



# Diagnostic microbiologique des infections à *Clostridium difficile*

Rev Med Suisse 2015; 11: 1840-3

**L. Bertaiola  
Monnerat  
C. Chuard**

Luce Bertaiola Monnerat<sup>1</sup>  
et Pr Christian Chuard<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de microbiologie

<sup>2</sup>Clinique de médecine interne

HFR Fribourg – Hôpital cantonal  
1708 Fribourg

luce.bertaiolamonnerat@h-fr.ch

christian.chuard@h-fr.ch

## Microbiological diagnosis of *Clostridium difficile* infection

The clinical microbiology laboratory plays an essential role in the management of *Clostridium difficile* infections, showing an increase in frequency and severity. Many tests (culture, EIA, PCR), detecting bacteria or their antigens, toxin genes or free toxins, allow the microbiologist to provide the clinician and the infection control specialist with a reliable diagnosis assistance, which meet essential criteria for rapidity, sensitivity and specificity. This review presents the diagnostic algorithms currently used.

Le laboratoire de microbiologie joue un rôle essentiel dans la prise en charge des infections à *Clostridium difficile*, dont la fréquence et la sévérité ont tendance à augmenter. Une combinaison de méthodes (culture, immuno-enzymologie, PCR) qui visent à mettre en évidence la bactérie, ses antigènes, ses gènes de production de toxines et les toxines elles-mêmes permet au microbiologiste de livrer au clinicien et au spécialiste en hygiène hospitalière une aide diagnostique fiable répondant aux critères essentiels de rapidité, de sensibilité et de spécificité. Cet article présente les algorithmes couramment utilisés.

## INTRODUCTION

*Clostridium difficile* est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, que l'on trouve dans l'intestin de l'homme et des animaux sous forme végétative et dans l'environnement (sol et eau essentiellement, mais aussi environnement hospitalier) sous forme sporulée. Cette bactérie est responsable de diarrhées postantibiothérapie, avec comme manifestation la plus sévère la colite pseudomembraneuse pouvant mener à des complications tels le mégacôlon toxique et le sepsis sévère. Cause fréquente de diarrhées nosocomiales et occasionnellement responsable d'épidémies, *C. difficile* se transmet par les mains, les objets et

l'environnement. Les spores de la bactérie sont résistantes à la dessiccation, à l'humidité et à de nombreux désinfectants, et peuvent survivre durant des mois. L'acquisition exogène de la bactérie est la cause majeure des épidémies nosocomiales. Après une à deux semaines d'hospitalisation, le risque d'acquérir *C. difficile* peut atteindre 13%, ce pourcentage augmentant avec la durée du séjour.<sup>1</sup> Une fois colonisés, tous les patients ne vont pas développer une infection à *C. difficile* (ICD). Les patients symptomatiques et asymptomatiques représentent un réservoir pour la bactérie. Il faut toutefois noter que le portage sain est rare dans la population adulte en bonne santé, alors que les enfants de moins d'un an sont fréquemment colonisés, ce qui rend la recherche du germe inutile dans cette classe d'âge. Les principaux facteurs de risque d'ICD sont l'administration d'antibiotiques ayant un impact sur la flore colique, l'âge supérieur à 65 ans, les antécédents d'hospitalisation, l'admission dans un hôpital en situation épidémique, la chirurgie digestive et certaines maladies sous-jacentes.<sup>2-4</sup> L'entérotoxine A et la cytotoxine B sont les principaux facteurs de virulence des souches toxigènes. 20% d'entre elles produisent une troisième toxine, la toxine binaire, dont le rôle est peu clair mais qui semble être un facteur de pathogénicité.<sup>5</sup> Le diagnostic d'ICD est généralement établi par l'examen des selles et repose sur la mise en évidence de la bactérie, de la toxine ou des gènes de la toxine.

L'augmentation de l'incidence des cas d'ICD dans les pays industrialisés et l'émergence d'une souche hypervirulente (ribotype 027), responsable de décès en Amérique du Nord et en Europe, ont augmenté l'intérêt pour le sujet.<sup>6,7</sup> Face à la diversité des tests présents sur le marché, des cibles choisies (bactérie, toxine, gènes) et des méthodes utilisées (culture, immuno-enzymologie, biologie moléculaire), chaque laboratoire doit mettre en place un algorithme diagnostique rapide,

simple, sensible, spécifique et d'un coût raisonnable, sachant qu'actuellement aucun test ne répond individuellement à toutes ces exigences. De nombreuses études ont montré le manque de sensibilité des tests immuno-enzymatiques détectant les toxines, approche la plus simple, et expliquent un intérêt grandissant pour la biologie moléculaire.

## DÉFINITION D'UNE INFECTION À *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* ET RECOMMANDATIONS GÉNÉRALES

La Société européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses (ESCMID) définit un épisode d'ICD par: «a) un tableau clinique compatible avec une ICD et la preuve microbiologique de la présence d'une souche de *C. difficile* productrice de toxines dans les selles sans autre cause évidente responsable de la diarrhée ou b) une colite pseudo-membraneuse». <sup>8</sup> Le diagnostic d'une ICD est le plus souvent posé par le clinicien sur la base du tableau clinique et des résultats du laboratoire de microbiologie, la colonoscopie qui permet de visualiser une colite pseudo-membraneuse étant une démarche compliquée, coûteuse et potentiellement dangereuse. Sauf en cas d'iléus, les analyses doivent être effectuées sur des selles diarrhéiques,

définies comme des selles prenant la forme du récipient. <sup>9</sup> L'inefficacité du traitement chez les porteurs sains asymptomatiques et le fait qu'ils ne sont pas plus à risque que les non-porteurs de développer une ICD impliquent qu'il est inutile de les dépister, comme le soulignent les recommandations américaines. <sup>9</sup> Pour juger de l'efficacité du traitement, la disparition des symptômes est le seul indicateur utile. Les contrôles microbiologiques post-traitement sont à bannir puisqu'on a montré que 56% des patients pouvaient avoir une culture positive une à quatre semaines après l'arrêt de l'antibiothérapie, malgré une guérison clinique. <sup>10</sup>

## MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DISPONIBLES AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET CHOIX DES DIFFÉRENTES CIBLES

Les tests microbiologiques actuellement à disposition permettent de détecter la bactérie ou ses antigènes, les toxines et les gènes codant pour les toxines (tableau 1).

### Méthodes de référence

La *culture toxigénique* représente l'une des deux techniques reconnues comme «gold standard» pour diagnostiquer une infection à *C. difficile*. Après un isolement sur un milieu sé-

**Tableau 1. Méthodes de diagnostic microbiologique des infections à *C. difficile*: cibles, points forts et points faibles**

GDH: glutamate déshydrogénase; EIA: Enzyme immunoassay; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; VPP: valeur prédictive positive; VPN: valeur prédictive négative.

| Méthodes   | Cibles  | Points forts   | Points faibles   |
|--|---|--|--|
| Culture toxigénique  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolement de la souche et détermination de la production de toxines in vitro</li> </ul>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthode de référence</li> <li>• Très sensible</li> <li>• Possibilité de faire un antibiogramme</li> <li>• Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques</li> <li>• Possibilité de réaliser un typage</li> <li>• Détection de l'émergence de nouveaux clones</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Long (2-4 jours), en 2 étapes</li> <li>• 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)</li> <li>• Pour la détection des toxines, nécessité de tester plusieurs colonies car co-infections possibles</li> </ul>  |
| Test de cytotoxicité   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxine B (et toxine A)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Méthode de référence</li> <li>• Très sensible</li> <li>• Très spécifique (détection de la production de toxine in vivo)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Long (1-2 jours)</li> <li>• Non standardisé</li> <li>• Infrastructure de laboratoire adaptée à la culture cellulaire</li> <li>• Neutralisation possible de l'effet cytopathogène</li> </ul>   |
| Test immuno-enzymatique (EIA) détectant la GDH               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzyme métabolique (glutamate déshydrogénase)</li> </ul>                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapide (30 min)</li> <li>• Simple</li> <li>• Très sensible</li> <li>• VPN <math>\geq 97\%</math> pour une prévalence <math>\leq 20\%</math> <sup>11,12</sup></li> <li>• Bonne corrélation avec la culture <sup>11</sup></li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Manque de spécificité (76% en comparaison avec la culture toxigénique) <sup>11</sup></li> <li>• Faible VPP <sup>11</sup></li> <li>• Doit être couplé à la recherche de toxine</li> <li>• Détecte les souches toxigènes et non toxigènes</li> </ul>  |
| Test immuno-enzymatique (EIA) détectant les toxines A ou A+B | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxines A ou A+B</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapide (30 min)</li> <li>• Simple</li> <li>• Très spécifique (97%) <sup>11</sup></li> <li>• Préférer les tests de 2<sup>e</sup> génération qui détectent les toxines A et B, car émergence des souches A·B<sup>+</sup> (1,5-10%) <sup>14</sup></li> </ul>                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu sensible (52-66%) <sup>11</sup></li> <li>• La VPP est insuffisante en cas de faible prévalence; doit être utilisé en combinaison avec un autre test <sup>11</sup></li> <li>• Coûteux</li> </ul>   |
| Biologie moléculaire (PCR)                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gènes <i>tcdA</i> codant pour la toxine A et/ou <i>tcdB</i> codant pour la toxine B</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapide (2 heures)</li> <li>• Très sensible <sup>11</sup></li> <li>• Détecte les gènes codant pour les toxines</li> <li>• Certains tests donnent une identification présomptive du clone 027</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spécificité bonne mais imparfaite (portage de souches toxigènes dont les gènes codant pour les toxines ne sont pas activés; 3%) <sup>15</sup></li> <li>• Coûteux</li> <li>• Nouveaux clones émergents hypervulnérables non détectés</li> <li>• Mutations possibles de <i>tcdB</i> ou <i>tcdA</i></li> <li>• Présence possible d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les selles</li> </ul> |



lectif et une identification de *C. difficile*, le pouvoir toxino-gène de la bactérie peut être évalué à l'aide d'un test de cytotoxicité (cf. ci-dessous), d'un test immuno-enzymatique détectant les toxines ou d'une PCR détectant les gènes des toxines. Il est conseillé de tester plusieurs colonies car des co-infections avec des souches toxigènes et non toxigènes sont possibles. Longue (2-4 jours), en deux étapes, et pouvant mener à des faux positifs par détection du portage de souches toxigènes dont les gènes codant pour les toxines ne sont pas activés chez le patient (en effet, la méthode met en évidence la production de toxines in vitro et non dans les selles), la culture toxigénique a toutefois l'avantage de permettre la réalisation d'un antibiogramme, de surveiller la résistance aux antibiotiques, de typer la souche et de détecter l'émergence de nouveaux clones.

La deuxième méthode de référence, également très sensible et d'une spécificité supérieure, est le *test de cytotoxicité* réalisé directement à partir des selles. Cette technique qui demande aussi du temps (1-2 jours) permet de révéler l'effet cytopathogène des toxines par les changements morphologiques qu'elles induisent sur des cellules de différentes lignées cellulaires (Vero, HeLA, Hep-2)<sup>11</sup> cultivées in vitro. Elle demande une infrastructure de laboratoire adaptée à la culture cellulaire.

### Tests immuno-enzymatiques (EIA)

Il existe actuellement deux catégories d'EIA : celle qui détecte l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH) produite par *C. difficile* et celle qui révèle la présence de la toxine A ou des toxines A et B.

La détection de la GDH est une technique rapide, simple et très sensible avec une valeur prédictive négative d'au moins 97% pour une prévalence de l'infection allant jusqu'à 20% (avec comme «gold standard» la culture).<sup>11,12</sup> Un résultat négatif permet donc d'exclure une ICD. Par contre, sa faible spécificité (elle détecte les souches toxigènes et non toxigènes) nécessite d'effectuer un deuxième test pour révéler la présence de toxines ou de gènes de toxines. L'excellente sensibilité de cette technique a toutefois été contestée dans des études qui ont montré que pour les souches épidémiques autres que 027, la sensibilité du test pouvait descendre à moins de 69%.<sup>13</sup>

Les tests EIA détectant les toxines A et B ont remplacé progressivement ceux détectant uniquement la toxine A, surtout depuis l'émergence de souches ne produisant que la toxine B (A<sup>-</sup>B<sup>+</sup>).<sup>14</sup> Rapide, simple et ayant une très bonne spécificité,<sup>11</sup> cette technique est largement utilisée dans les laboratoires. Toutefois, de nombreuses études ont montré son manque de sensibilité, allant de 52 à 66% en comparaison avec la culture toxigénique.<sup>11</sup> La valeur prédictive positive du test est insuffisante en cas de faible prévalence de l'infection et il doit donc être utilisé en combinaison avec une autre méthode.<sup>11</sup>

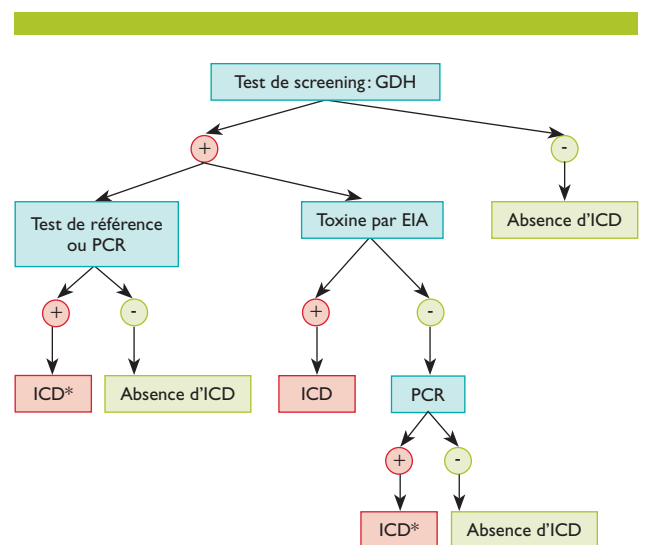
### Méthodes moléculaires

De nombreux tests moléculaires, disponibles sur le marché depuis 2010, proposent des PCR en temps réel ou des amplifications isothermiques. Ces dernières, utilisant la technologie LAMP (*loop-mediated isothermal DNA amplification*), présentent l'avantage de nécessiter un matériel moins coûteux

que pour la PCR en temps réel et de ne pas demander une grande expérience en biologie moléculaire. Les deux méthodes permettent de révéler la présence des gènes *tcdA* codant pour la toxine A, *tcdB* codant pour la toxine B, *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire et, pour certains d'entre eux, d'indiquer la délétion possible en 117 sur le gène *tadC*, marqueur présomptif de la souche épidémique 027. Ces méthodes moléculaires chères sont rapides et très sensibles.<sup>11</sup> Par contre, elles ont une spécificité imparfaite du fait qu'elles détectent les souches toxigènes indépendamment de l'activation des gènes, que ce soit in vivo ou in vitro. Finalement, ces tests présentent le risque de rendre des résultats faussement négatifs en cas de mutations des gènes *tcdA* ou *tcdB* ou en présence de nouveaux clones émergents hypervirulents.

### ALGORITHME

Pour pallier les défauts de sensibilité ou de spécificité des tests individuels, les recommandations européennes et américaines proposent d'utiliser un algorithme combinant deux ou trois méthodes successives (figure 1). On a donc un premier test de *screening*, puis une étape de diagnostic plus précis.<sup>2</sup> Grâce à sa grande sensibilité et son excellente valeur prédictive négative, le test immuno-enzymatique détectant la GDH permet, dans une première étape, d'éliminer les cas négatifs et ainsi d'exclure avec une très haute probabilité une ICD. Rapide et simple d'utilisation, cette technique réduit considérablement le nombre d'échantillons à tester par des méthodes diagnostiques plus complexes et plus chères. Les cas positifs en GDH doivent être confirmés dans une seconde étape pour laquelle on laisse au laboratoire le choix de la méthode (test de référence, PCR ou EIA). Si le laboratoire utilise un test de référence ou la biologie moléculaire, il pourra en principe conclure,



**Figure 1. Algorithme pour le diagnostic à *C. difficile***

ICD : infection à *C. difficile*; EIA : Enzyme immunoassay; GDH : glutamate déshydrogénase.

\*Peut occasionnellement révéler le portage d'une souche toxigène non productrice de toxine in vivo (gènes non activés).



en cas de résultat positif, à une ICD. Il faut toutefois noter que les examens qui passent par une culture peuvent révéler une production de toxine in vitro, alors qu'elle ne l'est pas in vivo (activation des gènes après culture). Cette situation concerne environ 3% des cas dans la population générale.<sup>15</sup> Un résultat négatif indique la présence d'une souche non toxigène et exclut une ICD.

Si le laboratoire choisit d'effectuer le test immuno-enzymatique détectant la toxine, il devra procéder à un troisième test par PCR en cas de résultat négatif en raison du manque de sensibilité de l'EIA. La PCR apportera donc l'information supplémentaire de la présence ou non des gènes codant pour la toxine. En cas de PCR positive, le diagnostic d'ICD est posé (avec la réserve mentionnée précédemment concernant l'activation des gènes), en cas de résultat négatif, il est écarté.

## CONCLUSION

Malgré le nombre important de tests microbiologiques à disposition, aucun ne satisfait à lui seul aux critères requis de rapidité, de simplicité, de sensibilité et de spécificité et pour le diagnostic de l'ICD. La solution actuellement proposée combine l'utilisation de plusieurs techniques. Il est important que chaque laboratoire de microbiologie

mette en place un diagnostic fiable en deux ou trois étapes, selon ses ressources, conformément aux recommandations européennes et américaines. Le clinicien doit être conscient de la complexité de la démarche diagnostique et savoir interpréter les résultats microbiologiques en fonction de l'algorithme utilisé par son laboratoire de référence. ■

Les auteurs n'ont déclaré aucun conflit d'intérêts en relation avec cet article.

### Implications pratiques

- > On observe une augmentation de l'incidence et de la gravité des infections à *Clostridium difficile* dans les hôpitaux et dans la communauté
- > Le rôle du laboratoire est essentiel pour poser un diagnostic rapide et fiable, nécessaire à un traitement adéquat du patient et à la mise en place de mesures spécifiques d'hygiène hospitalière
- > Aucune technique ne satisfait seule les critères de rapidité, de simplicité, de sensibilité et de spécificité requis. Des algorithmes en deux ou trois étapes doivent être utilisés

## Bibliographie

- 1 Clabots CR, Johnson S, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Acquisition of *Clostridium difficile* by hospitalized patients: Evidence for colonized new admissions as a source of infection. *J Infect Dis* 1992;166:561-7.
- 2 Eckert C, Lalande V, Barbut F. Diagnostic des infections à *Clostridium difficile*. *J Anti-Infect* 2011;13:67-73.
- 3 Chuard C, Regamey C. Diarrhée et colite à *Clostridium difficile*. *Med Hyg* 2000;58:949-53.
- 4 Copt C, Christodoulou M, Friolet R, et al. *Clostridium difficile*: vers des infections graves en médecine ambulatoire? *Rev Med Suisse* 2010;6:1910-3.
- 5 \* Eckert C, Coignard B, Hebert M, et al. Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: The ICD-RAISIN 2009 national survey. *Med Mal infect* 2013;42:67-74.
- 6 Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, et al. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill* 2007;12:E1-2.
- 7 Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005;353:2442-9.
- 8 \* Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1067-79.
- 9 \* 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;31:431-55.
- 10 Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Bobulsky GS, Donskey CJ. Persistence of skin contamination and environmental shedding of *Clostridium difficile* during and after treatment of *C. difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:21-7.
- 11 \* Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1053-66.
- 12 Barbut F, Revel R, Ephraïm R, et al. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* in stools. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:277-8.
- 13 Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: Comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J Clin Microbiol* 2010;48:3719-24.
- 14 Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, et al. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 2002;40:2079-83.
- 15 Bartlett JG. *Clostridium difficile*: History of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. *Clin Infect Dis* 1994;18:S265-72.

\* à lire

\*\* à lire absolument