

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenu publiquement le 22 octobre 2021  
Par M. COGET Maël**

---

**EVALUATION DES PERFORMANCES DU BD MAX™ ENTERIC  
BACTERIAL PANEL POUR LA PRISE EN CHARGE DES DIARRHEES  
INFECTIEUSES AIGUËS AU CH DE TOURCOING**

---

**Membres du jury :**

- Président :** M. le Professeur FOLIGNÉ Benoît  
Professeur des Universités, Université de Lille
- Directeur de thèse :** M. le Docteur BLONDIAUX Nicolas  
Maître de conférences des Universités, Université de Lille  
Pharmacien Praticien hospitalier, CH de Tourcoing
- Asseseurs :** M. le Docteur PATOZ Pierre  
Pharmacien Praticien hospitalier, CH de Tourcoing
- M. le Docteur ROBINEAU Olivier  
Maître de conférences des Universités, Université de Lille  
Médecin Praticien hospitalier, CH de Tourcoing





## Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL

M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle

M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

## Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques

M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques

M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
-----	-------	---------	---

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



# REMERCIEMENTS

**A mon président de jury,**

**Monsieur le Professeur Benoît FOLIGNE**  
*Professeur des Universités-Bactériologie et virologie*

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse, je vous en remercie. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**A mes assesseurs,**

**Monsieur le Docteur Olivier ROBINEAU**  
*Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier*  
*Service Universitaire des Maladies Infectieuses et du Voyageur-CH Dron*  
*Université de Lille*

Je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et d'avoir pris le temps de m'aiguiller et conseiller durant cette thèse. Je vous en suis profondément reconnaissant.

**Monsieur le Docteur Pierre PATOZ**  
*Chef de service du Laboratoire de biologie médicale du CH de Tourcoing*  
*Praticien Hospitalier-CH de Tourcoing*

C'est avec une grande bienveillance que tu m'as accueilli dans ton service où je m'y suis très vite senti intégré. Je te remercie pour la qualité de la formation, lors de mon passage dans ton laboratoire. C'est pourquoi je me réjouis de ta participation à ce jury, et te suis très reconnaissant d'évaluer ce travail.

**A mon directeur de thèse,**

**Monsieur le Docteur Nicolas BLONDIAUX**  
*Maître de Conférences des Universités-Université de Lille*  
*Praticien Hospitalier-CH de Tourcoing*

Je tiens à te remercier tout d'abord pour le semestre passé à tes côtés, de par tes enseignements en microbiologie, tu m'as donné l'envie de poursuivre dans ce domaine. Je tiens également à t'exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce travail. Tu as su te rendre disponible, à l'écoute et patient. Travailler avec toi fut un réel plaisir. Sois assuré de mes remerciements les plus sincères et de mon profond respect.

## **Je tiens également à remercier,**

Toute l'équipe du laboratoire du CH de Béthune, pour avoir accueilli un sudiste perdu dans le Grand Nord. Merci à tous les biologistes qui m'ont immédiatement intégré, et m'ont beaucoup appris. Je remercie tout particulièrement Marie-Hélène qui m'a encadré tout au long de ce stage.

Toute l'équipe du service de Bactériologie du CHU de Lille, pour ce premier pas dans ce domaine qui me passionne. Je remercie tous les techniciens qui ont contribué à ma formation, notamment Vanessa.

Toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille, notamment Elise et Adelaïde et tous les biologistes d'Hémostase. Merci également aux équipes des services d'Immunologie et de Parasitologie.

Un immense merci à toute l'équipe du laboratoire du CH de Tourcoing, c'est un réel plaisir de tous vous voir à chacun de mes passages. Je remercie tous les biologistes : Pierre, Nicolas, François, Gabrielle, Evelyne et Claire, j'ai énormément appris grâce à vous durant mon stage. Merci à Mohamed pour ta bonne humeur, que tu gardes même pendant les coupures Glim's. Merci à Mathilde qui a dû contacter le service client BD de trop nombreuses fois par ma faute. Merci à tout le monde : Vilay, Sofo, Blandine, Sylvia, Queen A et tous les autres.

## **Je souhaite dédier ce travail,**

### A ma famille,

A mes parents, pour m'avoir donné toutes les chances de réussir. Merci pour m'avoir toujours encouragé et soutenu dans tout ce que j'ai entrepris, même lorsque j'ai décidé de partir loin, dans le pays de la bière et du maroilles. Merci pour tout.

A mes frères, Arthur et Aloïs, merci pour votre soutien en toute circonstance. Très heureux qu'on soit tous les trois réunis dans le Ch'Nord pour ma soutenance ! Je pense aussi à ma belle-sœur, Chloé, qui m'a connu petit collégien, portant des Vans bien trop grandes.

A mes neveux, Jeanne et Léon, qui me manquent beaucoup, je suis toujours très heureux de vous retrouver.

A tout le reste de ma famille, merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces années d'études.

### A mes amis,

Mes meilleurs amis, le Noyau : Jojo, Lia (Véro), Nono, Maëlle, Marion et Maëva. Pour tous ces moments incroyables passés ensemble, et ceux à venir. Je pense bien sûr aussi aux pièces rapportées au fil des années : Victor, Thibaut, Baptiste et tous les autres.

Thymèle, pour ces années pharma ensemble, qui sont passées très vite à tes côtés. Val, je serai toujours le beau-fils préféré de Benoite.

Tony Bae, j'attends avec impatience nos prochaines vacances, peut-être seront-elles enfin réussies.

Sara, pour toutes ces semaines de révisions intenses, l'un sans l'autre on n'aurait probablement pas passé la deuxième année, ni la première saison de Face Off.

Toute la team Pharma montpelliéraine : Popo, Capucine, Minidrey, Najah, Damien, Guillaume, Indixxx, Bertrand, Laura et Basma, merci pour toutes les soirées mémorables. Spéciale dédicace à Aurore, même exilés de l'ensemble des TPs, on restait le meilleur binôme.

Les amis du lycée : Neela, Olivia, Gaël et Oriane. 8 ans plus tard vous avez encore des potins à partager sur nos anciens camarades.

Gatinou, le plus ch'ti des Normands, Kitty Love et Benkhe, pour tous ces moments passés ensemble, vous avez rendus ces années d'internat inoubliable.

Le meilleur des colocs, Quentin, qui même après m'avoir vu dans les pyjamas les plus moches, ne s'est pas encore enfui.

La Roynard, la troisième colocataire, merci pour les nombreux fou-rires (souvent à ton insu je l'avoue).

Djeffrey, le duc de Calais, c'est toujours un plaisir de t'accueillir à la maison, ne t'inquiète pas le prochain week-end arrive vite.

Martinou, la première personne que j'ai rencontré à Lille (et la meilleure ?), je serai le premier à acheter ton autobiographie !

Clara et Camille, merci d'avoir supporté mes élans dramatiques tout au long de ce stage.

Maman Tinez, tu l'auras sûrement compris, je te suis dans chacun de mes stages, je te serai donc reconnaissant de travailler dans un endroit plus ensoleillé.

Mes co-internes d'Immunologie : Benjamin le curieux, Dr Carrettu, Doriane, Claire et Gatien, j'ai passé un semestre incroyable avec vous.

Mes co-internes : Thibault, Mika, Ambroisito, Axelito, Alice et Alex, on est sans aucun doute la meilleure des promos !

La team Internium dont Gaucher et La Ride, vivement la prochaine édition !



# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	27
<b>GÉNÉRALITÉS</b> .....	29
I-Définition.....	29
II-Mécanismes physiopathologiques.....	29
III-Epidémiologie.....	31
1-Etiologies bactériennes .....	33
a. <i>Campylobacter</i> spp.....	33
b. <i>Salmonella</i> spp. ....	35
c. <i>Shigella</i> spp.....	39
d. <i>Yersinia</i> spp.....	41
e. <i>Vibrio</i> spp.....	44
f. <i>Plesiomonas shigelloides</i> .....	48
g. <i>Escherichia coli</i> .....	49
<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (ETEC) .....	50
<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène (EPEC).....	50
<i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragique (EHEC)/ <i>Escherichia coli</i> producteurs de Shiga toxines (STEC).....	51
<i>Escherichia coli</i> entero-agrégatif (ECEAgg).....	52
<i>Escherichia coli</i> entero-invasif (EIEC).....	53
<i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (ECAD).....	54
2- Autres étiologies bactériennes.....	55
a. <i>Clostridioides difficile</i> .....	55
b. <i>Aeromonas</i> spp.....	55
c. <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	55
d. TIAC.....	56
3- Etiologies virales et parasitaires.....	56
IV-Diagnostic .....	57
1- Diagnostic clinique .....	57
2- Diagnostic biologique .....	57
a. Aspect macroscopique des selles.....	58
b. Microscopie .....	59
c. Coproculture.....	59
d. Biologie moléculaire .....	59
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	61
I-Modalités de l'étude .....	61
1- Sélection des échantillons .....	61

2-	Le prélèvement.....	61
3-	Conservation des échantillons .....	61
II-	Recueil de données .....	61
III-	Coproculture .....	62
1-	Nomenclature.....	62
2-	Aspect macroscopique .....	62
3-	Mise en culture / Ensemencement .....	62
4-	Lecture des milieux de cultures.....	63
5-	Identification .....	66
6-	Rendu des résultats .....	66
IV-	BD MAX™ Enteric Bacterial Panel .....	66
1-	Cibles .....	66
2-	Préparation de l'échantillon .....	67
3-	Utilisation du BD MAX system.....	67
4-	PCR en temps réel .....	68
5-	Interprétation et présentation des résultats du BD Max System .....	69
6-	Invalide et relance .....	70
7-	Validation et rendu des résultats .....	70
<b>RESULTATS</b>	.....	<b>71</b>
I-	Caractéristiques démographiques .....	71
II-	Résultats des coprocultures et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel .....	72
1-	Coproculture.....	72
2-	BD MAX™ Enteric Bacterial Panel .....	73
3-	Autres résultats considérés comme des Faux positifs .....	76
4-	Résultats invalides du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel .....	76
5-	Analyse comparative de la coproculture et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel .....	78
6-	Analyse des concordances et discordances de la coproculture et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.....	80
III-	Analyse de la prise en charge des patients inclus dans l'étude .....	81
IV-	Données complémentaires récoltées .....	86
V-	Durées d'hospitalisations et temps de rendu des coprocultures .....	87
VI-	Impact supposé du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.....	87
VII-	Etude rétrospective des années 2019 et 2020 .....	89
VIII-	Etude médico-économique.....	91
1-	Calcul des coûts théoriques.....	91
2-	Extrapolation .....	92
<b>DISCUSSION</b>	.....	<b>95</b>
I-	Analyse comparative : Coproculture vs BD MAX™ Enteric Bacterial Panel .....	95

1- <i>Campylobacter jejuni/coli</i> .....	95
2- <i>Shigella</i> spp.....	96
3- <i>Salmonella</i> spp. ....	97
4- Shiga-toxines 1 et 2 .....	98
5- <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	100
6- <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Vibrio</i> , ETEC.....	100
7- <i>Aeromonas</i> spp.....	100
8- Co-infections.....	101
9- Significativité clinique d'un résultat positif .....	101
10- Concordances/discordances : .....	102
11- Invalides.....	102
II- Comparaison du BD MAX avec d'autres PCR Multiplexe entérique .....	102
III- Impact de la mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel au CH de Tourcoing .....	103
1- Au laboratoire.....	103
2- Clinique.....	104
3- Impact médico-économique .....	106
IV- Evaluation du BD MAX Panel : Avantages/limites par rapport à la coproculture .....	106
V- Limites de l'étude.....	107
<b>CONCLUSION</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	111
<b>ANNEXES</b> .....	117
Annexe 1 : Données récoltées au cours de notre étude.....	117
Annexe 2 : Etude médico-économique .....	118
Annexes 3 : Exemples de cibles et de paramètres de plateformes d'analyse moléculaire multiplex rapide .....	122



## LISTE DES ABBREVIATIONS

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BLSE : Bêta-lactamase à spectre élargi

C3G : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

CIN : Cefsulodine Irgasan Novobiocine

CNR : Centre National de Référence

CRP : Protéine C-Réactive

DMS : Durée Moyenne de Séjour

EAST-1 : ECEAgg ST-like toxine

ECAD : *Escherichia coli* à adhésion diffuse

ECEAgg : *Escherichia coli* entéroaggrégatif

EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments

EHEC : *Escherichia coli* entéro-hémorragique

EIA : *Enzyme ImmunoAssay*

EIEC : *Escherichia coli* entéro-invasif

EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogène

ETEC : *Escherichia coli* entéro-toxinogène

FQ : Fluoroquinolone

GEA : Gastro-entérite aiguë

IRA : Insuffisance rénale aiguë

IV : Intraveineux

LT/ST : Toxine thermolabile/Toxine thermostable

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

NABM : Nomenclature des actes de biologie médicale

NPA/PPA : Negative Percent Agreement/Positive Percent Agreement

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCT : Procalcitonine

PYV : *Plasmid of Yersinia Virulence*

qRT-PCR : *quantitative Real Time PCR*

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique

SIL : Système Informatique du Laboratoire

STEC : *Escherichia coli* producteur de Shiga-toxines

Stx : Shiga-toxine

SUMIV : Service Universitaire de Maladies Infectieuses et du voyageur

T3SS : Système de sécrétion de type 3

TIAC : Toxi-infection aiguë collective

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VNC : *Vibrio non cholérique*

YOP : *Yersinia Outer Protein*



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Taux d'incidence cumulée des cas de diarrhées aiguës vus en consultation de médecine générale en France métropolitaine lors des saisons hivernales de 1990/1991 à 2019/2020.....	31
<b>Figure 2</b> : Distribution des cas de diarrhée aiguë déclarés par les médecins généralistes du réseau Sentinelles selon l'âge et le sexe durant la saison hivernale 2019/2020.....	32
<b>Figure 3</b> : Evolution des taux incidences hebdomadaires des cas de diarrhées aiguës vus en consultation de médecine générale en fonction de l'âge durant la saison hivernale 2019/2020.....	32
<b>Figure 4</b> : Distribution des cas selon une demande ou non d'hospitalisation faite par le médecin généraliste en fonction de l'âge.....	33
<b>Figure 5*</b> : Mécanisme d'invasion des cellules non phagocytaires par <i>Campylobacter</i> .....	35
<b>Figure 6*</b> : Mécanisme d'invasion de <i>Salmonella Typhi</i> .....	37
<b>Figure 7*</b> : Mécanisme d'invasion de <i>Salmonella</i> non typhique.....	39
<b>Figure 8*</b> : Mécanisme d'invasion de <i>Shigella</i> spp. ....	41
<b>Figure 9*</b> : Mécanisme d'invasion de <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	44
<b>Figure 10</b> : Cas de choléra rapporté à l'OMS de 1984 à 2007.....	46
<b>Figure 11*</b> : Mécanisme physiopathologique de <i>Vibrio cholerae</i> O1 et O139.....	47
<b>Figure 12*</b> : Pathovars entéropathogènes de <i>E. coli</i> .....	49
<b>Figure 13</b> : Echelle de Bristol.....	58
<b>Figure 14</b> : Méthode d'ensemencement par demi-boîte. ....	63
<b>Figure 15</b> : Prise en charge des coprocultures au CH de Tourcoing. ....	65
<b>Figure 16</b> : Visualisation du clippage des tubes d'extraction et de Master Mix dans les barrettes réactives.....	68
<b>Figure 17*</b> : Utilisation de la sonde TaqMan dans le cadre d'une PCR en temps réel. ....	69
<b>Figure 18</b> : Rendu des résultats du BD MAX System. ....	70
<b>Figure 19</b> : Pyramide des âges (en années) des patients inclus dans notre étude..	71
<b>Figure 20</b> : Distribution des âges (en année) des patients inclus dans notre étude selon le service prescripteur.....	72
<b>Figure 21</b> : Synthèse des résultats des coprocultures incluses dans notre étude. ..	73
<b>Figure 22</b> : Résultats invalides des panels des bactéries entéropathogènes du BD MAX.....	77
<b>Figure 23</b> : Résultats obtenus des patients inclus dans notre étude par coproculture. ....	79
<b>Figure 24</b> : Comparaison des bactéries identifiées par coproculture et par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.....	80
<b>Figure 25</b> : Antibiothérapie probabiliste des patients inclus dans notre étude.....	82
<b>Figure 26</b> : Antibiothérapie postérieur au rendu de la coproculture chez les patients inclus dans notre étude.....	84
<b>Figure 27</b> : Antibiothérapie à la sortie d'hospitalisation des patients inclus dans notre étude. ....	85
<b>Figure 28</b> : Durée d'hospitalisation et temps de rendu des coprocultures des patients inclus dans notre étude en heures.....	87
<b>Figure 29</b> : Impacts supposés de la mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel au cours de notre étude.....	89

<b>Figure 30</b> : Bactéries retrouvées en coproculture au CH de Tourcoing des années 2019 et 2020.....	90
<b>Figure 31</b> : Coprocultures des années 2019 et 2020 au CH de Tourcoing.....	90

**\*Figures réalisées sur BioRender**

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Critères de sélection des échantillons de notre étude.....	61
<b>Tableau 2</b> : Principaux services prescripteurs des échantillons inclus dans notre étude. .....	72
<b>Tableau 3</b> : Synthèse des bactéries entéropathogènes détectées par coproculture et par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel. ....	75
<b>Tableau 4</b> : Interprétation du coefficient Kappa. ....	81
<b>Tableau 5</b> : Coût unitaire Hors Taxes d'une coproculture et d'un test de BD MAX™ Enteric Bacterial Panel. ....	92
<b>Tableau 6</b> : Moyenne des données récoltées des patients inclus dans notre étude. .....	117
<b>Tableau 7</b> : Moyenne des données récoltées des patients inclus dans notre étude, selon les résultats de la PCR et de la coproculture. ....	117
<b>Tableau 8</b> : Coût brut unitaire du matériel nécessaire à la réalisation d'une coproculture.....	118
<b>Tableau 9</b> : Coût brut unitaire des tests entériques du BD MAX.....	118
<b>Tableau 10</b> : Temps technique et coûts nécessaires à la réalisation d'une coproculture. .....	119
<b>Tableau 11</b> : Prix totaux de la coproculture et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel. .....	119
<b>Tableau 12</b> : Coûts des coprocultures incluses dans notre étude.....	120
<b>Tableau 13</b> : Coûts des PCR Multiplexe incluses dans notre étude. ....	120
<b>Tableau 14</b> : Coûts des coproculture de l'année 2020.....	121
<b>Tableau 15</b> : Coûts supposés de l'utilisation du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel sur les échantillons de l'année 2020.....	121



# INTRODUCTION

Les maladies diarrhéiques demeurent un problème majeur de santé publique, elles concernent l'ensemble du globe. Elles sont responsables d'une mortalité très importante dans les pays à faibles revenus, les enfants dans leurs premières années de vie, étant les plus touchés. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recense, chaque année, 525 000 décès chez les enfants de moins de 5 ans, principalement dans les pays en développement <sup>(1)</sup>. Dans les pays plus aisés néanmoins, la mortalité imputable aux diarrhées aiguës est très faible. Elles restent cependant, un motif de consultation majeur, avec en France, 3,7 millions nouveaux cas chaque année <sup>(2)</sup>.

Les présentations cliniques sont variées, allant, de formes pauci-symptomatiques à des formes plus sévères, causant diarrhées sanglantes, déshydratations majeures... Les étiologies impliquées sont diverses, mais les causes infectieuses (virus, bactéries et parasites) sont les plus fréquentes. Les virus sont les agents infectieux les plus couramment mis en causes ; toutefois, la symptomatologie d'une infection virale est généralement peu bruyante, et ne nécessite pas systématiquement la réalisation d'examens complémentaires. Au contraire, lorsqu'une étiologie bactérienne est évoquée, des examens microbiologiques doivent être initiés.

L'identification de bactéries entéro-pathogènes repose sur l'isolement de la souche lors de la réalisation du « gold standard », la coproculture. Cette technique, laborieuse, dont le temps de rendu s'étend sur plusieurs jours, manque de sensibilité. Cependant, le développement des techniques de biologie moléculaire permet de réduire substantiellement le temps analytique et améliore les performances diagnostiques. Initialement, ces techniques ne permettaient la recherche que d'un agent pathogène à la fois. Depuis, la mise au point des PCR Multiplexe, tel que le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, permet la recherche simultanée de plusieurs micro-organismes, certains n'étant pas recherchés par la coproculture. Suite à sa commercialisation, plusieurs études ont démontré les bénéfices de l'introduction de cette technique en pratique de routine <sup>(91, 92, 94, 103)</sup>.

Au Centre Hospitalier (CH) de Tourcoing, la méthode utilisée pour le diagnostic des bactéries entéro-pathogènes est la coproculture. Néanmoins, les avantages apparents de la PCR Multiplexe, nous motivent à étudier cette nouvelle option, dans l'optique de l'instaurer en tant que technique de routine. Ainsi, au cours de cette étude, notre

objectif est d'évaluer les performances de l'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel dans la prise en charge des diarrhées aiguës au CH de Tourcoing. Nous nous sommes intéressés, d'une part, aux performances de ce nouvel outil diagnostique en comparaison avec la technique de référence, la coproculture ; et d'autre part, nous avons étudié l'impact clinique supposé, sur les patients inclus dans notre étude, de l'utilisation de la PCR Multiplexe.

# GÉNÉRALITÉS

## I-Définition

La diarrhée aiguë est définie par l'émission de 3 selles molles ou liquides (ou des selles plus fréquentes que ce qui est habituel pour le sujet atteint) <sup>(1)</sup>. Les selles moulées ou pâteuses (notamment chez le nouveau-né en période d'allaitement), ne sont donc pas incluses dans cette définition. Un épisode aigu a une durée inférieure à 14 jours. De 14 à 28 jours on parlera de diarrhées persistantes, et au-delà, il s'agit de diarrhées chroniques.

Les diarrhées aiguës sont d'origine majoritairement infectieuses cependant, d'autres étiologies existent : de nombreux médicaments (antibiotiques, anticancéreux, certains anti-inflammatoires...) ainsi que les entéropathies inflammatoires débutantes (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin ou MICI) provoquent des symptômes similaires <sup>(71)</sup>.

Il est intéressant de noter que la diarrhée aiguë est un symptôme de la Gastro-Entérite Aigue (GEA), cependant les deux termes sont souvent confondus et utilisés de manières équivalentes.

## II-Mécanismes physiopathologiques

Parmi les causes de diarrhées aiguës infectieuses, on distingue les virus, majoritaires, les bactéries et les parasites.

### Mécanisme sécrétoire : syndrome cholériforme

L'origine des troubles provient de la sécrétion d'une toxine. Chez les bactéries, elle peut être préformée dans l'aliment avant son ingestion (Toxi-Infection Alimentaire Collective ou TIAC à *Staphylococcus aureus* par exemple), ou sécrétée une fois le pathogène fixé à la surface de l'épithélium digestif. La toxine, en augmentant la production d'AMPc/GMPc intracellulaire par stimulation de l'adénylcyclase, favorise la sécrétion d'eau et d'électrolytes par les entérocytes <sup>(72)</sup>.

Certains virus comme le rotavirus utilisent un mécanisme similaire, avec production d'une entérotoxine, associé à un mécanisme osmotique <sup>(15)</sup>.

Le syndrome cholérique se caractérise par une diarrhée aqueuse abondante dite en « eau de riz », accompagnée ou non de fièvre et de douleurs abdominales. Le risque majeur de ce syndrome est donc la déshydratation.

Les principaux pathogènes utilisant ce mécanisme sont : *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* entéro-toxinogène (ETEC), les agents de TIAC (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) et les virus (rotavirus, norovirus...).

### Mécanisme entéro-invasif

⇒ Syndrome dysentérique

Il se traduit par une diarrhée fébrile glairo-sanglante, mucopurulente quasi constante, et afécale, accompagnées de douleurs abdominales très fortes, de ténésmes, et d'épreintes.

La symptomatologie s'explique par l'invasion des entérocytes par des pathogènes, s'y multipliant et produisant des toxines jusque destruction de ces cellules (réduisant donc la capacité d'absorption), ceci provoquant une inflammation locale intense, à l'origine d'apparition de glaire, de pus et de sang dans les selles.

Ce tableau clinique est typique des infections à *Shigella dysenteriae* mais peut être retrouvé également chez les autres espèces de *Shigella*, chez les souches de *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC), entéro-invasives (EIEC), chez *Campylobacter* spp. et *Entamoeba histolytica* (celui-ci ne provoquant pas de fièvre).

⇒ Syndrome gastro-entérique

C'est un syndrome mixte associant un mécanisme entéro-invasif, et à un degré moindre un mécanisme toxinique. De fait, les pathogènes envahissent les entérocytes (mais ne provoquent pas leurs destructions) puis se multiplient dans les macrophages du tissu lymphoïde sous muqueux et mésentérique. La réaction inflammatoire en réponse à cette invasion est la cause d'une partie des symptômes.

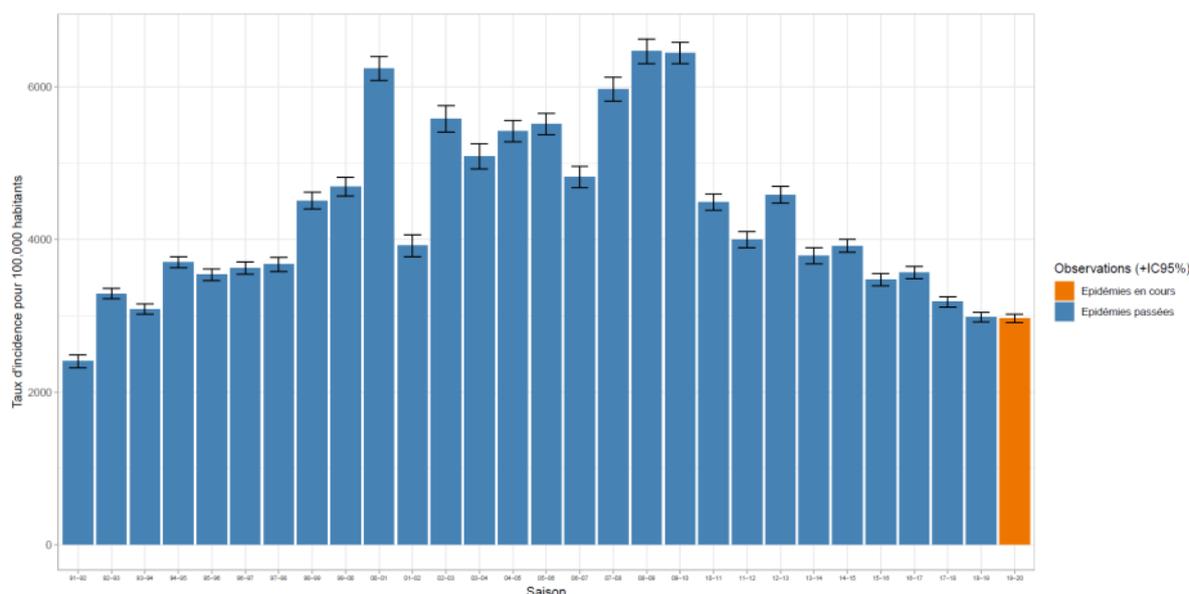
La symptomatologie associée à ce syndrome est moins forte que celle d'un syndrome dysentérique. En effet, les diarrhées sont fécales et rarement sanglantes. Il existe néanmoins un risque de passage systémique du micro-organisme, notamment chez l'immunodéprimé et le drépanocytaire.

Les bactéries à l'origine de ce syndrome sont les salmonelles entériques (non typhiques) et certaines souches de *Yersinia*, notamment *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*.

### III-Epidémiologie

Les maladies diarrhéiques constituent une cause majeure de mortalité dans le monde, et particulièrement chez les jeunes enfants. En effet, la diarrhée aiguë est impliquée dans 525 000 décès d'enfants de moins de 5 ans chaque année <sup>(1)</sup>, principalement dans les pays en voie de développement. Malnutritions et déshydratations sont à risques d'accompagner la maladie, notamment chez cette jeune population. L'OMS recense ainsi, 1,7 milliards de cas de diarrhées pédiatriques dans le monde, chaque année <sup>(1)</sup>.

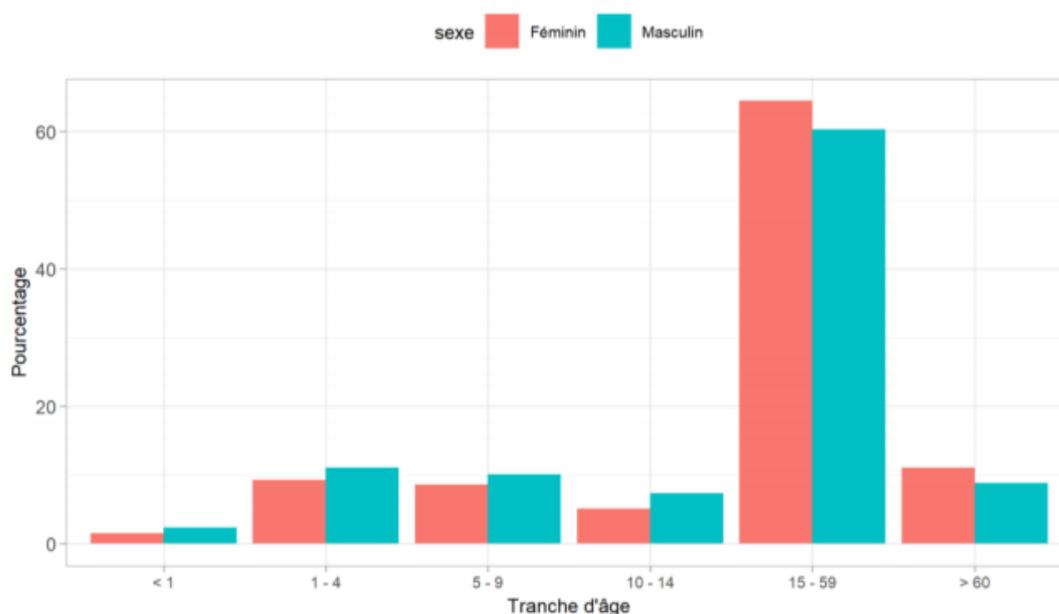
En France, les GEA sont prédominantes en hiver où elles atteignent leur pic. Cependant, on observe depuis 2008 une diminution chaque année des consultations pour ce motif (Cf. Figure 1).



**Figure 1 : Taux d'incidence cumulée des cas de diarrhées aiguës vus en consultation de médecine générale en France métropolitaine lors des saisons hivernales de 1990/1991 à 2019/2020.**

*Bilan annuel 2019, Réseau Sentinelles.*

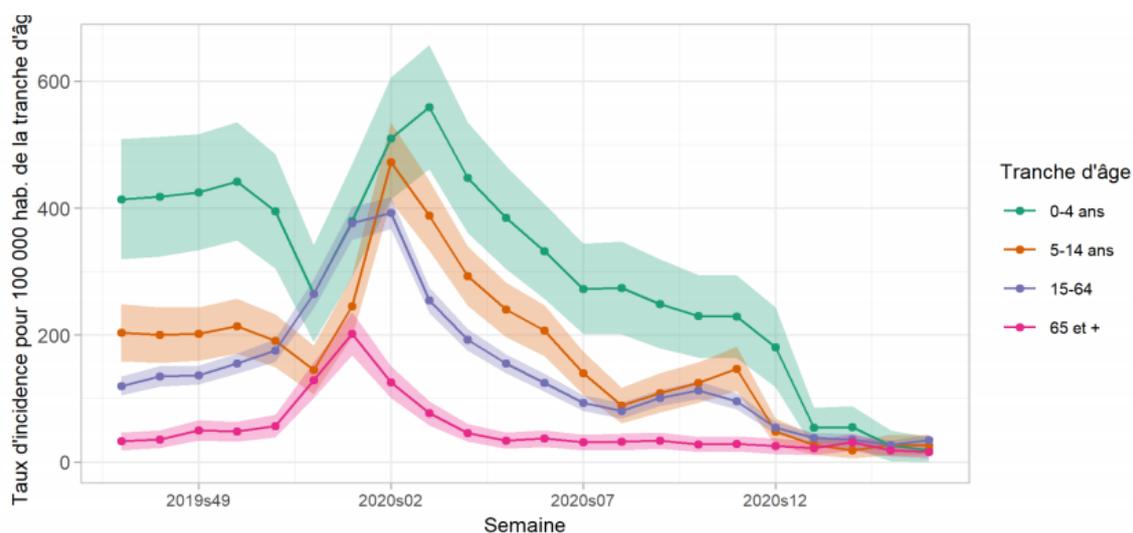
En 2019, le réseau Sentinelles rapporte une incidence annuelle des cas de GEA vus en consultation de médecine générale de 3 729 506 cas <sup>(2)</sup>. La majorité des cas (62%) étaient des adultes (15-59 ans). 27 % des consultations étaient des enfants (moins de 15 ans), avec une large majorité des cas situés entre 1 et 9 ans. Les plus de 60 ans ne constituaient que 10 % des consultations pour GEA (Cf. Figure 2).



**Figure 2 : Distribution des cas de diarrhée aiguë déclarés par les médecins généralistes du réseau Sentinelles selon l'âge et le sexe durant la saison hivernale 2019/2020.**

*Bilan annuel 2019, Réseau Sentinelles*

Néanmoins, pendant la période hivernale, les taux d'incidence les plus forts, étaient ceux des enfants, notamment les enfants très jeunes, entre 0 et 4 ans (Cf. Figure 3).



**Figure 3 : Evolution des taux incidences hebdomadaires des cas de diarrhées aiguës vus en consultation de médecine générale en fonction de l'âge durant la saison hivernale 2019/2020.**

*Bilan annuel 2019, Réseau Sentinelles*

Les proportions de demandes d'hospitalisations étaient faibles, de l'ordre de 0,5% des consultations, avec une plus forte proportion aux âges extrêmes (Cf. Figure 4).

Classe d'âge (ans)	Demande d'hospitalisation	Proportion (%)	Pas de demande d'hospitalisation	Proportion par tranche d'âge des cas avec demande d'hospitalisation (%)
< 1 an	4	7,3	221	1,8
1 – 4	11	20,0	1 172	0,9
5 – 9	3	5,5	1 094	0,3
10 – 14	2	3,6	726	0,3
15 – 59	16	29,1	7 316	0,2
≥ 60	19	34,6	1 166	1,6
<b>Total</b>	<b>55</b>		<b>11 695</b>	

**Figure 4 : Distribution des cas selon une demande ou non d'hospitalisation faite par le médecin généraliste en fonction de l'âge.**

*Bilan annuel 2019, Réseau Sentinelles*

## 1-Etiologies bactériennes

Les bactéries sont à l'origine de 15 à 20 % des diarrhées aiguës, et représentent la cause principale de diarrhées du voyageur <sup>(59)</sup>. Ce sont, pour la plupart, des entérobactéries, qui sévissent lorsque les mesures d'hygiène ne sont pas correctement suivies.

### a. Campylobacter spp.

Les espèces du genre *Campylobacter* sont l'une des premières causes de diarrhées infectieuses bactériennes au monde <sup>(6)</sup>. En Europe, on rapporte chaque année 200 000 cas, mais ce chiffre est très probablement fortement sous-estimé : l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) estimerait le nombre de cas réels à 9 millions par an <sup>(7 ; 8 ; 12)</sup>. En France en 2016, 6676 cas ont été isolés <sup>(7)</sup>.

La campylobactériose est une zoonose, dont le réservoir principal est la volaille. Chez l'animal la bactérie ne provoque pas d'infection. Par conséquent, la source principale de contamination chez l'homme est la consommation de volaille mal cuite : majoritairement du poulet, mais également de la dinde, du canard <sup>(18)</sup> ... Les infections observent un pic saisonnier, notamment en été <sup>(9)</sup>, probablement liés à la consommation de viande mal cuite en barbecue. D'autres paramètres seraient également en cause, comme la chaleur, les précipitations et la présence d'élevages proches <sup>(7)</sup>.

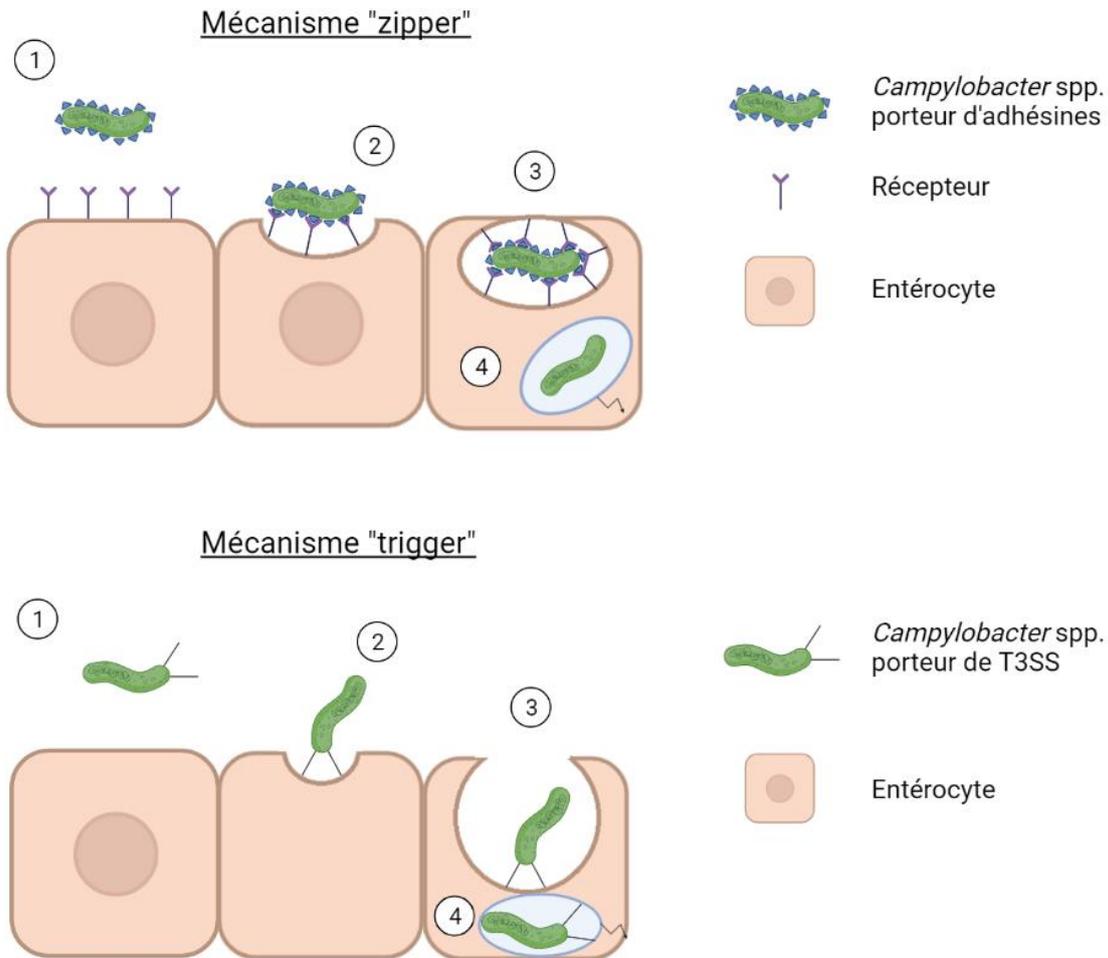
Parmi la large variété d'espèces (17 espèces) pouvant infecter l'homme, *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* sont les principaux responsables de cas sporadiques d'entérites. Certaines épidémies ont été recensées, via la consommation de lait non pasteurisé, ou par ingestion d'eau contaminée.

Les espèces du genre *Campylobacter* sont des bacilles à Gram négatif spiralé ou incurvée. Le mécanisme d'invasion n'est pas encore totalement connu, mais il est lié à la mobilité de la bactérie. Sa forme spiralée, et la présence d'un ou deux flagelles permettent un mouvement « en vol de moucheron ». Cette grande mobilité va permettre aux bactéries de traverser la muqueuse intestinale et d'adhérer aux cellules épithéliales. L'invasion se ferait ensuite selon deux mécanismes (Cf. Figure 5) : mécanisme « Zipper » qui internalise la bactérie via une vacuole suite à l'adhésion et le mécanisme « Trigger » qui par des systèmes de sécrétion de type III ou IV (T3SS ou T4SS) induit l'endocytose de *Campylobacter* <sup>(17)</sup>.

La symptomatologie débute après 1 à 10 jours d'incubation et elle correspond à une gastro-entérite classique : diarrhée, fièvre, douleurs abdominales asthénie, avec souvent la présence de sang dans les selles (bactérie au mécanisme entéro-invasif). Elle dure pendant 3 à 6 jours <sup>(73)</sup>. Néanmoins, malgré le pronostic largement favorable, certaines complications existent, avec la possibilité d'une bactériémie, d'hépatites et de pancréatites, mais également des complications post-infections, tels que l'arthrite réactionnelle ou le syndrome de Guillain-Barré. Ce dernier, bien que rare, est une atteinte neurologique, provoquant une paralysie pouvant entraîner dans de rare cas, un décès <sup>(74)</sup>.

L'introduction d'un traitement antibiotique est rarement nécessaire, l'infection étant spontanément résolutive, cependant certaines formes plus sérieuses peuvent avoir besoin d'y recourir. L'azithromycine 1g en dose unique est utilisé en première intention, une alternative par ciprofloxacine est également possible <sup>(75)</sup>. Cependant, le taux très élevé des résistances aux fluoroquinolones (notamment dû à l'usage abusif d'antibiotique dans l'industrie alimentaire <sup>(75)</sup>) rend cette option discutable. En effet, en 2020, en France, le centre national de référence des campylobacteriose rapportait pour *C. jejuni* et *C. coli* respectivement, 58,8 % et 61,5% de résistances à la ciprofloxacine <sup>(76)</sup>.

*Campylobacter fetus* est une autre espèce responsable d'infection chez l'homme. Bien que rarement mis en cause lors d'infections digestives, cette bactérie peut être néanmoins la cause de bactériémie chez la femme enceinte et l'immunodéprimé <sup>(77)</sup>.



**Figure 5 :** Mécanisme d'invasion des cellules non phagocytaires par *Campylobacter*

Mécanisme « zipper » : Suite à l'ingestion du *Campylobacter* (1), les adhésines bactériennes se lient à des récepteurs cellulaires spécifiques (2), provoquant l'englobement de la bactérie par la membrane cellulaire (3) et son endocytose (4).

Mécanisme « trigger » : Après l'acquisition du *Campylobacter* (1), celui-ci injecte des effecteurs protéiques via son système de sécrétion de type 3 (T3SS) (2), permettant l'internalisation de la bactérie (3) et son endocytose (4).

Adapté de FABRE A. Sciences pharmaceutiques <sup>(17)</sup>.

### b. Salmonella spp.

Les salmonelles sont responsables d'une part des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et d'autre part des salmonelloses non typhiques, un agent courant de TIAC. C'est une entérobactérie, mobile le plus souvent, aéro-anaérobie facultative, et parfois productrice de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S.

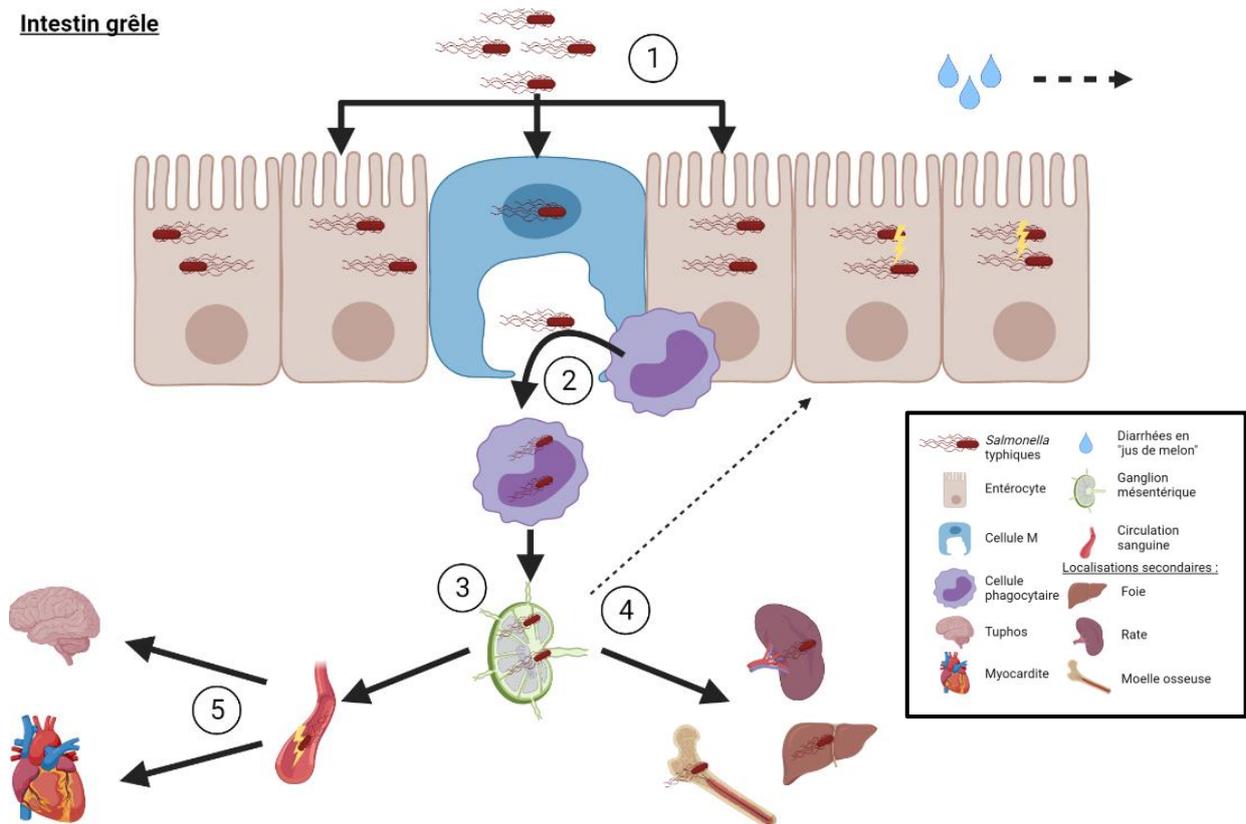
Le genre *Salmonella* comporte trois espèces dont la plus fréquente *Salmonella enterica* est divisée en 6 sous-espèces dont *Salmonella enterica subsp. enterica*, la principale, qui comprend elle-même plusieurs sérovars : Typhi, Paratyphi (A, B et C), Typhimurium, Enteritidis, Virchow, Infantis... Chaque sérovar est caractérisé par une mosaïque d'antigènes : somatique O, capsulaire Vi, flagellaire H, qui permettent leur identification. La fièvre typhoïde est provoquée par le sérovar *Salmonella* Typhi (bacille d'Eberth), et la fièvre paratyphoïde par les sérovars *Salmonella* Paratyphi A, B et C. L'épidémiologie liée à ces infections varie très franchement selon, l'espèce impliquée et la zone géographique touchée. Ainsi, l'OMS estime entre 11 et 20 millions de cas de fièvres typhoïdes et paratyphoïdes contractées chaque année, se traduisant par 128 000 à 161 000 décès <sup>(3)</sup>. Ces pathologies touchent très largement certaines zones en développement d'Afrique, d'Asie, ou d'Amérique latine avec un niveau d'hygiène insuffisant. En revanche, les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont très rares dans les pays industrialisés, avec 100 à 150 cas en France chaque année <sup>(4)</sup>, provenant de voyageurs ou de personnes vivant en zone d'endémie.

*A contrario*, les salmonelles non typhiques sont ubiquitaires et font partie des agents majeurs de maladies diarrhéiques en France et dans le monde. En France, l'Institut Pasteur répertorie entre 10 000 et 11 000 isollements annuels de *Salmonella* non typhiques chez l'homme <sup>(16)</sup>.

#### Fièvre typhoïde et paratyphoïde :

*Salmonella* Typhi et ParaTyphi A, B et C suivent un mécanisme physiopathologique entéro-invasif sans destruction (Cf. Figure 6), et la symptomatologie est d'autant plus forte que l'inoculum est important <sup>(79)</sup>. Ainsi, lors de l'incubation (de 7 à 21 jours), une diarrhée fugace, ou gastro-entérite, peut apparaître. La maladie se développe ensuite en 3 étapes, qualifiées de « septénaires » (chaque phase durant environ une semaine) <sup>(79)</sup>. La première phase, dite « d'invasion », est caractérisée par l'apparition progressive d'une fièvre associée à des signes digestifs et d'un abattement. Puis, pendant la phase suivante, dite « d'état », la fièvre en plateau se poursuit et l'état général se dégrade. Une diarrhée fétide en « jus de melon » apparaît, accompagnée d'une atteinte neurologique, le « tumphos ». Celle-ci se caractérise par une obnubilation diurne, des délires, des insomnies et une asthénie. Finalement, lors du dernier septénaire les symptômes peuvent disparaître, mais l'évolution peut se faire vers diverses complications : péritonites par perforation du grêle, cholécystite hémorragiques, myocardites, ostéites <sup>(79)</sup>. Une antibiothérapie adaptée permet

d'améliorer le pronostic (moins de 1% de mortalité), ainsi que de réduire le risque de rechutes (10 à 20 % chez le patient non ou mal traité) <sup>(16)</sup>. Depuis l'apparition de souches résistantes aux fluoroquinolones (environ 15 % des souches <sup>(80)</sup>), les céphalosporines et l'azithromycine sont désormais les antibiotiques principalement utilisés <sup>(4, 16)</sup>. La maladie est strictement humaine, à transmission féco-orale. Il en résulte principalement une contamination indirecte par l'ingestion d'aliments ou d'eau souillés ; mais une contamination directe entre personnes est également possible.



**Figure 6 : Mécanisme d'invasion de Salmonella Typhi**

Après ingestion, les salmonelles adhèrent aux cellules épithéliales intestinales et aux cellules M des plaques de Peyer (tissu lymphoïde digestif) et les envahissent sans être détruites par celles-ci (1). Après une période de multiplication de 12 à 24 h, les bactéries envahissent la lamina propria et la sous-muqueuse. Afin de lutter contre la pénétration de l'entérobactérie, les cellules phagocytaires sont déployées (2). Cependant les salmonelles vont persister et se multiplier à l'intérieur de ces cellules pour finalement envahir la circulation lymphoïde (3). On va alors les retrouver dans le foie, la rate, la moelle osseuse (4) puis dans la circulation sanguine (5). La lyse de la bactérie entraînera la libération de son endotoxine à l'origine d'un choc toxique et de la symptomatologie (tuphos, myocardite...).

Adapté de DOUGAN et al. *Salmonella Enterica Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever*, *Annual Review of Microbiology* <sup>(78)</sup>.

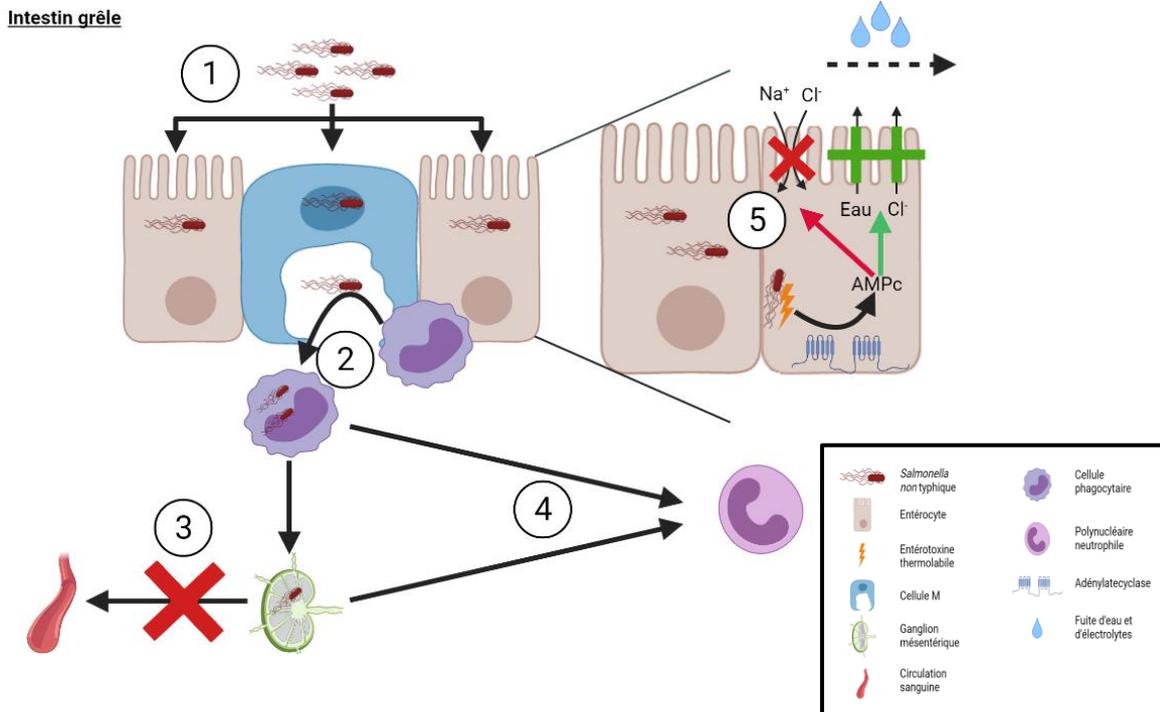
### *Salmonelloses* entériques non Typhiques :

Agent principal de TIAC, on retrouve très majoritairement deux sérovars : *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteridis.

La transmission est liée à la consommation d'œufs, laitages, viande crue/peu cuite. Ces infections sont favorisées par l'alimentation collective et la rupture de la chaîne du froid <sup>(16)</sup>. Ainsi oiseaux, ruminants, et rongeurs font partie du réservoir naturel des salmonelles entériques non typhiques. Cependant, certains humains sont porteurs asymptomatiques et peuvent donc être éventuellement source de contamination <sup>(16)</sup>.

Pour provoquer une infection, la dose infectante nécessaire est élevée. La réaction inflammatoire en réponse à l'invasion est la cause des symptômes : fièvre, douleurs abdominales, vomissements, diarrhée avec sang et leucocytes dans les selles (Cf. Figure 7). Néanmoins le mécanisme de la diarrhée est encore discuté <sup>(11)</sup>. Il reposerait également sur la sécrétion d'entérotoxine thermolabile (qui serait apparentée aux entérotoxines thermolabiles de *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*) capables d'activer l'adénylcyclase des entérocytes, entraînant une fuite liquidienne et d'électrolytes (Cf. Figure 7).

L'infection est spontanément favorable en 2-3 jours, mais peut cependant se compliquer de bactériémies, de localisations extradigestives, notamment chez les immunodéprimés, les enfants, les personnes âgées et les drépanocytaires. Dans ces cas-là, une antibiothérapie peut être proposée : ciprofloxacine, céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération, azithromycine sont principalement utilisés <sup>(81,85, 86, 87)</sup>.



### **Figure 7 : Mécanisme d'invasion de *Salmonella* non typhique**

Suite à l'ingestion d'aliments contaminés, les bactéries envahissent les cellules épithéliales puis la sous-muqueuse, cette phase correspondant à la courte période d'incubation : de 12 à 36 heures (1). A l'instar des salmonelloses typhiques, les cellules phagocytaires sont déployées contre l'envahisseur (2), et induit une réaction inflammatoire (4). Cependant, à la différence des fièvres typhoïdes, il n'y a que très rarement de passage dans la circulation systémique : les bactéries restent localisées dans la sous-muqueuse et dans les ganglions mésentériques (3). La sécrétion d'une toxine thermolabile par *Salmonella* entraîne une activation de l'adénylatecyclase, l'augmentation d'AMPc, qui, par perturbations des transporteurs ioniques, provoque une hypertonie du tube digestif et une fuite d'eau et d'électrolytes (5). Adapté de BERCHE P. GAILLARD J. SIMONET M. Bactéries des infections humaines <sup>(11)</sup>.

#### **c. *Shigella* spp.**

Elle est responsable de 80 à 165 millions de cas chaque année, dont le décès est l'issue pour 600 000 personnes, principalement des jeunes enfants <sup>(4,10)</sup>. La grande majorité des infections à *Shigella* ont lieu dans les pays en développement, en zone tropicale.

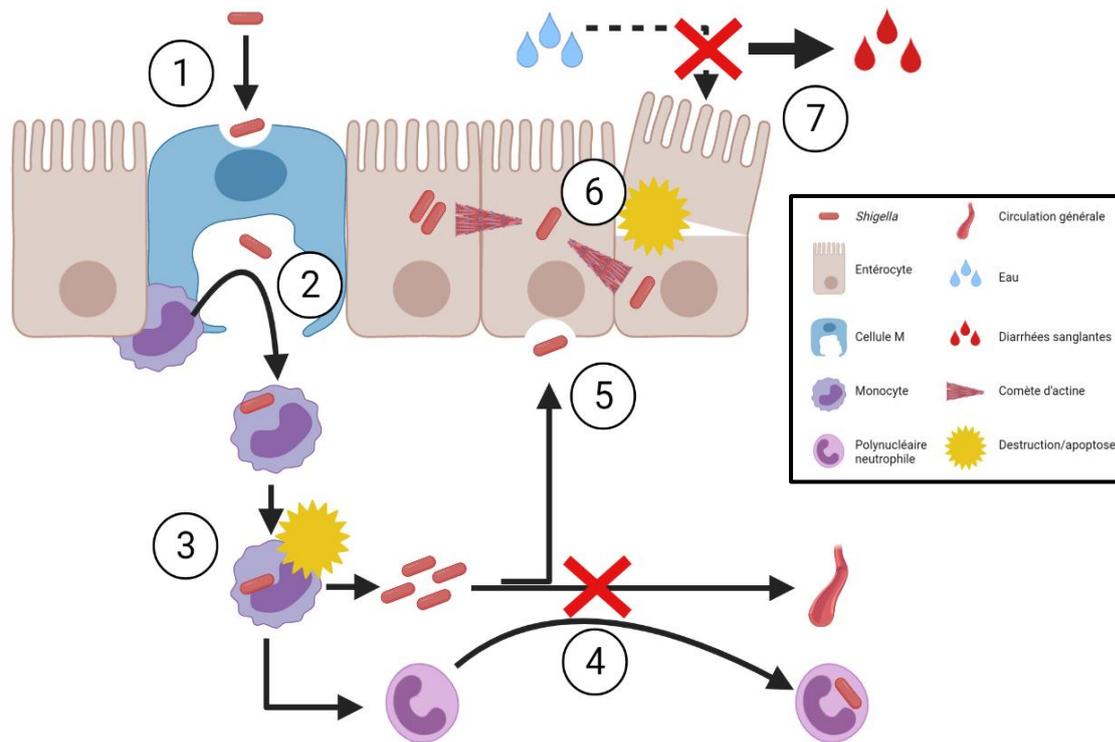
Cette bactérie est retrouvée uniquement chez l'homme, dont elle n'est pas commensale de la flore : elle est pathogène stricte du tube digestif, provoquant une dysenterie. La transmission est féco-orale, soit directement par contact direct avec une personne porteuse, soit indirecte par contact avec de l'eau ou des aliments souillés, grâce à une dose infectante très faible : de 10 à 100 bacilles pour engendrer une infection.

C'est une entérobactérie, immobile pouvant être dotée d'une capsule, ne produisant pas de sulfure d'hydrogène H<sub>2</sub>S. Elle comporte quatre espèces : *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* et *Shigella sonnei*.

- ✓ *Shigella flexneri* prédomine largement dans les pays en voie de développement, et est parfois retrouvé dans les shigelloses en France.
- ✓ *Shigella dysenteriae* de sérotype 1 est responsable de forme épidémique, plus graves.
- ✓ *Shigella sonnei* est isolé dans 80 % des cas français.
- ✓ *Shigella boydii* n'est que très rarement retrouvée en France.

La dysenterie bacillaire se traduit par des diarrhées glairo-sanglantes, avec douleurs abdominales violentes, ténésmes et épreintes. Ces signes digestifs sont accompagnés de fièvre élevée et d'asthénie. La symptomatologie débute après une période d'incubation courte de 2 à 3 jours, et dure classiquement une semaine <sup>(5)</sup>.

Le mécanisme entéro-invasif provoquant la destruction des entérocytes est l'origine des symptômes (Cf. Figure 8). De plus, *Shigella* sécrète des toxines (ShET-1 et ShET-2), induisant l'hypersécrétion de fluide dans l'intestin, source de diarrhées <sup>(10)</sup>. *Shigella dysenteriae* de type 1, détient un gène *stx* codant pour une Shiga-toxine. Cette toxine, est susceptible de provoquer un Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU), se traduisant par l'association d'une anémie hémolytique d'origine mécanique, une thrombopénie et une atteinte rénale <sup>(10)</sup>. Le traitement antibiotique facilite la guérison (sauf en cas de SHU où il est contre-indiqué), il se déroule sur trois jours à l'aide de ciprofloxacine, de ceftriaxone ou d'azithromycine <sup>(5, 84)</sup>.



**Figure 8 : Mécanisme d'invasion de *Shigella* spp.**

*Shigella* est incapable d'envahir les entérocytes par leur face apicale, la bactérie traverse donc les cellules M pour rejoindre le tissu lymphoïde (1) et être phagocyté par un macrophage (2). Elle échappe à la phagocytose grâce à la protéine *ipaB*, et induit son apoptose, provoquant une réaction inflammatoire (3,4). La bactérie libre, va pouvoir envahir l'entérocyte par sa face basolatérale (5), et se déplacer à travers les cellules en utilisant le réseau d'actine et former des « comètes d'actines » (6). Les cellules vont être progressivement détruites, ceci étant à l'origine des symptômes (7).

Adapté de Yang, Shih-Chun, Chi-Feng Hung, Ibrahim A. Aljuffali, et Jia-You Fang. « The Roles of the Virulence Factor *IpaB* in *Shigella* Spp. in the Escape from Immune Cells and Invasion of Epithelial Cells », *Microbiological Research* <sup>(10)</sup>.

#### d. *Yersinia* spp.

Les infections à *Yersinia* spp. constituent la troisième cause de zoonose en Europe <sup>(13)</sup>. En 2014, 6 839 cas ont été notifiés <sup>(13)</sup>, dont 574 en France, avec une incidence plus forte chez les jeunes enfants de 0 à 4 ans. Cependant, les infections dues à ce pathogène sont probablement sous-estimées, ceci étant probablement lié à la difficulté de leur isolement en culture.

Parmi les 18 espèces, seuls *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia pestis* sont pathogènes pour l'homme. Les deux premières sont des bactéries entéropathogènes présentes dans le monde entier ; *Y. pestis*, l'agent de la peste, n'est pas retrouvé en Europe.

*Y. enterocolitica* est l'espèce largement majoritaire, elle représente 98% des isolats en France, avec un pic en période estivale <sup>(14)</sup>. L'espèce est sub-divisée en 6 biotypes, le biotype 1A est avirulent, les biotypes 1B, 2, 3, 4, 5 sont pathogènes (porteur du plasmide de virulence *pYV*). *Y. enterocolitica* peut être aussi sub-divisée en 76 sérotypes. Ces deux classifications peuvent être associées en biosérotypes. En France, les biosérotypes pathogènes les plus fréquents sont: 4/O:3 et 2/O:9 <sup>(19)</sup>.

La bactérie a pour réservoir principal le porc, mais également les bovins et les ovins et sa voie habituelle de transmission se fait par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés <sup>(20)</sup>. Le mécanisme d'invasion de *Yersinia enterocolitica* est décrit dans la figure 9, sa pathogénicité se manifeste à travers de multiples facteurs de virulences (Cf. Figure 9). Elle possède une invasine, facilitant l'invasion des cellules et notamment son passage à travers les cellules M. Son plasmide de virulence *pYV* (*plasmid of Yersinia Virulence*) impliqué dans l'adhésion et l'invasion (commun aux 3 espèces pathogènes) code pour un appareil de sécrétion de type III ou injectisome. Celui-ci est capable d'injecter des protéines YOP (*Yersinia Outer Protein*) dans les cellules phagocytaires, induisant leur mort. *Y. enterocolitica* produit également une entérotoxine similaire à celle des souches de *E. coli* enterotoxinogène (ETEC), à l'origine de symptômes diarrhéiques <sup>(20)</sup>. Chez les patients fragilisés (cirrhose, diabète, hémochromatose ; patient âgé), la bactérie peut disséminer dans le foie, la rate (où elle formera des micro-abcès) mais également dans la circulation sanguine <sup>(20)</sup>.

La période d'incubation des deux espèces entéropathogènes est de 7 jours en moyenne <sup>(19)</sup>. Chez *Y. enterocolitica*, les principaux signes cliniques ont lieu dans son site de colonisation. Ainsi, l'infection peut provoquer des ulcérations de l'iléon terminal (responsables de saignements), des lésions nécrotiques des plaques de Peyer, et une hypertrophie des ganglions lymphatiques mésentériques. Une entérocolite est présente dans la majorité des infections, durant de 1 à 3 jours ; elle peut être associée à des nausées et des vomissements. L'atteinte mésentérique est source de fièvre et douleurs digestives <sup>(19)</sup>.

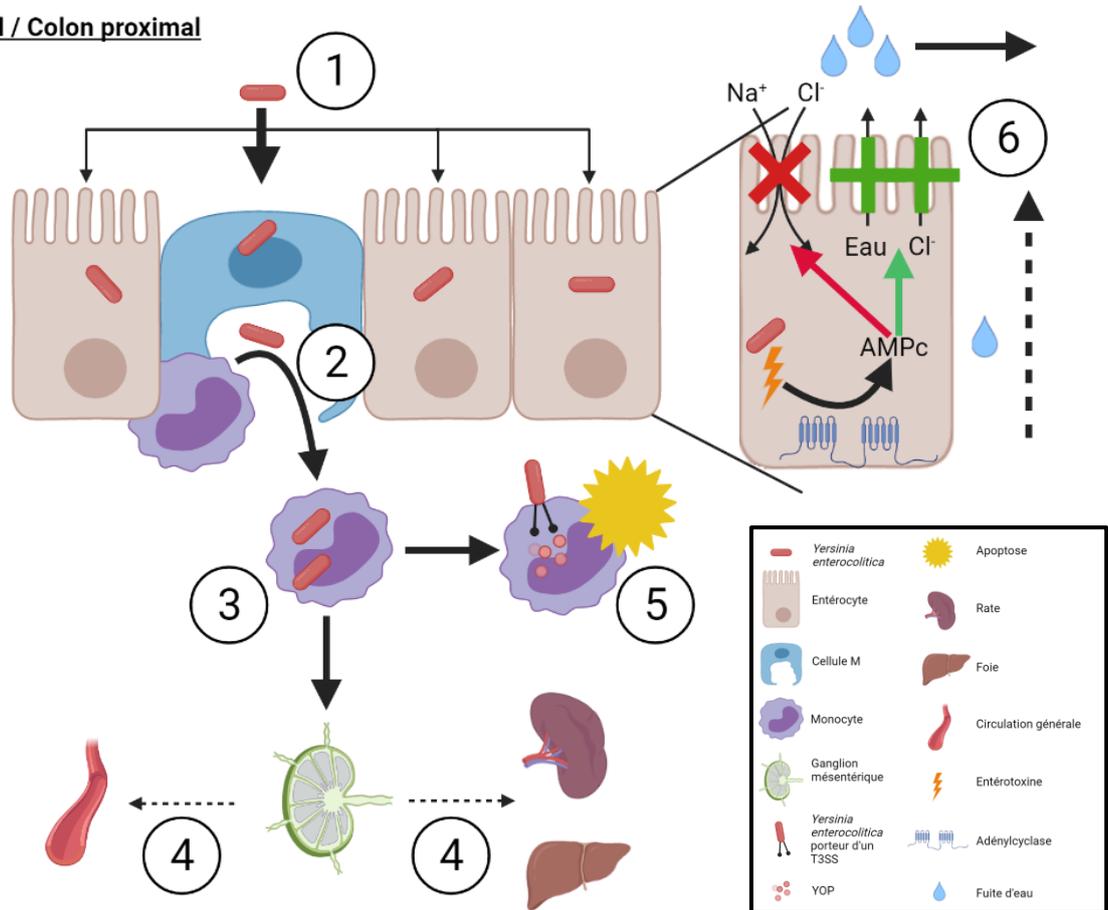
Il existe des complications secondaires à l'infection, elles sont plus courantes chez les personnes présentant l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-B27 <sup>(22)</sup>. Dans 15 % des infections, l'infection peut entraîner une polyarthrite réactionnelle (pouvant toucher genoux, chevilles, orteils, doigts et poignets), débutant quelques jours à un mois après les épisodes de diarrhées, avec une symptomatologie

s'estompant de 1 à 4 mois <sup>(21)</sup>. L'érythème noueux est une complication peu fréquente mais qui est évocatrice d'une infection à *Yersinia*. Elle est caractérisée par des lésions cutanées sur les jambes et le tronc qui se résolvent spontanément en un mois dans la majorité des cas <sup>(21)</sup>. Enfin, d'autres complications existent tels que la pharyngite exsudative, ou des atteintes pulmonaires.

L'entérocolite simple et l'adénite mésentérique ne nécessite pas de traitement antibiotique. Un traitement est justifié dans les formes graves, notamment chez les immunodéprimés. *Yersinia enterocolitica* possédant naturellement une céphalosporinase et une pénicillinase, la ciprofloxacine sera utilisée en première intention, avec le cotrimoxazole et les tetracyclines comme alternative <sup>(20)</sup>.

*Y. pseudotuberculosis* a pour réservoir l'environnement et de nombreuses espèces animales (lièvres, cygnes, oiseaux, mammifères sauvages...) chez lesquelles elle peut causer une infection symptomatique et parfois la mort <sup>(19)</sup>. Cette espèce est beaucoup plus rarement isolée que *Y. enterocolitica* en France (2% des yersiniose humaines) <sup>(14)</sup>. Contrairement à *Y. enterocolitica*, les infections humaines prédominent au cours de la saison froide. La manifestation la plus fréquente est l'adénite mésentérique, un syndrome ressemblant à l'appendicite avec fièvre et douleurs abdominales. Des complications à type d'érythème noueux et de polyarthrite sont également possible.

## Iléon terminal / Colon proximal



### Figure 9 : Mécanisme d'invasion de *Yersinia enterocolitica*.

La bactérie pénètre la barrière de mucus et adhère aux cellules épithéliales, notamment aux cellules M de la plaque de Peyer (1). Grâce à son invasine, le micro-organisme traverse la cellule M et est éjectée du côté basolatéral (2). Les cellules phagocytaires internalisent la bactérie, où celle-ci s'y réplique puis elle est transportée dans les ganglions mésentériques (3). Ce processus est à l'origine d'une réponse inflammatoire et de douleurs abdominales. Chez les patients fragilisés, la bactérie peut disséminer dans le foie, la rate mais également dans la circulation sanguine (4). Son appareil de sécrétion de type 3 (ou T3SS) est capable d'injecter des protéines YOP (*Yersinia Outer Protein*) dans les cellules phagocytaires, induisant leur mort (5). *Y. enterocolitica* produit également une entérotoxine qui par stimulation de l'adénylcyclase, provoque une augmentation d'AMPc induisant une perturbation des canaux ioniques (sortie massive d'ion  $\text{Cl}^-$  et un blocage de l'entrée d'ion  $\text{Na}^+$ ). L'hypertonie de la lumière intestinale entraîne une fuite d'eau et d'électrolytes (6).

Adapté de Fàbrega A, Vila J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (20).

### e. Vibrio spp.

Les espèces du genre *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif, en forme de bâtonnet incurvé et mobile. Ils appartiennent à la famille des *Vibrionaceae*, qui partage des caractéristiques communes avec la famille des *Enterobacterales*. Parmi les 12

espèces connues pathogènes chez l'homme, 3 espèces sont prépondérantes : *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* et *V. cholerae*.

\**Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* et *Vibrio cholerae* non cholérique (non O1/non O139)

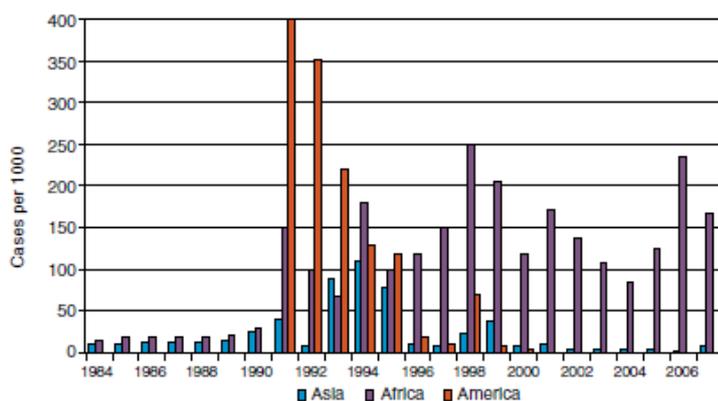
En France, une étude réalisée sur des échantillons de fruits de mer révèle la prédominance des 3 espèces de *Vibrio* incriminées en pathologie humaine <sup>(26)</sup>. *V. parahaemolyticus* était l'espèce la plus souvent retrouvée, puis *V. vulnificus* et enfin plus rarement *V. cholerae*. Si les cas de *V. cholerae* pathogène (séro groupe O1 et O139) sont extrêmement rare sur le territoire français, les *Vibrio* non cholériques (VNC) sont autochtones et responsables d'infections, mais probablement sous déclarés (déclaration non obligatoire) : le CNR recense une moyenne de 10 cas d'infections par des VNC (70% des cas dus à *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus*) <sup>(31)</sup>.

Ces bactéries sont présentes dans l'environnement marin, les estuaires et sont retrouvés aussi dans les poissons, les crustacés et les coquillages <sup>(24)</sup>. Elles sont sources de gastro-entérites majoritairement, se transmettant par la consommation de produits issus de la mer, notamment s'ils sont insuffisamment cuits <sup>(26, 31)</sup>. Il n'y a pas de contaminations interhumaines, il s'agit principalement de cas autochtones entre juin et octobre, majoritairement en zone côtière. Avec le réchauffement des océans, la prévalence de ces bactéries dans l'océan augmente <sup>(25)</sup>.

A noter que *V. vulnificus* peut être isolé de bactériémies.

\**Vibrio cholerae*

C'est l'agent pathogène du choléra, qui est responsable de 2,9 millions de cas et 95 000 morts chaque année en zone d'endémie <sup>(23)</sup>. L'Afrique est le continent le plus touché, il contient plus de 50% des cas (Cf. figure 10) ; mais toutes les régions du monde recensent des cas <sup>(29)</sup>. En France, la maladie est extrêmement rare, étant une maladie à déclaration obligatoire, on rapporte 4 à 5 cas d'importations par an <sup>(27)</sup>.



**Figure 10 : Cas de choléra rapporté à l'OMS de 1984 à 2007.**

Une forte hausse du nombre de cas est observée depuis le début des années 1990. C'est le résultat des grandes épidémies de choléra en Amérique et en Afrique par le sérotype O1 et en Asie par le sérotype O139. Actuellement, la très large majorité des cas de choléra se limite à l'Afrique.

Adapté de l'Organisation Mondiale de la Santé. Cholera <sup>(83)</sup>.

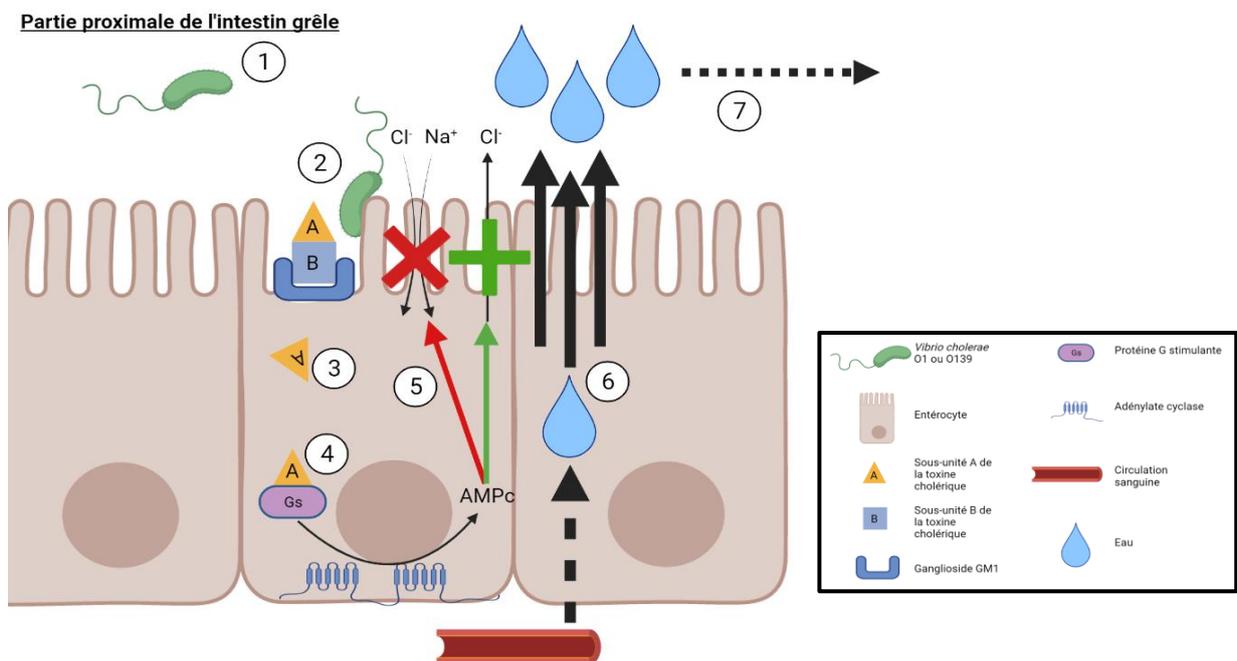
Parmi plus de 200 sérotypes identifiés de *Vibrio cholerae*, seuls deux sont pathogènes et responsables du choléra : les sérotypes O1 et O139. En effet, seuls ceux qui sécrètent une toxine cholérique peuvent causer une épidémie. Le biotype El Tor, du sérotype O1 est responsable de la 7<sup>ème</sup> pandémie mondiale de choléra (a débuté en 1961 et est toujours en cours actuellement) <sup>(28, 83)</sup>.

La famille des *Vibrionaceae* apprécie les eaux côtières salines, et est souvent associée au zooplancton et aux coquillages. Elles peuvent former des biofilms notamment en situation de privation, et prolifèrent lorsque les conditions leurs sont favorables. La bactérie se transmet par voie oro-fécale, avec une dose forte dose infectante (de l'ordre de  $10^8$  bactéries) nécessaire pour provoquer la maladie <sup>(30)</sup>.

La production d'une toxine cholérique est à l'origine de la symptomatologie diarrhéique. Il n'y a pas d'atteinte intestinale, pas de réaction inflammatoire, et pas de fièvre, la bactérie ne franchissant pas l'épithélium intestinal (Cf. Figure 11). Les principaux gènes de virulences sont *ctxA* et *ctxB*, qui codent pour les sous-unités A et B de la toxine cholérique <sup>(82)</sup>.

Après une période d'incubation de 18h à 5 jours, le syndrome cholérique débute brutalement par une diarrhée aqueuse en « eau de riz » avec 10 à 50 selles par jour, non glairo-sanglantes, sans fièvre, associant des vomissements « en jet » et parfois des douleurs abdominales <sup>(82)</sup>. Le risque majeur est bien entendu la déshydratation, qui peut être très brutale (quelques heures), qui si elle n'est pas traitée, peut être fatale. La forme classique évolue en trois phases : phase liquidienne ; phase de collapsus

(déshydratation, pouls imprenable, pression artérielle effondrée, température inférieure ou égale à 36°C, anurie) ; phase évolutive avec une amélioration spectaculaire sous réhydratation ou décès si le malade n'est pas réhydraté. La base du traitement est la réhydratation à base de sels de réhydratation orale si le patient ne présente pas de vomissements, ou par voie intraveineuse (IV) avec un soluté isotonique dans les formes graves. L'utilisation de l'antibiothérapie est discutée : il existe des souches résistantes aux agents anti-bactériens (triméthoprime-sulfaméthoxazole et cyclines). Sa mise en place se fera, par conséquent, en fonction de l'antibiogramme, dans un second temps (27, 29, 82). Selon le profil de résistance, on utilise généralement de la doxycycline monodose, de la ciprofloxacine ou de l'azithromycine (29, 82). La guérison peut être obtenue dès la 72<sup>ème</sup> heure (29). Dans les situations sanitaires particulières (les crises humanitaires associées à un haut risque de choléra ou les zones à risque de flambées épidémiques), trois vaccins oraux (Shanchol<sup>®</sup>, Euvichol<sup>®</sup> et Dukoral<sup>®</sup>) sont également disponibles (83).



### **Figure 11 : Mécanisme physiopathologique de *Vibrio cholerae* O1 et O139.**

Suite à l'ingestion, le micro-organisme adhère à la paroi intestinale (1). Celui-ci ne rentre pas dans la cellule, mais va pouvoir sécréter sa toxine (2). La sous-unité B de la toxine se fixe au récepteur GM1(2), ceci permettant la translocation de la sous-unité A dans le cytoplasme de la cellule (3) et, par activation d'une protéine G, provoque l'hypersécrétion d'AMPc (4). Cette élévation a pour effet une hypersécrétion d'ions chlorures par l'entérocyte, ainsi qu'une inhibition des canaux Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>, empêchant l'entrée de ces ions dans la cellule (5). Il en résulte une hypertonie du tube digestif. Pour compenser cela, l'eau des entérocytes est sécrétée dans le tube digestif, et la perte d'eau engendrée dans le cytoplasme est compensée par l'eau provenant du chorion et du sang (6). La volémie et la pression artérielle en pâtissent donc. Le vibron est évacué avec l'eau et dispersé dans l'environnement (7).

Adapté de Fournier, Jean-Michel, et Marie-Laure Quilici. « Choléra ». La Presse Médicale (82).

#### f. *Plesiomonas shigelloides*

Anciennement classé dans la famille des *Vibrionaceae*, le genre *Plesiomonas* réside actuellement dans la famille des *Enterobacterales*, même si cette place reste encore à définir. Une seule espèce représente le genre : *Plesiomonas shigelloides*. C'est un bacille à Gram négatif, mobile, qui contrairement aux autres entérobactéries est un micro-organisme produisant une cytochrome-oxydase.

Les cas d'infections sont probablement sous-estimés. En effet ce germe n'est généralement pas recherché en culture, et la plupart des infections étant spontanément résolutive, les cas recensés sont faibles. Cependant, certaines études montrent que ce micro-organisme représenterait 2 à 10 % des échantillons de selles contenant un entéropathogène bactérien <sup>(36)</sup>. Il faut noter qu'il n'est pas un commensal de l'Homme, la bactérie serait présente sans manifestation pathologique dans moins de 0,1% des cas <sup>(34,35)</sup>. La majorité des infections ont lieu lors des mois les plus chauds <sup>(32)</sup>, quand la température de l'eau s'élève, permettant la prolifération de *Plesiomonas*, notamment dans les eaux usées <sup>(37)</sup>. En effet, son réservoir naturel comprend les écosystèmes d'eau douce et d'estuaires <sup>(36)</sup>. Dans une étude réalisée à Istanbul sur les produits alimentaires en provenance de la mer, la bactérie a été retrouvée dans 0,86% des échantillons, uniquement dans du poisson <sup>(38)</sup>.

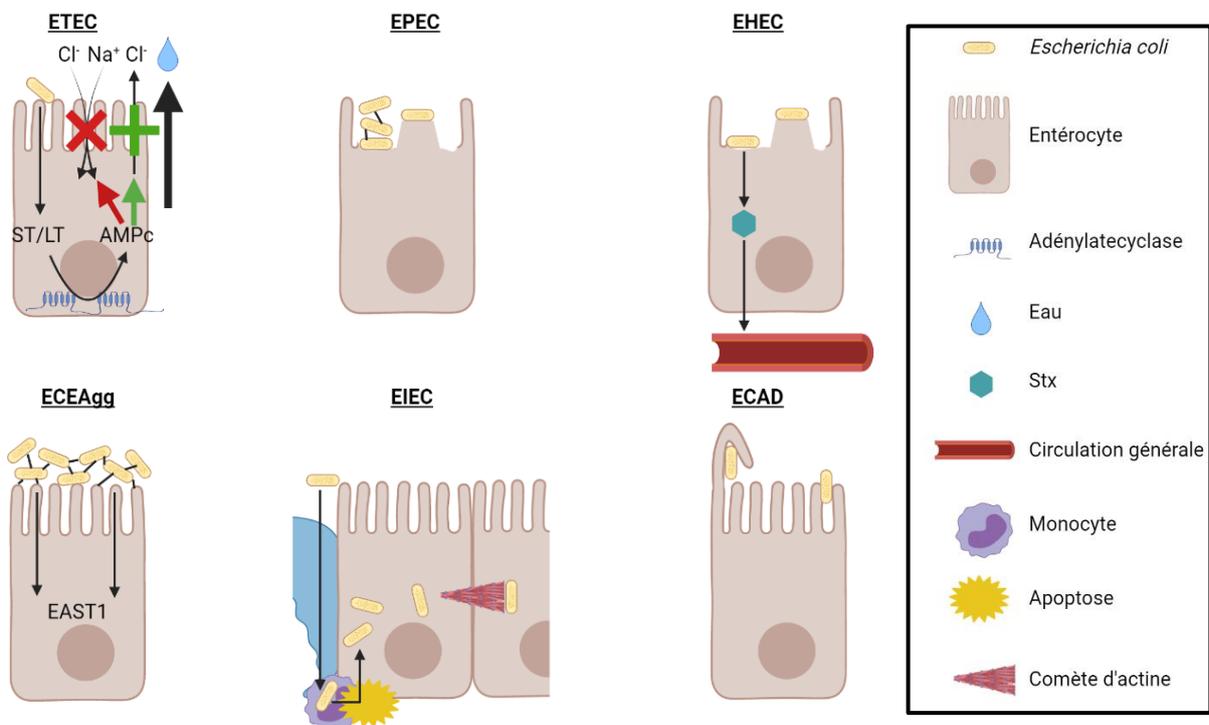
Le mécanisme d'infection n'est pas clairement élucidé, mais la maladie se présente dans la majorité des cas comme une gastro-entérite sécrétoire classique après une durée d'incubation courte allant jusqu'à 48 heures <sup>(32)</sup>, mais des formes cholériques et dysentériques sont également possibles. Les infections chroniques existent, selon une étude, elles représentent 5,4% des cas et durent entre deux semaines et deux mois <sup>(32)</sup>. Selon cette même étude, environ 70% des patients infectés avaient une maladie sous-jacente (cancer, cirrhose...) ainsi qu'un risque identifiable : voyage, consommation de produits de la mer mal ou non cuits. Quelques formes extra-intestinales ont été recensées <sup>(33)</sup>. Elles sont rares mais graves, et touchent principalement le sujet fragilisé avec des méningites, sepsis, cellulites, arthrites et endophtalmies.

*P. shigelloides* peut produire une  $\beta$ -lactamase mais reste sensible à des antibiotiques de première ligne comme les fluoroquinolones et la ceftriaxone <sup>(36, 40)</sup>. Néanmoins la majorité des infections sont résolutive et ne nécessitent pas de traitement. Dans les cas proches d'une dysenterie, certaines études recommandent de traiter l'infection

comme les shigelloses, à l'aide d'azithromycine, de ceftriaxone ou de fluoroquinolones (36, 39).

### *g. Escherichia coli*

Bacille à Gram négatif de la famille des *Enterobacterales*, *Escherichia coli* est une des bactéries aéro-anaérobie facultative prédominante de notre système digestif, comprenant entre  $10^7$  et  $10^9$  bactéries/g de selles chez un individu (41). Cette bactérie est un commensal de l'être humain, et la plupart du temps, non pathogène. Cependant elle peut être responsable d'une pléiade d'infections : infections urinaires (agent principal), infections digestives, méningites, sepsis, etc... Le caractère entéropathogène est lié à l'expression de facteurs de virulence acquis et/ou constitutifs, ce pouvoir pathogène étant actuellement connu pour six pathovars (46). (Cf. Figure 12).



#### **Figure 12 : Pathovars entéropathogènes de *E. coli***

***ETEC*** : Par un mécanisme proche des toxines cholériques, les toxines thermolabiles et thermostables (LT/ST) induisent des diarrhées aqueuses par stimulation de l'adénylatecyclase, provoquant l'augmentation d'AMPc, une perturbation des canaux ioniques et une fuite d'eau.

***EPEC*** : La bactérie adhère aux entérocytes, détruit l'architecture normale microvillositaire, induisant des lésions d'attachement et d'effacement. Elle remanie le cytosquelette, ceci formant un piédestal auquel *EPEC* se lie intimement.

***EHEC*** : Induit également des lésions d'attachement et d'effacement. *EHEC* sécrète aussi une Shiga-toxine (Stx), dont l'absorption systémique peut engendrer des complications sévères.

ECEAgg : Adhère aux entérocytes grâce à des *fimbriae*, puis forme du biofilm. Enfin la bactérie sécrète des entérotoxines (comme EAST1), responsable de diarrhées.

EIEC : Après invasion cellulaire, EIEC lyse la cellule phagocytaire et se déplace entre cellules grâce à des comètes d'actines.

ECAD : Croissance de projections cellulaires qui entourent la bactérie.

ETEC : *Escherichia entero-toxinogène* ; EPEC : *Escherichia coli entéro-pathogène* ; EHEC : *Escherichia coli entéro-hémorragique* ; ECEAgg : *Escherichia coli entéro-aggrégatif* ; EIEC : *Escherichia coli entéro-invasif* ; ECAD : *Escherichia coli* à adhésion diffuse

Adapté de Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. *Pathogenic Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* <sup>(50)</sup>.

### *Escherichia coli* entérotoxinogène (ETEC)

Les bactéries entéropathogènes causent au moins 80% des diarrhées du voyageur <sup>(43)</sup> et *Escherichia coli* entéro-toxinogène (ETEC) est l'agent largement majoritaire (40-70% des cas <sup>(43)</sup>). Quelques jours après la consommation d'eau ou d'aliments souillées, les diarrhées se déclarent. Elles sont aqueuses, non glairo-sanglantes, et sont associées parfois à de la fièvre et des vomissements. Pour provoquer les symptômes, la bactérie doit d'abord adhérer aux entérocytes via les *fimbriae* (aussi appelé *pili*). Elle sécrète alors une entérotoxine (thermolabile « LT » ou thermostable « ST »), très proche par sa structure et son mode d'action de la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, source de la symptomatologie (Cf. figure 12). ETEC peut également toucher les enfants en zones de développement, et causer des épidémies <sup>(42,43)</sup>. Le traitement repose la plupart du temps sur un maintien de l'hydratation associé à un anti-diarrhéique. Les antibiotiques (principalement des fluoroquinolones) sont efficaces en diminuant l'intensité et la durée de l'infection <sup>(44,45)</sup> mais leur utilisation est rarement nécessaire.

### *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC)

*Escherichia coli* entéropathogène (EPEC) est un agent majeur de diarrhées infantiles dans les pays en voie de développement. De fait, en 2008 <sup>(49)</sup>, 5 à 10 % des diarrhées pédiatriques en zone de développement lui était imputé. Les enfants très jeunes (de moins de deux ans) sont principalement touchés ; la prévalence de la maladie diminuant fortement avec l'âge, les cas sont très rares chez l'adulte <sup>(49)</sup>. La particularité de ce pathovar est son expression du gène *eae*, qui code pour l'intimine. Celle-ci via des remaniements du cytosquelette de l'entérocyte, provoque des lésions d'attachement/effacement. En effet, après l'entrée du micro-organisme dans le tractus

digestif, et adhésion aux cellules, les microvillosités sont effacées et un piédestal est formé sur lequel se fixe intimement la bactérie à la cellule (Cf. Figure 12).

La transmission de la maladie résulte de l'ingestion d'eau ou d'aliments souillés, ou d'une transmission interhumaine. Suite une incubation pouvant être très courte <sup>(47)</sup>, une symptomatologie proche de celle retrouvée lors d'une infection à ETEC se manifeste. Les diarrhées induites peuvent être persistantes, favorisant la malabsorption des nutriments. L'intensité des manifestations cliniques sont très variées allant de formes subcliniques à des issues parfois fatales <sup>(48)</sup>. Le traitement repose essentiellement sur la réhydratation, par voie orale principalement, ou par voie parentérale dans les formes préoccupantes. Le recours aux antibiotiques n'est, en général, pas nécessaire.

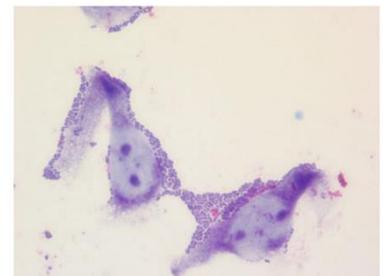
### *Escherichia coli* entéro-hémorragique (EHEC)/ *Escherichia coli* producteurs de Shiga toxines (STEC)

Les dénominations STEC et EHEC sont souvent confondues à tort. Les STEC produisent des Shiga-toxines (dénommées ainsi en raison de leurs ressemblances avec la toxine produite par *Shigella dysenteriae*) aussi appelées vérotoxines. Les EHEC sont des souches de STEC, qui partagent la capacité des EPEC d'induire des lésions d'attachement/effacement (Cf. Figure 12). Ces infections causent plus de 2,8 millions de diarrhées aiguës, 3890 cas de Syndrome Hémolytique et urémique (SHU), 270 insuffisances rénales terminales et 230 décès chaque année dans le monde <sup>(53)</sup>. Le sérotype O157:H7 est le sérotype le plus souvent mis en cause, et est responsable des plus grandes et graves épidémies <sup>(51)</sup>. Depuis 1982, plusieurs épidémies ont éclaté, principalement dans les pays industrialisés. Il existe cependant un biais lié au diagnostic et au recensement moins efficace dans les pays en développement. Ce phénomène peut également être expliqué par la consommation, dans les pays industrialisés, d'aliments dont la préparation est centralisée, favorisant l'émergence d'épidémies. En France, la plus grosse épidémie d'EHEC O157:H7 est survenue en 2005. Des steaks hachés surgelés contaminés en étaient la cause ; au total 79 personnes (dont 57 enfants de moins de 13 ans) ont été contaminés <sup>(54)</sup>. D'autres sérotypes à l'origine d'épidémies ont également été mis en causes : en Allemagne, en 2011, une épidémie éclate à EHEC O104:H4 producteur de Bêta-Lactamase à Spectre Étendu (BLSE). Au total 3816 personnes sont contaminées, 845 (22%) développeront un SHU, et l'issue sera fatale pour 54 d'entre eux <sup>(88)</sup>.

Le réservoir naturel des EHEC est le tractus digestif des ruminants, cependant, ce portage ne semble pas causer de pathologie. Par conséquent, la transmission à l'homme se fait classiquement par consommation d'aliments contaminés (notamment la viande mal cuite). La viande de bœuf est impliquée dans 40 % des épidémies, mais presque tous les aliments peuvent être sources de contaminations (viande, fruits et légumes) <sup>(51)</sup>. Plus rarement, d'autres modes de transmission sont mises en cause : la traite et l'abattage des animaux, ainsi qu'une contamination inter-humaine <sup>(54)</sup>. Comme pour *Shigella*, la dose infectante nécessaire est faible, de l'ordre de 100 bactéries <sup>(51)</sup>. Après une période d'incubation allant de 3 à 8 jours <sup>(54)</sup>, les symptômes se déclarent. Leurs intensités vont du portage asymptomatique à la colique hémorragique et au Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU), principalement chez les jeunes enfants. Dans la majorité des cas, les patients rapportent des douleurs abdominales avec des diarrhées sanglantes, associés parfois à de la fièvre et des vomissements. Chez 6 à 25 % des patients, la dissémination des Shiga-toxines induit le développement d'un SHU, mortel dans 10 % des cas <sup>(51)</sup>, qui se caractérise par l'association d'une thrombocytopénie, d'une anémie hémolytique, et d'une insuffisance rénale aiguë (IRA). La toxine sécrétée par le pathogène, Stx, est la cause de ces complications. En effet, celle-ci, produite dans le côlon, transloque dans la circulation sanguine et atteint le rein (Cf. Figure 12). Elle y endommage les cellules endothéliales et induit une occlusion de la microcirculation, qui contribue au développement du SHU. Cet état peut également engendrer des complications neurologiques ainsi que des séquelles rénales <sup>(54)</sup>. Le traitement de la phase aiguë est purement symptomatique ; les médicaments antipéristaltiques sont à éviter, ils favorisent le risque de complications systémiques. De même que l'utilisation d'antibiotiques pendant la phase aiguë qui induisent la libération de shiga-toxines <sup>(52)</sup>.

### *Escherichia coli* entero-agrégatif (ECEAgg)

Les *Escherichia coli* entero-agrégatif (ECEAgg) ont été décrits dans les années 1980 et dénommés ainsi de par leurs capacités à adhérer aux cellules HEp2 en culture, formant des images caractéristiques en « amas de briques » (Cf. Image 1). Ce pathovar ne sécrète pas les entérotoxines LT ou ST, mais certaines souches produisent une entérotoxine proche de ST : EAST1 (ECEAgg ST-like toxine). Celle-ci n'est cependant pas spécifique de ce pathovar (seulement



**Image 1 :** *Escherichia coli* entero-agrégatif formant des images en « amas de briques » sur cellules HEp2.

retrouvée dans 40% des ECEAgg) et elle a également été identifiée chez EHEC (42,58). Il est néanmoins probable que cette définition inclut également des souches non pathogènes (57). ECEAgg sévit principalement dans les pays en développement, où il est responsable de diarrhées aiguës ou persistantes chez l'enfant (55). Ce pathogène est également imputé à des diarrhées du voyageur dans toutes les catégories d'âge (56). Dans une étude réalisée au Royaume-Uni, les ECEAgg étaient le pathovar d'*E. coli* le plus souvent isolé lors de consultations pour gastro-entérites (56). Le recensement de plusieurs épidémies d'ECEAgg liées à l'alimentation a fait suspecter l'existence d'un réservoir animal, ce que ne confirmaient pas d'autres travaux ultérieurs (60,61).

Le mécanisme lié à la pathogénicité de cette bactérie comprend trois étapes : d'abord l'adhérence du micro-organisme aux entérocytes grâce à des *fimbriae* (responsables de l'adhésion agrégative) ; puis la formation de biofilm ; et enfin la sécrétion d'entérotoxines provoquant une réponse inflammatoire (57) (Cf. Figure 12). Les symptômes débutent entre 8 et 18 heures après contamination. Les infections se présentent cliniquement comme des diarrhées aqueuses non sanglantes, fébriles ou non, associés à la présence de mucus et de vomissements. La formation de biofilm favorise la persistance de ces diarrhées, qui peuvent parfois durer plus de 14 jours.

### *Escherichia coli* entéro-invasif (EIEC)

*Escherichia coli* entéro-invasif (EIEC) est taxonomiquement bien plus proche (voir identique) de *Shigella* qu'aux autres *E. coli* non pathogènes (62, 63). Tous deux sont des bacilles à Gram négatif, immobiles, ne fermentant pas le lactose et partageant des facteurs de virulence essentiels à leur pathogénicité (le plasmide *pInV* notamment). On peut néanmoins les différencier par quelques tests biochimiques mineurs (*EIEC* fermentant le glucose et le xylose). Ces deux bactéries sont également associées et mises à part des autres *E. coli* pathogènes par leurs propriétés invasives et cliniques particulières (63). Le modèle de pathogénicité d'EIEC n'est pas tout à fait élucidé, mais il semblerait partager des caractéristiques communes avec *Shigella*. Le mécanisme de la diarrhée se ferait donc sur un modèle entéro-invasif : il débute par la pénétration de la bactérie dans les cellules M qu'elle utilise comme voie d'entrée jusque la *lamina propria*. Après avoir échappé aux cellules phagocytaires, elle est capable d'envahir les entérocytes du côté baso-latéral et de s'y multiplier. Enfin l'invasion s'étend aux cellules adjacentes par la capacité de la bactérie à mobiliser les filaments d'actine

intracellulaires pour la propulser d'une cellule à une autre, telle une comète (Cf. Figure 12). Ces facteurs de pathogénicité sont portés par le plasmide *pInV*, qui code notamment l'appareil de sécrétion de type III (T3SS) qui permet la sécrétion d'invasines telles que IpaA et IpaB <sup>(50)</sup>.

EIEC se transmet principalement par l'eau ou les aliments souillés ; même si une transmission inter-humaine peut survenir. La dose infectante paraît cependant bien plus élevée que pour *Shigella*, de l'ordre de  $10^8$  bacilles <sup>(65)</sup>. La symptomatologie provoquée par EIEC occasionne des colites inflammatoires invasives et plus rarement des syndromes dysentériques. Dans la majorité des cas, EIEC cause des diarrhées aqueuses indifférenciables des autres diarrhées à *E. coli* pathogènes <sup>(50)</sup>. Les épisodes dysentériques sont plus rares, et surviennent après les diarrhées aqueuses. Par analogie avec *Shigella*, on suppose que les antibiotiques diminuent la durée de l'infection. Avant leur utilisation, il faut toutefois impérativement exclure une infection à EHEC.

Les infections à EIEC sont peu fréquentes, mais sont cependant souvent confondues avec *Shigella* et les autres pathovars d'*E. coli*. De ce fait, ce pathovar est principalement recensé dans des épidémies <sup>(63)</sup> ; les rares cas sporadiques n'étant notifiés que lorsqu'il est correctement identifié.

#### *Escherichia coli* à adhésion diffuse (ECAD)

Il s'agit d'un pathovar de *E. coli* à qui adhère aux cellules HEP2, sans former d'agrégats, provoquant des lésions diffuses (Cf. figure 12). Il se différencie de cette manière à ECEAgg, ainsi qu'à EPEC. C'est un pathovar responsable d'infections extra-intestinales (urinaire), mais il peut être responsable de diarrhées, principalement chez l'enfant de plus de 12 mois <sup>(66)</sup>. On en sait peu sur le mécanisme mis en cause pour les formes intestinales de la maladie. Néanmoins, il semblerait que la bactérie induise un effet cytopathique, qui se caractérise par le développement d'extensions cellulaires s'enroulant autour du micro-organisme <sup>(50)</sup>.

## 2- Autres étiologies bactériennes

### a. *Clostridioides difficile*

Anciennement nommé *Clostridium difficile*, *Clostridioides difficile* est un agent majeur d'infection nosocomiale, qui profite du déséquilibre de la flore intestinale provoquée par une antibiothérapie (bêta-lactamines, clindamycine, fluoroquinolones, ... <sup>(67)</sup>). Il s'agit d'un bacille à Gram positif, anaérobie strict et sporulé. La forme spore favorise sa persistance dans le milieu extérieur ; mais elle peut être retrouvée aussi chez certains animaux, ou en portage sain chez l'homme (5 % des adultes et 15 à 70% des enfants <sup>(67)</sup>). La transmission du bacille suit un mode féco-oral et débute par l'ingestion de spores résistant à l'acidité gastrique. La spore se transforme en bactérie active dans le côlon où elle sécrète deux toxines (A et B), à l'origine des symptômes. L'infection peut se manifester par une diarrhée aiguë, mais des complications graves sont possibles tel que la colite pseudomembraneuse, la forme la plus sévère de la maladie. Elle peut évoluer jusqu'au mégacôlon toxique et à la perforation digestive, potentiellement mortels. La diarrhée peut être spontanément résolutive à l'arrêt des antibiotiques, mais elle peut également nécessiter un traitement spécifique par métronidazole, vancomycine ou fidaxomicine.

### b. *Aeromonas spp.*

Les bactéries du genre *Aeromonas* sont des micro-organismes ubiquitaires de l'environnement hydrique, possédant la capacité de former des biofilms. Prférant l'eau douce, les eaux d'égout et de canalisations sont donc un réservoir idéal pour ces bactéries. On les retrouve également dans un large éventail d'animaux aquatiques (poissons, grenouilles, sangsues, huitres...). *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. veronii* sont les espèces les plus souvent isolées, et sont celles avec le plus grand impact clinique <sup>(68)</sup>. Elles causent le plus souvent des gastro-entérites (dans 80 % des isollements <sup>(68)</sup>), qui s'expriment sous différentes formes : diarrhées liquidiennes, syndromes dysentériques avec sang et glaires, ou des diarrhées chroniques. Plus rarement, on les isole dans des infections de plaies, des infections respiratoires, des bactériémies... Lorsqu'il est nécessaire un traitement par ciprofloxacine peut être utilisé <sup>(68)</sup>.

### c. *Klebsiella oxytoca*

*Klebsiella oxytoca* est une Entérobactérale, elle fait partie de la flore commensale digestive humaine. Cependant, dans les suites d'un traitement antibiotique, *K. oxytoca*

peut s'avérer pathogène et occasionner des diarrhées hémorragiques, mais son mécanisme n'est pas totalement élucidé <sup>(89)</sup>.

#### d. TIAC

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par la survenue d'au moins deux cas similaires d'un syndrome gastro-intestinal (diarrhées et/ou vomissements), dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire. C'est une maladie à déclaration obligatoire, cependant l'identification du germe causatif n'est pas nécessaire pour définir une TIAC. On décrit généralement, d'une part, les TIAC d'incubation courte (1 à 4 heures), causées par des toxines préalablement sécrétées dans l'aliment, par *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. D'autre part, on distingue les TIAC d'incubation longue (12 à 72 heures) dont les étiologies sont variées : *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*... Le diagnostic des TIAC tient du ressort de centres spécialisés des analyses alimentaires, qui recherchent la toxine à l'origine des symptômes.

### 3- Etiologies virales et parasitaires

Les virus représentent la première cause de diarrhées aiguës infectieuses. En France, environ 21 millions d'épisodes de gastro-entérites virales surviennent chaque année <sup>(69)</sup>. Elles sont plus courantes en hiver où elles atteignent leurs pics. Les rotavirus et les norovirus sont les agents les plus souvent mis en cause. Mais d'autres étiologies virales sont également incriminées : les sapovirus, les adénovirus et les astrovirus. Les GEA virales se manifestent par des diarrhées de courte durée associées ou non à des vomissements, avec parfois fièvre et douleurs abdominales. Ces infections sont sans gravité la plupart du temps, cependant la rapidité d'installation des diarrhées et de la déshydratation peut nécessiter une hospitalisation, notamment aux âges extrêmes de la vie.

Les parasitoses intestinales représentent l'une des principales causes de morbi-mortalité infantile en zone tropicale. Si certaines parasitoses ne doivent être suggérées qu'en cas de retour en zone d'endémie, d'autres parasitoses intestinales sont cosmopolites et doivent être évoquées, notamment en cas de diarrhées chroniques (plus de 3 semaines). Les agents mis en causes sont variés : *Giardia intestinalis* (protozoose intestinale la plus courante en France) cause des symptômes variés allant du portage asymptomatique à un syndrome de malabsorption en cas d'infection massive et chronique ; *Entamoeba histolytica* occasionne un syndrome dysentérique ;

*Cryptosporidium* spp. entraîne des diarrhées chez le patient immunodéprimé (VIH principalement). Les microsporidies, qui sont actuellement classés parmi les champignons, sont également à même de causer des diarrhées chez le patient immunodéprimé.

## **IV-Diagnostic**

### **1- Diagnostic clinique**

L'examen clinique du patient permet généralement à lui seul le diagnostic d'une GEA infectieuse. Celle-ci est classiquement caractérisée par des diarrhées aiguës parfois associées à des vomissements, de la fièvre et des douleurs abdominales. Les diarrhées infectieuses étant majoritairement d'origine virale, lorsque la symptomatologie reste modérée, il ne sera donc pas nécessaire de réaliser des examens complémentaires. L'identification d'un syndrome diarrhéique (cholérique, dysentérique, gastro-entérique) permettra donc une première orientation diagnostique.

L'interrogatoire du patient apporte également des éléments essentiels : la notion de contagion, la présence d'autres cas dans l'entourage (suspicion de TIAC), les aliments consommés, la notion de voyage, la prise d'antibiotiques.... Ces informations orienteront le diagnostic (étiologie bactérienne, virale, parasitaire ou autre), et identifieront les formes les plus sévères. Au cours de l'anamnèse, la connaissance du terrain du patient est capitale, elle permet de connaître la présence de maladies sous-jacentes (les états d'immunodépression notamment) favorisant ce type d'infections.

L'examen clinique se révélera particulièrement utile dans l'identification des formes plus compliquées : la déshydratation et le sepsis étant les risques majeurs des diarrhées aiguës ; il permettra également d'écartier les urgences chirurgicales.

Le diagnostic clinique est donc capital dans la prise en charge du patient, en permettant une première orientation diagnostique, il identifie les formes à risques et définit la suite de la prise en charge. Des examens biologiques complémentaires ne seront nécessaires que dans les formes présentant des facteurs de gravité ou des facteurs de risque de complication.

### **2- Diagnostic biologique**

Lorsqu'une étiologie bactérienne peut être évoquée (diarrhée glairo-sanglante invasive, retour de zone d'endémie, entourage proche atteint, contexte de TIAC, immunodépression) des examens microbiologiques complémentaires doivent être réalisés. La coproculture est la technique de référence mais l'avènement des

techniques de biologie moléculaire propose de nouveaux horizons diagnostics. La recherche de bactéries entéro-pathogènes doit être aussi associée à un bilan biologique complémentaire à la recherche d'une inflammation et d'une déshydratation.

### a. Aspect macroscopique des selles

Une fois l'échantillon arrivé au laboratoire, l'appréciation de l'aspect des selles est la première étape du processus diagnostique. Il permet d'orienter le diagnostic : la présence de diarrhées glairo-sanglantes fait suspecter préférentiellement une infection à bactérie entéro-invasive ; les diarrhées purement liquidiennes nous dirigent plutôt sur une infection virale ou une infection à bactérie non invasive. La présence de sang est parfois invisible à l'œil nu, un test immunochromatographique peut alors être réalisé pour révéler sa présence. Les selles vont d'une consistance dure (indiquant une constipation) aux formes liquidiennes pures (faisant suspecter la diarrhée infectieuse). A cela, des aspects glaireux, hémorragiques et pâteux peuvent se surajouter. L'échelle de Bristol (Cf. Figure 13) est un outil facilitant la différenciation de ces différents aspects et un agent pathogène infectieux peut être suspecté à partir du type n°5.

Type 1		Petites crottes dures et détachées, ressemblant à des noisettes. Difficiles à évacuer.
Type 2		En forme de saucisse, mais dures et grumeleuses.
Type 3		Comme une saucisse, mais avec des craquelures sur la surface. Crotte quasiment parfaite.
Type 4		Ressemble à une saucisse ou un serpent, lisse et douce. Crotte parfaite.
Type 5		Morceaux mous, avec des bords nets (néanmoins aisés à évacuer).
Type 6		Morceaux duveteux, en lambeaux, selles détrempées.
Type 7		Pas de morceau solide, entièrement liquide.

**Figure 13 : Echelle de Bristol**

Les types 1 et 2 indiquent une constipation, les types 3 et 4 sont idéals, et les types de 5 à 7 tendent vers la diarrhée.

Constipation chronique | SNFGE.org - Société savante médicale française d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive <sup>(70)</sup>.

### b. Microscopie

Un examen microscopique peut être réalisé, il permet de mettre en évidence un déséquilibre de la flore microbienne, de la quantifier semi-quantitativement et d'objectiver une réponse inflammatoire par la détection d'une leucocytorrhée.

### c. Coproculture

La coproculture bactérienne reste la technique de référence pour la recherche de bactérie entéro-pathogènes. Elle consiste en l'ensemencement des selles sur des milieux sélectifs permettant l'isolement d'une bactérie pathogène putative. La Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM) impose la recherche, *a minima*, de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. et *Yersinia enterocolitica*. Certaines recherches spécifiques peuvent s'ajouter en fonction du contexte clinique : la recherche de *Vibrio cholerae* (voyage en zone d'endémie), de certains pathovars d'*E. coli*, de *Plesiomonas shigelloides*...

Une fois une colonie bactérienne suspecte isolée des milieux de culture, celle-ci est identifiée au niveau de l'espèce. Une fois l'identification d'une bactérie entéro-pathogène confirmée, un test de sensibilité aux antibiotiques (ou antibiogramme) est réalisé pour faciliter la prise en charge thérapeutique. Malgré le temps gagné grâce à l'identification microbienne par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*), aujourd'hui très largement répandue, la principale limite de la coproculture est le délai d'analyse. Il faut compter 48h pour un résultat négatif ; 24 à 48h supplémentaires en cas d'identification d'une bactérie entéro-pathogène auxquelles s'ajoutent à nouveau 24 à 48h pour l'obtention de l'antibiogramme. A ces délais peuvent s'ajouter un temps de repiquage sur milieux spécifiques parfois nécessaire pour confirmer ou infirmer la présence d'entéro-pathogènes. Enfin, bien que très spécifique, cet examen de laboratoire est considéré assez peu rentable pour le diagnostic du fait d'une sensibilité insuffisante, estimée entre 60 et 76% pour l'identification de *Campylobacter* par exemple <sup>(115)</sup>.

### d. Biologie moléculaire

Les techniques d'amplification génique (ou de PCR, pour *Polymerase Chain Reaction*), initialement dédiées à la détection de micro-organismes non cultivables ou de culture difficile, sont en plein essor dans le domaine du diagnostic microbiologique. Les performances de ces techniques se sont progressivement accrues passant de PCR en point final ne détectant qu'un seul micro-organisme à la quantification en simultané de plusieurs cibles microbiennes en temps réel (qRT-PCR pour *quantitative*

*Real Time PCR*) grâce à la combinaison de sondes spécifiques couplées à différents fluorophores ; on parle alors de *Multiplex PCR*.

Comme pour d'autres tableaux cliniques, la recherche de bactéries entéro-pathogènes, est effectuée grâce à l'assemblage de plusieurs cibles moléculaires regroupées en un panel de qRT-PCR dit « syndromique ». Selon le fabricant, ce panel comprend *a minima* les bactéries entéro-pathogènes présentes à la NABM auxquelles peuvent s'ajouter d'autres pathogènes pouvant inclure des virus et/ou des parasites.

Cette technique démontre de nombreux avantages : un temps de rendu très court (entre 2 et 3 heures), un temps technique faible (quelques minutes), et une sensibilité accrue comparée à la coproculture. De plus, certains pathogènes non prévus par la NABM peuvent être détectés (comme les pathovars d'*E. coli*) sans faire l'objet d'une demande spécifique. Néanmoins son coût est très largement supérieur à celui de la culture. En outre, en cas de réaction d'amplification génique positive, la mise en culture reste nécessaire, afin de réaliser *in fine*, un antibiogramme. Enfin, pour la plupart des bactéries détectées, l'identification se fait au niveau du genre et non à celui de l'espèce et une mise en culture peut s'avérer nécessaire pour atteindre ce niveau de précision, que ce soit à des fins épidémiologiques et/ou de prise en charge thérapeutique.

# MATERIELS ET METHODES

## I-Modalités de l'étude

### 1- Sélection des échantillons

Les échantillons de selles analysés au laboratoire proviennent des différents services du Centre Hospitalier de Tourcoing, ainsi que de quelques centres y sous-traitants leurs analyses. Les échantillons sélectionnés pour notre étude, l'ont été selon les critères suivants (Tableau 1) :

<b><i>Critères d'inclusion</i></b>	<b><i>Critères d'exclusion</i></b>
Clinique évocatrice : diarrhées, douleurs abdominales, suspicion d'entérite...	Diarrhées avec une étiologie non infectieuse connue.
Syndrome inflammatoire (Elévation de la CRP et/ou de la PCT, hyperleucocytose,...).	Diarrhées apparues après plus de 72 h d'hospitalisation.
Hyperthermie.	Diarrhées chroniques (sauf si contexte d'immunodépression).
Aspect des selles anormal, présence de sang dans les selles.	Les nouveau-nés, avant la diversification alimentaire.
Notion de contagé récent.	Services extérieurs, sans accès au contexte clinique (CH Watrelos).

**Tableau 1 : Critères de sélection des échantillons de notre étude.**

### 2- Le prélèvement

L'échantillon de selle devait être recueilli dans un pot stérile, correctement fermé et identifié (selon les recommandations du Remic<sup>(93)</sup>).

### 3- Conservation des échantillons

Les prélèvements ont été conservés à -20°C jusqu'au rendu des résultats complets des différentes analyses (coproculture et PCR multiplexée).

## II-Recueil de données

Les données démographiques du patient (Nom, prénom, date de naissance, sexe) ont été récupérées via le SIL : GLIMS (CliniSys/MIPS, Gand, Belgique). Concernant les informations cliniques, elles ont été consultées à partir du Dossier Patient Informatisé hébergé sur l'application Hopital Manager (Softway Medical, Meyreuil, France).

Toutes les données ont été saisies sur un tableur Excel (Microsoft, Redmond, WA) : nom du patient, date de naissance, sexe, service clinique, numéro de dossier GLIMS, contexte clinique, aspect des selles, résultats de la coproculture, résultats du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, résultats invalides et relances éventuelles.

### III-Coproculture

#### 1- Nomenclature

Conformément à la nomenclature des actes de biologie médicale, l'analyse comprenait la recherche systématique de :

- *Salmonella* spp.
- *Shigella* spp.
- *Campylobacter* spp.
- *Yersinia enterocolitica*

A cela, certaines demandes spécifiques peuvent se rajouter, telles que la recherche d'*Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC), *Vibrio cholerae*...

#### 2- Aspect macroscopique

Dès la prise en charge de l'échantillon, l'aspect macroscopique des selles était relevé selon la classification suivante :

Selles :

- Glaireuses
- Liquides
- Moulées
- Pâteuses
- Sanglantes

En cas de selle liquide, la recherche d'une leucocytorrhée était réalisée. Pour cela, 100 µL de selles étaient repris dans 10 mL d'eau physiologique. Une goutte de cette suspension était ensuite incorporée dans une cellule d'hématimètre :

- un dénombrement de 10 leucocytes ou plus confirmant la présence d'une leucocytorrhée.

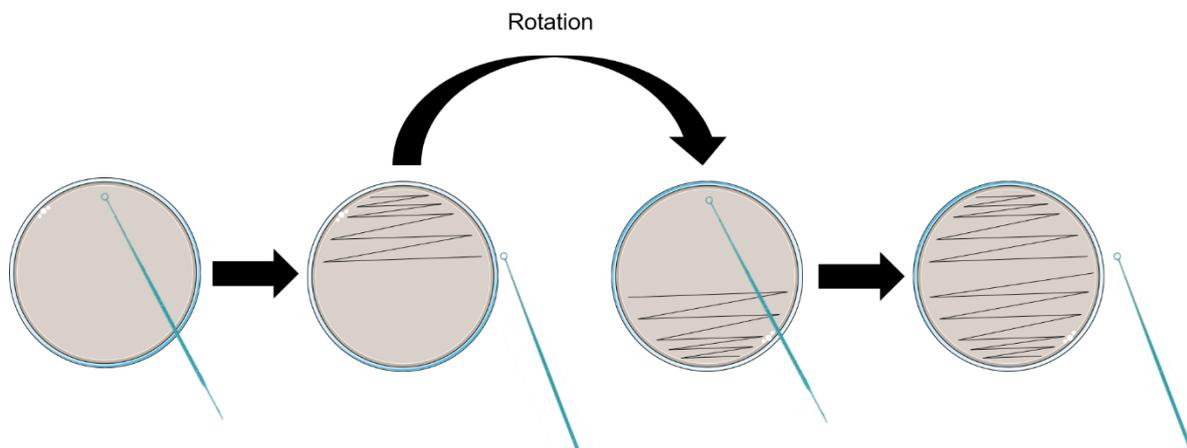
#### 3- Mise en culture / Ensemencement

L'ensemencement a été réalisé par demi-boîte (Cf. Figure 14). Nous avons prélevé un peu de selle avec une boucle d'inoculation non pleine et ensemencé :

- 1 gélose Karmali, milieu sélectif pour la recherche de *Campylobacter* spp. (ThermoFisher, Montigny-le-Bretonneux, France)

Puis nous avons préparé la suspension suivante : une noisette de selle dans 3 mL d'eau physiologique si la selle était solide, ou 100 µL dans 10 mL d'eau physiologique si la selle était liquide. A partir de cette suspension, les milieux suivants ont été ensemencés :

- 1 gélose CIN, milieu sélectif pour la recherche de *Yersinia enterocolitica*. (BioRad, Marnes-la-Coquette, France)
  - 1 gélose Hektoën, milieu sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants, utilisé pour la recherche de *Salmonella* spp. et *Shigella* spp. (BioRad, Marnes-la-Coquette, France)
  - 1 gélose Sabouraud, milieu non sélectif pour la recherche de levures. (BioRad, Marnes-la-Coquette, France)
  - 1 bouillon Muller Kauffmann, bouillon d'enrichissement sélectif pour *Salmonella* spp. (BioRad, Marnes-la-Coquette, France)
- } 1 öse de 10 µL  
} 1 mL



**Figure 14 : Méthode d'ensemencement par demi-boîte.**

L'ensemencement a été réalisé en stries serrées à l'aide d'une öse 10µL. Une première moitié de boîte de Petri a été ensemencée, puis après rotation, la seconde moitié a été ensemencée.

#### 4- Lecture des milieux de cultures

##### Milieu CIN, *Yersinia enterocolitica*

Après 18 à 24h d'incubation à  $30 \pm 0,8^\circ\text{C}$ , des colonies caractéristiques en « œil de poisson », c'est-à-dire transparentes sur les contours et avec un centre rose fuchsia bien prononcé étaient recherchées. Le cas échéant, ces colonies suspectes étaient identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-TOF-MS).



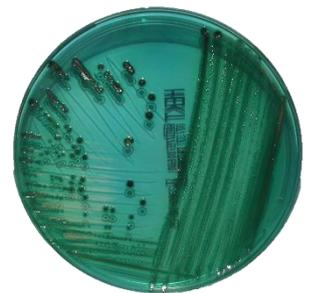
### Milieu Karmali, *Campylobacter* spp.

Après 48 h d'incubation à  $35\pm 1.8^{\circ}\text{C}$ , des colonies de couleurs grises, de 1 à 2 mm, parfois bombées étaient recherchées. La réalisation d'une coloration de Gram, ou d'un état frais ont pu nous conforter sur une suspicion de *Campylobacter*, on observait alors des bacilles spiralés, incurvés, très mobile, « en vol de moucheron ». Le cas échéant, les colonies suspectes étaient identifiées par MALDI-TOF-MS.



### Milieu Hektoën, *Salmonella* spp. et *Shigella* spp.

Après 48 h d'incubation à  $35\pm 1.8^{\circ}\text{C}$ , des colonies vertes, bleues, à centre noir (indiquant la production de sulfure d'hydrogène  $\text{H}_2\text{S}$ ) étaient recherchées. Les colonies jaunes ou orangées, indiquant l'utilisation du lactose, du saccharose et/ou de la salicine, n'étant donc ni des bactéries du genre *Salmonella* ni des bactéries du genre *Shigella*, n'ont pas été identifiées. Seules les colonies suspectes ont été identifiées par MALDI-TOF-MS.



Du fait de l'impossibilité de différencier par MALDI-TOF-MS les espèces du genre *Shigella* de *E. coli*, les colonies suspectes identifiées comme étant *E. coli* étaient testées avec des antisérums spécifiques (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) de *Shigella* spp. (sérotypage). Pour cela, nous avons ensemencé une gélose TCS et l'avons incubé à  $35\pm 1.8^{\circ}\text{C}$ , afin d'obtenir une culture pure. Après 18 à 24 h d'incubation, nous avons mis celle-ci en présence des différents antisérums spécifiques (*Shigella dysenteriae*, *flexneri*, *boydii*, *sonnei*). Nous avons alors déposé une goutte d'antisérum sur une lame de verre parfaitement propre, et émulsionné à la pipette un peu de culture bactérienne prélevée sur la gélose TCS. Nous avons ensuite agité le mélange réactionnel par mouvements lents et circulaires de la lame. Une espèce de *Shigella* était identifiée si la culture agglutinait avec l'antisérum correspondant. En absence d'agglutination ou si la colonie agglutinait avec plusieurs antisérums, l'identification de *E. coli* était confirmée.

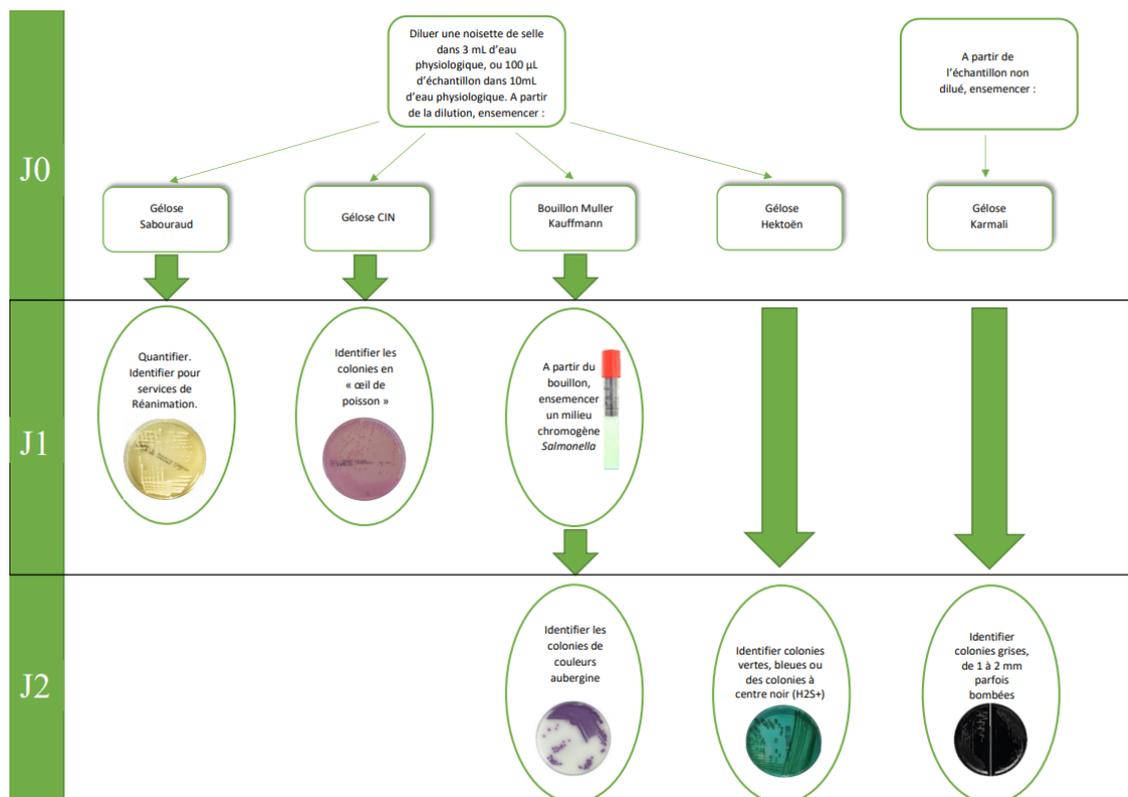
## Milieu chromogène *Salmonella* spp.

Après 18 à 24h d'incubation à  $35 \pm 1,8^\circ\text{C}$ , nous avons, à l'aide d'une boucle d'inoculation de 10  $\mu\text{L}$ , ensemencé un milieu chromogène spécifique des *Salmonella* spp. (gélose chromID™ *Salmonella* (SM2), BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) à partir du bouillon Muller Kauffmann (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Après 18 à 24h d'incubation supplémentaires à  $35 \pm 1,8^\circ\text{C}$ , des colonies de couleur aubergine étaient recherchées. Le cas échéant, ces colonies suspectes étaient identifiées par MALDI-TOF-MS.



## Milieu Sabouraud, recherche de levures

Après 18 à 24h d'incubation à  $35 \pm 1,8^\circ\text{C}$ , les levures étaient recherchées, et le cas échéant dénombrées semi-quantitativement et identifiées par MALDI-TOF-MS.



**Figure 15 : Prise en charge des coprocultures au CH de Tourcoing.**

CIN : Cefsulodine Irgasan Novobiocine ; H2S+ : Production de sulfure d'hydrogène ; JO : Jour 0 ; J1 : Jour 1 ; J2 : Jour 2.

## 5- Identification

L'identification a été réalisé par spectrométrie de masse *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF)*, Vitek®MS Biomerieux.

Chaque isolat suspect sur boîte de Petri a été déposé sur un puit de la cible métallique destinée au spectromètre de masse, puis co-cristallisé par séchage avec 1 µL de matrice (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Après séchage complet, la cible était insérée dans le spectromètre de masse, et l'analyse était lancée. Une fois terminée, nous avons visualisé et validé les résultats dans l'interface informatique Myla™ (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France).

## 6- Rendu des résultats

Après validation dans Myla™, les identifications étaient transmises dans le SIL GLIMS (MIPS, Vincennes, France). En prenant en compte ces dernières, le résultat de l'analyse était alors le suivant :

- **Présence d'un ou plusieurs entéro-pathogènes** : les isolats identifiés étaient alors rendus, dénombrés semi-quantitativement et associés à un antibiogramme.
- **Flore digestive banale** : si aucun entéro-pathogène n'était identifié et sans rapporter l'identification des bactéries commensales.

## IV- BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

### 1- Cibles

Le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel détecte les acides nucléiques de :

- *Salmonella* spp. (séquence du gène *spaO*)
- *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli* (séquence du gène *tuf*)
- *Shigella* spp. /*E. coli* entéro-invasif ou EIEC (séquence du gène *ipaH*)
- Shiga-toxines 1 et 2 (gènes *stx1* et *stx2* présents chez *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) ainsi que chez *Shigella dysenteriae*).

Le BD MAX™ Extended Enteric Bacterial Panel détecte les acides nucléiques de :

- *Plesiomonas shigelloides* (fragment spécifique non décrit par le fabricant)
- *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* (séquence du gène *atpA*)

- L'entérotoxine thermolabile (séquence du gène *eltA*) et entérotoxine thermostable d'*E. coli* entérotoxigène LT (séquence des gènes *sta1* et *sta2*)
- *Yersinia enterocolitica* (séquence du gène *invA*)

## 2- Préparation de l'échantillon

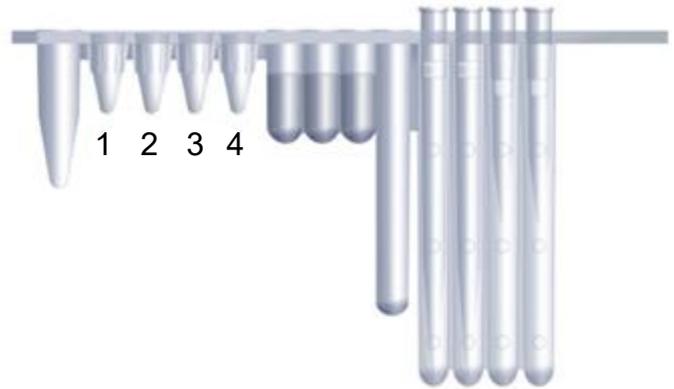
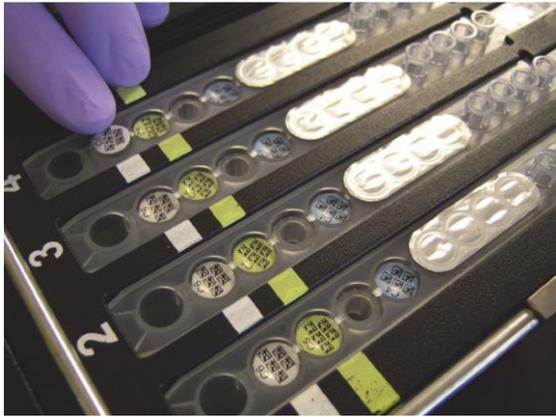
Pour chacun des échantillons à analyser, nous avons préparé : un tube de tampon échantillon, un capuchon à membrane, deux tubes Master Mix (un pour le panel entérique classique, un pour le panel entérique étendu), un tube d'extraction et une barrette réactive.

Pour chaque échantillon nous avons procédé comme suit : après l'avoir homogénéisé pendant 15 secondes au vortex, nous avons procédé à son inoculation. Pour cela, nous avons prélevé une öse de 10 µL, sans prendre trop de matériel (afin de limiter le risque d'inhibition de la réaction PCR), puis avons remis en suspension l'öse chargée dans le tube de tampon échantillon jusqu'à obtenir une solution de couleur « thé ». Le tube de tampon échantillon inoculé a été ensuite rebouché à l'aide d'un bouchon à membrane, puis mélangé au vortex à vitesse maximum pendant une minute.

## 3- Utilisation du BD MAX system

Pour chaque échantillon à tester, nous avons placés une barrette réactive sur le portoir du BD MAX System. Nous avons placé les réactifs dans les barrettes réactives comme indiqué dans la Figure 16 : les tubes Extraction (aluminium blanc) en position 1, les tubes BD MAX™ Enteric Bacterial Panel Master Mix (aluminium vert) en position 2, et les tubes BD MAX™ Extended Enteric Bacterial Panel Master Mix (aluminium bleu) en position 4.

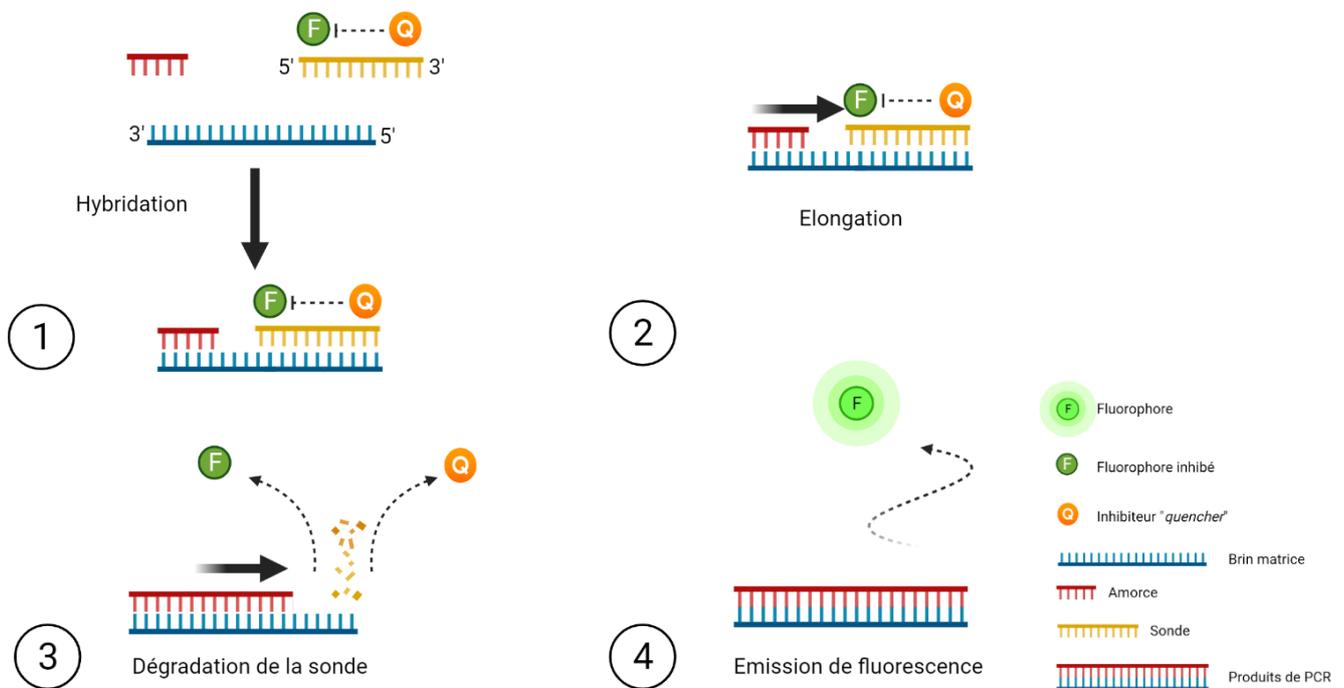
Une fois les tubes de tampon échantillon identifiés par l'informatique de l'appareil et associés à l'identité de l'échantillon du patient correspondant, nous avons placé les tubes échantillons dans les portoirs du BD MAX System ainsi que les BD MAX PCR Cartridge. Une fois assuré que le système était correctement clos, l'analyse a pu être démarrée.



**Figure 16 :** Visualisation du clipsage des tubes d'extraction et de Master Mix dans les barrettes réactives.

#### 4- PCR en temps réel

À la suite de la lyse enzymatique des cellules à température élevée, les acides nucléiques libérés sont capturés sur des billes magnétiques d'affinité. Les billes, liées aux acides nucléiques, sont lavées et les acides nucléiques sont élués. L'ADN élué est neutralisé et transféré dans un Master Mix Tube pour réhydrater les réactifs de PCR. Après réhydratation, le BD MAX System dépose un volume fixe de solution prête pour la PCR dans la BD MAX PCR Cartridge. Les microvalves de la BD MAX PCR Cartridge sont scellées par le système avant de commencer la PCR pour contenir le mélange d'amplification, empêchant ainsi l'évaporation et la contamination. Les cibles d'ADN amplifiées sont détectées par des sondes d'hydrolyse de type TaqMan, marquées à une extrémité par un colorant fluorescent (fluorophore) et à l'autre extrémité par un fragment inhibiteur. Des sondes marquées avec des fluorophores différents servent à détecter les amplicons pour les cibles bactériennes entériques. Quand ces sondes sont à leur état natif, la fluorescence du fluorophore est inhibée à cause de la proximité de l'inhibiteur. Cependant, en présence de l'ADN cible, les sondes s'hybrident à leur séquence complémentaire et sont hydrolysées par l'activité 5'–3' exonucléase de l'ADN polymérase à mesure que le brin naissant le long de la matrice d'ADN est synthétisé. Il en résulte que les fluorophores sont séparés des molécules inhibitrices et qu'une fluorescence est émise (Cf. Figure 17).



**Figure 17 : Utilisation de la sonde TaqMan dans le cadre d'une PCR en temps réel.**

*1:* La sonde TaqMan comprend un fluorophore dont la fluorescence est inhibée par un inhibiteur, un « quencher », à proximité. Lors de la PCR en temps réel, la sonde Taqman et l'amorce s'hybrident sur une région d'ADN qui leur est spécifique.

*2:* La Taq polymérase élonge l'amorce pour synthétiser un nouveau brin complémentaire de l'extrémité 3' à 5' du brin matrice.

*3:* L'activité de la Taq polymérase, lors de l'élongation, entraîne la dégradation de la sonde et le relargage du fluorophore et de son inhibiteur.

*4:* Le fluorophore étant séparé de son inhibiteur, sa fluorescence est exprimée. Elle est proportionnelle à la quantité de fluorophore libérée et donc à la quantité de produits de PCR.

PCR : Polymerase Chain Reaction

## 5- Interprétation et présentation des résultats du BD Max System

Le BD MAX System interprète automatiquement le signal : il surveille la fluorescence émise à chaque cycle et interprète les données à la fin du programme pour fournir les résultats finaux. Chaque cible est spécifique d'une longueur d'onde, il en est de même pour le contrôle interne. Pour chaque bactérie du panel, l'automate rend un résultat « POS », « NEG » ou « UNR ».

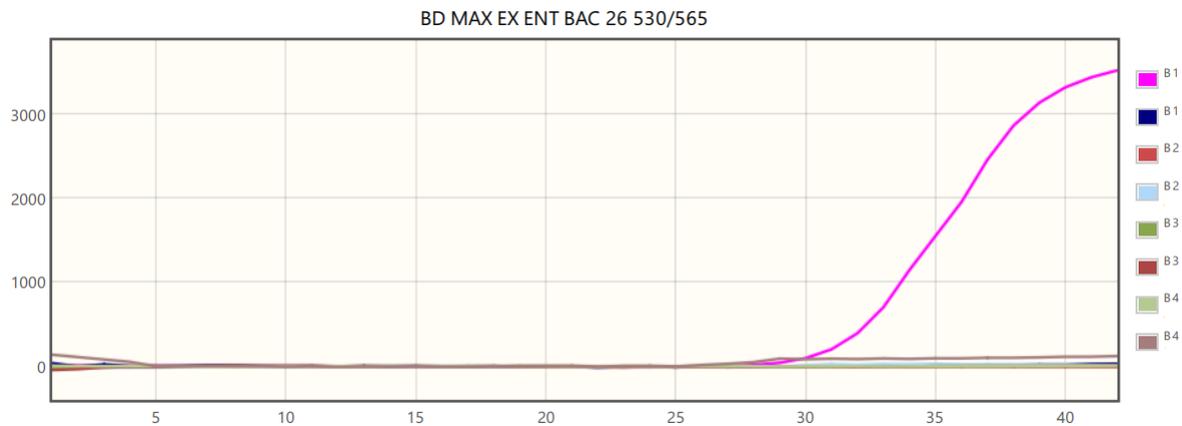
POS : Détection de la cible

NEG : Absence de détection de la cible et détection du contrôle de traitement d'échantillon

UNR : Absence de détection de la cible et absence de détection du contrôle de traitement d'échantillon

Le BD MAX interprétant les courbes de PCR pour le rendu des résultats selon des algorithmes généraux de PCR en temps réel, il était nécessaire de vérifier la concordance de chaque résultat avec la courbe d'amplification correspondante (Cf. Figure 18).

Position	Nom test	Tube échantillon	ID patient	Résultat	Ct 475/520	Ct 530/565	Ct 585/630	Ct 630/665	Ct 680/715
État de prép. d'échantillon	État PCR	N° d'examen	Dissoc.		Dissoc.	Dissoc.	Dissoc.	Dissoc.	
Numéro de lot	Cartridge Barcode	Lot de Master Mix	475/520		530/565	585/630	630/665	680/715	
B1	BD MAX EX ENT BAC 26	B33016087220220129KL13		Shig NEG   STX NEG Campy NEG   Salm POS Vibrio NEG   Plesio NEG ETEC NEG   Yersi NEG	-1,0	30,1	-1,0	-1,0	27,3
Success	Success		200810		-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	27,3
K52019505320220129	C24021283120220904AI39	M26020345920220205			--	--	--	--	--



**Figure 18 : Rendu des résultats du BD MAX System.**

Les différentes longueurs d'ondes détectées par le BD MAX System sont associées à la détection d'une bactérie entéropathogène spécifique. Dans cet exemple, à la longueur d'onde 530/565, correspondant au fluorophore associée à la détection de *Salmonella* spp, l'échantillon B1 (rose fuchsia) est positif. Le BD MAX System propose alors une interprétation « Salm POS », et détaille le Ct (30,1), ainsi que le Ct de la courbe d'amplification du contrôle interne (27,3).

Ct : Cycle threshold ; PCR : Polymerase Chain Reaction ; NEG : négatif ; POS : positif ; Shig : *Shigella* spp ; STX : shiga-toxines ; Campy : *Campylobacter jejuni* et *coli* ; Salm : *Salmonella* spp ; Vibrio : *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio cholerae* ; Plesio : *Plesiomonas shigelloides* ; ETEC : *Escherichia coli* entéro-toxinogène ; Yersi : *Yersinia enterocolitica*.

## 6- Invalide et relance

Les échantillons pour lesquels il n'y avait pas de détection du contrôle de traitement d'échantillon (résultats « UNR ») ont été relancés. Cependant, si leur repassage ne permettait pas l'obtention d'un autre résultat, un troisième passage était réalisé en prétraitant au préalable l'échantillon par un choc thermique afin de réduire au minimum l'activité de potentiels inhibiteurs de la réaction de PCR. Pour cela, l'échantillon était congelé à -80°C. Une fois congelé il était soumis à une décongélation rapide à +60°C au bain marie.

## 7- Validation et rendu des résultats

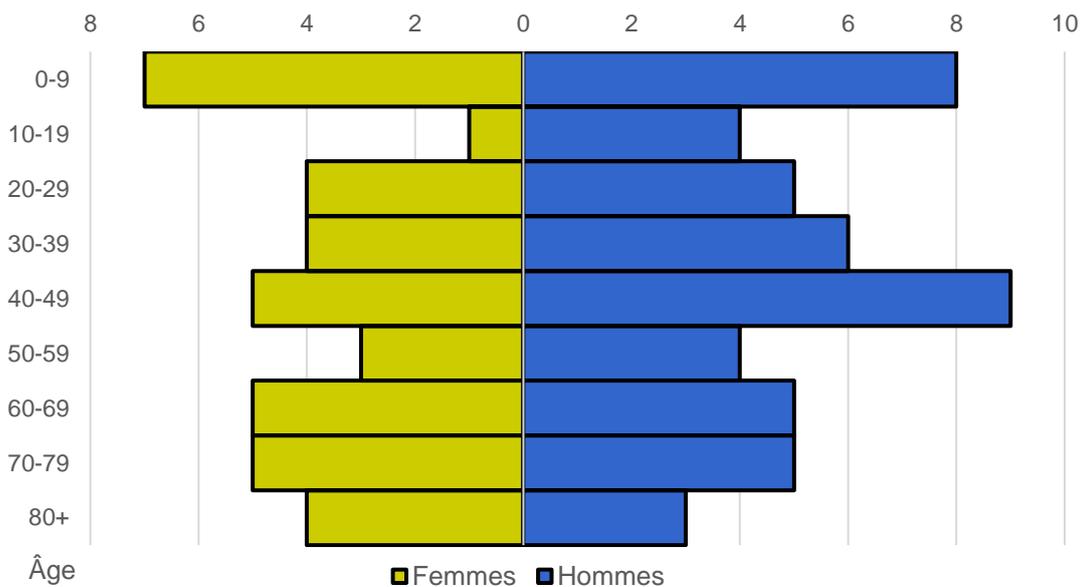
Les résultats vérifiés sur le BD MAX System ont été transmis au SGL GLIMS. Pour chaque bactérie du panel, un résultat « positif » ou « négatif » était validé et rendu après interprétation biologique.

# RESULTATS

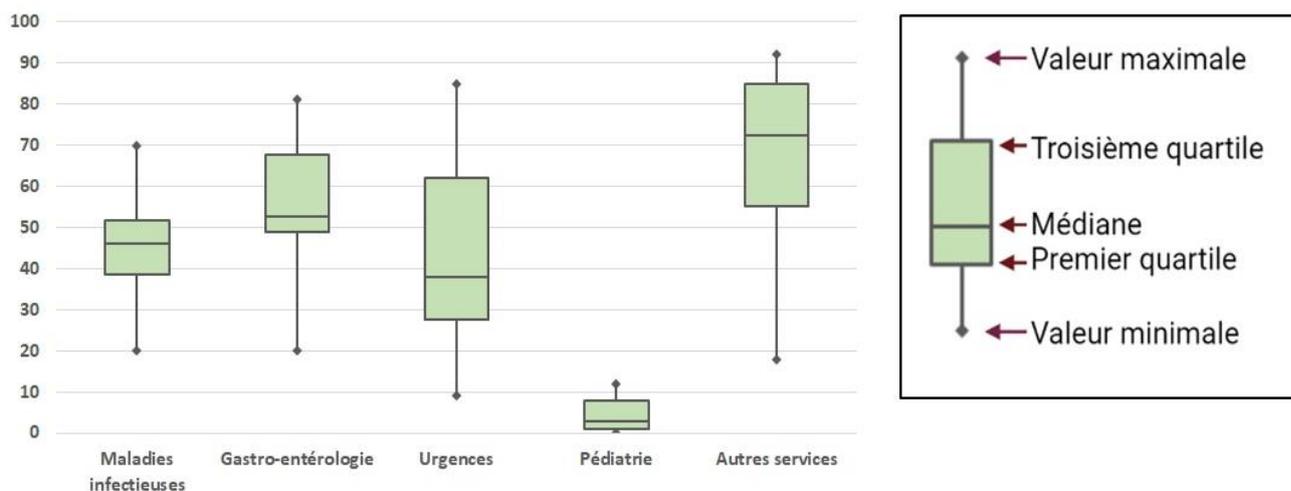
## I-Caractéristiques démographiques

Durant 10 mois, nous avons inclus, recueilli et analysé les échantillons de 87 patients. Une majorité d'homme composait l'étude : 49 hommes pour 38 femmes (sex ratio H/F = 1,29), avec un âge moyen de  $43 \pm 27$  ans (mini : 9 mois ; maxi : 92). La répartition des participants à notre étude selon l'âge est décrite dans la Figure 19.

Les patients provenaient principalement de 4 services : Service Universitaire des Maladies Infectieuses et du Voyageur (SUMIV), Gastro-entérologie, Urgences et Pédiatrie (Cf. Tableau 2). Les services restants sont réunis dans un groupe nommé « autres services ». La distribution des âges des patients selon le service prescripteur est représentée par la figure 20.



**Figure 19 :** Pyramide des âges (en années) des patients inclus dans notre étude.



**Figure 20 :** Distribution des âges (en année) des patients inclus dans notre étude selon le service prescripteur.

SERVICES PRESCRIPTEURS				
SERVICE	HOMME	FEMME	SEXE RATIO	TOTAL
M. INFECTIEUSES	11 (73,3%)	4 (26,6%)	2,75	15 (17,2%)
GASTROENTEROLOGIE	6 (42,9%)	8 (57,1%)	0,75	14 (16,1%)
URGENCES	11 (45,8%)	13 (54,2%)	0,85	24 (27,6%)
PEDIATRIE	11 (61,1%)	7 (38,9%)	1,57	18 (20,7%)
AUTRES SERVICES	10 (62,5%)	6 (37,5%)	1,67	16 (18,4%)
<b>TOTAL</b>	<b>49</b>	<b>38</b>	<b>1,29</b>	<b>87</b>

**Tableau 2 :** Principaux services prescripteurs des échantillons inclus dans notre étude.

## II-Résultats des coprocultures et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

### 1- Coproculture

Parmi les 87 échantillons retenus pour l'étude, la coproculture était positive chez 30 patients (34,5%), dont 26 (29,85%) correspondent à des bactéries dont la recherche est prévue par la NABM (Cf. Tableau 3). Les bactéries du genre *Campylobacter* étaient les agents pathogènes les plus couramment isolés : 11 échantillons positifs (12,6%),

suivies de *Shigella* spp. et de *Salmonella* spp. avec respectivement 8 isolements (9,2%) et 6 isolements (6,9%). Enfin, une coproculture identifiait *Yersinia enterocolitica* (1,15%).

La coproculture a permis également l'identification de 4 bactéries du genre *Aeromonas* (4,6%) dont la recherche n'est pas demandée par la NABM et ne figure pas dans le panel entérique du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, et la mise en évidence de 4 levures. La synthèse des résultats des coprocultures est reprise ci-dessous (Cf. Figure 21).



**Figure 21 :** Synthèse des résultats des coprocultures incluses dans notre étude.

## 2- BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

Au sein des 87 échantillons retenus pour notre étude, 37 présentaient un résultat positif (avec au moins une bactérie identifiée), soit un taux de positivité de 42,5 %. Comme la coproculture, lorsqu'elle est positive, la PCR retrouve nettement plus souvent *Campylobacter jejuni/coli* avec 18 échantillons positifs ce qui représente un taux de positivité de 20,7%. Le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel a identifié également : 9 *Shigella* spp. (taux de positivité de 10,3%), 6 *Salmonella* spp. (taux de positivité de 6,9 %), 5 Shiga-toxines 1 et 2 (taux de positivité de 5,7 %) ainsi que 2 *Yersinia enterocolitica* (taux de positivité de 2,3 %).

Notons que, la PCR Multiplexe a détecté un total de 40 bactéries, chez 37 patients différents. En effet, parmi eux, 3 présentaient une co-infection. Ainsi, nous avons pu retrouver les associations bactériennes suivantes : *Salmonella/Campylobacter*, *Salmonella/Shiga-toxines* et *Campylobacter/Shiga-toxines*.

On peut néanmoins souligner que, 3 des bactéries ciblées par le panel étendu du BD MAX™ Enterical Bacterial Panel n'ont jamais été retrouvées au cours de notre étude : *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae/parahaemolyticus/vulnificus* et ETEC.

Enfin, contrairement à la coproculture, le BD MAX™ Enterical Bacterial Panel n'a mis en évidence aucun *Aeromonas* spp. ni aucune levure, ces micro-organismes ne figurant pas parmi ceux ciblés.

La synthèse des résultats des deux techniques est exposée dans le Tableau 3 suivant.

## BACTERIES ENTEROPATHOGENES DETECTEES PAR LA COPROCULTURE ET LE BD MAX™ ENTERIC BACTERIAL PANEL

Technique	Coproculture		BD MAX™ Enteric Bacterial Panel	
<b>Sur 87 échantillons sélectionnés</b>	87 échantillons testés 87 résultats rendus complets		87 échantillons testés 84 résultats rendus complets	
	<b>Nombre de patients positifs</b>	<b>Taux de positivité (/87)</b>	<b>Nombre de patients positifs</b>	<b>Taux de positivité (/87)</b>
<i>Salmonella</i> spp.	6	6,9 %	6	6,9 %
<i>Shigella</i> spp. et EIEC	8	9,2 %	9	10,3 %
<i>Campylobacter jejuni</i> et <i>coli</i>	11	12,6 %	18	20,7 %
Shiga-toxines 1 et 2	0	0 %	5	5,7 %
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1,15 %	2	2,3 %
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	0	0 %	0	0 %
<i>Vibrio cholerae</i> / <i>parahaemolyticus</i> / <i>vulnificus</i>	0	0 %	0	0 %
ETEC	0	0 %	0	0 %
<i>Aeromonas</i> spp.	4	4,6 %	0	0 %
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>34,5 %</b>	<b>37</b>	<b>42,5%</b>
<b>Co-infections</b>	<b>0</b>		<b>3</b>	

**Tableau 3 : Synthèse des bactéries entéropathogènes détectées par coproculture et par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.**

*ETEC* : *Escherichia coli* entéro-toxinogène ; *EIEC* : *Escherichia coli* entéro-invasif

### 3- Autres résultats considérés comme des Faux positifs

#### Coproculture

Nous avons identifié deux résultats faussement positifs par coproculture :

- Face à la difficulté de discriminer *Shigella* spp. de *E. Coli* par MALDI-TOF-MS, l'identification de ce genre bactérien repose au laboratoire sur le sérotypage. Toutefois, le manque de spécificité de cette technique impose la confirmation d'un sérotypage positif par le Centre National de Référence (CNR). Ainsi l'identification dans une coproculture de *Shigella flexneri* a été infirmée par le CNR. Le passage de l'échantillon en PCR Multiplexe a confirmé l'absence de *Shigella*/EIEC, mais a révélé cependant une positivité aux Shiga-toxines 1 et 2.
- De la même façon, le sérotypage identifiait *Shigella boydii* dans un autre échantillon. Mais devant la rareté de cette espèce en France, le contexte clinico-biologique non-évocateur, et la négativité du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, le résultat a été modifié en « Flore digestive banale ».

#### BD MAX™ Extended Enteric Bacterial Panel

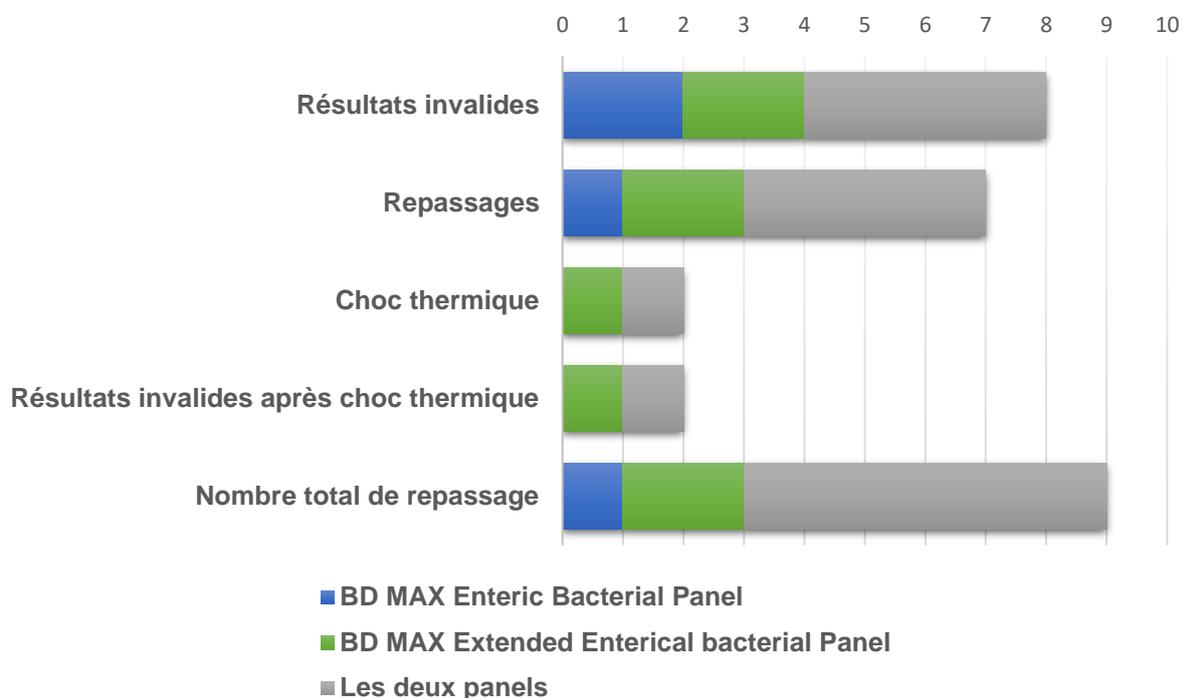
Nous avons recensé trois résultats faussement positifs provenant du BD MAX™ Extended Enteric Bacterial Panel : 1 *Yersinia enterocolitica* et 2 *Vibrio cholerae/parahaemolyticus/vulnificus*. En effet, dans ces 3 cas, le system expert du BD MAX interprétait chacune des courbes d'amplifications correspondantes comme positives. Cependant, l'analyse visuelle des courbes permettait sans conteste de conclure à la détection d'amplicons non spécifiques. De plus, l'extrême rareté des infections à *Vibrio* spp. dans nos régions nous a conforté dans le rendu final des résultats.

### 4- Résultats invalides du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

Un résultat invalide correspond à une réaction d'amplification génique où le Contrôle Interne, le témoin du bon déroulement de la réaction, n'a pas été amplifié. Par conséquent, les courbes d'amplifications négatives des échantillons ne peuvent pas être interprétées et les résultats de la PCR ne peuvent être rendus. Dans ces cas-là, un repassage est nécessaire. Si cela ne permet toujours pas l'obtention un résultat valide, on peut procéder à un dernier repassage, en recourant au pré-traitement

préalable de l'échantillon par un choc thermique (permettant d'éliminer de nombreux inhibiteurs de PCR). Malgré ces mesures, il est possible que le test reste invalide, et qu'aucun résultat valide ne puisse être rendu. Il est important de noter que, chacun des deux panels du BD MAX étudiés lors de cette étude (BD MAX™ Enteric Bacterial Panel et BD MAX™ Extended Enteric Bacterial Panel), possède indépendamment de l'autre son Contrôle Interne. De fait, un des panels peut être invalide sans que l'autre soit impacté.

Bien que notre étude contienne 87 échantillons, c'est bien 96 tests de BD MAX™ Enteric Bacterial Panel qui ont été utilisés. En effet, 8 tests étant invalides, ils ont nécessité 9 repassages, soit 10,3 % des tests utilisés durant l'étude. Parmi les 8 échantillons invalides, un n'a pas pu être repassé par manque de test disponible ; et après repassage des autres échantillons invalides, encore deux étaient invalides. Ces derniers ont donc nécessité un dernier repassage avec un pré-traitement préalable par choc thermique. Au total, parmi les 8 tests invalides nécessitant 9 repassages, 5 sont finalement totalement valides, 2 tests sont partiellement valides (seul un des deux panels est valide) et 1 test est totalement invalide (les deux panels sont invalides). Les résultats invalides du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel sont illustrés par la Figure 22.



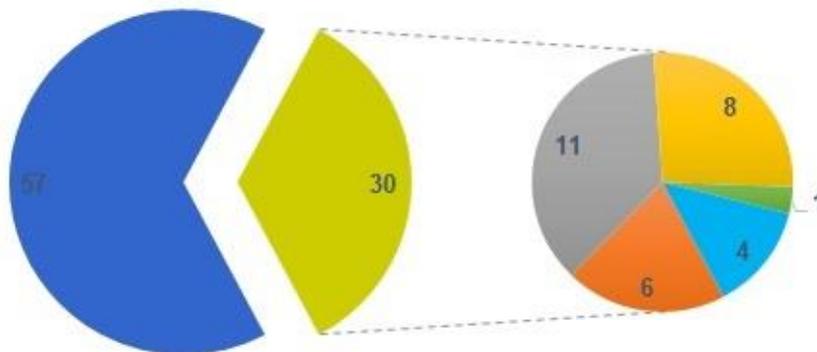
**Figure 22 : Résultats invalides des panels des bactéries entéropathogènes du BD MAX.**

*Un « choc thermique » défini repassage de l'échantillon avec auparavant, un pré-traitement de l'échantillon par choc thermique.*

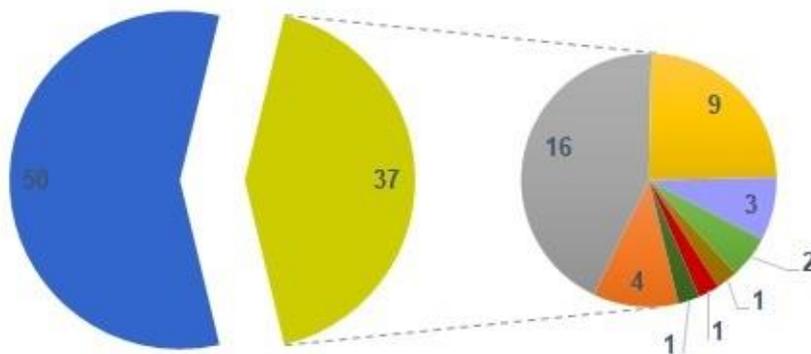
## 5- Analyse comparative de la coproculture et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

En comparaison à la coproculture, le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel a permis l'identification de 14 bactéries supplémentaires chez 11 patients différents. La différence la plus marquante de performances se situe au niveau de l'identification de *Campylobacter jejuni/coli* : 18 ont été retrouvés par PCR et seulement 11 par coproculture, soit 7 (50 % des discordances) *Campylobacter* non isolés par la technique de routine. Un autre écart notable entre les deux techniques correspond à l'identification des Shiga-toxines 1 et 2. En effet, 5 échantillons (soit 36 % des échantillons positifs seulement par PCR) y étaient positifs en PCR Multiplexe, cependant la coproculture ne permettant pas leurs recherches systématiques, aucune coproculture ne les a retrouvés. Des différences mineures sont observées pour *Shigella*/EIEC et *Yersinia enterocolitica* : au total la PCR n'a identifié qu'une *Shigella* spp. supplémentaire en regard de la coproculture (soit 7% des résultats discordants), cependant, le patient correspondant avait déjà présenté une infection à *Shigella* dans les semaines précédentes. De même pour *Yersinia enterocolitica*, le BD MAX™ Extended Enteric Bacterial Panel se positive pour un échantillon en plus par rapport à la technique de référence (soit 7% des résultats discordants). Concernant l'identification des *Salmonella* spp., il n'existe, dans notre étude, pas de différences notables de performances entre nos deux techniques soumises à essai : elles ont identifié de manière équivalente 6 patients présentant une salmonellose. Enfin, ni la coproculture, ni le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel n'auront permis la mise en évidence d'EPEC, de *Plesiomonas shigelloides*, et de *Vibrio cholerae/parahaemolyticus/vulnificus*. Néanmoins, la coproculture a montré sa supériorité dans l'identification des bactéries non comprise dans le panel du BD MAX. De fait, elle a permis l'isolement de 4 *Aeromonas* spp., non retrouvés par PCR. La comparaison des deux techniques est illustrée par les histogrammes des Figures 23 et 24.

### Coproculture



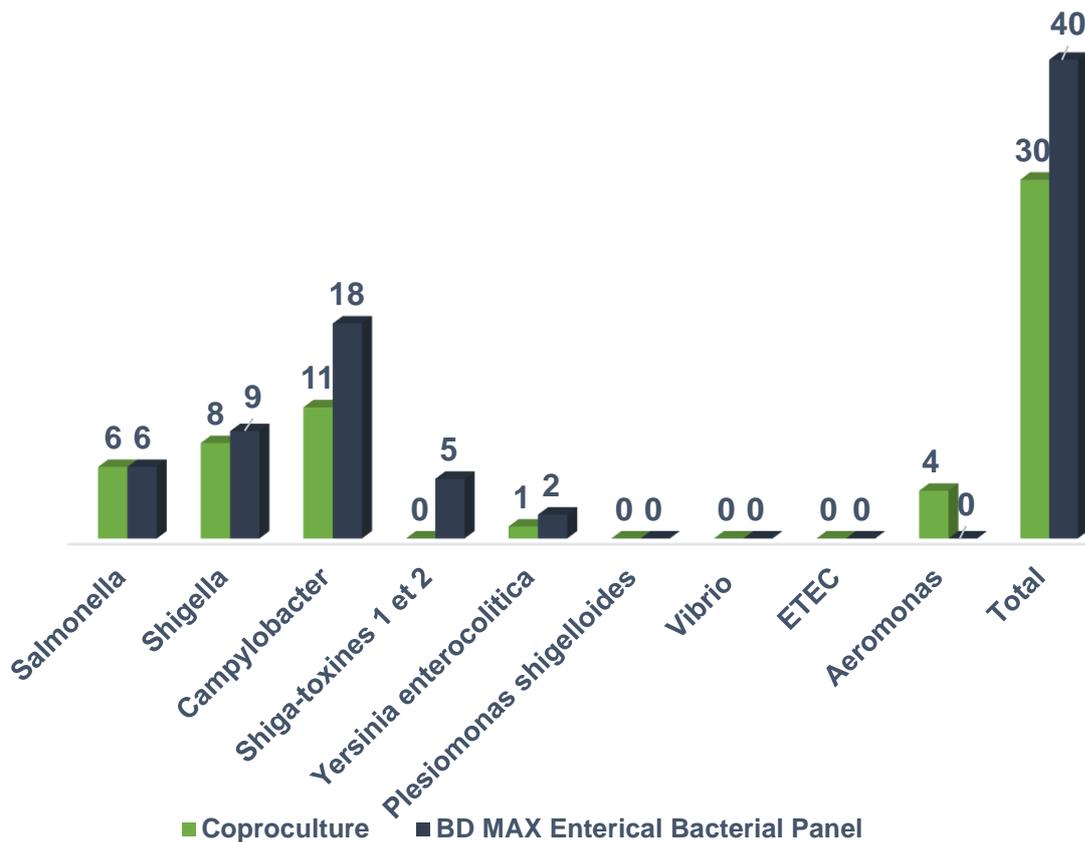
### BD MAX Enteric Bacterial Panel



- Négatif
- Salmonella
- Campylobacter
- Shigella
- Shiga-toxines 1 et 2
- Yersinia enterocolitica
- Campylobacter et Shiga-toxines
- Salmonella et Shiga-toxines
- Campylobacter et Salmonella
- Aeromonas

**Figure 23 :** Résultats obtenus des patients inclus dans notre étude par coproculture.

*Salmonella* : *Salmonella* spp. ; *Shigella* : *Escherichia coli* entéro-invasif/*Shigella* spp. ; *Campylobacter* : *Campylobacter jejuni* et *coli* ; *Vibrio* : *Vibrio cholerae*, *vulnificus* et *parahaemolyticus* ; *ETEC* : *Escherichia coli* entéro-toxinogène ; *EIEC* : *Escherichia coli* entéro-invasif ; *Shiga-toxines* : *Shiga-toxines 1 et 2* ; *Aeromonas* : *Aeromonas* spp.



**Figure 24 : Comparaison des bactéries identifiées par coproculture et par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.**

Une coproculture négative correspond à un résultat final « flore digestive banale » ou « stérile en aérobiose ».

*Salmonella* : *Salmonella* spp. ; *Shigella* : *Escherichia coli* entéro-invasif/*Shigella* spp. ; *Campylobacter* : *Campylobacter jejuni* et *coli* ; *Vibrio* : *Vibrio cholerae*, *vulnificus* et *parahaemolyticus* ; *ETEC* : *Escherichia coli* entéro-toxinogène ; *EIEC* : *Escherichia coli* entéro-invasif ; *Aeromonas* : *Aeromonas* spp.

## 6- Analyse des concordances et discordances de la coproculture et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

Il peut être aussi intéressant de déterminer la concordance entre nos deux techniques d'intérêts, bactérie par bactérie. Pour cela, le test du Kappa de Cohen <sup>(97)</sup> semble être un bon indicateur, il permet de déterminer la force de concordances entre deux techniques. Cependant, son utilisation nécessite d'avoir des résultats positifs dans les deux techniques testées. Par conséquent cette méthode n'a d'intérêt que pour *Salmonella* spp., *Shigella* spp. et *Campylobacter jejuni/coli* (le faible nombre d'échantillons positifs à *Yersinia enterocolitica* limite également son intérêt). Concernant les *Salmonella* spp. : le coefficient Kappa associé est de 1 [1,000-1,000]. En se référant au Tableau 3, ce score définit donc un accord parfait entre la coproculture et la PCR pour le diagnostic de *Salmonella* spp.. Concernant *Shigella*

spp., le coefficient Kappa est de 0,9 [0,808-1,000], avec un taux d'accord de 98,8 %, il définit un accord presque parfait. Enfin, pour *Campylobacter jejuni/coli*, ont un coefficient de kappa plus faible : 0,713 [0,518-0,908], avec un pourcentage d'accord de 91,9 %, définissant un accord fort.

Coefficient Kappa	Interprétation
0	Désaccord
0,00-0,20	Accord très faible
0,21-0,40	Accord faible
0,41-0,60	Accord modéré
0,61-0,8	Accord fort
0,81-0,99	Accord presque parfait
1	Accord parfait

**Tableau 4 : Interprétation du coefficient Kappa.**

*Landis, Biometrics, 1977.*

S'il n'est pas possible, ici, d'obtenir des valeurs de sensibilité et de spécificité, elles peuvent être remplacées par les calculs du « Positive Percent Agreement » (PPA) et du « Negative Percent Agreement » (NPA). Le PPA est défini par la proportion de résultats positifs par méthode de référence dans laquelle le résultat de la méthode à l'essai est positif. Le NPA est défini par la proportion de résultats négatifs de la méthode référence dans laquelle le résultat de la méthode à l'essai est négatif. Plus simplement, on considère que  $PPA = \frac{\text{nombre de positifs dans les deux techniques}}{\text{nombre de positifs par la coproculture}}$ , et

$$NPA = \frac{\text{nombre de négatifs dans les deux techniques}}{\text{nombre de négatifs par la coproculture}}$$

Comme pour les coefficients de Kappa de Cohen, il n'est possible de les calculer que pour *Salmonella* spp., *Shigella* spp. et *Campylobacter jejuni/coli*. Pour *Salmonella*, les PPA et NPA sont de 100%. Chez *Campylobacter jejuni/coli*, le PPA est de 100% et le NPA est de 91%. Enfin, pour les *Shigella*, le PPA est de 100 % et le NPA de 98,7%.

### III- Analyse de la prise en charge des patients inclus dans l'étude

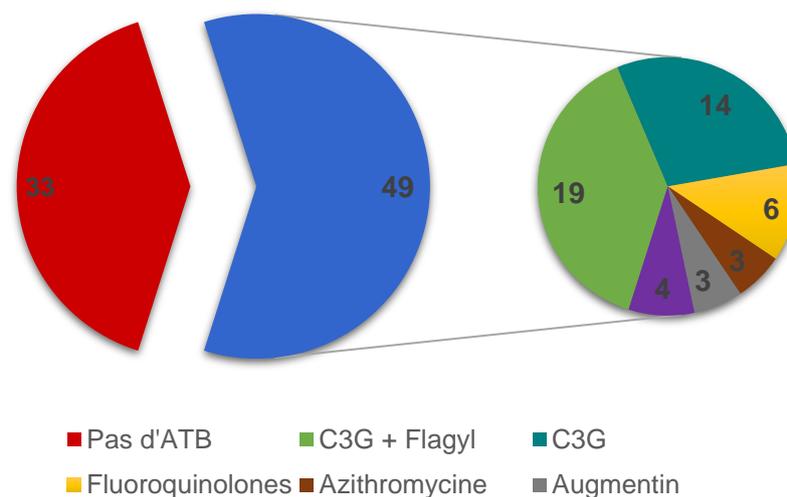
Nous nous sommes intéressés à la prise en charge des patients hospitalisés sélectionnés pour notre étude, et ainsi mettre en évidence les avantages que pourraient apporter la mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.

Dans cette partie, nous n'avons pas retenu les échantillons issus du CH de Wattrelos, n'ayant pas accès aux données cliniques les concernant... Nous ne traiterons donc ici

que les 82 échantillons, correspondant à 36 patients positifs par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.

### Antibiothérapie probabiliste

La plupart des patients ont été traités par une antibiothérapie probabiliste, précédant donc le résultat de la coproculture. 49 patients, soit 60% des participants, en ont bénéficié et une large majorité, 33 patients (67%), étaient traités par une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération (C3G) associée ou non au métronidazole. Il est intéressant de relever la diversité des antibiotiques utilisés puisque 6 patients (12,2%) ont été traités par fluoroquinilones (FQ), 3 par azithromycine (6%), 3 par amoxicilline/acide clavulanique (6%) et 4 (8%) avec d'autres schémas thérapeutiques (amoxicilline, cotrimoxazole ou métronidazole seul par exemple). Finalement, 24 patients traités en probabiliste n'ont pas eu d'étiologie bactérienne identifiée. Pour les 25 autres, le BD MAX™ Enterical Bacterial Panel était positif pour au moins une bactérie. Au sein de ce dernier groupe, 7 (14 % des patients traités) ont reçu une antibiothérapie probabiliste non adaptée à l'agent pathogène causatif ultérieurement identifié. Il est également intéressant de noter que 10 patients, soit 12 % des patients, n'ont pas reçu d'antibiothérapie probabiliste alors que la PCR Multiplexe était finalement positive pour au moins une des cibles bactériennes. Les antibiothérapies probabilistes prescrites sont représentées par la Figure 25 ci-dessous.



**Figure 25 : Antibiothérapie probabiliste des patients inclus dans notre étude.**

*Pas d'ATB : Patients n'ayant pas reçus d'antibiothérapie probabiliste ; C3G : céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ; Flagyl : Métronidazole ; Augmentin : Amoxicilline/Acide clavulanique.*

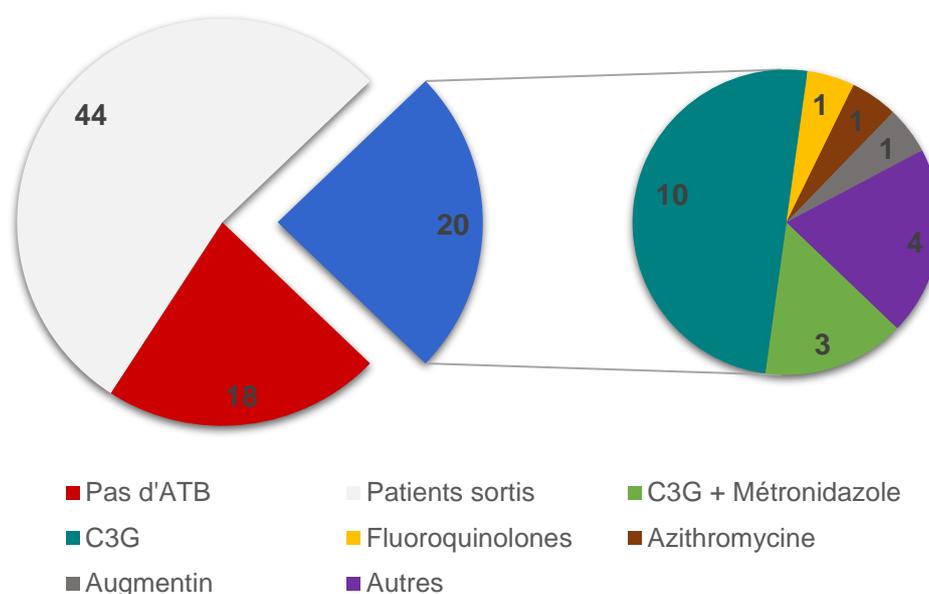
### Antibiothérapie suite au rendu de la coproculture

Une majorité de patients (54%) est sortie d'hospitalisation avant la validation biologique de la coproculture. 14 (32%) de ces patients auront finalement une coproculture positive et 21 (48%) une PCR Multiplexe positive.

Ainsi, seuls 38 patients (46%) étaient encore présents après le rendu de la coproculture, et seulement 20 (24%) ont reçus une antibiothérapie à sa suite. Pareillement aux antibiothérapies probabilistes, les traitements à base de C3G sont les plus nombreux (13 patients soit 65% des patients traités). On remarque néanmoins que, l'utilisation de métronidazole en association est moins courante, seulement 3 cas (15 % des patients traités), alors qu'elle était prédominante en probabiliste. L'utilisation des autres classes thérapeutiques est également plus rare : 1 patient sous FQ (5% des patients traités), 1 sous azithromycine (5% des patients traités), 1 sous augmentin (5% des patients traités) et 4 patients (20% des patients traités) sous d'autres type d'antibiothérapie (cotrimoxazole, métronidazole seul, amoxicilline seule). Le détail des antibiothérapies reçues par les patients de notre étude suite au rendu de la coproculture est illustré Figure 26.

Suite au rendu de la coproculture, le traitement antibiotique a été modifié (ajout, changement ou arrêt) chez 12 patients, soit 31% des personnes encore hospitalisées après le rendu final de la coproculture. Pour 7 patients (9%), l'antibiothérapie a été partiellement ou totalement arrêtée, et au contraire, deux autres patients (2%) ont bénéficié d'une initiation de traitement. Enfin, chez 3 patients (4%), une thérapeutique plus appropriée avec l'agent pathogène identifié a été introduite, en remplacement de l'ancien traitement.

Parmi les 18 patients (22%) non traités et encore hospitalisés après le rendu de la coproculture, 14 avaient une coproculture n'identifiant pas d'entéropathogène. Cependant, le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel a mis en évidence chez deux de ces patients des bactéries entéropathogènes non retrouvées par la culture, ainsi qu'une co-infection. Par conséquent, la thérapeutique en place avait été arrêtée au rendu de la coproculture. Enfin, 4 patients présentant une coproculture anormale (dont 1 *Aeromonas sobria* non retrouvée par PCR Multiplexe), n'ont pas bénéficié d'une antibiothérapie suite à l'identification.



**Figure 26 : Antibiothérapie postérieure au rendu de la coproculture chez les patients inclus dans notre étude.**

*Pas d'ATB : Patient non traité par antibiothérapie probabiliste ; C3G : céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ; Augmentin : Amoxicilline/acide clavulanique.*

### Antibiothérapie à la sortie d'hospitalisation

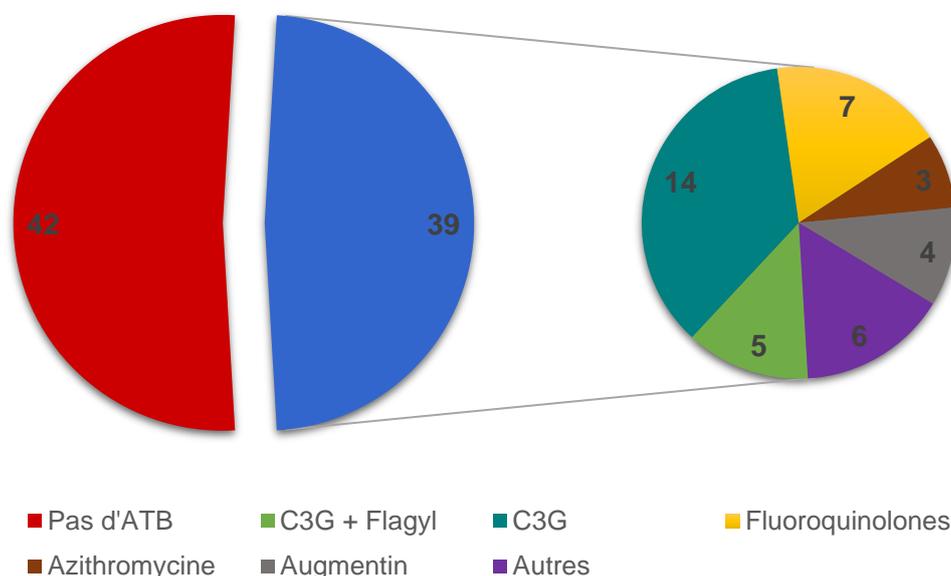
Une petite majorité de patient est sortie d'hospitalisation sans thérapeutique antibactérienne : 42, soit 51,2%. Au sein de ce groupe, 11 (26%) présentaient au moins une cible positive par BD MAX™ Enteric Bacterial. En effet, 7 de ces patients étaient sortis avant le rendu final de la coproculture ; deux autres patients étaient sortis après le rendu de la coproculture mais celle-ci était normale, seule la PCR Multiplexe avait identifié une bactérie.

Intéressons-nous maintenant aux patients traités à la sortie de leur hospitalisation. Seuls 24, soit 60 % des patients traités à leur sortie, ont un résultat positif par PCR

Multiplexe. Si l'on prend en compte les 36 patients positifs en PCR, un tiers n'a donc pas reçu de traitement à sa sortie d'hospitalisation.

Ensuite, toujours parmi les 40 patients sous antibiotiques à la sortie d'hospitalisation, 8 ont une antibiothérapie non adaptée à l'agent pathogène identifié par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, soit 20 % des patients traités à leur sortie, et correspond dans 6 cas sur 8 à des bactéries non isolées par la coproculture. Au sein de ce même groupe de 40 patients traités à leur sortie, 16 (soit 40%) ne présentent aucune identification (coproculture ou PCR Multiplexe). Au final, on compte seulement 16 patients (40%) avec un traitement adapté au germe identifié, en sortie d'hospitalisation.

Comme pour les antibiothérapies probabilistes, les principales thérapeutiques sont à base de C3G : 19 (48% des patients traités) ; 14 (35%) sont associés à du métronidazole. On retrouve également 7 patients (17,5%) sortis sous FQ, 3 (7,5%) sous azithromycine, 4 (10%) sous amoxicilline/acide clavulanique et 7 (17,5%) sous un autre antibiotique (cotrimoxazole, cefepime, amoxiciline seule, métronidazole seul...). Les antibiothérapies à la sortie d'hospitalisation des patients inclus dans notre étude sont représentées dans la Figure 27 ci-dessous.



**Figure 27 : Antibiothérapie à la sortie d'hospitalisation des patients inclus dans notre étude.**

*Pas d'ATB : Patient non traité par antibiothérapie probabiliste ; C3G : céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération ; Flagyl : Métronidazole ; Augmentin : Amoxicilline/Acide clavulanique.*

## Discordances entre la coproculture et le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

Si nous nous intéressons dans un premier temps aux bactéries entéro-pathogènes uniquement retrouvées par la coproculture, il s'agit, parmi les 82 échantillons, de 3 *Aeromonas* spp. (1 avait également été isolé chez un patient de Wattrelos). Aucun des patients concernés n'a bénéficié d'une antibiothérapie à la fin de son hospitalisation. De plus, aucun d'eux ne présentait d'hyperthermie, et les taux de CRP moyens étaient plus faibles que la moyenne générale de l'étude. Cependant cette différence n'est pas statistiquement significative ( $p=0,58$ ).

Dans un second temps, si on s'intéresse aux bactéries uniquement isolées par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, 14 sont identifiées chez 11 patients différents, lorsque la coproculture, elle, est normale. Au sein de ce groupe, 6 patients sont sortis avec une antibiothérapie non adaptée à l'agent pathogène finalement identifié et 3 patients n'ont pas été traités à la sortie d'hospitalisation. Seuls 3 patients ont un traitement adapté en sortie d'hospitalisation. De plus, parmi ces 11 patients, 8 étaient sortis avant le résultat de la coproculture.

### **IV-Données complémentaires récoltées**

Au travers de cette étude, nous avons récolté certaines données, notamment des marqueurs biologiques. Parmi eux, la Protéine C-Réactive (CRP) dont l'élévation peut mettre en évidence une réaction inflammatoire, pouvant être reliée, dans notre cas, à une infection bactérienne. De manière générale, ces valeurs sont élevées dans notre population étudiée avec une moyenne globale de 79,9 mg/L (la CRP d'un patient sain étant inférieure à 5 mg/L). En second lieu, intéressons-nous aux moyennes des patients avec un résultat positif en PCR Multiplexe, en les comparant aux patients avec un résultat négatif. Les patients positifs en PCR Multiplexe présentent des taux moyens plus élevés : 90,9 mg/L, en contraste avec les patients négatifs qui présentent des taux moyens plus faibles, de l'ordre de 71 mg/L. Néanmoins cette différence n'est pas statistiquement significative ( $p=0,261$ ). On peut également mettre en évidence des taux plus faibles pour les 3 *Aeromonas* spp. isolés en coproculture : des taux moyens de 38,3 mg/L sont observés, cette différence n'est cependant pas statistiquement significative comme cela a déjà été rapporté plus haut.

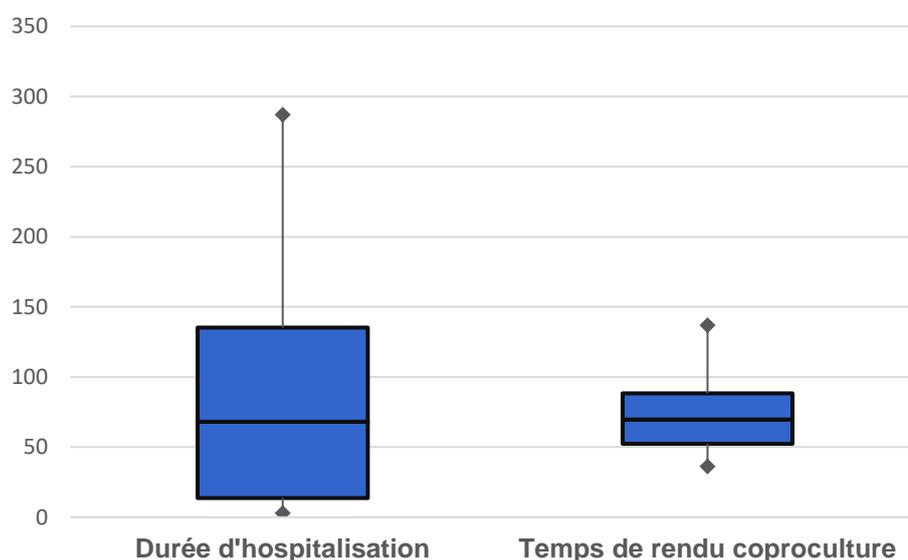
Le nombre absolu de polynucléaires neutrophiles (PNN) par  $\text{mm}^3$  de sang total est aussi un paramètre biologique d'intérêt. Lorsqu'il est augmenté, il peut décrire une réaction inflammatoire, notamment d'origine bactérienne. Néanmoins, au cours de notre étude, aucune tendance significative n'a été observée.

Des paramètres cliniques, comme l'hyperthermie, peuvent être la manifestation d'une réaction de défense de l'organisme. Un fébricule est souvent retrouvé chez des patients présentant des diarrhées aiguës infectieuses. Les participants à l'étude ayant un résultat positif en coproculture et PCR y sont sujets dans 71 % des cas. La fréquence d'observation d'une hyperthermie la plus faible est observée chez les patients négatifs dans les deux techniques simultanément, concernant 46,5% des patients. Les patients seulement positifs par PCR Multiplexe présentaient une hyperthermie plus fréquemment (54,5% d'entre eux). Enfin, chez les patients présentant une infection à *Aeromonas* spp., déterminée par la seule coproculture, aucun n'a présenté d'hyperthermie.

Le détail des données récoltées au cours de notre étude est disponible an Annexe 1.

### **V-Durées d'hospitalisations et temps de rendu des coprocultures**

La durée d'hospitalisation moyenne est de  $81,2 \pm 71,04$  heures (min : 3,15 h, max : 287 h). Les patients présentant des motifs d'hospitalisations complexes avec des temps d'hospitalisations s'étendant sur plusieurs semaines n'ont pas été pris en compte. Le temps de rendu moyen d'une coproculture est de  $71,91 \pm 21,84$  heures (min : 36,27, max : 136,93).



**Figure 28 :** Durée d'hospitalisation et temps de rendu des coprocultures des patients inclus dans notre étude en heures.

### **VI-Impact supposé du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel**

Dans ce paragraphe, nous avons imaginé quel aurait été l'impact de la mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel à la place de la technique habituelle, la

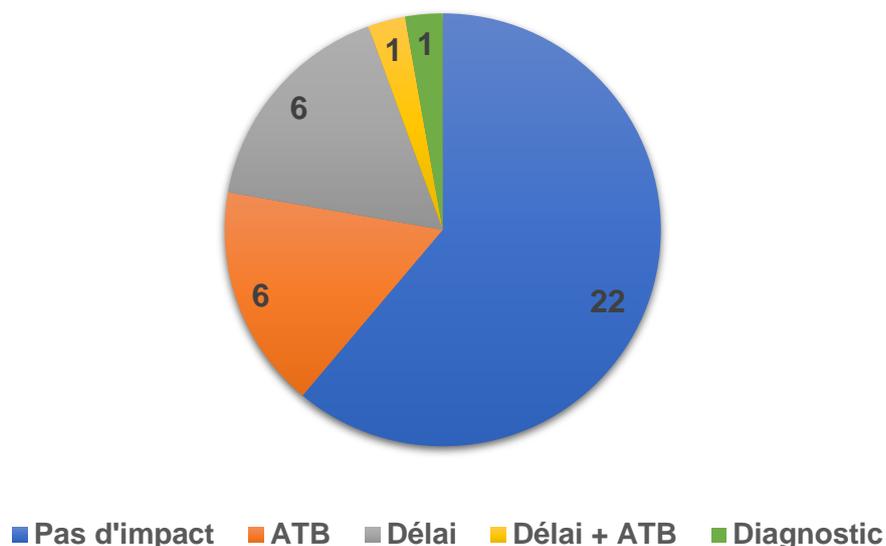
coproculture. Pour cela, nous nous sommes intéressés aux patients (composant notre étude) positifs par PCR Multiplexe. En corrélant nos résultats avec les données cliniques, nous avons pu déterminer l'existence d'un bénéfice éventuel à l'introduction de cette nouvelle technique. Nous avons classé les différents avantages de la PCR Multiplexe comme suit :

- « Adaptation ATB » : En l'absence d'identification d'une bactérie entéropathogène par coproculture, l'antibiothérapie probabiliste non adaptée n'est pas corrigée. La mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel permettant une identification exacte, une thérapeutique correcte pourra être initiée.
- « Délai de rendu » : Le résultat de coproculture est attendu pour accorder la sortie du patient ; la PCR Multiplexe, de par son temps de rendu bien plus court, aurait donc permis un raccourcissement de la durée d'hospitalisation.
- « Diagnostic » : Un diagnostic erroné était évoqué devant la négativité de la coproculture, le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel aurait pu éviter cette erreur.

Dans près de 40% des cas, cette mise en place aurait un impact direct sur la prise en charge du patient :

- « Adaptation ATB » : Pour 6 patients (soit 17%), l'absence d'identification a entraîné la poursuite d'une antibiothérapie non adaptée.
- « Délai de rendu » : A 6 occasions, soit 17%, le rendu de la coproculture était attendu pour autoriser la sortie d'hospitalisation ; l'utilisation de la PCR Multiplexe aurait permis une sortie d'hospitalisation plus précoce.
- « Adaptation ATB et délai de rendu » : Les deux problématiques se cumulent dans 2,7% des cas : le service était dans l'attente du rendu de la coproculture, et celle-ci n'ayant pas permis une identification, l'antibiothérapie non adaptée a été continuée à la sortie d'hospitalisation.
- « Diagnostic » : Enfin, dans 2,7% des cas, devant l'absence d'identification à la coproculture, un diagnostic de MICI a été évoqué. Cependant le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel identifiait un *Campylobacter coli/jejuni*, ce qui semblait être mieux corrélé avec le contexte clinico-biologique.

Les impacts supposés de l'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel au cours de notre étude sont illustrées par la Figure 29.

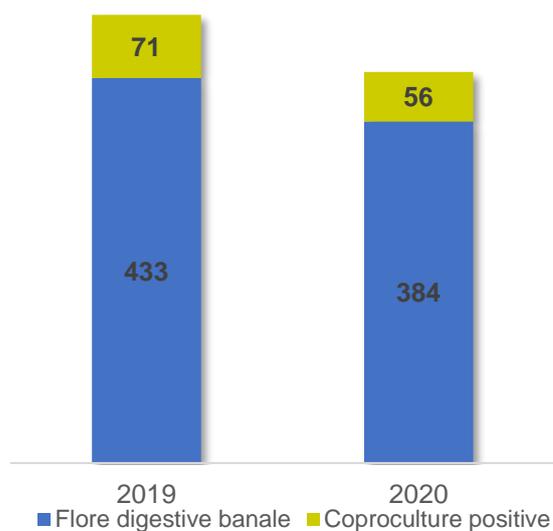


**Figure 29 : Impacts supposés de la mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel au cours de notre étude.**

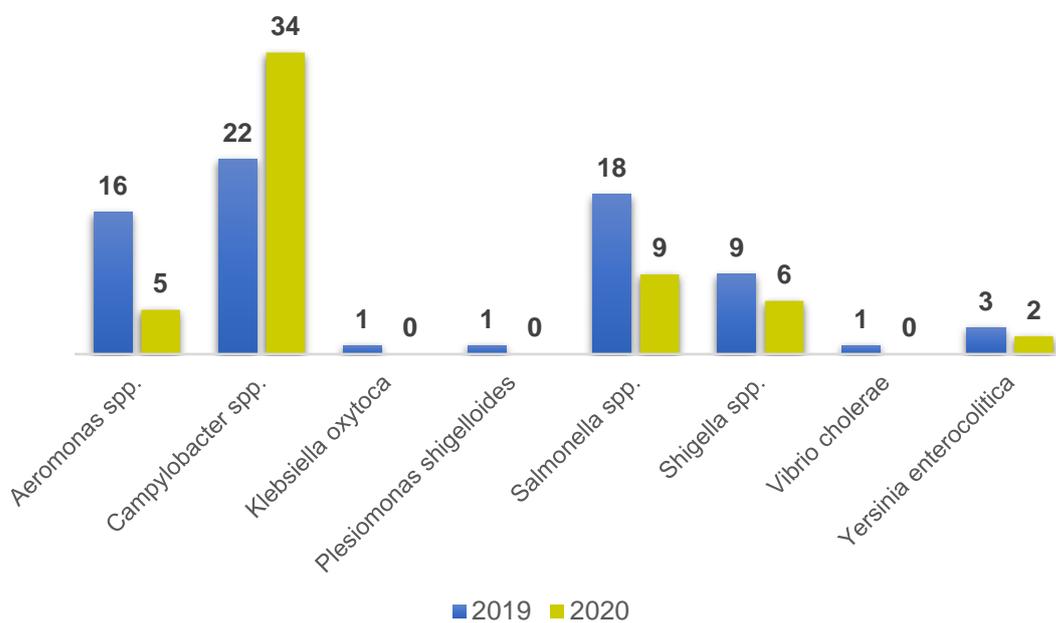
*Pas d'impact* : La mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel n'a pas eu d'impact sur la prise en charge du patient ; *ATB* : l'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel aurait permis une antibiothérapie adaptée ; *Délai* : l'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel aurait raccourci les durées d'hospitalisations ; *Diagnostic* : l'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel aurait permis un diagnostic correct.

## VII-Etude rétrospective des années 2019 et 2020

Afin d'identifier une éventuelle conséquence de la pandémie SARS-CoV2 sur le nombre de coproculture prescrite ainsi que leurs performances diagnostiques, nous avons analysé les données des années 2019 (année ante-pandémie) et 2020 (durant la pandémie). En 2019, c'est 504 coproculture qui ont été prescrites, alors qu'en 2020 440 coprocultures ont été demandées, soit 64 de moins qu'en 2019. En 2019, 71 coprocultures sont positives, avec un taux de positivité de 14% ; en 2020 ce sont 56 coprocultures qui sont positives, soit un taux de positivité de 12,7% (Cf. Figure 30). Concernant les agents pathogènes responsables, à l'exception du *Campylobacter*, ils sont systématiquement plus nombreux en 2019 qu'en 2020 (Cf. Figure 31).



**Figure 30 :** Coprocultures des années 2019 et 2020 au CH de Tourcoing.



**Figure 31 :** Bactéries retrouvées en coproculture au CH de Tourcoing des années 2019 et 2020.

## VIII-Etude médico-économique

### 1- Calcul des coûts théoriques

Nous avons recherché à déterminer le coût théorique de chacune des deux techniques d'intérêt, en ne tenant pas seulement compte du prix brut du matériel, mais également du coût du personnel technique nécessaire à la réalisation des différentes analyses (le « temps technicien »). Les calculs des coûts de chacune des techniques est détaillé en Annexe 2.

#### Coût unitaire HT d'une coproculture :

Nous avons estimé le coût Hors Taxes (HT) du matériel pour chacune des coprocultures négatives à 2,43€, 2,73 € pour une coproculture positive ou nécessitant des recherches supplémentaires et 5,3 € si la coproculture présentait une suspicion de shigellose. Nous n'avons, cependant, pas tenu compte du prix engagé dans la réalisation d'un antibiogramme, en cas d'identification d'une bactérie entéropathogène, puisqu'il devrait être réalisé de la même manière pour une PCR positive.

Le temps technicien moyen pour une coproculture négative est estimé autour de 15 minutes et de 35 minutes si la coproculture nécessite des recherches additionnelles<sup>(90)</sup>. En retenant un coût technicien horaire moyen à 18,35 €/h, le coût technicien d'une coproculture négative est estimé à 4,6 €, et est estimé à 10,7 € en cas de coproculture nécessitant des recherches complémentaires

Au total, une coproculture négative coûte en moyenne 7,03 €, une coproculture nécessitant des explorations supplémentaires coûte 13,43 € et une coproculture faisant suspecter une *Shigella* coûte en moyenne 16 €. (Cf. Tableau 3).

#### Coût d'un test BD MAX™ Enteric Bacterial Panel avec le test étendu associé :

Le prix HT du panel entérique avec le panel étendu correspond à un prix unitaire de 16 euros. Nous avons mesuré un temps technique moyen de 4 minutes pour un test, en retenant toujours un coût technicien horaire moyen à 18,35 €/h, nous pouvons estimer le coût technicien d'un test à 1,22 €.

Au total, un test de BD MAX™ Enteric Bacterial Panel avec son test étendu complémentaire coûte en moyenne 17,22 € (Cf. Tableau 5). Néanmoins, en cas de positivité du test, il est nécessaire d'ajouter le prix d'une coproculture, puisque celle-ci est nécessaire à la réalisation de l'antibiogramme.

Technique	Temps technicien	Coût technicien	Coût du matériel	Coût total
<b>Coproculture négative</b>	15 minutes	4,6 €	2,43 €	<b>7,03 €</b>
<b>Coproculture nécessitant des explorations additionnelles</b>	35 minutes	10,7 €	2,73 €	<b>13,43 €</b>
<b>Coproculture avec une suspicion de <i>Shigella</i></b>	35 minutes	10,7 €	5,3 €	<b>16 €</b>
<b>BD MAX Enteric Bacterial Panel</b>	4 minutes	1,22 €	16 €	<b>17,22 €</b>

**Tableau 5 : Coût unitaire Hors Taxes d'une coproculture et d'un test de BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.**

#### Coût d'une hospitalisation pour diarrhées aiguës

Le tarif d'une hospitalisation pour une gastro-entérite infectieuse est de 1639 € si le patient est majeur, et de 1483 € si le patient est mineur. L'identification d'un germe causatif, ne modifiant pas ces tarifs.

De plus une journée d'hospitalisation coûte en moyenne 450 € dans un service de médecine.

#### 2- Extrapolation

Concernant notre étude, nous avons réalisé 96 tests BD MAX™ Enteric Bacterial Panel correspondant à 87 coprocultures (dont 9 repassages). Parmi ces dernières, 36 ont nécessité des explorations additionnelles, et dans 10 cas un sérotypage a été réalisé pour différencier *Shigella/E.coli*. En se référant au tableau 3, les coprocultures et le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel ont coûté respectivement : **867 € et 2078 €**.

Nous pouvons également spéculer sur les coûts potentiellement économisés par l'introduction de cette nouvelle technique. En effet, pour sept patients, le rendu de la coproculture était attendu pour permettre l'autorisation de sortie d'hospitalisation. S'il est difficile de prédire l'impact exact de cette nouvelle technique sur la durée d'hospitalisation, nous pouvons prendre l'exemple d'une journée d'hospitalisation économisée pour chacun de ces patients. Cela correspondrait au total à 7 jours d'hospitalisations économisés, soit **3150 €**.

Nous pouvons également extrapoler nos données pour calculer le coût en coproculture de l'année 2020, et calculer le coût théorique du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel s'il avait été utilisé systématiquement cette même année. Ainsi, en 2020, 440 coprocultures ont été demandés, 350 n'ont pas nécessités d'explorations supplémentaires, 90 coprocultures ont eu des explorations additonnelles dont 9 sérotypages. Si l'on considère que des tests BD MAX avaient été utilisés systématiquement, et auraient nécessité, comme lors de notre étude 10,3 % de repassage (soit 45 repassages), les deux techniques auraient donc coûté : **3692 € pour la coproculture et 8953 € pour le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.**

En considérant que, comme au cours de notre étude, pour 8,5% des patients (soit 37 patients en 2020), le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel permettrait une réduction de la durée d'hospitalisation d'une journée, cela correspondrait à 37 jours d'hospitalisations économisés soit **16 650 €.**



# DISCUSSION

## I-Analyse comparative : Coproculture vs BD MAX™ Enteric Bacterial Panel

Cette étude a évalué le gain potentiel de la recherche simultanée de 8 bactéries entéropathogènes par PCR Multiplexe, en la comparant à la méthode conventionnelle, la coproculture. Nous nous sommes appuyés, dans cette partie, sur l'analyse de plusieurs publications ayant comparé nos deux techniques d'intérêt : l'étude de Knab et al. <sup>(91)</sup>, portant sur 971 échantillons prospectifs ; l'étude de Harrington et al. <sup>(92)</sup>, avec 4242 échantillons, prospectifs et rétrospectifs ; Wohlwend et al. <sup>(94)</sup>, ayant mené une étude prospective sur 1056 prélèvements ; et Simner et al. <sup>(103)</sup>, la seule étude, à notre connaissance, s'intéressant spécifiquement au panel entérique étendu du BD MAX, elle porte sur 2410 échantillons prospectifs et rétrospectifs.

Dans notre étude, comprenant 87 échantillons, le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel présente un taux de positivité de 42,5 %, alors que la coproculture affiche un taux de positivité plus faible : 29,85 %. L'analyse de la littérature rapporte une tendance similaire : Knab et al. <sup>(91)</sup> décrit une hausse des taux de positivités avec la mise en place de la PCR Multiplexe : de 5,26 à 8,06% ; Wohlwend et al. <sup>(94)</sup> observe également une élévation du taux de positivités avec l'introduction du BD MAX : 9,1 à 13,5 %, au cours de son étude. On remarque que, les taux de détections de notre étude semblent fortement supérieurs à ceux retrouvés dans la littérature. Ceci est très probablement dû au fait que notre étude repose sur une sélection d'échantillons diarrhéiques dont l'étiologie infectieuse était fortement suspectée, alors que les études précédentes ont été menées sur tout type d'échantillon parvenant au laboratoire, sans distinction. De plus, contrairement à ce travail, la plupart des études n'incluaient pas le panel étendu du BD MAX. Cependant, cette différence n'a pas eu d'impact sur le taux de positivité de notre étude, à l'égard de la faible prévalence des pathogènes identifiés par cette extension. Dans la suite de cette partie, nous nous intéresserons aux performances de la PCR et de la coproculture pour chacune des bactéries retrouvées au cours de l'étude.

### 1- *Campylobacter jejuni/coli*

Les bactéries du genre *Campylobacter* étaient les plus souvent retrouvées durant notre étude : 18 ont été identifiées par PCR soit 45% des résultats positifs, avec un taux de positivité global de 20,7%. C'est également la bactérie pour laquelle on

observe la plus forte discordance entre nos deux techniques soumises à étude : 7 échantillons sont positifs par PCR, alors qu'ils sont négatifs par la technique de routine, la coproculture. Celle-ci affiche donc un taux de positivité plus faible : 12,6%.

- Knab et al. <sup>(91)</sup> décrit la même tendance au cours de son étude : 41 *Campylobacter jejuni/coli* ont été détectés par PCR, dont 13 seulement par cette technique, représentant un taux de positivité de 4,6 % ; le taux de positivité de la coproculture est par conséquent, plus faible : 3,1%.
- Harrington et al. <sup>(92)</sup> détecte 22 bactéries supplémentaires du genre *Campylobacter* par PCR, en comparaison à la coproculture.
- Dans l'étude de Wohlwend et al. <sup>(94)</sup>, 109 patients y sont positifs, soit 10,4%, alors que la coproculture ne permet l'isolement que de 75 *Campylobacter* spp. soit 8,9%.

Les *Campylobacter* sont donc les bactéries le plus souvent sous-estimées par la technique standard, la coproculture. La prise en charge tardive des échantillons (non techniqué le soir et le week-end) peut affaiblir la viabilité du germe et diminuer le rendement de la coproculture, un problème que ne rencontre pas la PCR. La mise en place en routine du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel permettrait une nette hausse des détections de ces bactéries entéropathogènes.

## 2- *Shigella* spp.

Au cours de l'étude que nous avons menée, les bactéries du genre *Shigella* ont été identifiées chez 9 patients par PCR Multiplexe, soit un taux de positivité de 10,3%. La coproculture était positive pour 8 de ces patients, avec un taux de positivité de 9,2%. Par conséquent, 1 échantillon était positif uniquement par PCR. Il est intéressant de noter que le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel cible la séquence du gène *ipaH*, retrouvée chez *Shigella* et EIEC, ainsi que les gènes *stx 1* et *2* retrouvés chez les STEC et *Shigella dysenteriae*. Ainsi une PCR positive pour ces deux cibles peut être interprétée comme positive à *Shigella dysenteriae*.

- Lors de l'étude de Knab et al. <sup>(91)</sup>, seuls 3 échantillons sont positifs à *Shigella* spp. par PCR et 2 par la technique standard, soit des taux de positivité respectifs de 0,3 % et de 0,2%.
- Harrington et al. <sup>(92)</sup> détecte au cours de son étude, 9 spécimens supplémentaires de *Shigella* spp. en PCR, en comparaison avec la coproculture.

- Dans l'étude de Wohlwend et al. <sup>(94)</sup>, 20 PCR y sont positives, soit 1,9% des échantillons, alors que la coproculture n'identifie que 7 *Shigella* spp. soit 0,7% des échantillons.

Même en tenant compte des critères de sélection plus drastiques de notre étude, le taux de positivité de *Shigella* spp identifiées semble largement supérieur à ceux observés dans la littérature. En effet, une majorité des patients inclus dans notre étude et présentant une shigellose (6 des 9 patients), sont des Hommes ayant des relations Sexuelles avec des Hommes (HSH), pris en charge dans le Service Universitaire des Maladies Infectieuses et du Voyageur (SUMIV) pour une infection au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Plusieurs études identifient ce phénomène : il est probable que la faible dose infectante de la bactérie, la susceptibilité immunitaire des patients séropositifs, et les pratiques sexuelles à risques soient des facteurs favorisant de ce type d'infections et donc d'une fréquence de détection de ce pathogène plus importante dans ce type de population <sup>(95, 96)</sup>.

La littérature corrobore ainsi les résultats de notre étude concernant les performances de la PCR Multiplexe. Le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel s'est également distingué de la coproculture en infirmant la positivité de deux échantillons positifs à *Shigella* en culture ; résultats négatifs confirmés par le CNR. A contrario, concernant le patient positif avec la seule PCR, celui-ci avait déjà présenté une shigellose, traitée avec succès quelques semaines avant. Un résultat positif à *Shigella* par PCR uniquement lors de sa nouvelle hospitalisation pour lymphogranulomatose vénérienne associée à des diarrhées, rend délicat l'interprétation du résultat de la PCR ; s'agit-il d'une ré-infection, ou de la persistance de l'infection chez un patient immunitairement plus fragile (VIH+) ? S'agit-il de la persistance de la détection de l'agent pathogène incriminé lors du premier épisode infectieux ? Concernant cette dernière hypothèse, l'absence de données ne permet pas de l'écarter ce qui pose la question de la prise en charge thérapeutique de ce type d'évènement et/ou de sa systématisation en vue d'endiguer une éventuelle épidémie dans une population de patients sensibles.

Au final, au CH de Tourcoing, l'identification de cette bactérie semble revêtir un intérêt particulier dans une population de patients sensibles à ce type d'infection et pour la prévention de sa dissémination. Les performances de la PCR sembleraient donc plus avantageuses par rapport à celles de la coproculture dans cette situation.

### 3- *Salmonella* spp.

6 patients ont présenté une salmonellose au cours de notre étude. La méthode de référence et la PCR n'ont pas montré de différences en termes de taux d'identification et ont permis, tous deux, la détection de cette bactérie entéropathogène, avec un taux de positivité de 6,9 %. Cependant, l'analyse de la littérature montre des résultats quelque peu différents :

- Au cours de l'étude menée par Knab et al. <sup>(91)</sup>, 14 échantillons identifient une *Salmonella* spp. par PCR Multiplexe, soit 1,6 %, alors que la coproculture n'en isole que 8 (0,9%). Seuls 6 échantillons sont positifs dans les deux techniques représentant un PPA moins élevé de 75% et un NPA de 99%.
- Harrington et al. <sup>(92)</sup> décrit également, dans son étude, des discordances marquées entre les deux techniques : 19 échantillons sont positifs uniquement en PCR et 5 uniquement par la coproculture. Les PPA et NPA sont respectivement de 97,3 et 99,8%.
- Wohlwend et al. <sup>(94)</sup> observe des différences moins franches avec 17 *Salmonella* spp. identifiées par PCR (1,6%) et 14 par la méthode standard, la coproculture (1,3%).

Contrairement à la littérature, au CH de Tourcoing, la coproculture semble aussi performante que la PCR Multiplexe avec des PPA/NPA entre nos deux techniques de 100%. On peut mettre en avant que, les études de Knab et al. <sup>(91)</sup> et Whowend <sup>(94)</sup> n'utilisent pas de géloses chromogènes mais des géloses Hektoën pour la détection des salmonelles, or, les milieux chromogènes sont plus performants <sup>(99)</sup>. Harrington et al. <sup>(92)</sup>, utilisent différents milieux dont des géloses chromogènes au cours de leur étude, mais n'utilisent cependant pas la spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-TOF-MS) pour l'identification de potentielles bactéries entéropathogènes, mais des galeries biochimiques API 20. L'utilisation au CH de Tourcoing d'un bouillon d'enrichissement associé à une gélose chromogène, suivie d'une identification par MALDI-TOF-MS permet d'améliorer les performances de la coproculture qui apparaissent équivalentes à celles du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel. Cette conclusion reste toutefois conditionnée par le faible nombre d'échantillons positifs dans notre étude.

#### 4- Shiga-toxines 1 et 2

Au cours de notre étude, 5 échantillons ont été positifs aux Shiga-toxines 1 et 2 (5,7%), et ce, seulement par PCR. Il faut cependant souligner que la coproculture ne les recherche pas systématiquement. Avant l'avènement de la biologie moléculaire, des

techniques d'*Enzyme ImunnoAssay* (EIA) étaient principalement utilisées pour la recherche de ces toxines.

- Knab et al. <sup>(91)</sup> retrouve dans sa cohorte, 12 patients positifs aux Shiga-toxines 1 et 2 par PCR. L'EIA n'est positif que pour 7 de ces échantillons. On peut noter cependant, qu'une EIA ne s'est pas positivée en PCR.
- Au cours de l'étude d'Harrington et al. <sup>(92)</sup>, 9 patients sont positifs uniquement par PCR. Cependant, 2 échantillons sont seulement positifs par EIA.
- Wohlwend et al <sup>(94)</sup> n'a pas inclus dans son étude les Shiga-toxines 1 et 2 détectées par le BD MAX™. Comme dans notre pays, la Suisse ne les recherche pas systématiquement dans sa coproculture standard, l'auteur a donc préféré les exclure de son étude.

De manière générale, la PCR semble bien plus performante que les méthodes conventionnelles d'EIA ou de coproculture <sup>(101)</sup>. Cependant, la NABM ne prévoyant pas la recherche de STEC par coproculture, au cours de notre étude, nous n'avons pas réalisé de technique ciblant spécifiquement ce pathogène (EIA ou milieux chromogènes). Nous ne sommes donc pas en mesure de comparer les résultats obtenus par la PCR avec ceux obtenus par la coproculture.

Ainsi, parmi les 5 patients positifs aux Shiga-toxines 1 et 2 par PCR, tous présentaient des diarrhées aiguës, mais seul 1 patient avait des diarrhées sanglantes. Les symptomatologies associées aux infections à STEC sont très variées, néanmoins, les formes sanglantes, pouvant déboucher sur un SHU, sont celles qui nécessitent une attention particulière. Une positivité aux Shiga-toxines 1 et 2 impose de s'interroger sur la signification de ce résultat : le patient est-il à risque de se dégrader ? l'antibiothérapie doit-elle être suspendue ? En cas de co-infections (Shiga-toxines présentes dans 2 des 3 co-infections de notre étude), la positivité aux Shiga-toxines empêchent-elles nécessairement l'arrêt de l'antibiothérapie pour l'ensemble des germes impliqués ? Il serait intéressant, pour répondre à ces nombreuses interrogations, de poursuivre notre étude sur une population plus importante.

Notons que, les Shiga-toxines ne sont pas seulement retrouvées chez les STEC. Les *Aeromonas*, par exemple, peuvent être également producteurs, et seraient donc à même de positiver ce test <sup>(68,102)</sup>. Cependant, lors de notre étude, aucune réaction croisée de ce type n'a été mise en évidence, les *Aeromonas* spp. isolés par la coproculture n'ont pas donné de résultat positif aux Shiga-toxines par PCR.

## 5- *Yersinia enterocolitica*

Deux *Yersinia enterocolitica* ont été identifiées par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, et 1 par coproculture. 1 échantillon est donc uniquement positif par PCR.

Lors de son étude, Simner et al. <sup>(103)</sup> a été surpris de la faible prévalence des bactéries entéropathogènes recherchées par ce panel, notamment *Yersinia enterocolitica*. En effet, 1 seule, parmi 1556 échantillons prospectifs, a été détectée. L'auteur suppose que la saisonnalité de l'infection est la principale cause de cette faible positivité. Devant cette faible prévalence, l'étude a également été menée sur des échantillons rétrospectifs et artificiels. Ils permettent de montrer une forte concordance entre le BD MAX et la technique de référence, dans le cas de *Yersinia enterocolitica*, les PPA et NPA se situent entre 99 et 100%, et le coefficient de Kappa montre une corrélation presque parfaite.

Notre étude ne contient pas assez d'échantillons pour conclure sur un bénéfice éventuel de la mise en place de la PCR Multiplexe pour l'identification de *Yersinia enterocolitica*, et ne peut pas être, de fait, comparée avec la littérature.

## 6- *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio*, ETEC

Au cours de notre étude, aucun échantillon ne s'est positif à *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae/vulnificus/parahaemolyticus* et ETEC. L'absence d'échantillons positifs à *Plesiomonas* et *Vibrio* est probablement due à la très faible prévalence de ces bactéries dans notre région. Cependant, l'absence d'ETEC semble, au premier abord, très étonnante. Il est le pathogène le plus retrouvé de l'étude de Simner et al. <sup>(103)</sup> avec 1,2 % des échantillons. De même, d'autres panels tels que le BioFire FilmArray® <sup>(104)</sup> montrent des performances similaires avec un taux de positivité de l'ordre de 1,4%. Toutefois, notre étude se déroulant en pleine pandémie de SARS-CoV-2, la diminution drastique des voyages hors de France peut expliquer l'absence de détection de ETEC, cette dernière étant responsable de diarrhées chez le voyageur principalement. Avec la reprise des voyages, il serait intéressant de poursuivre notre étude, et de pouvoir évaluer la qualité du panel dans la détection des ETEC.

## 7- *Aeromonas* spp.

Contrairement à toutes les autres bactéries identifiées pendant notre étude, *Aeromonas* spp. est uniquement retrouvée par la méthode standard, la coproculture. De fait, elle n'est pas recherchée par le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, et n'est

donc également pas mis en évidence dans la littérature <sup>(91, 92, 94, 103, 107)</sup>. Cependant, on peut s'interroger sur la significativité d'un isolement d'*Aeromonas* spp. et de son impact clinique. En effet si la littérature met d'abord en évidence le lien avec notamment des gastro-entérites <sup>(68, 105, 106)</sup>, d'autres études remettent en question sa pathogénicité <sup>(108, 109)</sup>. Au cours de notre étude toutefois, les patients dont la coproculture s'était positivée à *Aeromonas* spp. avaient une présentation clinique peu bruyante, sans hyperthermie, avec des taux de CRP globalement plus faibles que les autres participants à l'étude. Il est à noter également qu'aucun de ces patients n'avait reçu d'antibiothérapie à la sortie d'hospitalisation. Une étude ciblée sur ce genre bactérien apparaît donc ici nécessaire afin de déterminer si le recours à la coproculture reste nécessaire devant un test PCR négatif avec le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel dans le contexte d'une diarrhée aiguë d'allure infectieuse. Il est toutefois important de noter que d'autres automates de PCR Multiplexe, tel que FilmArray® <sup>(104)</sup>, proposent dans leur panel entérique, la détection d'*Aeromonas* spp.

## 8- Co-infections

La coproculture n'a pas permis la mise en évidence de co-infections au cours de notre étude. Au contraire, la PCR Multiplexe a identifié 3 patients infectés par deux bactéries différentes. Cette tendance est confirmée par la littérature : l'analyse d'Harrington et al. <sup>(92)</sup> détecte 10 co-infections par PCR et aucune par coproculture. De même, Wohlwend et al. <sup>(94)</sup> met en évidence trois co-infections par PCR lorsque la méthode standard n'en retrouve aucune. La PCR a montré sa supériorité par rapport à la coproculture dans la détection des co-infections. Néanmoins, l'interprétation de ces résultats s'en retrouve plus ardue : il est difficile de déterminer si tous les germes identifiés sont à l'origine des symptômes, et s'ils nécessitent par conséquent, tous un traitement spécifique.

## 9- Significativité clinique d'un résultat positif

La PCR ne nous informe pas sur la viabilité du germe, contrairement à la coproculture, qui, permet une quantification. Une étude finlandaise étaye ce point : elle a comparé l'utilisation d'une PCR Multiplexe sur des échantillons de patients présentant des diarrhées en retour de voyage avec des échantillons de patients asymptomatiques en retour de voyage <sup>(114)</sup>. Si la présence de bactéries (notamment ETEC) était plus fréquente chez les patients symptomatiques (environ 80%), étonnamment plus de 60 % des patients asymptomatiques avaient une PCR Multiplexe positive ! À la lumière de ces résultats, il paraît d'autant plus important de mettre en avant, d'une part la

nécessité de l'interprétation biologique des résultats de la PCR Mutiplexe afin de distinguer les amplifications non spécifiques et d'autre part la mise en place d'une sélection des échantillons à analyser en fonction du contexte clinique n'incluant que les patients strictement symptomatiques.

#### 10- Concordances/discordances :

Les PPA/NPA et coefficients de Kappa de notre étude sont très proches de ceux retrouvés lors de l'analyse de la littérature. Ces taux de concordances sont très hauts et montrent des performances proches entre la coproculture et le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel. Cependant, ces analyses de concordances ont certaines limites : ils placent la coproculture en référence, et montrent la concordance entre nos deux techniques parmi les résultats positifs de la coproculture. Par ces calculs, on ne peut donc pas montrer une supériorité supposée de la PCR en termes de performances diagnostics, mais montrer au mieux une équivalence.

#### 11- Invalides

Les résultats invalides ont été un problème majeur tout au long de notre étude, conduisant, pour environ 10% des échantillons, à un repassage. En plus du délai et des coûts supplémentaires engendrés, malgré les repassages, nous n'avons pas pu rendre *in fine* de résultats pour 2 échantillons (2%). L'utilisation d'un pré-traitement par choc thermique, dans l'optique de limiter la présence d'inhibiteurs de PCR, n'a pas eu d'impact dans notre étude.

- Knab et al. <sup>(91)</sup> retrouve dans son étude un taux d'invalides assez proche : 8,03% ; 1,8% resteront invalide après repassage.
- Lors de l'étude d'Harrington et al. <sup>(92)</sup>, 5% des échantillons étaient invalides ; après repassage, 1,3% des échantillons restaient invalides.

Les résultats invalides, en nécessitant des repassages, provoquent un retard dans le rendu du résultat, une surcharge de travail au laboratoire ainsi qu'un surcoût. De plus, nous pouvons nous retrouver devant une impasse diagnostique lorsque le résultat est irrémédiablement invalide. Un nouveau prélèvement est alors recommandé, ou alors, le passage à un autre outil diagnostic.

## **II- Comparaison du BD MAX avec d'autres PCR Multiplexe entérique**

En 2013, Buchan et al. <sup>(100)</sup> décrit des performances similaires entre les différents panels de PCR Multiplexe disponibles dont le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel (Seeplex Diarrhea-V ACE® ; Luminex®). Depuis, de nombreux autres panels ont été

développés, citons notamment le panel gastro-intestinal développé par BioMerieux : le FilmArray®. Comme ses prédécesseurs, il montre des performances diagnostics supérieures à la coproculture avec des temps de rendu nettement réduits <sup>(104, 111)</sup>. Si nous n'avons pas trouvé d'étude comparant directement le BD MAX avec d'autres panels, Zhang et al. <sup>(112)</sup> décrit une sensibilité du BD MAX de l'ordre de 85 à 100% et une spécificité proche de 100%, des performances proches de ses concurrents. Néanmoins, malgré les performances élevées de chacun de ces panels, lorsque deux panels sont directement comparés <sup>(111)</sup>, des discordances sont retrouvées. En effet, certaines cibles semblent afficher des sensibilités plus faibles pour certains panels, avec par exemple des sensibilités de l'ordre de 50 % pour la détection de *Yersinia enterocolitica* par le Luminex®, ou pour la détection d'*Aeromonas* spp. par le FilmArray® avec des sensibilités de l'ordre de 24% <sup>(110)</sup>.

Toutefois, la différence majeure entre ces panels se situe dans les micro-organismes recherchés. En effet, le nombre et le type d'agents pathogènes inclus dans les panels peuvent beaucoup varier : FilmArray® propose par exemple en un seul bloc la recherche de 22 entéropathogènes dont 15 bactéries. Si nous prenons l'exemple de notre BD MAX, en plus des deux panels de bactéries entéropathogènes, d'autres panels peuvent être utilisés (parasitaires, virales), pour un total de 18 cibles (Cf. Annexe 3). Il y a moins d'agents pathogènes inclus pour le BD MAX, mais contrairement au FilmArray®, les panels bactériens, viraux et parasitaires sont indépendants, ce qui permet une meilleure flexibilité selon les besoins du laboratoire.

### **III- Impact de la mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel au CH de Tourcoing**

#### **1- Au laboratoire**

Le remplacement de la coproculture, par la PCR Multiplexe, permettrait, en premier lieu, une diminution notable du temps technique consacrée à cette tâche, libérant du temps au technicien pour la réalisation d'autres tâches <sup>(90)</sup>. De plus, la prise en main du BD MAX est plus aisée que pour la coproculture. Cependant, celle-ci ne peut être totalement abandonnée : elle reste indispensable pour la réalisation de l'antibiogramme en cas de PCR positive.

Cette étude a également permis de souligner que la mise en place d'une sélection des échantillons à tester permettait d'améliorer le rendement de chacune des techniques,

s'inscrivant ainsi dans le courant de la rationalisation des prescriptions des examens de laboratoire.

## 2- Clinique

Les critères stricts de sélection des échantillons dans notre étude ne permettent pas d'extrapoler les résultats à la totalité des patients du CH de Tourcoing, ainsi qu'à la population générale. Toutefois, nous avons vu que l'absence de sélection exposait au risque de résultats faussement positifs. L'impact clinique de l'implémentation de la PCR Multiplexe est donc évalué dans ce contexte ; il est traité dans les deux paragraphes suivants, selon deux axes : l'amélioration du temps de rendu et l'amélioration des performances diagnostiques.

### Amélioration du temps de rendu

L'utilisation du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel dans notre étude s'est faite rétrospectivement à la coproculture ; il apparaît, dans ces conditions, difficile de déterminer le gain apporté par la PCR en termes de délai de rendu des résultats. En s'appuyant sur les données publiées, le temps de rendu moyen de la PCR mesuré au CHU de Lyon se situe autour de 4h30<sup>(98)</sup>. En comparaison, le temps de rendu moyen d'une coproculture dans notre étude est d'environ 72 heures. L'introduction de la PCR Multiplexe permettrait donc de réduire substantiellement le temps de rendu. Cependant le délai d'obtention de l'antibiogramme, lui, ne change pas. Il existe donc un risque que le service prescripteur attende, à tort, le rendu de l'antibiogramme pour modifier la prise en charge du patient. L'obtention de l'identification d'un agent entéro-pathogène par la PCR gagnerait à être accompagnée d'un commentaire sur le compte rendu rappelant les classes thérapeutiques généralement efficaces sur la bactérie identifiée permettant la mise en route d'une antibiothérapie probabiliste ciblée.

Une majorité de patients est sortie d'hospitalisation avant que la coproculture ne soit rendue. 14 (32%) de ces patients auront finalement une coproculture positive et 21 (48%) une PCR Multiplexe positive. Ainsi, 7 patients sont sortis sans antibiothérapie alors que la PCR identifiait *in fine* une bactérie. L'introduction de la PCR en technique de routine, permettrait donc d'augmenter fortement le nombre de patient sortant avec une documentation microbiologique, et d'améliorer ainsi le nombre d'antibiothérapies adaptées en sortie d'hospitalisation.

Si on s'intéresse maintenant aux patients positifs par PCR Multiplexe, 7 (19%) étaient dans l'attente du rendu de la coproculture pour sortir d'hospitalisation. La mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel aurait permis de réduire le temps d'hospitalisation de ces patients.

Enfin, près de la moitié des patients ayant reçu une antibiothérapie probabiliste auront finalement un résultat négatif par coproculture et PCR, et l'antibiothérapie probabiliste était non adaptée au germe identifié pour 7 patients (14%). En outre, seul un tiers des patients encore hospitalisés après le rendu de la coproculture connaîtront une modification de la thérapeutique antibiotique. L'introduction du panel entérique en pratique de routine réduirait donc la durée d'antibiothérapies probabilistes inutiles et permettrait, lorsque c'est nécessaire, un changement plus précoce vers une antibiothérapie adaptée.

La mise en place du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, permettrait, de par son temps de rendu très court, une meilleure documentation des patients sortants, une réduction du temps d'hospitalisation de certains patients, et une réduction de la durée de l'antibiothérapie probabiliste.

#### Amélioration des performances diagnostiques

Le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, a permis l'identification de 40 bactéries chez 37 patients différents, alors que la coproculture n'est positive que pour 26 patients. Si nous nous intéressons plus particulièrement aux 11 patients pour lesquels la PCR a été plus performante que la coproculture, seuls 2 sont sortis d'hospitalisation avec un traitement adapté. En effet, 6 patients sont sortis d'hospitalisation avec une antibiothérapie qui n'était pas adaptée à l'agent pathogène finalement identifiée, et 3 patients sont sortis sans traitement antibiotique.

Pour 7 patients (soit 19%), l'absence d'identification par la coproculture a entraîné la poursuite d'une antibiothérapie non adaptée, alors que la PCR Multiplexe avait permis l'identification de la bactérie causative. De même, 20 % des patients traités à leur sortie, ont reçu une antibiothérapie non adaptée au germe identifié par PCR. En plus d'être inefficace, toutes ces antibiothérapies non adaptées ont un impact écologique fort, quoique difficilement quantifiable <sup>(64)</sup>.

Enfin, l'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel pourrait limiter certaines errances diagnostiques. En effet, un diagnostic de MICI a été évoqué chez un patient

suite au rendu d'un résultat négatif en coproculture. La PCR Multiplexe a permis l'identification d'un entéropathogène, évitant l'exploration d'un diagnostic erroné.

L'introduction du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel en remplacement de la coproculture, permettrait une amélioration de la prise en charge des patients, et de réduire l'utilisation d'une antibiothérapie mal adaptée. Celle-ci, en plus d'être inefficace, peut avoir un impact non négligeable sur l'écologie du microbiote des patients suivis au CH de Tourcoing.

### 3- Impact médico-économique

Le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel coûte près de deux fois plus cher que la coproculture. Néanmoins, ce surcoût pourrait être rattrapé par les économies faites sur les durées moyennes de séjour (DMS) grâce au rendu de résultat très court de la PCR Multiplexe. En effet, lors de notre étude la PCR a coûté 2078 €, ce qui représente un surcoût par rapport à la coproculture qui a coûté 867 €. Néanmoins, d'après nos données extrapolées, la PCR Multiplexe aurait permis de réduire les DMS de 7 jours au total et ainsi d'économiser 3150 €. Goldenberg et al. <sup>(113)</sup>, bien qu'utilisant un autre panel lors de son étude portant sur 800 patients, à Londres, le Luminex®, démontre une tendance similaire : la PCR Multiplexe a eu un coût additionnel de £22 283 par rapport à la méthode standard, mais elle a permis d'économiser environ £66 765 sur les séjours hospitaliers.

## **IV- Evaluation du BD MAX Panel : Avantages/limites par rapport à la coproculture**

### Avantages

Tout au long de notre exposé nous avons pu mettre en évidence les avantages du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, en comparaison de la méthode de diagnostic de routine, la coproculture :

- Une sensibilité accrue, notamment pour l'identification des bactéries du genre *Campylobacter*. Cette amélioration permettrait une meilleure prise en charge des patients hospitalisés, ainsi qu'un impact positif sur l'épidémiologie de la résistance au CH de Tourcoing.
- Un temps de rendu fortement réduit, qui permettrait une réduction du temps technique, de la durée d'hospitalisation de certains patients ainsi de la durée d'antibiothérapie probabiliste, parfois non adaptée.

- Un impact financier positif, notamment grâce à des sorties d'hospitalisations plus précoces.

### Limites

Cependant, le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel présente également quelques limites :

- De nombreux tests invalides, engendrant des repassages, des délais supplémentaires et un surcoût. De plus, il est possible qu'aucun rendu valide ne soit possible, contraignant au recueil d'un nouvel échantillon.
- L'analyse se limite aux 8 cibles des panels, qui, s'ils couvrent la totalité des étiologies bactériennes prévues à la NABM, font l'impasse sur quelques agents bactériens potentiellement impliqués dans les syndromes diarrhéiques tels que *Aeromonas* spp..
- La réalisation d'une coproculture reste nécessaire pour la réalisation d'un antibiogramme pour les PCR positives. L'identification seule permettant toutefois la mise en route d'une antibiothérapie probabiliste plus ciblée.
- La significativité clinique d'un résultat positif peut-être délicate à interpréter. L'absence de données concernant la persistance de la positivité d'un test PCR associé au risque d'obtention de résultats faussement positifs rend indispensable l'instauration d'un dialogue clinico-biologique visant à éviter une sur-prescription d'examens et d'antibiotiques.

### **V- Limites de l'étude**

L'une des principales limites est que l'étude que nous avons menée s'est déroulée rétrospectivement : les techniques n'ont pas été réalisées en parallèle, la PCR Multiplexe a été exécutée ultérieurement à la coproculture. Un travail prospectif permettrait de mieux apprécier les différences entre les deux techniques d'intérêts.

Une autre limite concerne la taille de notre effectif : sa faible ampleur ne permet pas de montrer statistiquement la supériorité d'une des deux techniques.

L'absence d'un Gold Standard ne permet pas vraiment d'apprécier les performances de chacune des deux techniques. Durant notre étude nous n'avons pu uniquement montrer leurs concordances et leurs différences, sans pour autant déterminer la véracité d'un résultat.

Enfin, le caractère monocentrique de notre étude, ne permet pas d'extrapoler ces conclusions en dehors du CH de Tourcoing. Néanmoins, notre étude n'avait pas pour objectif d'obtenir des résultats généralisables, mais bien d'identifier l'intérêt d'une nouvelle technique au CH de Tourcoing.

# CONCLUSION

Notre travail a comparé l'utilisation du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, une PCR Multiplexe, à la méthode de routine, la coproculture. Pour cela, nous avons sélectionnés et recueillis 87 échantillons de patients présentant des signes évocateurs de diarrhées fébriles aiguës d'origine infectieuse.

Nous avons pu mettre en évidence, au cours de cette étude, des différences entre les deux techniques, en termes de taux de détections et de temps de rendu de l'analyse. De fait, la PCR Multiplexe a permis l'identification de 14 bactéries supplémentaires en comparaison de la technique de routine, ainsi que 3 co-infections, alors que la coproculture n'en retrouve aucune. De même, le temps de rendu de la coproculture était d'environ 72 heures, ce temps se retrouve réduit à seulement quelques heures avec le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.

Pour mettre en avant les bénéfices éventuels de la mise en place de ce panel entérique, nous nous sommes intéressés à l'hospitalisation des patients inclus dans l'étude. Nous avons pu nous apercevoir des gains potentiels : meilleure documentation des infections, réduction des durées moyennes de séjour, réduction des durées des antibiothérapies probabilistes et meilleure prise en charge du patient.

Cependant, l'introduction de cette nouvelle technique de biologie moléculaire, a un surcoût technique net par rapport à la technique standard : elle coûte environ deux fois plus cher. Toutefois, ce coût est largement compensé par les économies prévisibles sur les durées d'hospitalisation, suite à la mise en place de la PCR Multiplexe.

L'introduction de ce nouveau panel se heurte néanmoins à de nombreuses limites : nombreux tests invalides ; cibles prédéfinies du test en nombre limitée ne permettant pas d'identifier toutes les bactéries entéro-pathogènes ; la coproculture ne peut être totalement remplacée devant la nécessité de réaliser un antibiogramme en cas de test PCR positif ; et la significativité clinique qui n'est pas toujours facile à établir. Sa mise en place devra également concorder avec les autres analyses déjà réalisées par le BD MAX System, tels que les PCR SARS-CoV2.

Finalement, afin de confirmer les observations de notre étude, il paraît nécessaire de poursuivre ce travail en menant une étude prospective sur un plus grand nombre d'échantillons. Nous pourrions ainsi confirmer les données de la littérature et adopter le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel comme technique de routine pour l'identification

des bactéries entéro-pathogènes dans les selles. Il pourrait également être intéressant, lors d'une prochaine étude, de se focaliser sur des patients présentant une PCR positive, et de réaliser des PCR de suivi après le traitement. Nous pourrions alors, mieux déterminer le temps de persistance d'un test positif et améliorer ainsi l'interprétation d'un tel résultat.

# BIBLIOGRAPHIE

1. « Maladies diarrhéiques ». WHO, Mediacenter, Fact Sheet  
Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
2. Bilan annuel 2019, Réseau Sentinelles
3. « Typhoïde ». WHO, Mediacenter, Fact Sheet  
Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
4. Institut Pasteur. « Fièvres typhoïde et paratyphoïde »,  
Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/fievres-typhoide-paratyphoide>
5. « Shigellose : informations et traitements - Institut Pasteur ».  
Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/shigellose>
6. Fitzgerald, Collette. « Campylobacter ». *Clinics in Laboratory Medicine* 35, n° 2
7. Eurosurveillance | Exploring Campylobacter seasonality across Europe using The European Surveillance System (TESSy), 2008 to 2016 ».   
Disponible sur : <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.13.180028>
8. European Food and Safety Authority (EFSA). Campylobacter Fact Sheet. Parma, Italy: EFSA; 2014.
9. The seasonal distribution of campylobacter infection in nine European countries and New Zealand | Epidemiology & Infection | Cambridge Core ». 2021.  
Disponible sur : <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/seasonal-distribution-of-campylobacter-infection-in-nine-european-countries-and-new-zealand/6215501C528C1164B213924BA2F536CA>
10. Yang, Shih-Chun, Chi-Feng Hung, Ibrahim A. Aljuffali, et Jia-You Fang. « The Roles of the Virulence Factor IpaB in Shigella Spp. in the Escape from Immune Cells and Invasion of Epithelial Cells ». *Microbiological Research*
11. BERCHE Patrick, GAILLARD Jean-Louis, SIMONET Michel. Bactériologie, Bactéries des infections humaines.
12. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal.
13. Yersiniosis - Annual Epidemiological Report 2016. European Centre for Disease Prevention and Control.  
Disponible sur : <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/yersiniosis-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>
14. Les infections à Yersinia. Institut Pasteur.  
Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/cnr/les-cnr/peste-autres-yersinioses/infections-yersinia>
15. Lorrot M, Vasseur M. Physiopathologie de la diarrhée à rotavirus. *Journal de pédiatrie et de puériculture* (2007) 20, 330—336
16. Salmonellose : informations et traitements - Institut Pasteur [Internet].  
Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/salmonellose>
17. Adrien Fabre. Analyse du génome de Campylobacter : une alternative aux antibiogrammes classiques ?. Sciences pharmaceutiques. 2016.
18. Effect of climate and farm environment on Campylobacter spp. colonisation in Norwegian broiler flocks - ScienceDirect  
Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587712001419?via%3Dihub>
19. *Yersinia enterocolitica* *Yersinia pseudotuberculosis*, ANSES
20. Fàbrega A, Vila J. *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1 janv 2012
21. Townes, J. M., A. A. Deodhar, E. S. Laine, K. Smith, H. E. Krug, A. Barkhuizen, M. E. Thompson, P. R. Cieslak, et J. Sobel. « Reactive Arthritis Following Culture-Confirmed Infections with Bacterial Enteric

- Pathogens in Minnesota and Oregon: A Population-Based Study ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 67
22. Sahlberg, Anna S., Kaisa Granfors, et Markus A. Penttinen. « HLA-B27 and Host-Pathogen Interaction ». In *Molecular Mechanisms of Spondyloarthropathies*, édité par Carlos López-Larrea et Roberto Díaz-Peña, 235-44. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer, 2009.
  23. Ali, Mohammad, Allyson R. Nelson, Anna Lena Lopez, et David A. Sack. « Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9, n° 6 (2015).
  24. Bonnin-Jusserand, Maryse, Stéphanie Copin, Cédric Le Bris, Thomas Brauge, Mélanie Gay, Anne Brisabois, Thierry Grard, et Graziella Midelet-Bourdin. « Vibrio species involved in seafood-borne outbreaks (*Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*): Review of microbiological versus recent molecular detection methods in seafood products ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59, n° 4 (21 février 2019).
  25. Vezzulli, Luigi, Rita R. Colwell, et Carla Pruzzo. « Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment ». *Microbial Ecology* 65, n° 4 (mai 2013)
  26. Robert-Pillot, Annick, Stéphanie Copin, Charlotte Himber, Mélanie Gay, et Marie-Laure Quilici. « Occurrence of the Three Major Vibrio Species Pathogenic for Human in Seafood Products Consumed in France Using Real-Time PCR ». *International Journal of Food Microbiology* 189 (17 octobre 2014)
  27. Institut Pasteur. « Choléra », 6 octobre 2015.  
Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/cholera>
  28. Silva, Anisia J., et Jorge A. Benitez. « Vibrio cholerae Biofilms and Cholera Pathogenesis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, n° 2 (4 février 2016).
  29. Clemens, John D, G Balakrish Nair, Tahmeed Ahmed, Firdausi Qadri, et Jan Holmgren. « Cholera ». *The Lancet* 390, n° 10101 (23 septembre 2017)
  30. Hornick RB, Music SI, Wenzel R, Cash R, Libonati JP, Snyder MJ, Woodward TE. The Broad Street pump revisited: response of volunteers to ingested cholera vibrios. *Bull N Y Acad Med*.
  31. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : Vibrions entéropathogènes : *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 et *Vibrio vulnificus* Saisine n°2016-SA-0272
  32. Wong TY, Tsui HY, So MK, Lai JY, Lai ST, Tse CW, Ng TK. Plesiomonas shigelloides infection in Hong Kong: retrospective study of 167 laboratory-confirmed cases. *Hong Kong Med J*. 2000 Dec
  33. Brenden RA, Miller MA, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with Plesiomonas shigelloides infections in humans. *Rev Infect Dis*. 1988 Mar-Apr;10
  34. Kain KC, Kelly MT. Clinical features, epidemiology, and treatment of Plesiomonas shigelloides diarrhea. *J Clin Microbiol*. 1989 May;27
  35. Arai, T., Ikejima, N., Itoh, T., Sakai, S., Shimada, T., & Sakazaki, R. (1980). A survey of Plesiomonas shigelloides from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. *Journal of Hygiene*
  36. Janda, J. Michael, Sharon L. Abbott, et Christopher J. McIver. « Plesiomonas shigelloides Revisited ». *Clinical Microbiology Reviews* 29
  37. Kevin J. Greenlees, John Machado, Thomas Bell, Stephen F. Sundlof, Food Borne Microbial Pathogens of Cultured Aquatic Species, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*,
  38. Başaran Kahraman, Beren & DUMEN, Emek & ISSA, Ghassan & Kahraman, T. & IKIZ, Serkan. (2017). Incidence of aeromonas hydrophila and plesiomonas shigelloides in seafoods. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*.
  39. DuPont, Herbert L. « Bacterial Diarrhea ». *New England Journal of Medicine*, 15 octobre 2009.
  40. Avison, Matthew B., Peter M. Bennett, et Timothy R. Walsh. «  $\beta$ -Lactamase expression in Plesiomonas shigelloides ». *Journal of Antimicrobial*
  41. Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M., Byappanahalli, M., Yan, T. and Ishii, S. (2017), Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol*
  42. « Diarrheagenic Escherichia coli | Clinical Microbiology Reviews ».  
Disponible sur : [https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.11.1.142?url\\_ver=Z39.882003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pu b%20%20pubmed](https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.11.1.142?url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pu b%20%20pubmed)

43. Arduino RC, DuPont HL. Travellers' diarrhoea. Baillieres Clin Gastroenterol. 1993
44. Black RE, Levine MM, Clements ML, Cisneros L, Daya V. Treatment of experimentally induced enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea with trimethoprim, trimethoprim-sulfamethoxazole, or placebo. Rev Infect Dis. 1982
45. DuPont H. L. and Ericsson C. D. Prevention and treatment of traveler's diarrhea. *N. Engl. J. Med.*
46. Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S, Bingen E. Diagnostic bactériologique des infections gastro-intestinales. Bactériologie Médicale. 2016:149–61. French.
47. Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. J Clin Invest.
48. Hu, J., et A. G. Torres. « Enteropathogenic *Escherichia Coli*: Foe or Innocent Bystander? » *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21
49. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008
50. Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*
51. Bryan, Allen, Ilan Youngster, et Alexander J. McAdam. « Shiga Toxin Producing *Escherichia Coli* ». *Clinics in Laboratory Medicine* 35
52. Jennifer M. Nelson, Patricia M. Griffin, Timothy F. Jones, Kirk E. Smith, Elaine Scallan, Antimicrobial and Antimotility Agent Use in Persons with Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157 Infection in FoodNet Sites, *Clinical Infectious Diseases*
53. Majowicz SE, Scallan E, Jones-Bitton A, et al. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. Foodborne Pathog Dis 2014;11(6):447–55.
54. Institut Pasteur. « *Escherichia coli* entérohémorragiques (ECEH) », 6 octobre 2015.  
Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/escherichia-coli>
55. Okeke, Iruka N, et James P Nataro. « Enteroaggregative *Escherichia Coli* ». *The Lancet Infectious Diseases* 1
56. Wilson A, Evans J, Chart H, Cheasty T, Wheeler JG, Tompkins D, Smith HR. Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. Eur J Epidemiol.
57. Jenkins, Claire. « Enteroaggregative *Escherichia coli* ». In *Escherichia coli, a Versatile Pathogen*, édité par Gad Frankel et Eliora Z Ron, 416:27-50. Cham: Springer International Publishing, 2018.
58. Harrington SM, Dudley EG, Nataro JP. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. FEMS Microbiol Lett. 2006
59. Graves, Nancy S. « Acute Gastroenteritis ». *Primary Care* 40, n° 3 (septembre 2013)
60. Cassar, C., M. Ottaway, M. J. Woodward, G. A. Paiba, S. Newbold, et R. Futter. « Absence of Enteroaggregative *Escherichia Coli* in Farmed Animals in Great Britain ». *Veterinary Record* 154, n° 8
61. Auvray, Frédéric, Françoise Dilasser, Delphine Bibbal, Monique Kérouédan, Eric Oswald, et Hubert Brugère. « French Cattle Is Not a Reservoir of the Highly Virulent Enteroaggregative Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* of Serotype O104:H4 ». *Veterinary Microbiology* 158
62. Pupo, G. M., Lan, R. & Reeves, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 10567–10572 (2000).
63. Belotserkovsky, Iliia, et Philippe J. Sansonetti. « *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia Coli* ». In *Escherichia Coli, a Versatile Pathogen*, édité par Gad Frankel et Eliora Z Ron, 416:1-26. Cham: Springer International Publishing, 2018.
64. Résistances aux anti-infectieux-INVS  
Disponible sur : <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Resistance-aux-anti-infectieux/Points-sur-les-connaissances>

65. DuPont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Sheahan DG, LaBrec EH, Kalas JP. Pathogenesis of Escherichia coli diarrhea. *N Engl J Med*. 1971
66. Scaletsky IC, Fabbriotti SH, Carvalho RL, Nunes CR, Maranhão HS, Morais MB, Fagundes-Neto U. Diffusely adherent Escherichia coli as a cause of acute diarrhea in young children in Northeast Brazil: a case-control study. *J Clin Microbiol*. 2002
67. Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H. *et al.* Clostridium difficile infection: review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*
68. Parker, Jennifer L., et Jonathan G. Shaw. « Aeromonas Spp. Clinical Microbiology and Disease ». *The Journal of Infection* 62, n° 2 (février 2011)
69. « Article - Bulletin épidémiologique hebdomadaire ». Disponible sur : [http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2018/1/2018\\_1\\_1.html](http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2018/1/2018_1_1.html).
70. « Constipation chronique | SNFGE.org - Société savante médicale française d'hépatogastroentérologie et d'oncologie digestive ». Disponible sur : <https://www.snfge.org/content/constipation-chronique>
71. Truchis, Pierre de, et Anne de Truchis. « Diarrhées aiguës infectieuses ». *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*
72. Thiagarajah, Jay R., Mark Donowitz, et Alan S. Verkman. « Secretary Diarrhoea: Mechanisms and Emerging Therapies ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 12
73. « Campylobacter ». Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>
74. Willison, Hugh J., Bart C. Jacobs, et Pieter A. van Doorn. « Guillain-Barré Syndrome ». *The Lancet* 388
75. Kaakoush, Nadeem O., Natalia Castaño-Rodríguez, Hazel M. Mitchell, et Si Ming Man. « Global Epidemiology of Campylobacter Infection ». *Clinical Microbiology Reviews* 28
76. Rapport annuel d'activité 2020, Centre national de Référence des Campylobacters et des Hélicobacters année d'exercice 2019.
77. Wagenaar, Jaap A., Marcel A. P. van Bergen, Martin J. Blaser, Robert V. Tauxe, Diane G. Newell, et Jos P. M. van Putten. « Campylobacter fetus Infections in Humans: Exposure and Disease ». *Clinical Infectious Diseases* 58
78. Dougan, Gordon, et Stephen Baker. « Salmonella Enterica Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever ». *Annual Review of Microbiology* 68 (2014)
79. Parry, Christopher M., Tran Tinh Hien, Gordon Dougan, Nicholas J. White, et Jeremy J. Farrar. « Typhoid Fever ». *The New England Journal of Medicine* 347, n° 22 (28 novembre 2002)
80. Marchello, Christian S., Samuel D. Carr, et John A. Crump. « A Systematic Review on Antimicrobial Resistance among Salmonella Typhi Worldwide ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 103, n° 6 (décembre 2020)
81. Wen, Sophie Ch, Emma Best, et Clare Nourse. « Non-Typhoidal Salmonella Infections in Children: Review of Literature and Recommendations for Management ». *Journal of Paediatrics and Child Health* 53, n° 10 (octobre 2017)
82. Fournier, Jean-Michel, et Marie-Laure Quilici. « Choléra ». *La Presse Médicale* 36, n° 4, Part 2 (1 avril 2007)
83. « Choléra ». Consulté le 28 mai 2021. Disponible : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cholera>
84. Germani, Y., et P. Sansonetti. « Shigellose et infections à Escherichia coli entéro-invasifs ». *EMC - Maladies infectieuses* 5
85. « Treating Opportunistic Infections Among HIV-Infected Adults and Adolescents Recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America ».

86. Leibovitz, E., J. Janco, L. Piglansky, J. Press, P. Yagupsky, H. Reinhart, I. Yaniv, et R. Dagan. « Oral Ciprofloxacin vs. Intramuscular Ceftriaxone as Empiric Treatment of Acute Invasive Diarrhea in Children ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 19
87. Carré, D. « Conduite à tenir devant une diarrhée aiguë. Étiologies ». *EMC - Chirurgie* 1
88. Frank, Christina, Dirk Werber, Jakob P. Cramer, Mona Askar, Mirko Faber, Matthias an der Heiden, Helen Bernard, et al. « Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing Escherichia coli O104:H4 Outbreak in Germany ». *New England Journal of Medicine* 365
89. Beaugerie, Laurent, et Harry Sokol. « Diarrhées infectieuses aiguës de l'adulte : épidémiologie et prise en charge ». *La Presse Médicale*, Infections et parasitoses intestinales aiguës, 42, n° 1 (1 janvier 2013)
90. Mortensen, Joel, Cindi Ventrola, Sarah Hanna, et Adam Walter. « Comparison of time-motion analysis of conventional stool culture and the BD MAX™ Enteric Bacterial Panel (EBP) ». *BMC Clinical Pathology* 15 (28 mai 2015).
91. Knabl, L., I. Grutsch, et D. Orth-Höller. « Comparison of the BD MAX® Enteric Bacterial Panel Assay with Conventional Diagnostic Procedures in Diarrheal Stool Samples ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 35, n° 1 (janvier 2016)
92. Harrington, S. M., B. W. Buchan, C. Doern, R. Fader, M. J. Ferraro, D. R. Pillai, J. Rychert, et al. « Multicenter Evaluation of the BD Max Enteric Bacterial Panel PCR Assay for Rapid Detection of Salmonella spp., Shigella spp., Campylobacter spp. (C. jejuni and C. coli), and Shiga Toxin 1 and 2 Genes ». *Journal of Clinical Microbiology* 53
93. Société Française de Microbiologie. REMIC 6<sup>ème</sup> édition, 2018.
94. Wohlwend, Nadia, Sacha Tiermann, Lorenz Risch, Martin Risch, et Thomas Bodmer. « Evaluation of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Detecting Major Bacterial Enteric Pathogens in Fecal Specimens: Intestinal Inflammation and Bacterial Load Are Correlated in Campylobacter Infections ». *Journal of Clinical Microbiology* 54, n° 9 (1 septembre 2016)
95. Key, R., G. Singh, M. Abdul-Latif, M. Rayment, et M. Nelson. « Shigella Flexneri Enteritis in Risk-Taking HIV-Infected MSM ». *Journal of Infection* 68
96. Richardson, Daniel, John Devlin, Colin Fitzpatrick, et Nicolas Pinto-Sander. « Sexually Transmitted Shigella Flexneri and Shigella Sonnei in Men Who Have Sex with Men ». *Sexually Transmitted Infections* 97, n° 3 (1 mai 2021)
97. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977 Mar
98. RANC, Retour d'expérience sur mise en place des panels BDMax entériques et C. difficile aux HCL.
99. Maddocks, S.; Olma, T.; Chen, S. Comparison of CHROMagar Salmonella Medium and Xylose-Lysine-Desoxycholate and Salmonella-Shigella Agars for Isolation of Salmonella Strains from Stool Samples. *J Clin Microbiol* **2002**
100. Buchan, B. W.; Olson, W. J.; Pezewski, M.; Marcon, M. J.; Novicki, T.; Uphoff, T. S.; Chandramohan, L.; Revell, P.; Ledebor, N. A. Clinical Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Identification of Salmonella, Shigella, Campylobacter (Campylobacter Jejuni and C. Coli), and Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Isolates in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **2013**
101. Comparison of Three Different Methods for Detection of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in a Tertiary Pediatric Care Center
102. Alperi, A.; Figueras, M. J. Human Isolates of Aeromonas Possess Shiga Toxin Genes (Stx1 and Stx2) Highly Similar to the Most Virulent Gene Variants of Escherichia Coli. *Clin Microbiol Infect* **2010**
103. Simner, Patricia J., Margret Oethinger, Kathleen A. Stellrecht, Dylan R. Pillai, Ram Yogev, Helene Leblond, et Joel Mortensen. « 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 ». *Journal of Clinical Microbiology* 55
104. Buss, S. N.; Leber, A.; Chapin, K.; Fey, P. D.; Bankowski, M. J.; Jones, M. K.; Rogatcheva, M.; Kanack, K. J.; Bourzac, K. M. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Gastrointestinal Panel for Etiologic Diagnosis of Infectious Gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 2015
105. George, W. L.; Nakata, M. M.; Thompson, J.; White, M. L. Aeromonas-Related Diarrhea in Adults. *Arch Intern Med* 1985

106. Gracey, M.; Burke, V.; Robinson, J. Aeromonas-Associated Gastroenteritis. *Lancet* 1982
107. Nolla-Salas, J.; Codina-Calero, J.; Vallés-Angulo, S.; Sitges-Serra, A.; Zapatero-Ferrándiz, A.; Climent, M. C.; Gómez, J.; Masclans, J. R. Clinical Significance and Outcome of Aeromonas Spp. Infections among 204 Adult Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017
108. Travis, L. B.; Washington, J. A. The Clinical Significance of Stool Isolates of Aeromonas. *Am J Clin Pathol* 1986
109. von Graevenitz, A. The Role of Aeromonas in Diarrhea: A Review. *Infection* 2007
110. Rochat, L., Croxatto, A., Vallière, S., d., D'acremont, V., Genton, B. (2017). 'Panels gastro-intestinaux par PCR multiplex pour la prise en charges diarrhées du voyageur : performants et utiles ?', *Rev Med Suisse* 2017
111. Khare, Reeti, Mark J. Espy, Elizabeth Cebelinski, David Boxrud, Lynne M. Sloan, Scott A. Cunningham, Bobbi S. Pritt, Robin Patel, et Matthew J. Binnicker. « Comparative Evaluation of Two Commercial Multiplex Panels for Detection of Gastrointestinal Pathogens by Use of Clinical Stool Specimens ». *Journal of Clinical Microbiology* 52
112. Zhang, Hongwei, Scott Morrison, et Yi-Wei Tang. « Multiplex Polymerase Chain Reaction Tests for Detection of Pathogens Associated with Gastroenteritis ». *Clinics in Laboratory Medicine* 35, n° 2 (juin 2015)
113. Goldenberg, Simon D., Mariana Bacelar, Peter Brazier, Karen Bisnauthsing, et Jonathan D. Edgeworth. « A Cost Benefit Analysis of the Luminex XTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for Detection of Infectious Gastroenteritis in Hospitalised Patients ». *Journal of Infection* 70
114. Lääveri, T., J. Antikainen, S. H. Pakkanen, J. Kirveskari, et A. Kantele. « Prospective Study of Pathogens in Asymptomatic Travellers and Those with Diarrhoea: Aetiological Agents Revisited ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22
115. Buss, Janice E., Elizabeth Thacker, et Michelle Santiago. « Culture Methods to Determine the Limit of Detection and Survival in Transport Media of Campylobacter Jejuni in Human Fecal Specimens ». *Journal of Visualized Experiments*
116. Tran, Anthony, Kevin Alby, Alan Kerr, Melissa Jones, et Peter H. Gilligan. « Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry ». *Journal of Clinical Microbiology* 53

# ANNEXES

## Annexe 1 : Données récoltées au cours de notre étude

Paramètres	Moyennes
<b>CRP</b>	79,9 mg/L
<b>PNN</b>	7,76 G/L
<b>Patients hyperthermes</b>	53,1 %

**Tableau 6 : Moyenne des données récoltées des patients inclus dans notre étude.**

*CRP : Protéine C-Réactive ; PNN : Polynucléaire neutrophile*

	Négatif par PCR et coproculture	Positif par PCR Négatif par coproculture	Négatif par PCR Positif par Coproculture	Positif par PCR et coproculture
<b>CRP</b>	73,7 mg/L	95,3 mg/L	38,3 mg/L	88,8 mg/L
<b>PNN</b>	8,36 G/L	7,55 G/L	7,59 G/L	6,87 G/L
<b>Hyperthermie</b>	46,5 %	54,5 %	0 %	70,8 %

**Tableau 7 : Moyenne des données récoltées des patients inclus dans notre étude, selon les résultats de la PCR et de la coproculture.**

*CRP : Protéine C-Réactive ; PNN : Polynucléaire neutrophile*

## Annexe 2 : Etude médico-économique

### 1- Coût du matériel :

Nous n'avons pas tenu compte du prix négligeable des öses et des pipettes, étant utilisées dans les deux techniques soumises à étude.

#### Coproculture :

Le coût du matériel nécessaire à la réalisation d'une coproculture est détaillé dans le Tableau 6 ci-dessous.

Matériel	Prix HT unitaire
Gélose Karmali	0.32 €
Gélose Sabouraud	0,24 €
Gélose Hektoen	0,213 €
Bouillon Mueller Kauffmann	0,844 €
Gélose CIN	0,198 €
Gélose SM2	0,61 €
TCS	0,59 €
Antisérums	2 €
Identification MALDI-TOF	0,3 € <sup>(116)</sup>
<b>Total : coproculture négative</b>	<b>2,43 €</b>
<b>Total : coproculture nécessitant des explorations supplémentaires</b>	<b>2,73 €</b>
<b>Total : coproculture avec suspicion de shigellose</b>	<b>5,3 €</b>

#### **Tableau 8 : Coût brut unitaire du matériel nécessaire à la réalisation d'une coproculture.**

*CIN : Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine ; SM2 : Gélose chromID™ Salmonella ; MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight*

#### **BD MAX™ Enteric Bacterial Panel :**

Le coût du matériel nécessaire à la réalisation d'une PCR Multiplexe est détaillé dans le Tableau 7 suivant.

Matériel	Prix HT unitaire
Panel classique	13 euros
Panel étendu	3 euros
<b>Total</b>	<b>16 euros</b>

#### **Tableau 9 : Coût brut unitaire des tests entériques du BD MAX.**

## 2- Temps technicien :

Dans cette partie nous considérons que le prix horaire d'un technicien équivaut à celui d'un technicien en milieu de carrière, soit 18,35 €/h. Le temps technique nécessaire à la réalisation d'une coproculture et son coût technique sont détaillés dans le tableau 8 ci-dessous.

	Temps technique	Coût technique
<b>BD MAX™ Enteric Bacterial Panel</b>	4 min	1,22 €
<b>Coproculture négative</b>	15 min	4,6 €
<b>Coproculture nécessitant des recherches additionnelles</b>	35 min	10,7 €

**Tableau 10 : Temps technique et coûts nécessaires à la réalisation d'une coproculture.**

## 3- Au total :

Le prix total nécessaire à la réalisation de chacune des techniques est détaillé dans le tableau 9 suivant.

<b>Coproculture négative</b>	7,03 €
<b>Coproculture nécessitant des explorations supplémentaires</b>	13,43 €
<b>Coproculture avec suspicion de shigellose</b>	16 €
<b>BD MAX™ Enteric Bacterial Panel</b>	17,22 €

**Tableau 11 : Prix totaux de la coproculture et du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel.**

## 4- Coût de notre étude

### Coproculture

L'étude que nous avons menée comprend 87 coprocultures. 36 explorations additionnelles ont été nécessaires dont 10 sérotypages pour suspicion de shigellose. Par conséquent il y a : 51 coprocultures négatives, sans explorations additionnelles ; 26 coprocultures qui ont nécessité des explorations additionnelles mais sans suspicion de shigellose ; et 10 échantillons qui ont nécessité un sérotypage pour suspicion de shigellose. La coproculture a donc coûté **867,71 €**. Le détail des coûts des coprocultures incluses dans notre étude est détaillé dans le tableau 10 suivant.

	Quantité	Prix unitaire	Prix total
<b>Coprocultures négatives</b>	51	7,03 €	2460,5 €
<b>Coprocultures nécessitant des explorations supplémentaires</b>	26	13,43 €	1087,83 €
<b>Sérotypage <i>Shigella</i></b>	10	16 €	144 €
<b>Total</b>			<b>867,71 €</b>

**Tableau 12 : Coûts des coprocultures incluses dans notre étude.**

Les prix unitaires et totaux prennent en compte le prix du matériel et le prix du temps technique nécessaire à la réalisation de l'analyse.

### *BD MAX™ Enteric Bacterial Panel*

Concernant le prix de la PCR Multiplexe, en plus du coût du matériel de l'automate, il ne faut pas oublier d'ajouter à ces dépenses, le coût de l'isolement sur gélose pour la réalisation de l'antibiogramme, en cas de PCR positive. Nous tiendrons compte uniquement du prix de la gélose utilisée et du temps technicien nécessaire. Ainsi, il faudra additionner au prix des tests utilisés, le coût de la gélose et le coût technique nécessaires pour : 18 *Campylobacter*, 9 *Shigella*, 6 *Salmonella* et 2 *Yersinia enterocolitica*.

Notons que c'est 96 tests BD MAX™ Enteric Bacterial Panel qui ont été nécessaires à la réalisation de cette étude (à cause de multiples résultats invalides nécessitant un repassage).

Les coûts des PCR Multiplexe incluses dans notre étude sont détaillés dans le tableau 11 suivant.

	Quantité	Prix unitaire	Prix total
<b><i>Campylobacter</i></b>	18	11,32 €	203,76€
<b><i>Shigella</i></b>	9	13,8 €	124,2 €
<b><i>Salmonella</i></b>	6	12,45 €	74,7 €
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	2	11,2 €	22,4 €
<b>BD MAX™ Enteric Bacterial Panel</b>	96	17,22 €	1653,12 €
<b>Total</b>			<b>2078,18 €</b>

**Tableau 13 : Coûts des PCR Multiplexe incluses dans notre étude.**

Les prix unitaires et totaux prennent en compte le prix du matériel et le prix du temps technique nécessaire à la réalisation de l'analyse.

## 5- Extrapolation de notre étude aux échantillons de l'année 2020

### Coproculture

En 2020, 440 coprocultures ont été techniquées. 350 n'ont pas nécessités d'explorations supplémentaires, 90 explorations additionnelles ont été réalisées dont 9 sérotypages. Les coûts en coproculture de l'année 2020 sont détaillés dans le tableau 12 ci-dessous.

	Quantité	Prix unitaire	Prix total
<b>Coprocultures négatives</b>	350	7,03 €	2460,5 €
<b>Coprocultures nécessitant des explorations supplémentaires</b>	81	13,43 €	1087,83 €
<b>Sérotypage <i>Shigella</i></b>	9	16 €	144 €
<b>Total</b>			<b>3692,33 €</b>

**Tableau 14 : Coûts des coproculture de l'année 2020.**

*Les prix unitaires et totaux prennent en compte le prix du matériel et le prix du temps technique nécessaire à la réalisation de l'analyse.*

### BD MAX™ Enteric Bacterial panel

Si nous extrapolons nos données à l'année 2020, 10,3% des tests auraient été invalides, soit 45. Au total c'est donc, 485 tests qui auraient été utilisés.

En reprenant la même logique que précédemment, il faut également ajouter le coût des isollements pour l'antibiogramme, lorsque la PCR revient positive.

Les coûts supposés de l'utilisation de la PCR Multiplexe dans l'année 2020 sont détaillés dans le tableau 13 suivant.

	Quantité	Prix unitaire	Prix total
<b><i>Campylobacter</i></b>	34	11,32 €	384,88 €
<b><i>Shigella</i></b>	6	13,8 €	82,8 €
<b><i>Salmonella</i></b>	9	12,45 €	112,05 €
<b><i>Yersinia enterocolitica</i></b>	2	11,2 €	22,4 €
<b>BD MAX™ Enteric Bacterial Panel</b>	485	17,22 €	8351,7 €
<b>Total</b>			<b>8953,83 €</b>

**Tableau 15 : Coûts supposés de l'utilisation du BD MAX™ Enteric Bacterial Panel sur les échantillons de l'année 2020.**

### Annexes 3 : Exemples de cibles et de paramètres de plateformes d'analyse moléculaire multiplex rapide <sup>(110)</sup>

Cibles	BDmax	FilmArray GI (Biofire)	xTAG GPP (Luminex)	Seeplex Diarrhea ACE detection (Seegene)
<b>Bactéries</b>				
<i>Campylobacter</i> spp. <sup>1</sup>	x	x	x	x
<i>Salmonella</i> spp.	x	x	x	x
EIEC/ <i>Shigella</i> spp.	x	x	x	x
STEC/EHEC (stx1/stx2)	x	x	x	x
<i>E. coli</i> 0157		x	x	x
EPEC	x	x	x	
EAEC		x		
EPEC		x		
<i>Aeromonas</i> spp.		x		x
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	x	x		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	x	x	x	x
<i>Vibrio</i> spp. <sup>2</sup>	x	x	x	x
<i>Clostridium difficile</i> (toxin A/B)	x (toxine B)	x	x	x (toxine B)
<b>Parasites</b>				
<i>Cryptosporidium</i> spp. <sup>3</sup>	x	x	x	
<i>Entamoeba histolytica</i>	x	x	x	
<i>Giardia lamblia</i>	x	x	x	
<i>Cyclospora cayetanensis</i>		x		
<b>Virus</b>				
Adenovirus 40/41	x	x	x	x
Norovirus GI/GII	x	x	x	x
Rotavirus A	x	x	x	x
Sapovirus	x	x		
Astrovirus	x	x		x
<b>Paramètres</b>				
Nombres de cibles	18	22	15	13
Temps de rendu des résultats	~2-3 h	~1 h	~5 h	~10 h
Sensibilité	93,1-100% <sup>4</sup>	24-100%	48-100%	40-100%
Spécificité	99-100% <sup>4</sup>	96-100%	85-100%	96-100%

**DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE**

Nom et Prénom de l'étudiant : COGET Maël ..... INE : 1105000370j.....

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 12 | 10 | 2021 à 18.h.15. Amphithéâtre ou salle : curie.....  
jour mois année

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :

Avis du directeur de thèse

Nom : BONDIRAUX.....

Prénom : Nicolas.....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : 20/08/21

Signature:



Avis du président du jury

Nom : FOLIGNE.....

Prénom : Benoît.....

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable : .....

Date : Lille, le 14/09/2021

Signature:

Décision du Doyen

Favorable

Défavorable

29/9/21  
Le Doyen  
  
B. DÉCAUD

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.



Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
Année Universitaire 2020/2021

**Nom : COGET**  
**Prénom : Maël**

**Titre de la thèse : EVALUATION DES PERFORMANCES DU BD MAX™ ENTERIC  
BACTERIAL PANEL POUR LA PRISE EN CHARGE DES DIARRHEES INFECTIEUSES  
AIGUËS AU CH DE TOURCOING**

**Mots-clés : BD MAX, diarrhées infectieuses aiguës, bactéries entéropathogènes,  
Multiplex PCR**

---

**Résumé :** Les diarrhées aiguës fébriles constituent une cause majeure de consultation et d'hospitalisation. Lorsqu'elle est d'origine bactérienne, le diagnostic de la diarrhée aiguë repose sur la coproculture, une technique longue et peu sensible. Le développement de nouveaux outils diagnostics de biologie moléculaire, promet d'améliorer ces performances diagnostiques, avec des temps de rendu considérablement réduit. Notre étude vise à étudier les performances d'une PCR Multiplexe, le BD MAX™ Enteric Bacterial Panel, dans la prise en charge des diarrhées aiguës au CH de Tourcoing.

Nous avons inclus 87 patients présentant des diarrhées dont l'étiologie infectieuse était fortement suspectée. La PCR Multiplexe était positive pour 42,5% des échantillons, alors que la coproculture n'était positive que pour 34,5%. Parmi les 14 bactéries détectées seulement par la PCR, les *Campylobacter* étaient majoritaires (50%), suivi par les Shiga-toxines 1 et 2 (36%), et dans une moindre mesure les *Shigella* (7%) et *Yersinia enterocolitica* (7%).

Concernant l'impact clinique de la PCR Multiplexe, 19% des patients positifs auraient bénéficié d'une sortie précoce d'hospitalisation si elle avait été utilisée en remplacement de la coproculture. Dans la même logique, 19% des patients positifs auraient reçu une antibiothérapie adaptée, et dans 2,7% des cas, une errance diagnostic aurait pu être évitée.

Les résultats de cette étude montrent la supériorité des performances de la PCR Multiplexe, ainsi que le potentiel bénéfique clinique apporté par sa mise en place. À la lumière de ces résultats, la poursuite de l'étude incluant un plus grand nombre d'échantillons semble pertinente.

---

**Membres du jury :**

**Président :** M. le Professeur FOLIGNÉ Benoît  
Professeur des Universités, Université de Lille

**Directeur de thèse :** M. le Docteur BLONDIAUX Nicolas  
Maître de conférences des Universités, Université de Lille  
Pharmacien Praticien hospitalier, CH de Tourcoing

**Asseseurs :** M. le Docteur PATOZ Pierre  
Pharmacien Praticien hospitalier, CH de Tourcoing

M. le Docteur ROBINEAU Olivier  
Maître de conférences des Universités, Université de Lille  
Médecin Praticien hospitalier, CH de Tourcoing