

Clostridium difficile

Diagnostic au laboratoire

Anne Vachée
CH de Roubaix

Conflits d'intérêts

- Aucun

Introduction

Depuis le début des années 2000 :

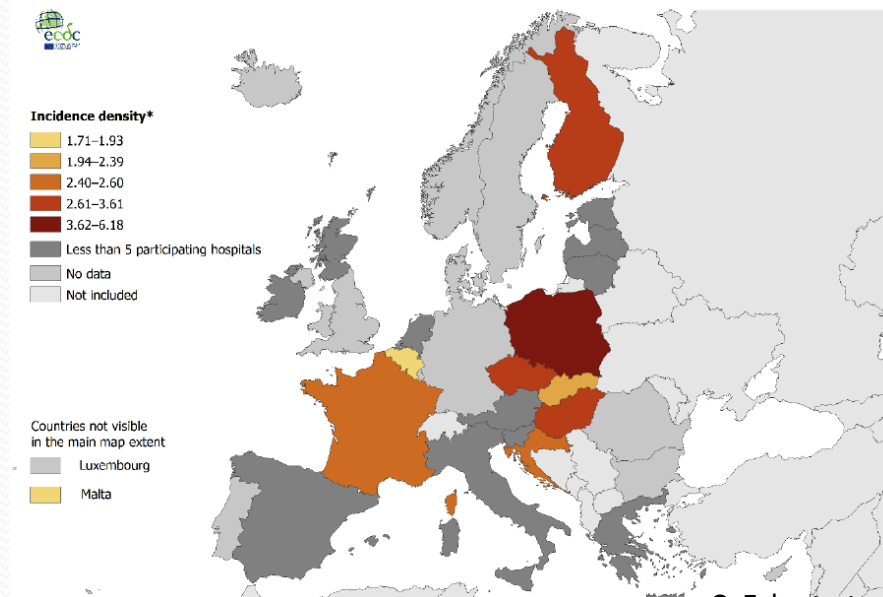
- ↗ **incidence** des colites à *C. difficile*
- Apparition de **souches hypervirulentes**, associées à des tableaux cliniques particulièrement sévères
- Jusqu'à 25% des patients : **récidive** dans les 30 jours, voir récidives multiples

→ **Développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques**

Epidémiologie

- Incidence des ICD (infections à *Clostridium difficile*) en augmentation en France:
 - 2,3 ICD / 10 000 patients-jour en 2009 (ICD-Raisin)
 - 3,6 ICD /10 000 patients-jour en 2012

Figure 1. Healthcare-associated CDI cases per 10 000 patient-days in participating hospitals by country, EU/EEA, 2016

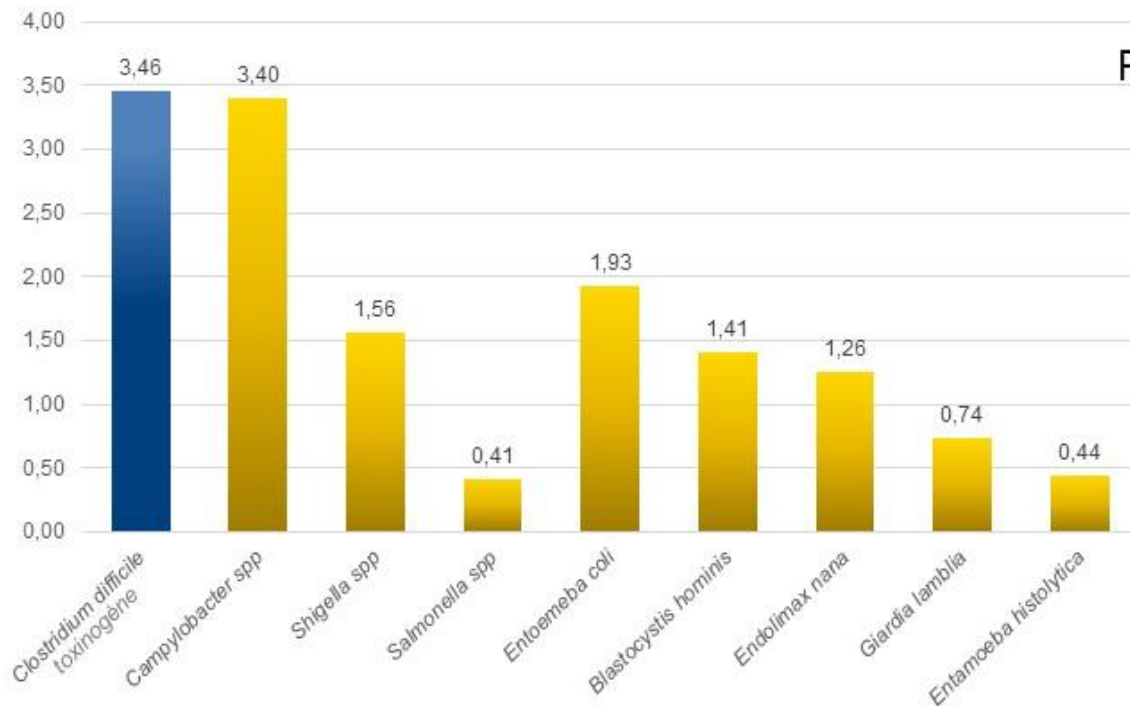


2016

C. Eckert *et al.* Médecine et maladies infectieuses 2013
F. Barbut *et al.* Presse Med. 2015
ECDC 2016

⦿ Formes communautaires

Etude COMMUNODIF



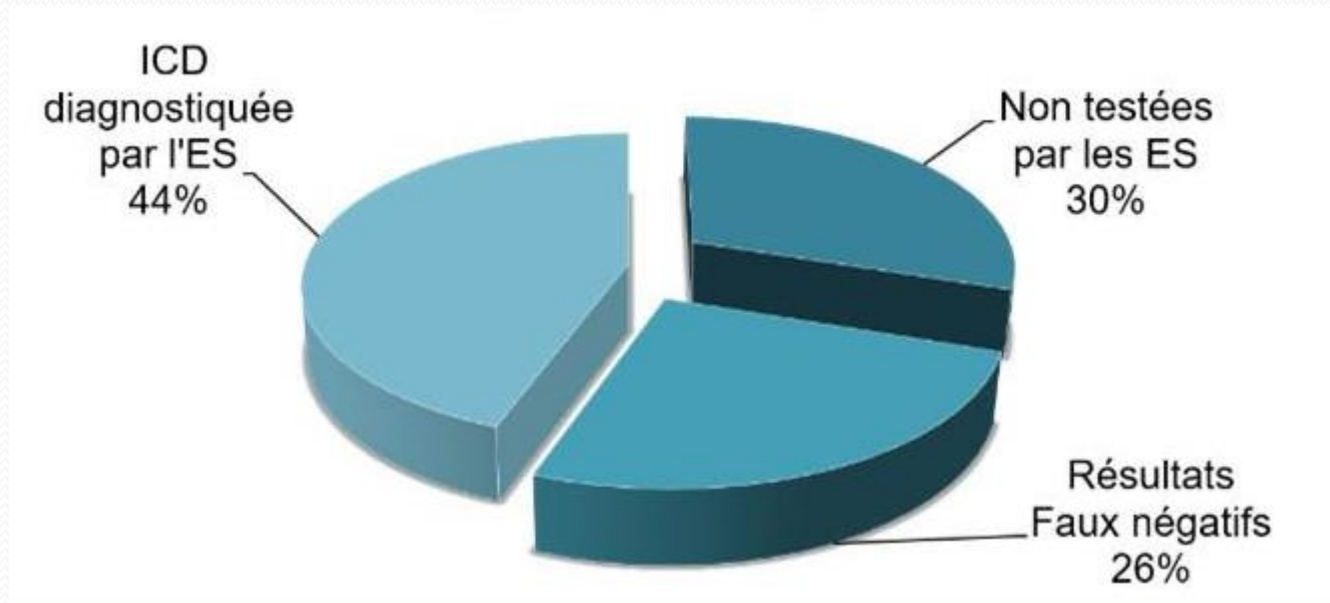
Patients non hospitalisés pour
lesquels un Médecin
généraliste a prescrit une
coproculture

1705 patients
âge moyen = 40,9 ans
49% H et 51% F

➤ **CD pathogène le plus fréquemment retrouvé**

Sous diagnostic

- Etude EUCLID (CNR) :
 - 651 selles de 70 hôpitaux
 - GDH+toxine puis culture toxinogénique
 - 9,7% des échantillons positifs
 - 55,6% non diagnostiquées par le laboratoire d'origine



Densité de prescription

- La recherche systématique *C. difficile* toxigène chez les patients développant une diarrhée après 48 h d'hospitalisation est recommandée par le Haut conseil de Santé publique
- L'incidence moyenne des ICD rapportées en 2012 par les ES participants était de $3,6 \pm 2,9$ pour 10 000 patients-jours ; l'incidence était positivement corrélée à la densité de prescription (nombre de tests réalisés pour 10 000 patients-jours) qui variait largement d'un ES à l'autre (médiane 29 pour 10 000 patients-jours ; IQR 19–50).

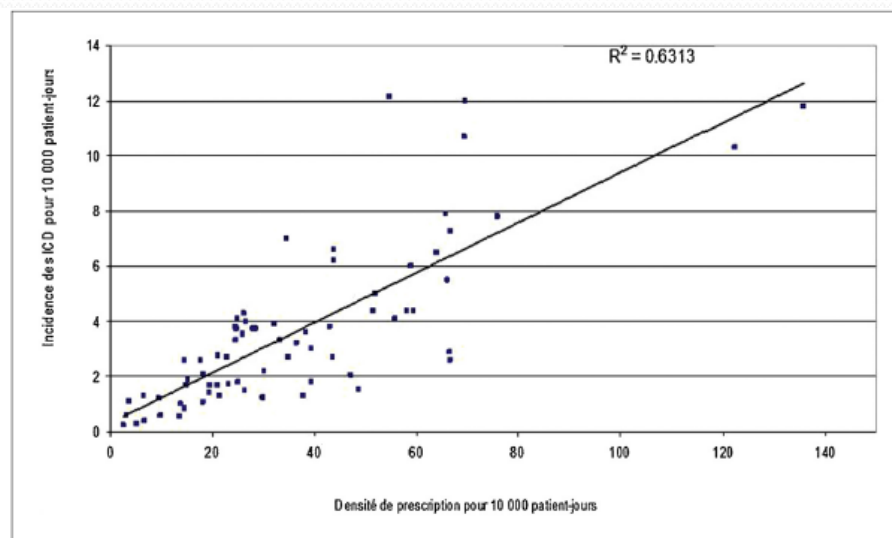


FIGURE 2

Relation entre la densité de prescription de *Clostridium difficile* (nombre de recherche de *C. difficile*/10 000 patients-jours) et l'incidence d'infections à *C. difficile* (ICD) (nombre d'ICD/10 000 patient-jours)

Une ICD est définie par :

- un tableau clinique compatible avec une ICD

et

la mise en évidence microbiologique d'un *C. difficile* producteur de toxines dans les selles en l'absence d'autre cause évidente de diarrhée

ou

- une colite pseudomembraneuse

➔ recommandations de bonne pratique

Ne pas tester les selles moulées

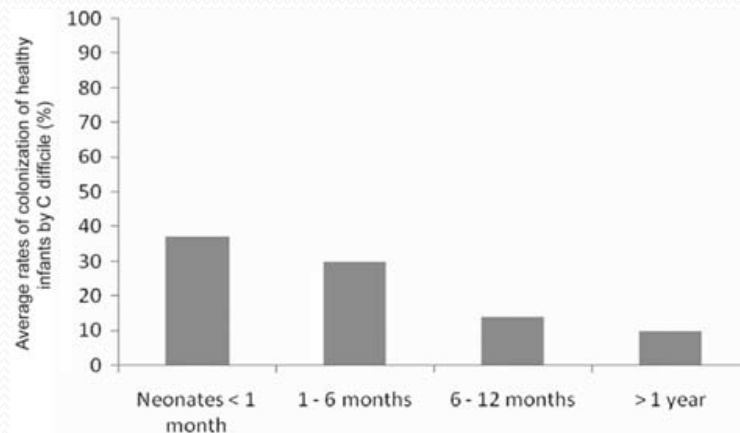
- Seules les selles diarrhéiques doivent être testées (selles prenant l'aspect du récipient)
- Patient diarrhéique :
 - Aspect 5, 6, 7 sur l'échelle de Bristol
 - ≥ 3 selles par 24 h ou moins ou émissions plus fréquente que d'habitude (définition OMS)
- Commentaire « selles moulées, recherche non indiquée »
- 18 à 36% des patients testés ne présentaient pas de diarrhée ou avaient une autre explication (laxatifs)

Type 1		petites boules dures e détachées, comme des noi- settes- difficiles à évacuer
Type 2		forme d'une saucisse, dures et grumeleuses.
Type 3		comme une saucisse, avec des craquelures sur la surface
Type 4		comme une saucisse ou un serpent, lisse et douce
Type 5		petits fragments mous, avec des bords nets- néanmoins aisés à évacuer
Type 6		petits fragments, duve- teux aux bords irréguliers, selles détrempées
Type 7		entièrement liquides, aucun fragment solide

Echelle de Bristol

Ne pas tester les selles des enfants de moins de 3 ans

- Colonisation asymptomatique fréquente chez les nouveaux nés (jusqu'à 60%)
- Le portage diminue progressivement, à partir de 3 ans le portage est équivalent à un adulte non hospitalisé (0-3%)



- Ne rechercher que si facteur de risque

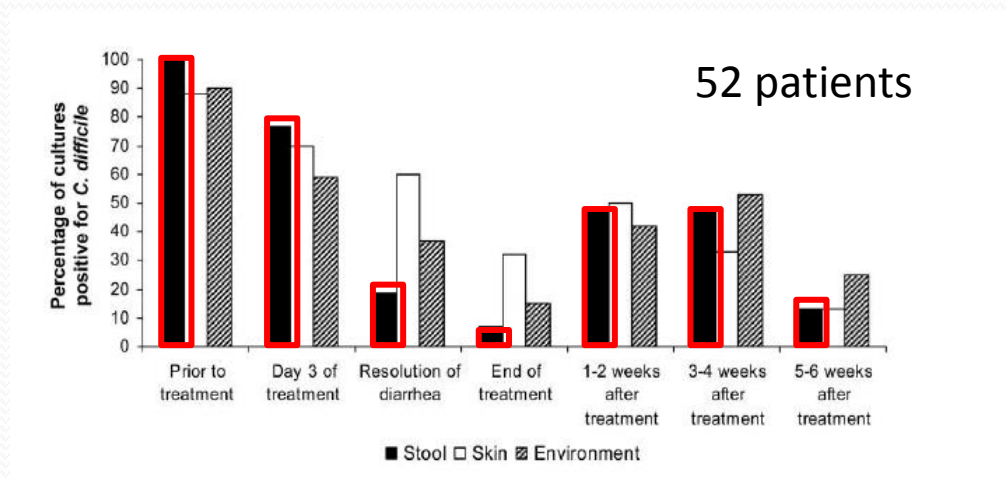
Ne pas répéter les tests

- Pratique fréquente (13% des recherches négatives testées deux fois sur une période de 7 jours) et coûteuse
- Gain diagnostic faible
- Répéter un test peut conduire à un résultat faux positif (défaut de spécificité)

Auteurs	Technique	Patients (n)	Gain diagnostique
Aichinger et al. 2008 ¹	EIA A + B,	5,788	1.9% (7 days)
	PCR	2,827	1.7% (7 days)
Renshaw et al. 1996 ²	CTA	2,009	1%

Ne pas réaliser de contrôles microbiologiques après traitement

- Spores détectables chez 7% des patients à la fin du traitement
- Culture positive chez 56% des patients 1-4 semaines après l'arrêt du traitement

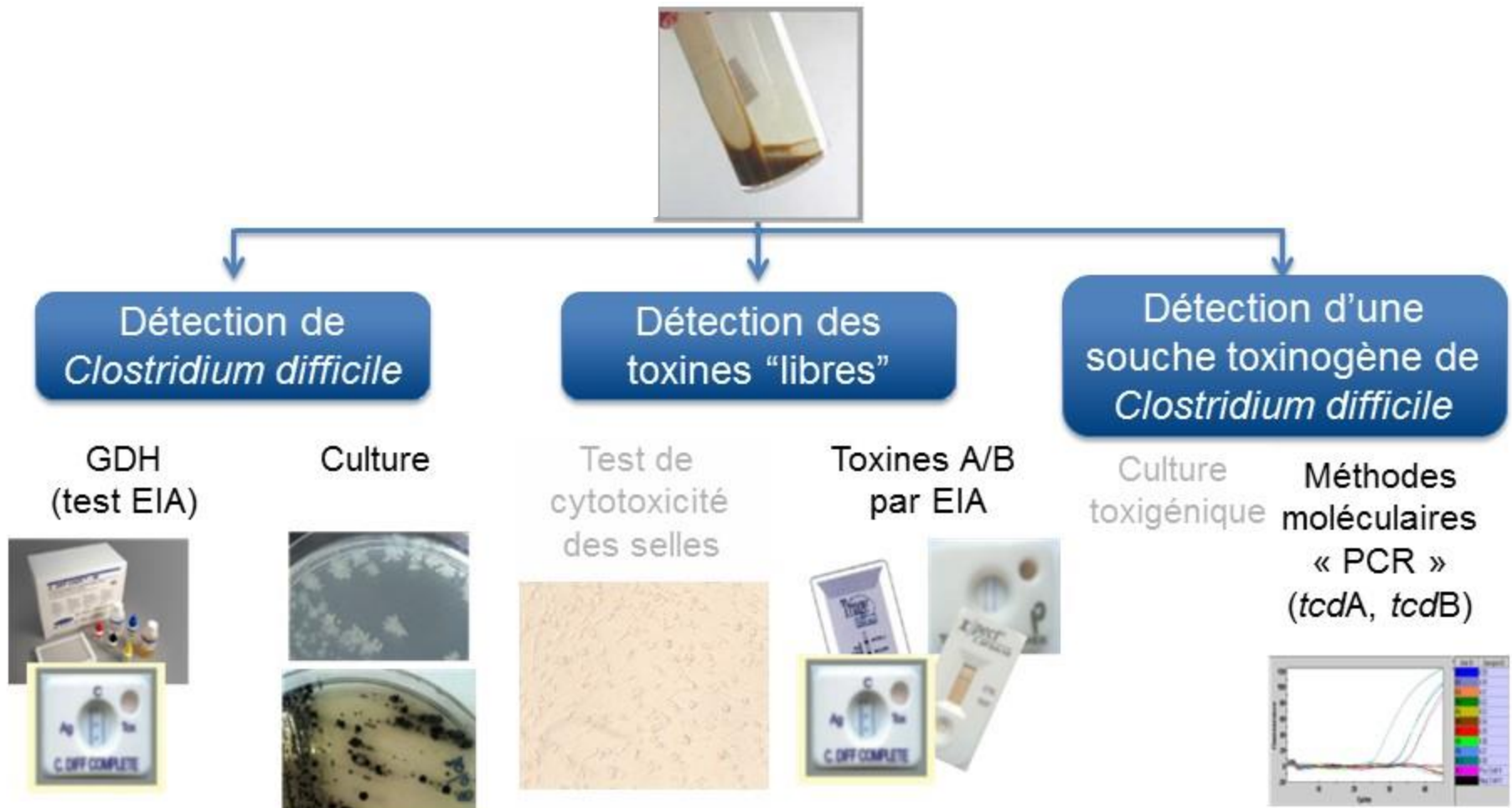


Sethi *et al.* Infect Control Hosp Epidemiol 2010

➔ Rejeter les selles redondantes (< 7 j si 1er résultat - ou <10 j si premier résultat +)

Méthodes	Cibles	Points forts	Points faibles
Culture toxigénique	• Isolement de la souche et détermination de la production de toxines in vitro	• Méthode de référence • Très sensible • Possibilité de faire un antibiogramme • Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques • Possibilité de réaliser un typage • Détection de l'émergence de nouveaux clones	• Long (2-4 jours), en 2 étapes • Spécificité bonne mais imparfaite (portage de souches toxigènes dont les gènes codant pour les toxines ne sont pas activés in vivo mais le sont in vitro après culture) • Pour la détection des toxines, nécessité de tester plusieurs colonies car co-infections possibles
Test de cytotoxicité	• Toxine B (et toxine A)	• Méthode de référence • Très sensible • Très spécifique (détection de la production de toxine in vivo)	• Long (1-2 jours) • Non standardisé • Infrastructure de laboratoire adaptée à la culture cellulaire • Neutralisation possible de l'effet cytopathogène
Test immuno-enzymatique (EIA) détectant la GDH	• Enzyme métabolique (glutamate déshydrogénase)	• Rapide (30 min) • Simple • Très sensible • VPN $\geq 97\%$ pour une prévalence $\leq 20\%$^{11,12} • Bonne corrélation avec la culture¹¹	• Manque de spécificité (76% en comparaison avec la culture toxigénique)¹¹ • Faible VPP¹¹ • Doit être couplé à la recherche de toxine • Détecte les souches toxigènes et non toxigènes
Test immuno-enzymatique (EIA) détectant les toxines A ou A+B	• Toxines A ou A+B	• Rapide (30 min) • Simple • Très spécifique (97%)¹¹ • Préférer les tests de 2^e génération qui détectent les toxines A et B, car émergence des souches A-B+ (1,5-10%)¹⁴	• Peu sensible (52-66%)¹¹ • La VPP est insuffisante en cas de faible prévalence; doit être utilisé en combinaison avec un autre test¹¹ • Coûteux
Biologie moléculaire (PCR)	• Gènes <i>tcdA</i> codant pour la toxine A et/ou <i>tcdB</i> codant pour la toxine B	• Rapide (2 heures) • Très sensible¹¹ • Détecte les gènes codant pour les toxines • Certains tests donnent une identification présomptive du clone 027	• Spécificité bonne mais imparfaite (portage de souches toxigènes dont les gènes codant pour les toxines ne sont pas activés; 3%)¹⁵ • Coûteux • Nouveaux clones émergents hypervirulents non détectés • Mutations possibles de <i>tcdB</i> ou <i>tcdA</i> • Présence possible d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les selles

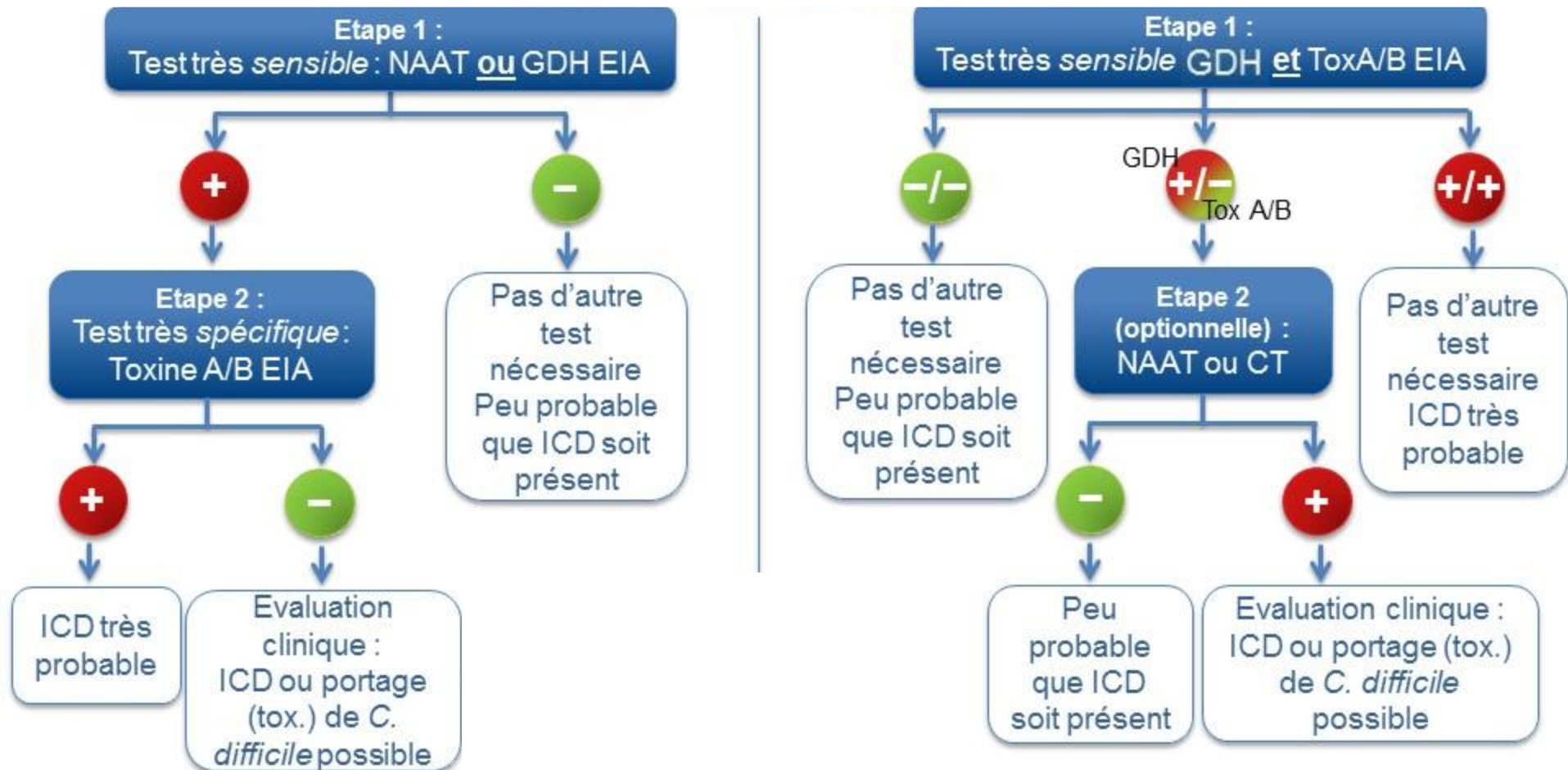
⚡ Tous les tests ne détectent pas exactement la même chose



EIA : enzyme immunoassay. GDH : glutamate déshydrogenase.

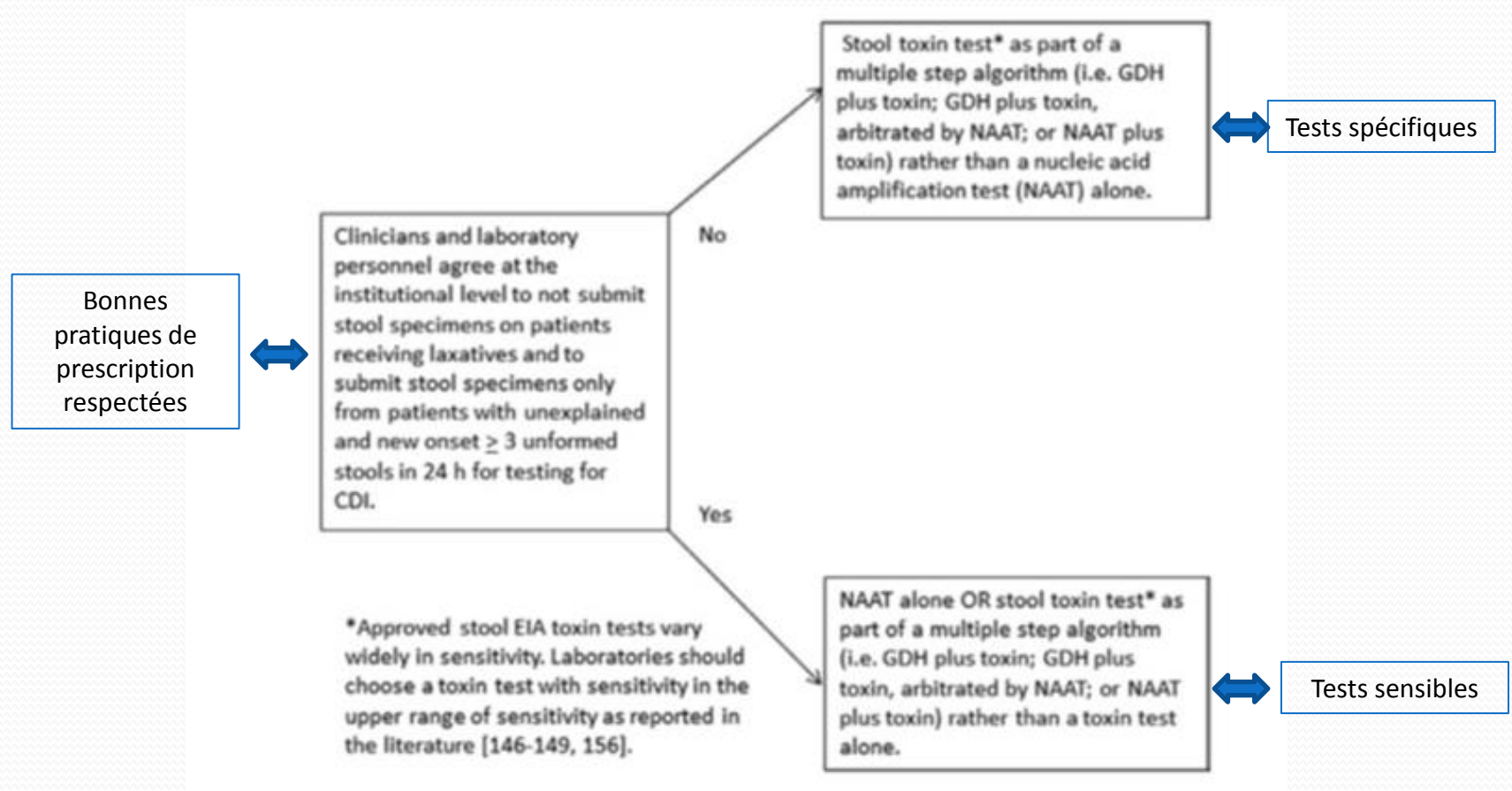
D'après F Barbut

Recommandations ESCMID 2016



GDH : glutamate déshydrogénase. CT : culture toxigénique. NAAT: nucleic acid amplification test
 ICD: infection à *C. difficile*. EIA : test immuno-enzymatique ou immuno-chromatographique.

Recommandations IDSA 2018



Présence des toxines libres mieux corrélée à la sévérité de la maladie?

- Etude prospective multicentrique incluant 10186 patients
 - La présence de toxine libre est significativement associée à une évolution défavorable
 - Les patients ayant une souche toxino-gène sans toxine libre ne diffèrent pas en termes de mortalité et d'hyperleucocytose de la population sans ICD

	CTA positive	NAAT positive/ CTA negative	CTA and NAAT negative	CTA positive vs NAAT positive/CTA negative p value	CTA positive vs CTA and NAAT negative p value	NAAT positive/CTA negative vs CTA and NAAT negative p value
Number	435	311	3943	..	..	..
Female (%)	243/435 (56%)	174/311 (56%)	2117/3941* (54%)	..	..	..
Mean age (years; SD)	69 (20)	64 (22)	64 (21)	..	..	..
Mean white cell count ($\times 10^9/L$; SD)	12.4 (8.9)	9.9 (6.6)	10.0 (12.0)	<0.0001	<0.0001	0.8633
Mean rise in creatinine (%; SD)	37% (63)	49% (132)	34% (81)	0.0222	0.3018	0.0085
>100% rise in creatinine (%)	40/316 (13%)	30/245 (12%)	321/3163 (9%)	..	..	..
Mean albumin (g/L; SD)	31 (7)	33 (8)	33 (8)	0.0328	<0.0001	0.0456
Albumin <20 g/L (%)	13/344 (4%)	15/258 (6%)	166/3223 (5%)	..	..	..
Died (%)	72/435 (16.6%)	30/311 (9.7%)	349/3943 (8.9%)	0.004	<0.0001	0.606
Mean length of stay before sample (days; SD)	17.9 (29)	13.6 (23)	11.2 (22)	0.0311	<0.0001	0.0978
Mean length of stay after sample (days; SD)	19.4 (25)	16.5 (24)	15.1 (24)	0.1869	0.0010	0.2771
Death rate per 1000 inpatient days	9.03	6.04	6.05	0.0317	0.0018	0.8436

CTA=cytotoxin assay. CC=cytotoxigenic culture. NAAT=nucleic acid amplification test. *Sex was not recorded for two patients in this group.

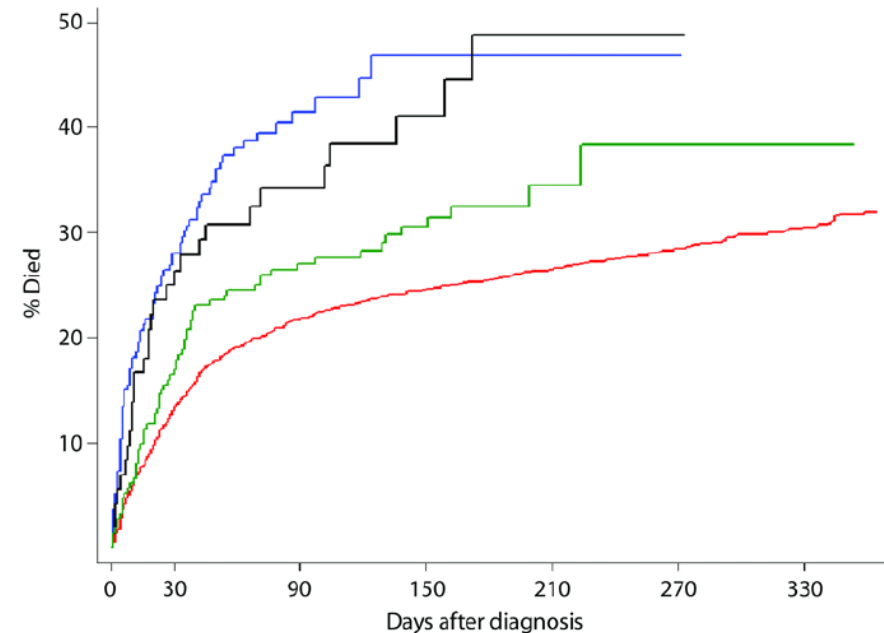
Planche *et al* Lancet infect dis 2013

Table 3: Clinical characteristics of first episodes of inpatients with available clinical outcome results with use of the result of the CTA and NAAT tests to define diagnostic categories

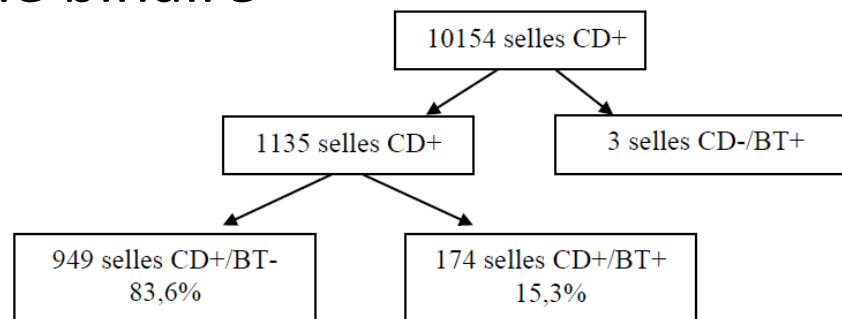
Toxine binaire ?

Le gène de la toxine binaire est **prédicteur de la sévérité** et de la récurrence de l'infection

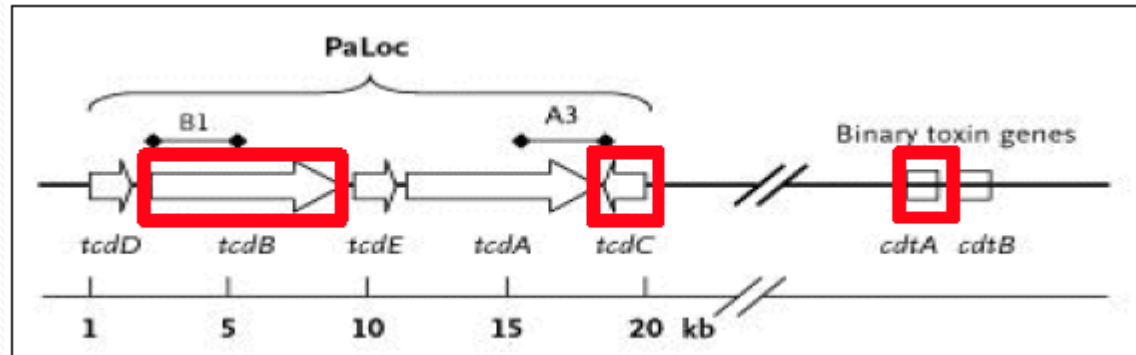
- Les souches contenant les gènes codant pour les toxines A ou B, mais pas pour la toxine binaire, ont montré une mortalité plus faible
- Il existe des souches toxines A/B négatives mais toxine binaire positive



Blue line, *C. difficile* PCR ribotype 027; black line, *C. difficile* PCR ribotype non-027; green line, *C. difficile* with toxins A and B without binary toxin; red line, others



Toxine binaire ?



Xpert *C. difficile* (Cepheid) cible :

- **La toxine B (*tcdB*)**
- **La délétion du *tcdC* (*inhibiteur de la transcription des toxines*)**
- **La toxine binaire (*cdtA*)**

Conclusion

- Bien prescrire
 - Prescrire davantage → augmenter la densité de prescription, ne pas sous estimer la part communautaire
 - Intégrer la recherche de CD dans la coproculture standard ??
 - Place des approches syndromiques (PCR multiplex) ?
 - Panels gastro-intestinaux : plusieurs cibles en un minimum de temps (coût +++)
- Mieux prescrire → ne pas réaliser les recherches quand :
 - Selles moulées
 - Selles redondantes
 - Enfants moins de 3 ans
 - Contrôle après traitement

Conclusion

- Au laboratoire :
 - pas de test parfait
 - utiliser des tests sensibles en connaissant leur limite de spécificité (**dialogue clinico-biologique +++**)
- rendre les résultats rapidement (dans la journée)
- place des marqueurs microbiologiques dans la définition de la sévérité et/ou risque de récurrence à définir (O27, toxine libre, toxine binaire)