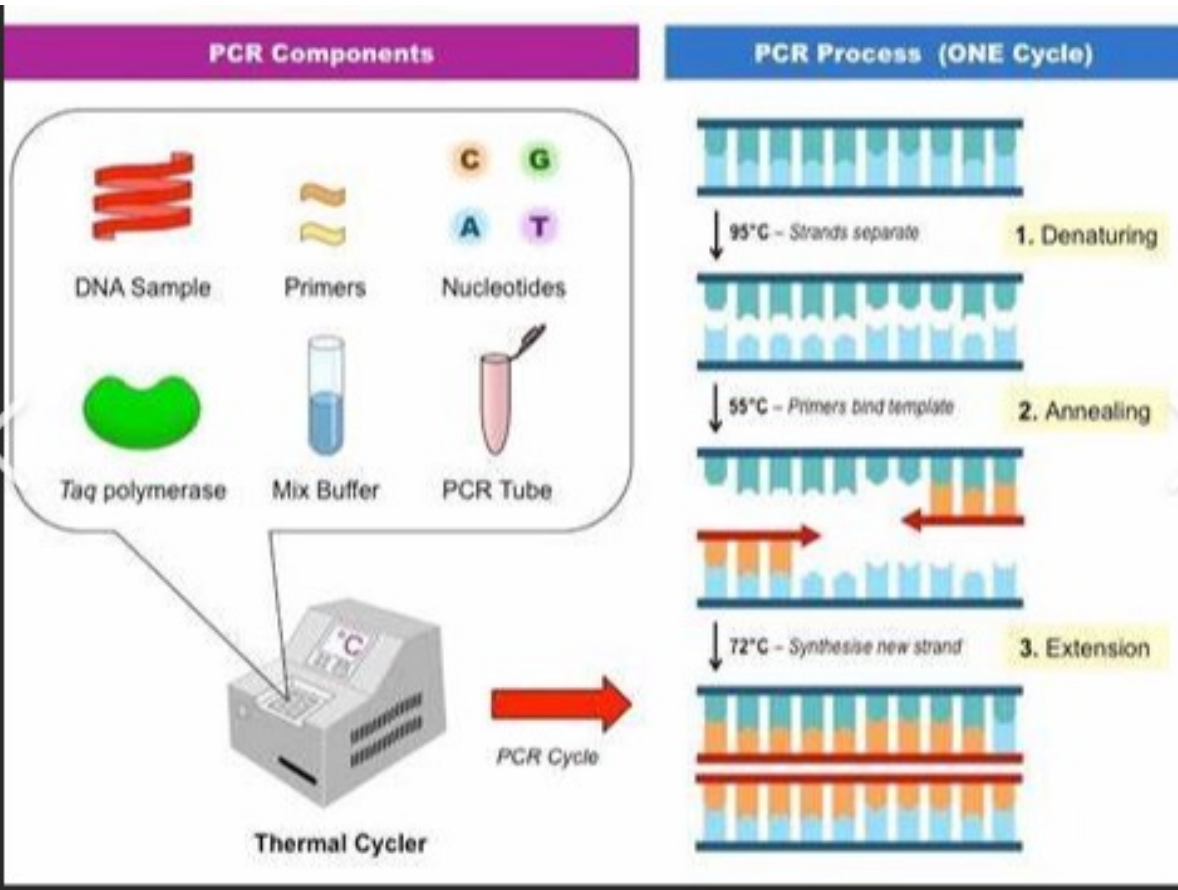
- **Mr Andréa Stenick, 47 ans**
- **Antécédent d'asthme d'effort et de fibromyalgie**
- **Depuis 3 ans, douleurs abdominales occasionnelles et dyspepsie, avec parfois des selles liquides 2 à 3 fois dans une journée. Pas de perte de poids. Il n'a jamais séjourné en zone tropicale, mais dit que la symptomatologie s'est nettement majorée depuis qu'il a pris un traitement par AUGMENTIN® pour une bronchite il y a 3 mois.**
- **Examen clinique normal**



Comment analyser la microbiologie des selles de ces patients?

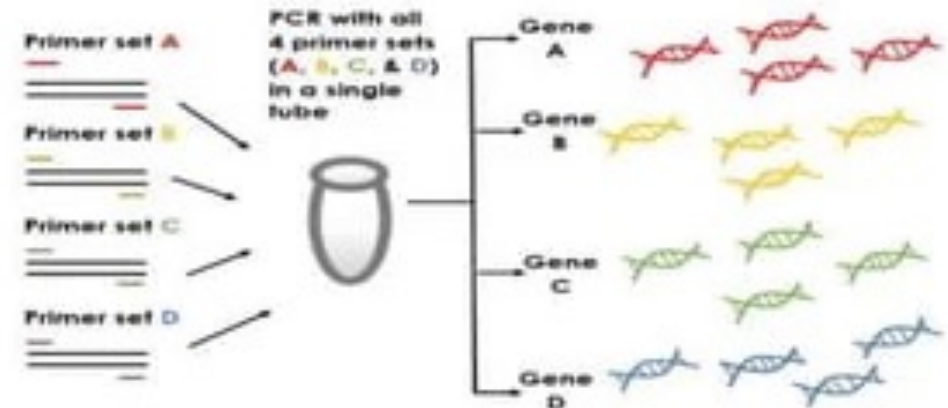


PCR MULTIPLEXE : PRINCIPE



MULTIPLEX PCR

- Uses more than one pair of primers.
- Amplification of many targets in one reaction.



PCR MULTIPLEXES EN LABORATOIRE DE VILLE

- **Dépistage des IST** : PCR MULTIPLEXE *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* et *Trichomonas vaginalis*
Prélèvement vaginal, prélèvement urétral, 1^{er} jet urine (*Chlamydia* + gono inclus mais mycoplasmes sur prescription explicite)
- **Coproculture** : PCR MULTIPLEXE *Salmonella* sp, *Shigella* sp/*E coli* enteroinvasif, *Campylobacter* sp, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas* sp, *Vibrio* (*cholerae*, *parahaemolyticus* ou *vulnificus*), *Clostridium difficile* (sur prescription explicite) + CULTURE (1 milieu non spécifique +/- milieux spécifiques si PCR +)
- **Virologie des selles (sur prescription explicite)** : PCR MULTIPLEXE *Norovirus GI et GII*, *Rotavirus A*, *Adénovirus F*, *Astrovirus*, *Sapovirus*
- **Parasitologie des selles (3 FOIS)** : PCR MULTIPLEXE *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* sp, *Dientamoeba fragilis*, *Cyclospora cayentanensis* + ENRICHISSEMENT recherche protozoaire (formes végétatives et kystes), helminthes (œufs, larves...)

EXAMEN MICROBIOLOGIQUE

EXAMEN MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE D'UNE SELLE

Prélèvement transmis au laboratoire

Examen macroscopique :

Aspect des selles :

Moulées
Absence de parasites**Examen microscopique :**Absence de leucocytes
Absence d'hématies**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE D'UNE SELLE****Recherche de bactéries pathogènes par amplification génique**

GI-Bacteria(I) Assay, Allplex Seegene: test d'amplification génique par PCR en temps réel

Salmonella sp. :	Recherche négative
Shigella sp. / E.coli entéroinvasif :	Recherche négative
Campylobacter sp. :	Recherche négative
Yersinia enterocolitica :	Recherche négative
Aeromonas sp. :	Recherche négative
Vibrio (cholerae, parahaemolyticus ou vulnificus) :	Recherche négative

Recherche de germes pathogènes par culturesMilieux d'isolement et d'enrichissement Biomérieux ;
Identification bactérienne par Spectrométrie de masse

Culture :	Flore saprophyte sans prédominance
-----------	------------------------------------

EXAMEN MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE D'UNE SELLE

Prélèvement transmis au laboratoire

Examen macroscopique :

Aspect des selles :

Moulées

Examen microscopique :Absence de leucocytes
Absence d'hématies**EXAMEN BACTERIOLOGIQUE D'UNE SELLE****Recherche de bactéries pathogènes par amplification génique**

GI-Bacteria(I) Assay, Allplex Seegene: test d'amplification génique par PCR en temps réel

Salmonella sp. :	Recherche négative
Shigella sp. / E.coli entéroinvasif :	Recherche négative
Campylobacter sp. :	Recherche positive

Détection de Campylobacter. La détection du gène d'une bactérie en PCR ne préjuge pas de sa viabilité. Résultat à confronter au contexte clinique.

Molécules recommandées pour le traitement antibiotique : Azithromycine (sensibilité déduite de celle de l'érythromycine)

Alternative : Ciprofloxacine

Dans tous les cas le traitement devra être instauré par le prescripteur qui tiendra compte des contre-indications et complications éventuelles.

CMIT. Diarrhée aiguë chez l'enfant et chez l'adulte. Maladies Infectieuses et Tropicales. E. PILLY, 2018.

Yersinia enterocolitica :	Recherche négative
Aeromonas sp. :	Recherche négative
Vibrio (cholerae, parahaemolyticus ou vulnificus) :	Recherche négative
Toxine B de Clostridium difficile :	Recherche négative

EXAMEN MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE D'UNE SELLE

Prélèvement transmis au laboratoire

Examen macroscopique :

Aspect des selles : Glaireuses

Examen microscopique :

Absence de leucocytes
Absence d'hématies

EXAMEN BACTERIOLOGIQUE D'UNE SELLE

Recherche de bactéries pathogènes par amplification génique

GI-Bacteria(I) Assay, Allplex Seegene: test d'amplification génique par PCR en temps réel

Salmonella sp. :	Recherche négative
Shigella sp. / E.coli entéroinvasif :	Recherche négative
Campylobacter sp. :	Recherche négative
Yersinia enterocolitica :	Recherche négative
Aeromonas sp. :	Recherche négative
Vibrio (cholerae, parahaemolyticus ou vulnificus) :	Recherche négative
Toxine B de Clostridium difficile :	Recherche positive

La PCR a permis de mettre en évidence la présence de toxine B de C. difficile. Cette toxine peut être responsable de diarrhée post-antibiotique voire de colite pseudomembraneuse chez l'adulte. A confronter au contexte clinique.
Chez le jeune enfant un portage sain de souches mêmes toxigènes reste possible.

Recherche de germes pathogènes par cultures

Milieux d'isolement et d'enrichissement Biomérieux ;
Identification bactérienne par Spectrométrie de masse

Culture : Flore saprophyte sans prédominance

VIROLOGIE DES SELLES

Test GI virus, Allplex Seegene, test d'amplification génique par PCR en temps réel

Norovirus GI (NVG1) :	Négative
Norovirus GII (NVG2) :	Négative
Rotavirus A (ROV) :	Recherche positive
Adénovirus F (ADV-F;Sérotypage 40/41) :	Négative
Astrovirus (ASV) :	Négative
Sapovirus (SV;Génogroupes G1,2,4) :	Négative

VIROLOGIE DES SELLES

Test GI virus, Allplex Seegene, test d'amplification génique par PCR en temps réel

Norovirus GI (NVG1) :	Négative
Norovirus GII (NVG2) :	Négative
Rotavirus A (ROV) :	Recherche positive
Adénovirus F (ADV-F;Sérotypage 40/41) :	Négative
Astrovirus (ASV) :	Négative
Sapovirus (SV;Génogroupes G1,2,4) :	Négative

VIROLOGIE DES SELLES

Test GI virus, Allplex Seegene, test d'amplification génique par PCR en temps réel

Norovirus GI (NVG1) :	Négative
Norovirus GII (NVG2) :	Recherche positive
Rotavirus A (ROV) :	Négative
Adénovirus F (ADV-F;Sérotypage 40/41) :	Négative
Astrovirus (ASV) :	Négative
Sapovirus (SV;Génogroupes G1,2,4) :	Négative

EXAMEN PARASITOLOGIQUE DES SELLES

Il est recommandé d'effectuer au moins 3 recherches sur 3 selles prélevées à quelques jours d'intervalle. Recommandation pour la pratique clinique : "Indication des examens de selles chez l'adulte".

Recherche de parasites par amplification génique

GI-Parasite(I) Assay, Allplex Seegene: test d'amplification génique par PCR en temps réel

Recherche de Giardia intestinalis :	Recherche négative
Recherche d'Entamoeba histolytica :	Recherche négative
Recherche de Cryptosporidium sp. :	Recherche négative
Recherche de Blastocystis hominis :	Recherche positive

~~Blastocystis hominis est un organisme intestinal fréquent et cosmopolite, dont la pathogénicité est controversée, elle doit être évoquée après élimination des autres causes de troubles digestifs.~~

~~Blastocystis hominis peut être responsable de diarrhée et de douleurs abdominales.~~

~~Dans tous les cas, le traitement devra être institué par le prescripteur, qui tiendra compte des contre-indications et des complications éventuelles.~~

~~Traitement éventuellement suivant le contexte clinique, en cas d'absence d'amélioration spontanée des signes digestifs et/ou en cas d'absence d'autres pathogènes dans les selles : Métronidazole~~

~~Refaire des examens parasitologiques des selles espacés de 72 heures chacun, pour rechercher un autre parasite pathogène
Source : P.Bovier Rev Med Suisse 2014.~~

Recherche de Dientamoeba fragilis :	Recherche négative
Recherche de Cyclospora cayetanensis :	Recherche négative

Examen microscopique

Recherche de protozoaires :	Absence de formes végétatives et de kystes
Recherche d'helminthes :	Absence d'oeufs et de larves d'helminthes

Examen microscopique après concentration

Technique Midi Parasep SF SafEFix EUROBIO

Recherche de protozoaires :	Absence de kystes
-----------------------------	-------------------

Recherche d'helminthes :	Absence d'oeufs d'helminthes
Commentaire :	Absence de parasite dans les selles

EXAMEN PARASITOLOGIQUE DES SELLES

Il est recommandé d'effectuer au moins 3 recherches sur 3 selles prélevées à quelques jours d'intervalle. Recommandation pour la pratique clinique : "Indication des examens de selles chez l'adulte".

Recherche de parasites par amplification génique

GI-Parasite(I) Assay, Allplex Seegene: test d'amplification génique par PCR en temps réel

Recherche de Giardia intestinalis :	Recherche négative
Recherche d'Entamoeba histolytica :	Recherche négative
Recherche de Cryptosporidium sp. :	Recherche négative
Recherche de Blastocystis hominis :	Recherche positive

~~Blastocystis hominis est un organisme intestinal fréquent et cosmopolite, dont la pathogénicité est controversée, elle doit être évoquée après élimination des autres causes de troubles digestifs.~~

Recherche de Dientamoeba fragilis :	Recherche positive
-------------------------------------	---------------------------

~~Dientamoeba fragilis est un parasite intestinal cosmopolite, pouvant être responsable, en particulier chez l'enfant, de troubles digestifs : diarrhée modérée, douleurs abdominales, nausées et vomissements.~~

Recherche de Cyclospora cayetanensis :	Recherche négative
--	--------------------

Examen microscopique

Recherche de protozoaires :	Absence de formes végétatives et de kystes
Recherche d'helminthes :	Absence d'oeufs et de larves d'helminthes

Examen microscopique après concentration

Technique Midi Parasep SF SafEFix EUROBIO

Recherche de protozoaires :	Absence de kystes
-----------------------------	-------------------

Recherche d'helminthes :	Absence d'oeufs d'helminthes
Commentaire :	Absence de parasite dans les selles

CONTEXTE

Les agents responsables de diarrhées sont nombreux.

Les méthodes de diagnostic conventionnelles (culture ou microscopie) sont longues et peu sensibles.

Les PCR multiplexes révolutionnent ces analyses de laboratoire.

PCR =
technique de biologie moléculaire (Polymerase Chain Reaction)

Multiplexe =
Détection simultanée de plusieurs agents pathogènes

AVANTAGES DES PCR MULTIPLEXES Par rapport aux méthodes conventionnelles (microscopie et culture).

- Large panel de pathogènes identifiés en une seule fois :

Bactéries

Campylobacter sp
Salmonella sp
Shigella sp
Aeromonas sp
Vibrio sp
Yersinia enterocolitica
E. coli entero-invasif
Clostridium difficile (gène toxine B)

Parasites

Giardia intestinalis
Entamoeba histolytica
Cryptosporidium sp
Blastocystis hominis
Dientamoeba fragilis
Cyclospora cayetanensis

- Meilleure sensibilité :

PCR Multiplexe vs Culture [1,2] : 100% vs 78.3%

PCR Multiplexe vs Microscopie [3] : 39.33% vs 5.43%

- Spécificité équivalente [1,2,3].

- Très rapide :

PCR Multiplexe

Résultats à J1

95% des échantillons :
- PCR NEG
- PCR parasito
- PCR *Campylobacter*
- Autres PCR bactériennes POS (résultats partiels)

Résultats à J2

Microscopie parasitaire

Résultats à J3

5% des échantillons :
Antibiogramme :
- *Salmonelles*, *Shigelles*, *Yersinia*

Techniques traditionnelles parasitologiques

Techniques traditionnelles bactériennes

Culture avec antibiogramme

- Diagnostic possible malgré un traitement en cours.

LIMITE DES PCR MULTIPLEXES

Détection d'organisme non viable

Détection d'organisme en portage : *C. difficile* est isolé dans près de 60% des cas chez les enfants de moins de 2 ans, sans être pathogène.

Non exhaustivité : De rares agents pathogènes ne sont pas détectés. Un résultat négatif n'exclut pas l'infection.

- Pour les bactéries : *Plesiomonas shigelloides*, *Klebsiella oxytoca* (colite post-antibiotique uniquement).

- Pour les parasites : Les helminthes (Oxyures, Ascaris, Taenia, Bilharziose) nécessitent la microscopie.

Pas d'étude des sensibilités aux antibiotiques :

À compter de mars 2019, certaines PCR réalisées au laboratoire Ketterhill détecteront la présence de gènes de résistance en orientant la prise en charge thérapeutique dès J0 (PCR *Helicobacter pylori* et gène de la résistance à la clarithromycine.)

CONSÉQUENCES

Toujours interpréter les résultats en fonction du contexte clinique, l'aspect de la selle, la présence de leucocytes et érythrocytes.

Les pathogènes rares sont recherchés éventuellement en 2^o intention sur prescription motivée.

Les renseignements cliniques sont indispensables pour orienter la recherche microscopique.

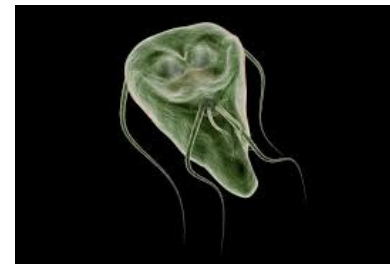
Une PCR positive entraîne la culture en vue de la réalisation d'un antibiogramme (à condition que la souche soit viable, et exception faite des *Campylobacter* sp : traitement par azithromycine ou érythromycine ou association amoxicilline-acide clavulanique).

- Des situations où la PCR apportent un avantage indéniable:
 - **Meilleure sensibilité**
 - Germes difficiles à identifier (protozoaires, virus)



Eva

- . Coproculture et parasitologie des selles négatives
- . PCR multiplexe: *Giardia intestinalis*
- . Traitement par métronidazole 500mgx3/j 10 jours
- Guérison



- Des situations où la PCR apportent un avantage indéniable:
 - **Réponse rapide**
 - Diarrhée avec signe de gravité
 - Contexte épidémiologique particulier (établissement de santé notamment)

Clinical impact of syndromic molecular point-of-care testing for gastrointestinal pathogens in adults hospitalised with suspected gastroenteritis (GastroPOC): a pragmatic, open-label, randomised controlled trial

Nathan J Brendish, Kate R Beard, Ahalya K Malachira, Alex R Tanner, Langizya Sanga-Nyirongo, Markus Gwiggner, J R Fraser Cummings, Helen E Moyses, Tristan W Clark

Lancet Infect Dis 2023;
23: 945-55

	Molecular point-of-care testing group (n=137)	Control group (n=140)	Exponentiated coefficient comparing mPOCT with control*
All patients, days	1.8 (1.5-2.2)	2.6 (2.2-3.0)	0.70 (0.56-0.87), p=0.0017
Patients with pathogen detected, days	2.8 (2.1-3.5)	2.9 (2.2-3.9)	0.94 (0.64-1.39), p=0.76
Patients with no pathogen detected, days	1.3 (1.0-1.6)	2.5 (2.1-2.9)	0.51 (0.39-0.67), p<0.0001

Data are geometric mean (95% CI). Time in a side room log-transformed for analysis. Pathogen testing in the control group was by laboratory testing. *The interpretation of the exponentiated coefficient is that the time in a single-occupancy room was reduced by 30% in the intervention group ($100 \times [1 - 0.70]$) for all patients.

Table 2: Duration of time in single-occupancy rooms for all patients, and by pathogen detection status

- Des situations où le résultat de la PCR doit être interprété avec grande prudence et de ne pas entraîner automatiquement une antibiothérapie:
 - **Diarrhée aigue avec PCR très précoce**

Clinical impact of syndromic molecular point-of-care testing for gastrointestinal pathogens in adults hospitalised with suspected gastroenteritis (GastroPOC): a pragmatic, open-label, randomised controlled trial

Nathan J Brendish, Kate R Beard, Ahalya K Malachira, Alex R Tanner, Langizya Sanga-Nyirongo, Markus Gwiggner, J R Fraser Cummings, Helen E Moyses, Tristan W Clark

Lancet Infect Dis 2023;
23: 945-55

	Molecular point-of-care testing group (n=137)	Control group (n=140)	Absolute difference (95% CI)	p value
Antibiotics received	89 (65%)	66 (47%)	18% (6 to 29)	0.0028
Number of agents used per patient	2 (1 to 3)	2 (1 to 3)	0 (-0.9 to 0.9)	1.0
Duration of all antibiotics, days	5.0 (2.0 to 8.3)	5.4 (1.9 to 7.3)	-0.4 (-2.1 to 1.3)	0.63
Received intravenous antibiotics	53 (39%)	46 (33%)	6% (-5 to 17)	0.31
Duration of intravenous antibiotics, days	2.1 (0.1 to 5.0)	2.0 (0.6 to 4.9)	0.1 (-1.9 to 2.0)	0.93
Received inappropriate antibiotics	34/89 (38%)	35/66 (53%)	-15% (-31 to 0.9)	0.066
Duration of inappropriate antibiotics, days	0.5 (0.04 to 1.8)	4.2 (0.7 to 6.5)	-3.7 (-5.6 to -1.9)	0.0002

Data are n (%), n/N (%), or median (IQR).

Table 4: Antibiotic use

- Des situations où le résultat de la PCR doit être interprété avec grande prudence et de ne pas entraîner automatiquement une antibiothérapie:
 - **Identification de germes peu ou pas pathogènes**



Andréa

- . Coproculture et parasitologie des selles négatives
- . PCR multiplexe: *Blastocystis hominis* et *Dientamoeba fragilis*
- . Traitement par métronidazole 10 jours à 2 reprises, puis cotrimoxazole 10 jours sans effet
- . Adressé en consultation d'infectiologie: diagnostic de troubles somatiques fonctionnels

Focus sur *B. hominis* et *D. fragilis*

- Protozoaires
- Ubiquitaires et fréquents
 - **Bh 26,6% et Df 18,7% des voyageurs avec symptômes digestifs persistants**

Gefen-Alevi J Travel Med 2022

- Pathogénicité très incertaine
 - **Troubles digestifs persistants du voyageur?**
 - **Colopathie fonctionnelle?**

Rostami Parasitol Res 2017

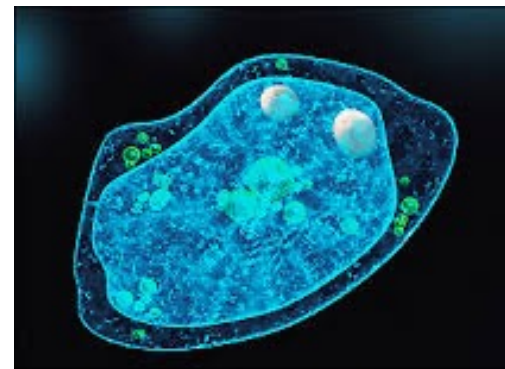
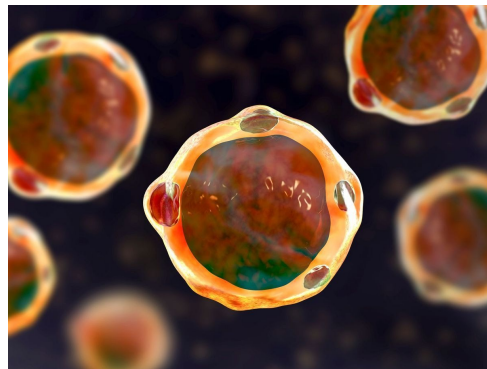
- **Microbiome d'un intestin « en bonne santé »?**

Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* species in gastroenteritis: results from a case-control study

Dullaert-De Boer E J Clin Microb Infect Dis 2019

		Prevalence in cases	Prevalence in controls	OR (95% CI)	P value
a. <i>D. fragilis</i>					
Overall	Unadjusted	354/1374** (25.8)	386/1026*** (37.6)	0.58 (0.48–0.69)	< 0.001
	Adjusted*			0.55 (0.46–0.66)	< 0.001
b. <i>Blastocystis</i>					
Overall	Unadjusted	355/1374** (25.8)	410/1026*** (40.0)	0.52 (0.44–0.62)	< 0.001
	Adjusted*			0.50 (0.42–0.60)	< 0.001

- **Conduite à tenir**
 - **Pas de traitement antibiotique en première intention**
 - **Antibiothérapie seulement si pas d'autre explication retrouvée à une symptomatologie digestive franche:**
 - Métronidazole 500mgx3/j PO 10 j
 - Alternative: Cotrimoxazole
 - **Avis spécialisé si échec ou récurrence**



- **Apport certain de la PCR multiplexe en terme de sensibilité, spécificité et rapidité du rendu des résultats**
- **Détection ≠ infection**
- **Indications possibles en médecine de ville**
 - **Diarrhée aiguë**
 - Si signes de gravité
 - Si persistance plus de 7 jours et/ou après antibiothérapie probabiliste par azithromycine (retour de voyage +++)
 - Si forte suspicion de colite à *Clostridium difficile*
 - **Diarrhée chronique**
 - Patient lourdement immunodéprimé
- **Ne pas oublier les diagnostics différentiels non infectiologiques**