

# DIAGNOSTIC DES INFECTIONS DIGESTIVES A *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

Dr Frédéric BARBUT

Unité d'Hygiène et de Lutte contre les Infections Nosocomiales

Hôpital Saint-Antoine

184 rue du faubourg Saint-Antoine

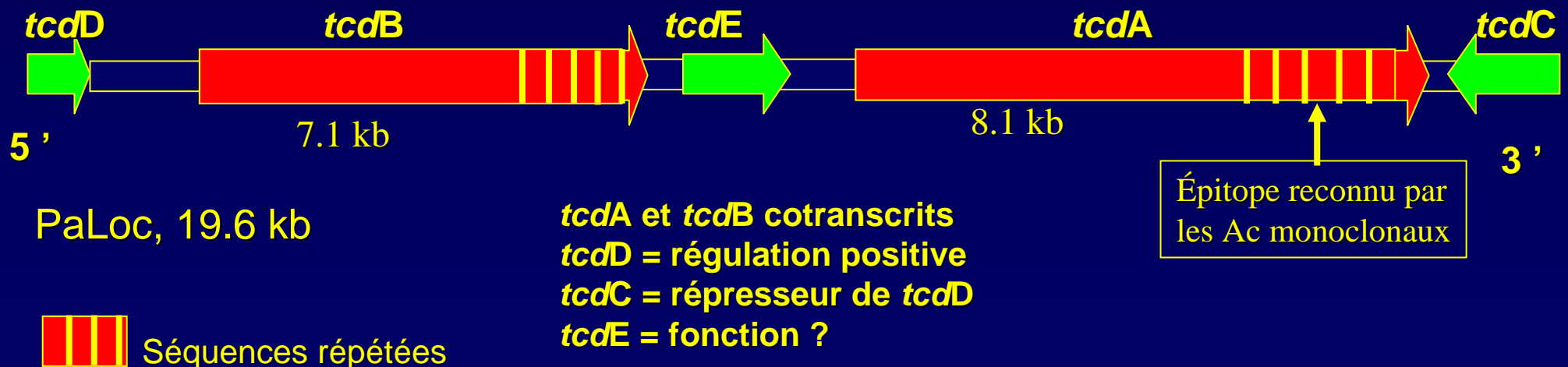
75012 PARIS

Contact : [frederic.barbut@sat.ap-hop-paris.fr](mailto:frederic.barbut@sat.ap-hop-paris.fr)



# *Clostridium difficile*

- BGP anaérobie strict
- Spore subterminale
- Souches toxigènes (pathogènes) ou non toxigènes (non pathogènes)
  - Toxine A : entérotoxine (308 kDa)
  - Toxine B : cytotoxine (270 kDa)



## SPECTRE CLINIQUE

Population étudiée	Isolement de <i>C. difficile</i> (%)	Toxine (%)
• Patients avec CPM post-ATB	95-100	95-100
• Patients avec diarrhée post-ATB sans CPM	15-25	10-25
• Adultes sains	<3	<1
• Nouveau-nés sains	5-70	5-63

*D'après Bartlett et coll., Clin. Infect. Dis. 1994 ; 18 : 265-272*

## *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity

Jacques Pépin, Louis Valiquette, Marie-Eve Alary, Philippe Villemure, Anick Pelletier, Karine Forget, Karine Pépin, Daniel Chouinard



Fast-tracked article. Early release, published at www.cmaaj.ca on Aug. 4, 2004. Subject to revision.

**Table 1: Patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) in the Estrie region of Quebec who died within 30 days after diagnosis or who had complicated CDAD, 1991–2003**

Period	No. of patients with CDAD*	No. (%) who died within 30 days after diagnosis	Adjusted OR (95% CI)†	No. (%) who had complicated CDAD‡	Adjusted OR (95% CI)†
1991–1992	169	8 (4.7)	1.0	12 (7.1)	1.0
1993–1994	217	11 (5.1)	1.7 (0.5–5.3)	14 (6.5)	1.0 (0.4–2.7)
1995–1996	215	13 (6.0)	1.6 (0.5–5.0)	17 (7.9)	0.9 (0.3–2.2)
1997–1998	192	11 (5.7)	1.1 (0.4–3.7)	13 (6.8)	0.6 (0.3–1.7)
1999–2000	248	19 (7.7)	1.5 (0.5–4.6)	28 (11.3)	1.2 (0.5–2.9)
2001–2002	244	21 (8.6)	1.6 (0.5–4.7)	28 (11.5)	1.1 (0.5–2.5)
2003	390	54 (13.8)	3.0 (1.1–8.4)	71 (18.2)	2.2 (1.0–4.9)
<i>p</i> value		< 0.001§	< 0.001¶	< 0.001§	0.001¶

Note: OR = odds ratio, CI = confidence interval.

\*Includes only patients for whom enough information was available to assess these outcomes.

†Adjusted for age, sex, initial treatment, immune status, and tube feeding and surgery in the 2 months preceding diagnosis; 1991–1992 was used as the baseline period.

‡Presence of one or more of the following: megacolon, perforation, colectomy, shock requiring vasopressor therapy, death within 30 days after diagnosis.

§ $\chi^2$  test for trend.

¶ $\chi^2$  test, comparing 2003 with all other years.

## PHILIPPE COUILLARD ANNONCE 20 MILLIONS DE DOLLARS POUR LUTTER CONTRE LE CLOSTRIDIUM DIFFICILE

MONTREAL, le 27 janv. /CNW Telbec/ - "Les hôpitaux du Québec peuvent maintenant compter sur des budgets supplémentaires de 20 millions de dollars pour mieux s'attaquer aux infections à Clostridium difficile. Ce soutien financier vient s'ajouter au nombreuses mesures déjà mises en place en 2004 pour lutter contre ce type d'infections." C'est ce qu'a déclaré aujourd'hui le ministre de la Santé et des Services sociaux, monsieur Philippe Couillard, qui a également rendus publics les premiers résultats recueillis grâce au système de surveillance mis sur pied en août dernier. Il était accompagné du docteur Alain Poirier, directeur national de santé publique.

### NEWS

## C. difficile hits Sherbrooke, Quebec hospital: 100 deaths

Early release, published at [www.cmaaj.ca](http://www.cmaaj.ca) on Aug. 4, 2004. Subject to revision.

## **Quand rechercher *C. DIFFICILE* ?**

- **Uniquement sur selles diarrhéiques**
- **Patients ayant les facteurs de risque suivants :**
  - **Antibiothérapie +++ < 4 semaines**
  - **Age > 2 ans ( la majorité des cas ont >65 ans)**
  - **ATCD d'hospitalisations**
  - **Diarrhée nosocomiale**

***C. difficile* : PRINCIPAL AGENT DE DIARRHÉE NOSOCOMIALE  
DE L'ADULTE (*Barbut et coll., EJCMID 1995 ; 14 : 347-349*)**

ENTÉROPATHOGENÈ	N SELLES POSITIVES (%)	
	Prescrites entre 0-3 j (n= 377)	Prescrites > 3 jours (n= 344)
<b><i>Salmonella</i> sp.</b>	<b>21 (5.5)</b>	<b>1 (0,3)</b>
<b><i>Shigella</i> sp.</b>	<b>2 (0,5)</b>	<b>1 (0,3)</b>
<b><i>Campylobacter</i> sp.</b>	<b>18 (4,8)</b>	<b>3 (0,9)</b>
<b><i>Yersinia</i> sp.</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b><i>C. difficile</i></b>	<b>39 (10,3)</b>	<b>35 (10,2)</b>

# DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A *C. DIFFICILE*

- Diagnostic endoscopique
- Diagnostic bactériologique
  - culture
  - toxines

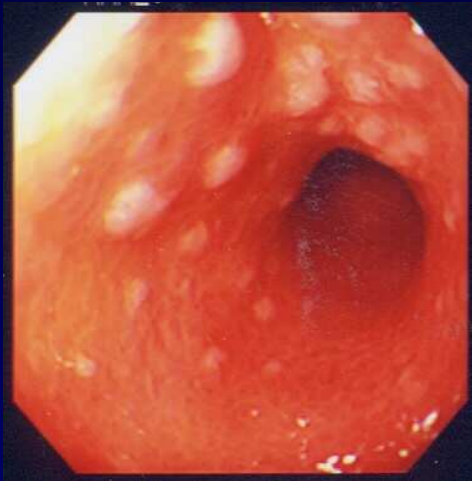


# 1- DIAGNOSTIC ENDOSCOPIQUE

---

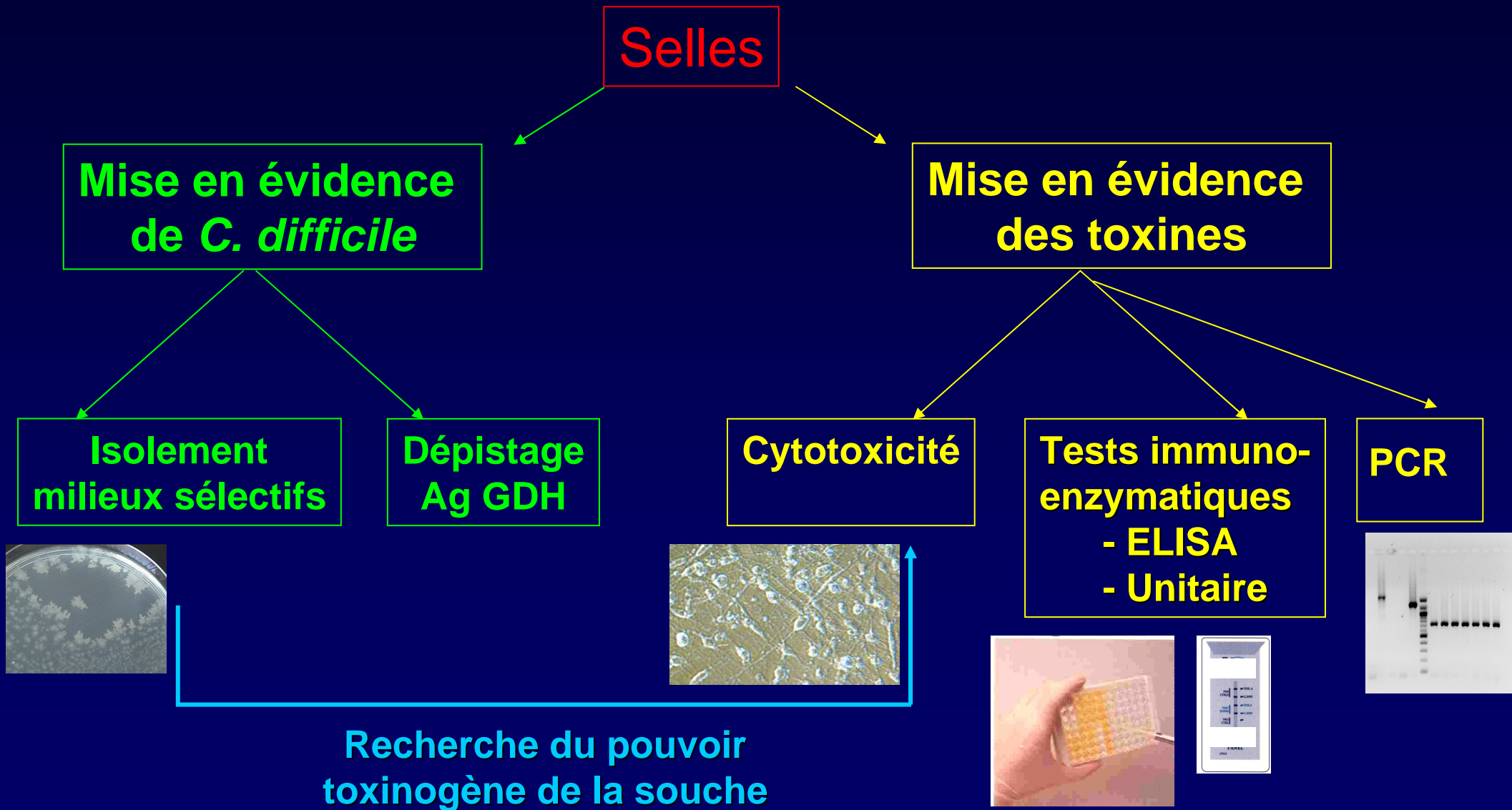
## Exploration recto-sigmoïdoscopique : pseudo-membranes

- Spécifique : lésions aphtoïdes jaunâtres arrondies  
colon +++ ( $\pm$  rectum), rarement grêle



- Peu sensible - stade précoce : absence de lésions  
- lésions segmentaires hautes
- Difficilement applicable en routine

## 2- DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE



# ■ Prélèvement – Examen microscopique

---

- Prélèvement de selles +++ (*Freeman , J. Clin Pathol, 2003, 56, 126-128.*)
  - une seule copro. suffit en règle générale
  - acheminement rapide
  - conservation quelques jours à 4°C
  - si différé : congélation -80°C (toxines)
- Cas des biopsies (*Barbut F., Clin Infect Dis. 1999;29:356-60*)
  - peu sensible pour la mise en évidence des toxines
  - possibilité d'isolement du germe
- Examen microscopique (peu spécifique)
  - leucocytes : 50% des cas
  - flore déséquilibrée
  - présence de BGP sporulés

# ■ Recherche de la glutamate deshydrogénase (GDH)

---

- tests d'agglutination (Microscreen<sup>ND</sup>, Microgen; Culturette Brand, Marion)
- tests immuno-enzymatiques (Triage<sup>ND</sup> )

*(Barbut F., Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:481-4)*

Avantages :

- Simple, rapide
- Bonne corrélation avec la culture

Triage GDH versus culture	
Sensibilité	90.8%
Spécificité	98.7%
VPP	95.8%
VPN	97%

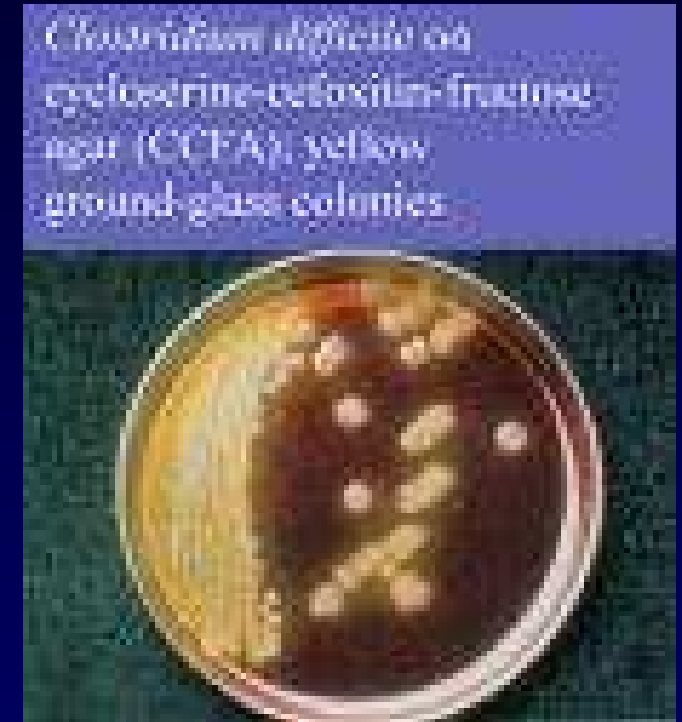
Inconvénients :

- Ne préjuge pas du pouvoir toxigène de la souche
- Méthode peu spécifique

# ■ Recherche de *C. difficile* par culture

---

- Milieu CCFA (Georges 1979)  
cyclosérine (500 mg/l), céfoxitine (16 mg/l)  
fructose, jaune d'œuf, rouge neutre
- CCA modifié : plus performant  
cyclosérine (250), céfoxitine (10)  
gélose cœur cerveau (BHI) + 5% sang mouton
- Addition de taurocholate (TCCFA), Lysozyme  
↑ recouvrement des spores



Incubation ANAEROBIOSE (N<sub>2</sub> 80%, H<sub>2</sub> 10%, CO<sub>2</sub> 10%)

# Aspect de *C. difficile* sur milieu CCA

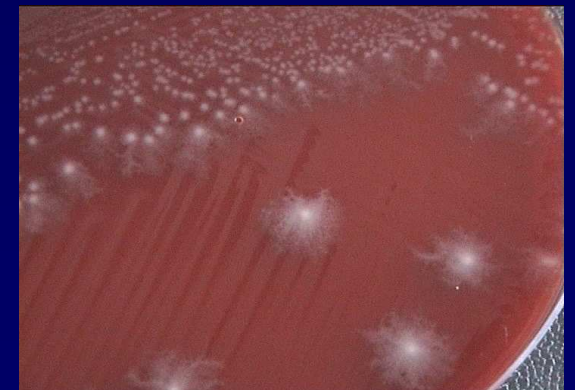
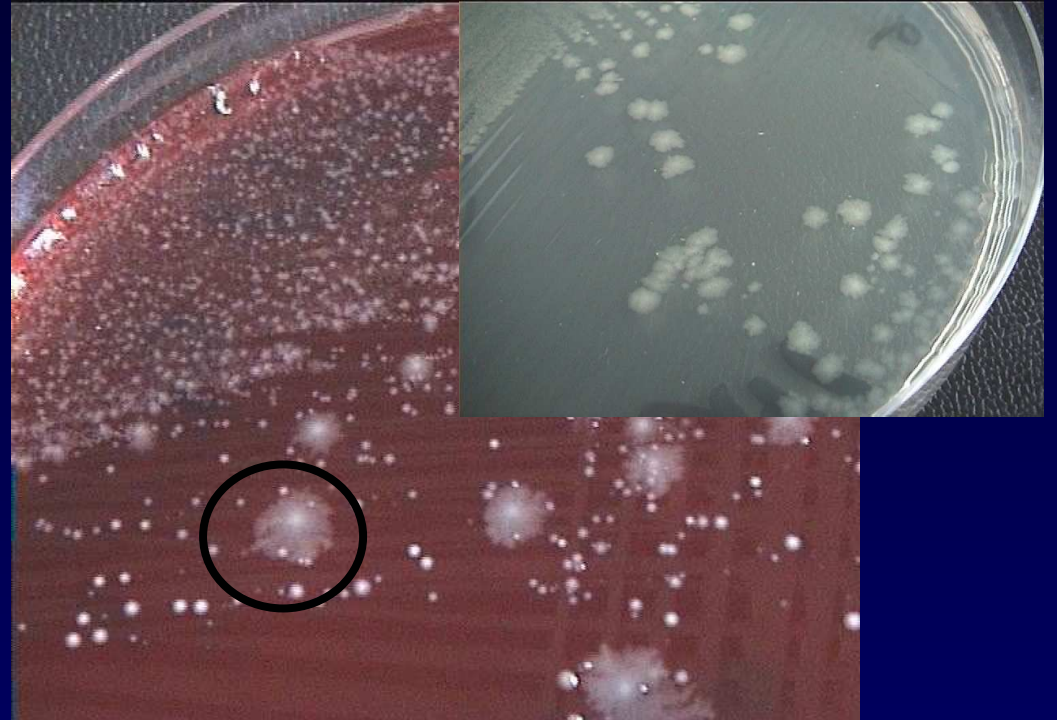
En 24-48h en anaérobiose

- Colonies plates, 3-5 mm, bords irréguliers, non hémolytiques blanches à grises

Loupe : « verre brisé »

- Odeur caractéristique : crottin de cheval (libération de crésol)

- Fluorescence jaune vert sous UV (360 nm) (dépend du milieu de culture)





# Aspect microscopique de *Clostridium difficile*

Bacille Gram +, spore subterminale peu déformante



# Identification de *C. difficile*

- Identification biochimique : Galeries Api 20A (bioMérieux)  
Incubation anaérobie 48h  
Similitudes de *C. difficile* avec *C. sordellii*, *C. bifermentans*
- Equipement enzymatique : Rapid 32A (bioMérieux)  
Inoculum lourd (4-5 McF) - lecture après 4h - 37°C - aérobiose



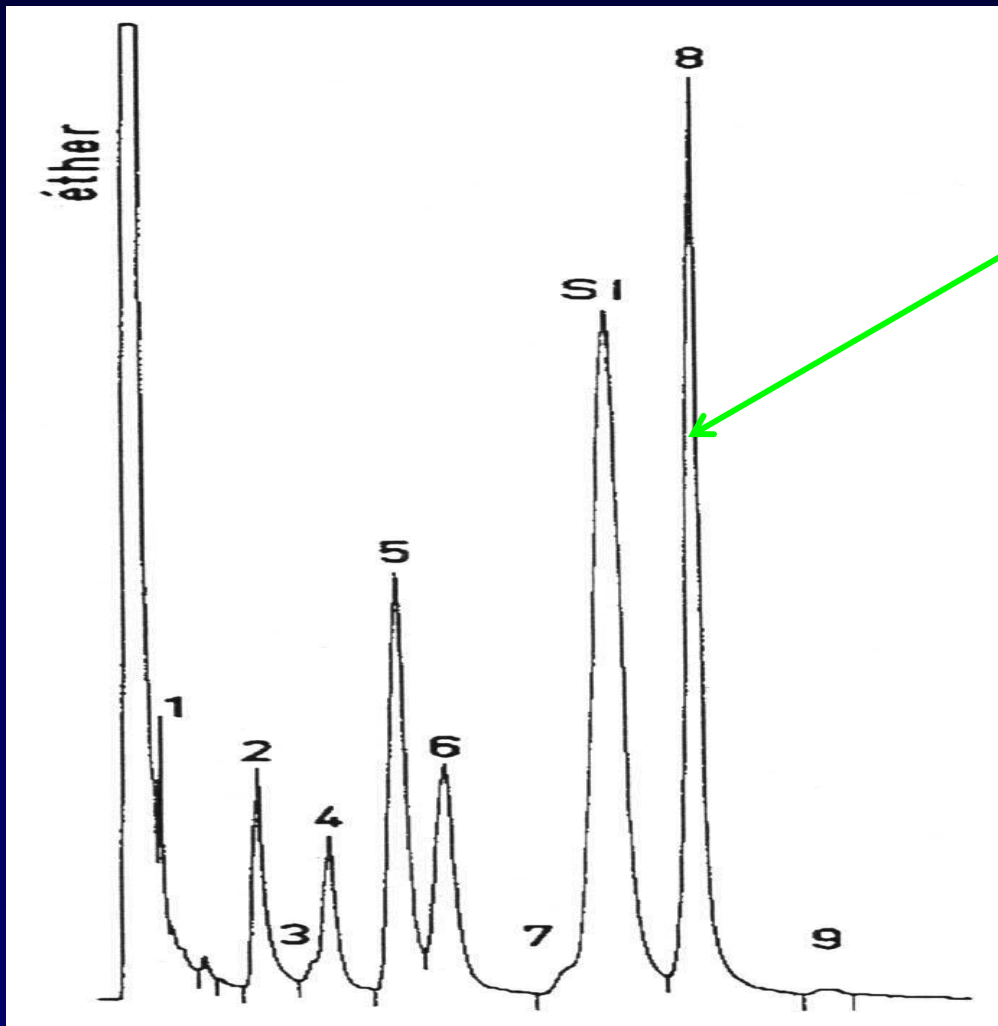


## Diagnostic différentiel

Organisme	Odeur	UV	Latex	Lécithinase
<i>C. difficile</i>	+	V	+	-
<i>C. innocuum</i>	-	+	-	-
<i>C. glycolicum</i>	-	-	+	-
<i>C. bifermentans/ sordellii</i>	-	-	+	+

# Identification de *C. difficile*

CPG : Etude des AG volatils (qualitatif + quantitatif)



- Acide isocaproïque  
*C. bifermentans*  
*C. sordellii*  
*C. sporogenes* +  
*C. difficile* ++ (> 33% des aires)
- Acide butyrique  
uniquement par *C. sporogenes*

# Avantages et inconvénients de la culture

- Avantages :
  - Méthode très sensible  $\approx$  2000 bactéries /g de selles
  - 10% des infections à CD ne sont diagnostiquées que par la culture
  - Permet de caractériser les souches
    - Investigation d'épidémies
    - Suivi de la résistance aux antibiotiques
    - Identifier un clone virulent
  - Permet de dépister les porteurs asymptomatiques
- Inconvénients
  - Long (minimum 48-72 heures)
  - Nécessite de prolonger l'étude par le pouvoir toxinogène

# ■ Test de cytotoxicité (ECP lié à la toxine B)

---

## Méthode de référence +++

### Inoculation d'un filtrat stérile de selles sur cellules (MRC5, Vero,...)

- 24-48h 37°C sous CO<sub>2</sub>
- ECP = arrondissement, globulisation des cellules, décollement

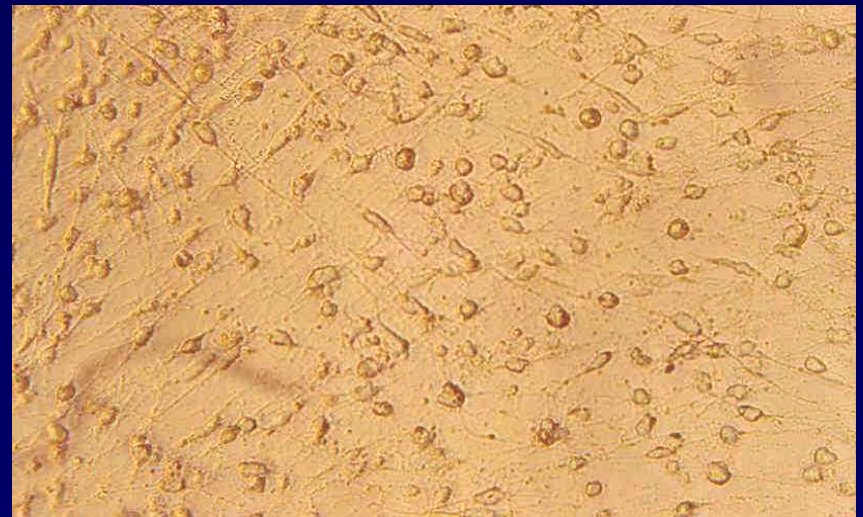
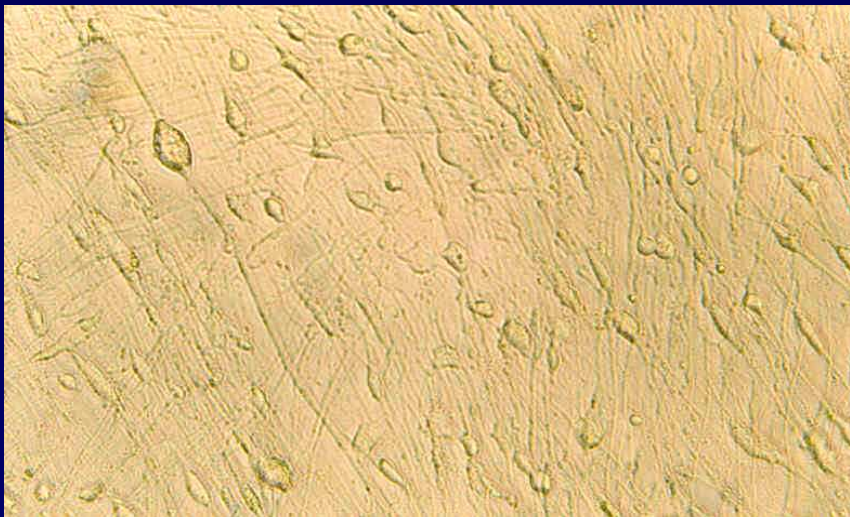
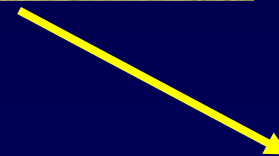
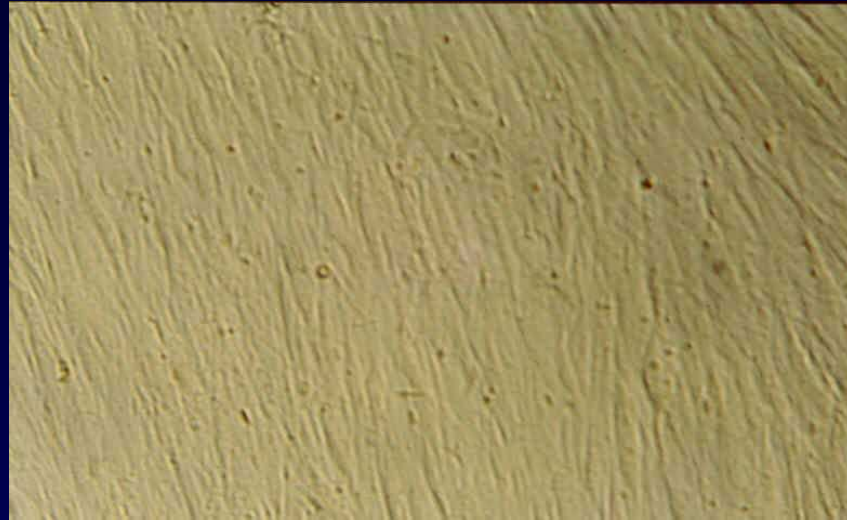
### Sensibilité : 10 pg de toxine B

Dépiste les souches ToxA- Tox B+ (<3%)

### Spécificité : neutralisation (sérum anti *C. difficile* ou anti *C. sordellii*)

- Inconvénients :**
- méthode longue
  - nécessite une infrastructure spécifique
  - Les anticorps neutralisants ne sont pas commercialisés

# Effet cytopathogène sur cellules MRC-5 (Gx200)



# ■ Détection des toxines par méthodes immuno-enzymatiques

## Production d'Ac monoclonaux anti-toxine A (PCG4) ou anti-toxine B

### ➤ Développement de trousse ELISA

Détection de toxine A ou toxines A+B

Rapide (< 3h)

Spécificité > 97%

Sensibilité : 52-95% selon les études (100- 1000 pg de toxines)

Coût ++



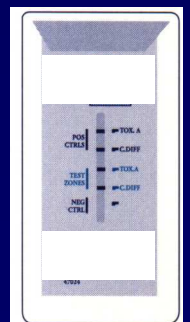
### ➤ Tests unitaires (immuno-enzymatiques ou immuno-chromatographiques)

Détection de toxine A ou A+B

Rapide : 30 min

Sensibilité, spécificité # méthodes ELISA

Coût





# TESTS IMMUNO-ENZYMATIQUES

(Lalande et coll., RFL 2004, 368, 57-63)

Nom	Fabricant (*Distributeur)	Technique	Antigène dépiaté	Sensibilité % [référence]
Culturette brand toxin CD ©	Becton Dickinson	ELISA	Toxine A	54-73 [12,31]
Premier Toxin A ©	Méridian	ELISA	Toxine A	84-93 [2, 35]
Prima A	Bartels	ELISA	Toxine A	82-95 [15, 30]
Tox A test	Techlab	ELISA	Toxine A	77-99 [2, 31]
Vidas CD ToxA II©	bioMérieux	ELIFA	Toxine A	62-70 [30, 32]
Cytoclone A+B	Méridian	ELISA	ToxA/B	71-89 [21, 30]
Premier Toxins A&B ©	Méridian	ELISA	ToxA/B	
Ridascreen CD Toxin A/B	R-biopharm	ELISA	ToxA/B	57 [31]
Tox A/B test	Techlab	ELISA	ToxA/B	66-93 [1, 19]
Culturette brand CDT ©	Becton Dickinson	Latex	GDH	23 [23]
ImmunoCard CD ©	Méridian	EIA (unitaire)	GDH	84 [28]
Clearview C DIFF A	Unipath	IC (unitaire)	Toxine A	70-91[9, 23]
ColorPac Toxin A	Becton Dickinson	IC (unitaire)	Toxine A	89 [31]
ImmunoCard STAT!Tox A ©	Méridian*	IC (unitaire)	Toxine A	
Test CD Toxine A ©	Oxoid	IC (unitaire)	Toxine A	
Toxin A Sign ©	Servibio*	IC (unitaire)	Toxine A	
ImmunoCard Tox A	Méridian	EIA (unitaire)	Toxine A	56-74 [23,30]
Triage CD panel ©	Biosite	EIA (unitaire)	Toxine A	52-79 [1, 5]
			+GDH	91-93 [1, 5]
Immunocard Tox A/B©	Méridian	EIA (unitaire)	Toxine A/B	

© Trousses commercialisées en France

# ■ Diagnostic moléculaire

- **Hybridation : sondes spécifiques (toxine B)**
  - Peu sensible
- **Amplification par PCR : ARN16S, *tcdA* ou *tcdB* de *C. difficile***

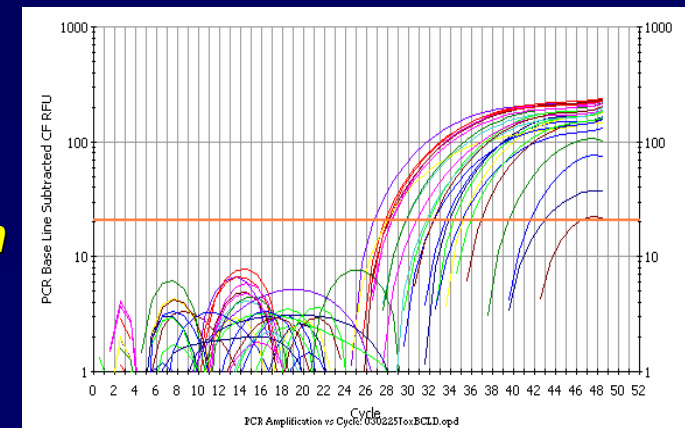
**Toxine A** (fragment 1200 bp)

**Toxine A** (séro groupe F)

**Toxine B** (fragment 700 bp)



- **PCR en temps réel multiplex (Bélanger et al., JCM 2003, 41, 730-734)**
  - Résultat en 1 heure
  - Sensibilité sur selles surchargées :  $5.10^4$  UFC/g de selles
  - Spécificité : pas de réaction croisée avec autres *Clostridium*
  - Sensibilité : 96% (28/29) ; Spécificité : 100% (27/27)





## ■ Stratégies diagnostiques

---

**Près de 10 % des CDAD ne sont dépistées  
que par la culture toxigénique**

- Test de dépistage des toxines à partir des selles
- Associer la culture sur milieux sélectifs si possible
- Si culture + toxine - :
  - ➔ rechercher le pouvoir toxinogène de la souche
- Pas de contrôle microbiologique pour évaluer l'efficacité du traitement

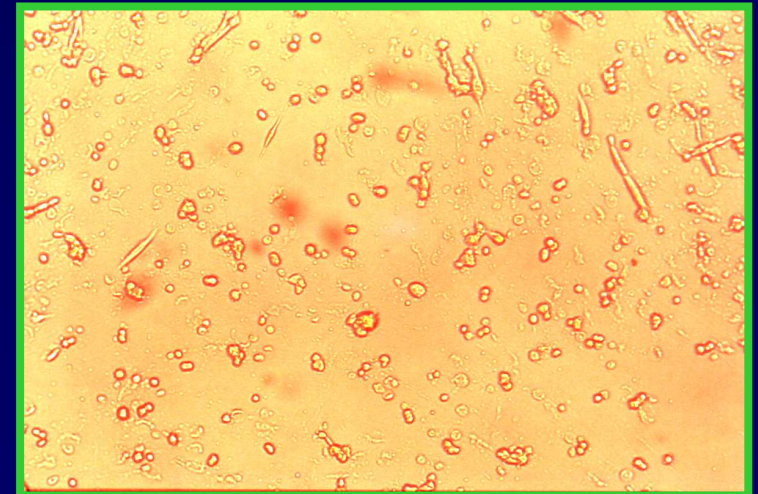
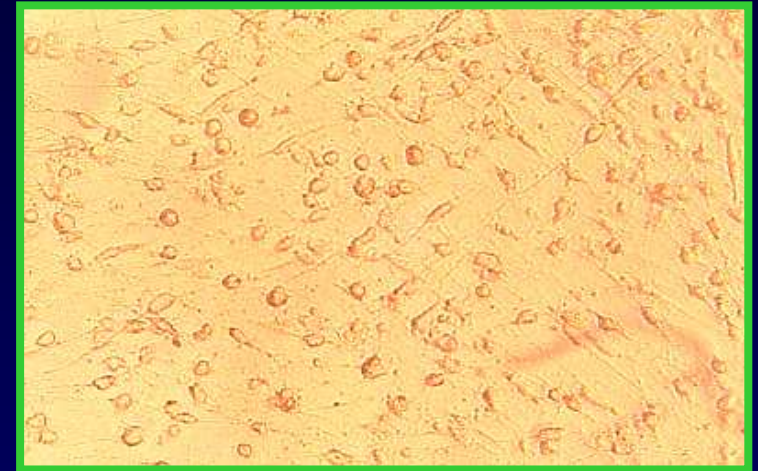
## ■ Interprétation *(Delmée et al., CMI, 2001)*

Culture	Toxine	Tests complémentaires	Interprétation
+	+		CDAD
-	-		Pas de CDAD
-	+	Refaire la culture	Probable CDAD
+	-	Pouvoir toxinogène in vitro	
		+	Probable CDAD
		-	Porteur de souche non toxinogène

# La mise en évidence de la toxine A est elle suffisante ?

## PRÉVALENCE DES VARIANTS « toxA- toxB+ »

- Barbut *et al.*, JCM 2002, 40, 2079-2083
  - 334 cas patients avec CDAD (1998 et 1999)
  - Prévalence variants toxA-toxB+ : **1.5%**
  - Toxinotype VIII : délétion de 0.7 kb
  - Souches de sérotype F
- ECP atypique +++ :
  - Absence de protusion cytoplasmique
  - Cluster de cellules



## PRÉVALENCE DES VARIANTS « toxA- toxB+ »

Auteurs (Pays, année)	N selles	% ToxA-ToxB+	Remarques
Brazier (GB, 1999)	1300	3.3	Sérogroupe F
Kato (Japon, 1998)	421	10.4	Sérogroupe F et X
Pituch (Pologne, 2001)	159	11	

# CONCLUSIONS

- *C. difficile* doit être recherché devant toute diarrhée inexpliquée survenant au cours ou au décours d'un traitement ATB
- *C. difficile* doit être recherché systématiquement devant toute diarrhée nosocomiale (« règle des 3 jours »)
- Le diagnostic doit associer une méthode de dépistage des toxines (toxine B, ou A+B) et la culture
- Beaucoup de tests utilisent le même anticorps monoclonal anti-toxine A (PCG-4)
- Les tests unitaires ont une sensibilité équivalente aux tests immuno-enzymatiques. Ils restent moins sensibles que le test de cytotoxicité