

## Actualités sur le diagnostic des infections à *Clostridium difficile*

Frédéric Barbut, Jeanne Couturier, Cécile Gateau

Laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des bactéries anaérobies

[frederic.barbut@aphp.fr](mailto:frederic.barbut@aphp.fr)

*Clostridium difficile* est une bactérie à Gram positif anaérobie sporulée (spore subterminale peu déformante) responsable de pathologies allant de la diarrhée simple à la colite pseudo-membraneuse pouvant se compliquer de mégacôlon toxique voire de perforation digestive. Il est considéré chez l'adulte comme le principal agent responsable de diarrhées associées aux soins.

La virulence des souches est principalement liée à la sécrétion de deux toxines : la toxine A (TcdA ou entérotoxine) et la toxine B (TcdB ou cytotoxine). Certaines souches (environ 20% en France) produisent une troisième toxine (toxine binaire ou Cdt) dont le rôle est encore incertain. Les souches non toxigènes (A-B-Cdt-) sont considérées comme non pathogènes (1). Depuis 2006, un clone épidémique (PCR ribotype 027 ou pulso-type NAP1) responsable de formes sévères et d'épidémies a émergé et a diffusé à travers le monde entier. En outre, des formes communautaires d'infections à *C. difficile* (ICD) chez des patients ne présentant aucun des facteurs de risque habituels (patient jeune, sans antécédent d'antibiothérapie ni d'hospitalisation) ont été décrites (2).

La recherche de *C. difficile* chez les enfants de moins de 3 ans est extrêmement difficile à interpréter du fait d'un portage asymptomatique fréquent (30-80%) et de l'absence de preuve du rôle pathogène de *C. difficile* dans cette population. Au-delà de 3 ans, la fréquence du portage asymptomatique est identique à celle retrouvée chez l'adulte (< 3%) (3).

Selon les recommandations américaines et européennes (4, 5, 6, 7), la définition des ICD repose sur un des critères suivants :

1. tableau clinique compatible (diarrhée, iléus, mégacôlon toxique) et mise en évidence des toxines de *C. difficile* dans les selles ou d'une souche toxigène, sans autre cause évidente de diarrhée
2. diagnostic de colite pseudo-membraneuse (réalisé lors d'une endoscopie, après colectomie ou à l'autopsie)

### Recommandations générales

La sélection des selles est particulièrement importante et conditionne l'interprétation du résultat. Plusieurs mesures générales doivent être appliquées :

- Seules les selles diarrhéiques (selles prenant la forme du récipient) doivent être acceptées afin de ne pas mettre en évidence les porteurs asymptomatiques. Même si ces porteurs asymptomatiques ont été incriminés dans la transmission nosocomiale de *C. difficile*, les recommandations actuelles ne préconisent pas leur dépistage systématique.
- La prescription d'une seule coproculture est suffisante ; de nombreuses études ont montré que le gain diagnostique à répéter cette recherche dans les 7 jours suivants un premier résultat négatif est rela-

tivement faible (0,9 à 3,8%) et ce, quelle que soit la méthode de diagnostic utilisée.

- Les prélèvements pour contrôler l'éradication de *C. difficile* à la fin d'un traitement spécifique sont à bannir. En effet l'efficacité d'un traitement repose sur l'amélioration des signes cliniques. Il faut savoir que 30-40% des patients ayant cliniquement bien répondu à un traitement adapté présenteront encore une culture ou des toxines positives à l'issue du traitement.
- Les selles doivent être analysées rapidement (au plus 2 heures après leur émission) ou conservées à +4°C au maximum pendant 3 jours. Des conditions de transport inappropriées sont délétères pour les toxines alors qu'elles affectent peu la viabilité des spores. Les écouvillons rectaux ne sont pas adaptés pour la recherche de toxines dans les selles.
- Le prélèvement de selles doit être réalisé avant le début d'une antibiothérapie spécifique. Il a été montré que 14 %, 35 %, et 45 % des tests de PCR deviennent négatifs après respectivement 1, 2, et 3 jours de traitement par métronidazole ou vancomycine.

## Techniques diagnostiques

Techniquement, on classe les méthodes diagnostiques en 3 groupes :

- Les méthodes qui dépistent les toxines A et/ou B directement dans les selles : tests immuno-enzymatiques de type ELISA ou immuno-chromatographiques, test de cytotoxicité des selles en culture cellulaire. Ces méthodes sont spécifiques de l'ICD mais peu sensibles même si les tests immuno-enzymatiques ou immuno-chromatographiques de dernière génération sont devenus plus sensibles (8).
- Les méthodes qui dépistent la présence d'une souche de *C. difficile* ayant le potentiel de produire les toxines. Ces méthodes incluent la culture toxigénique et les méthodes moléculaires (8,9). Elles sont très sensibles pour dépister les souches toxinogènes mais peu spécifiques de l'ICD puisqu'elles mettent aussi en évidence les porteurs asymptomatiques. Elles ne permettent pas de prédire la production de toxines dans les selles du patient.
- Les méthodes dépistant un antigène spécifique de *C. difficile* en particulier la glutamate déshydrogénase (GDH). Cette enzyme étant commune aux souches

toxinogènes et non toxigènes, ces méthodes ne sont pas spécifiques des ICD mais présentent une très bonne valeur prédictive négative.

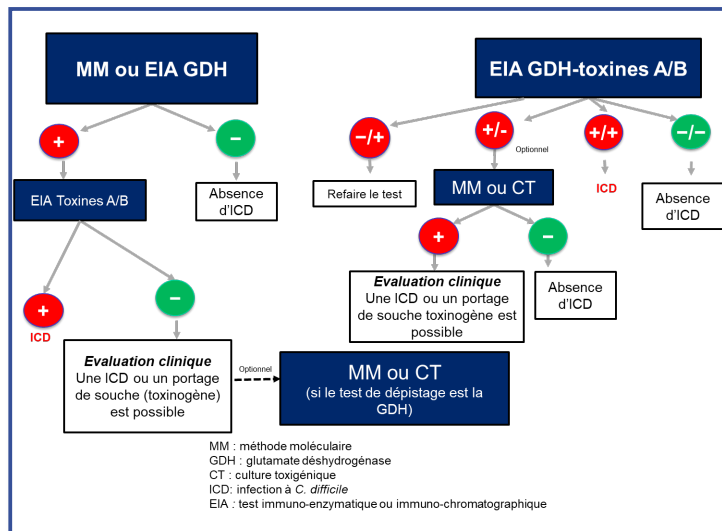
## Stratégies diagnostiques (figure 1)

Aucune des techniques citées précédemment ne peut à elle seule assurer un diagnostic optimal dans une population où la fréquence de l'ICD est faible. Les recommandations européennes (7) préconisent actuellement un algorithme diagnostique en 2 (voire 3) étapes. La sensibilité du test utilisé lors de la première étape doit être élevée, permettant d'exclure le diagnostic d'ICD si le résultat est négatif. Il peut s'agir de la recherche de GDH par EIA ou de la PCR. Un résultat positif doit ensuite être confirmé par un test immuno-enzymatique (EIA) détectant les toxines A et B, ayant l'avantage de mettre en évidence les toxines libres. Un second résultat positif permet de conclure à la présence d'une ICD. Plusieurs études ont montré que la présence de toxine libre est associée à des ICD plus sévères et à une mortalité à J30 plus élevée comparée à celle des patients ayant une souche toxigène dans les selles mais sans toxines libres (10).

En revanche, une évaluation clinique est nécessaire en cas de second test négatif (possibilité de portage asymptomatique de *C. difficile* ou de faux négatif (manque de sensibilité) en EIA). Une troisième étape peut alors être réalisée par culture toxigénique ou par PCR (si le test de dépistage est la GDH).

Une autre option est de détecter simultanément la GDH et les toxines A et B par EIA. Un résultat GDH-/toxine+ (invalide) entraîne la répétition du test. Un résultat GDH-/toxine- permet d'écarter le diagnostic d'ICD tandis qu'un résultat GDH+/toxine+ permet de conclure à l'ICD. Une PCR peut être réalisée sur les échantillons GDH+/toxine- afin de déterminer la présence d'une souche toxigène.

Figure 1 : Propositions d'algorithmes diagnostiques des ICD



## Conclusion

Le diagnostic des ICD reste encore complexe et le microbiologiste doit accompagner le clinicien dans l'interprétation des différents résultats qu'il transmet.

## Références

- Carter GP, Chakravorty A, Pham Nguyen TA, *et al.* Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *MBio* 2015 ; 6(3):e00551-15. [10.1128/mBio.00551-15](https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15)
- Hensgens MP, Dekkers OM, Demeulemeester A, *et al.* Diarrhoea in general practice: when should a *Clostridium difficile* infection be considered? Results of a nested case-control study. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(12): O1067-O1074. [10.1111/1469-0691.12758](https://doi.org/10.1111/1469-0691.12758)
- Schutze GE, Willoughby RE, Committee on Infectious Diseases, *et al.* *Clostridium difficile* infection in infants and children. *Pediatrics* 2013; 131(1):196-200. [10.1542/peds.2012-2992](https://doi.org/10.1542/peds.2012-2992)
- Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, *et al.* Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the Infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31(5):431-455. [10.1086/651706](https://doi.org/10.1086/651706)
- Kuijper EJ, Van den Berg RJ, Debast S, *et al.* *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12(5):827-830. [10.3201/eid1205.051350](https://doi.org/10.3201/eid1205.051350)
- McDonald LC, Coignard B, Dubberke E, *et al.* 2007. Recommendations for surveillance of *Clostridium difficile*-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28(2):140-145. [10.1086/511798](https://doi.org/10.1086/511798)
- Crobach MJ, Planche T, Eckert C, *et al.* 2016. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(Suppl 4):S63-S81. [10.1016/j.cmi.2016.03.010](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.010)
- Planche T, Aghaizu A, Holliman R, *et al.* Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2008 ; 8(12):777-784. [10.1016/S1473-3099\(08\)70233-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70233-0)
- Eckert C, Jones G, Barbut F. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the molecular approach. *Future Microbiol* 2013; 8(12):1587-1598. [10.2217/fmb.13.129](https://doi.org/10.2217/fmb.13.129)
- Planche TD, Davies KA, Coen PG, *et al.* Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection. *Lancet Infect Dis* 2013 ; 13(11):936-945. [10.1016/S1473-3099\(13\)70200-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70200-7)