



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2012

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

***Détection de Clostridium difficile toxigène par biologie
moléculaire avec le BD Max CDiff RUO***

Présentée et soutenue publiquement le 05 juillet 2012

Par *Rémi LE GUERN*

Jury

Président : Monsieur le Professeur René COURCOL

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Luc DUBREUIL
Monsieur le Docteur Bruno GRANDBASTIEN**

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Frédéric WALLET

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
GENERALITES	5
Caractères bactériologiques généraux.....	6
Facteurs de virulence	8
Epidémiologie.....	12
Typage des souches	13
Physiopathologie	16
Aspects cliniques	18
Traitement	20
Mesures d'hygiène	23
Diagnostic	25
Biologie moléculaire	31
ETAT DES LIEUX DU DIAGNOSTIC D'ICD AU CHU DE LILLE.....	35
MATERIEL ET METHODES.....	41
RESULTATS	47
DISCUSSION	55
CONCLUSION.....	60
BIBLIOGRAPHIE.....	62

INTRODUCTION

La première description de *Clostridium difficile* a été réalisée à partir de selles de nouveau-nés par Hall et O'Toole en 1935 (33) qui l'ont nommé *Bacillus difficilis* en raison des difficultés présentées pour l'isoler. Pendant les 40 années qui ont suivi, *C. difficile* a été considéré comme un commensal de l'homme et ce n'est qu'à partir de 1978 qu'il a été reconnu responsable de colites pseudo-membraneuses (CPM) associées à l'utilisation d'antibiotiques (6), bien que le premier cas de CPM ait été décrit en 1893. Désormais le pouvoir pathogène de cette bactérie est clairement établi : on lui attribue la responsabilité de plus de 95% des cas de colite pseudo-membraneuse et de 15 à 25% des diarrhées post-antibiotiques. Les infections à *C. difficile* (ICD) surviennent volontiers au décours d'une hospitalisation et représentent la première cause de diarrhées nosocomiales chez l'adulte.

C. difficile peut coloniser les patients sans occasionner de manifestations cliniques (porteurs sains) mais aussi provoquer des formes sévères de mégacôlon toxique pouvant conduire au décès. Les ICD surviennent fréquemment en milieu hospitalier, principalement dans des services à risque (gériatrie, soins de suite et de réadaptation, réanimation, maladies infectieuses, maladies du sang). La contamination se fait de manière oro-fécale par manuportage ou par l'intermédiaire de l'environnement, les spores étant extrêmement résistantes. Les patients recevant une antibiothérapie sont particulièrement à risque de développer une ICD, *C. difficile* s'implantant au niveau intestinal une fois que le microbiote normal est perturbé ou absent. Classiquement les patients âgés hospitalisés ont un risque accru de développer une ICD mais une augmentation des cas chez des patients plus jeunes sans contact préalable avec le milieu hospitalier est constatée : *C. difficile* est donc une étiologie de diarrhée persistante à évoquer chez tout type de patient (62).

Le diagnostic d'ICD se fait devant un tableau clinique évocateur (diarrhée, iléus ou mégacôlon toxique) associé à la mise en évidence de *C. difficile* producteur de toxines par le laboratoire, ou en cas de colite pseudomembraneuse à l'endoscopie. La recherche des toxines de *C. difficile* se fait principalement par technique immunoenzymatique mais la sensibilité décevante de la technique (19) a conduit au développement de techniques de biologie moléculaire ciblant les gènes des toxines.

Ce travail a pour but de tester de manière prospective le BD Max CDiff RUO, un nouvel automate en finalisation de marquage CE-IVD permettant la détection du gène *tcdB* dans les selles, par rapport à la méthode d'immunochromatographie actuellement employée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Lille (Wampole TOX A/B QUIK CHEK®). Les échantillons ont également été testés sur le BD GeneOhm, un autre automate ayant obtenu le marquage CE-IVD et détectant la présence du gène *tcdB*. Le protocole de l'étude a été optimisé après une étude rétrospective des résultats de la recherche de *C. difficile* toxigène au CHU de Lille de 2007 à 2011. La méthode de référence choisie est l'isolement en culture après choc alcoolique de colonies de *C. difficile* possédant le gène *tcdB*.

GENERALITES

Caractères bactériologiques généraux

C. difficile est un bacille à Gram positif anaérobie strict sporulé qui possède une mobilité péritriche, comme la plupart des membres de ce genre bactérien. Sa taille varie de 3 à 15 µm pour 0.5 à 2 µm de large et il possède des spores subterminales à terminales.

Un milieu sélectif appelé CCFA (Cyclosérine Cefoxitine Fructose Agar) a été conçu spécifiquement en 1979 par le « Wadsworth Anaerobic Laboratory » pour isoler *C. difficile* à partir de selles diarrhéiques (28). Sa sensibilité est de 2.10^3 organismes dans un total de 6.10^{10} bactéries par gramme de matières fécales. Il a depuis été proposé d'inclure du taurocholate de sodium dans ce milieu ce qui favoriserait la germination des spores (6 fois plus sont récupérées après addition de taurocholate) et augmenterait sa sensibilité (76).

Les selles de patients souffrant de diarrhées peuvent êtreensemencées directement sur CCFA mais la sélectivité de ce milieu n'est pas absolue, d'autres *Clostridium* (*C. innocuum*, *C. glycolicum*, *C. bifermentans*) ou *Lactobacillus* (*L. rhamnosus*) pouvant également être retrouvés et masquer la présence de *C. difficile*. Un simple prétraitement des selles par choc alcoolique permet de contourner ce problème de façon peu coûteuse : un volume de selles est mélangé à un volume d'éthanol à 100% et laissé à température ambiante 30 à 60 minutes avant l'ensemencement sur milieu CCFA, ce qui permet au final de sélectionner exclusivement les spores de *C. difficile* (14).

L'identification de *C. difficile* après 24 à 48 heures d'incubation en anaérobiose est assez facile : parmi les *Clostridium*, seul *C. innocuum* présente une

morphologie sur milieu sélectif ressemblant fortement à celle de *C. difficile*. La taille des colonies est en moyenne de 7.5 mm sur CCFA, contre 4.5 mm sur une gélose au sang. Une fluorescence chartreuse (jaune-vert) est mise en évidence à l'aide d'une lumière ultraviolet (360 nm). Sur milieu CCFA contenant du jaune d'œuf, les colonies apparaissent jaune avec un aspect de verre brisé, circulaires avec un bord un peu filamenteux, lisses à légèrement bombées de profil, lipase et lécithinase négatives. Du sang de cheval peut être substitué au jaune d'œuf, les colonies deviennent alors grises, sans modification de la sensibilité du milieu. Les colonies de *C. difficile* dégagent une odeur de crottin de cheval liée à la production de *p*-cresol.



Figure 1 : Culture de *C. difficile* sur CCFA, *Anaerobic Bacteriology Manual* (36)

Il est possible de tester les colonies suspectes vis-à-vis de leur activité L-proline aminopeptidase (PRO) grâce au PRO-KIT (Remel) avec apparition d'une coloration rose foncé à rouge en moins de 3 minutes, permettant de différencier *C. difficile* (PRO positif) de *C. innocuum* (PRO négatif). On peut également détecter la présence de glutamate deshydrogenase (GDH) par agglutination au latex ou technique immunoenzymatique : *C. difficile* est GDH positif et *C. innocuum* GDH négatif.

Actuellement l'arrivée de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS (« Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry ») a révolutionné l'identification bactérienne en permettant une identification rapide et peu coûteuse, ce qui diminue l'intérêt des tests biochimiques (27).

Facteurs de virulence

Le principal mécanisme de virulence de *C. difficile* est la production des toxines TcdA (308 kDa) et TcdB (270 kDa) qui sont des glucosyltransférases. Les gènes encodant ces toxines, respectivement *tcdA* et *tcdB*, se trouvent sur un locus de pathogénicité de 19.6 kb (PaLoc). Ces deux gènes présentent un haut degré d'homologie (66%), ils sont très proches l'un de l'autre sur le chromosome (Figure 2) et les protéines qu'ils codent ont une fonction similaire : il est probable qu'ils résultent d'un ancêtre commun ayant subi une duplication génique (70).

TcdA et TcdB sont exprimées principalement en fin de période de croissance et en phase stationnaire en réponse à de multiples stimuli environnementaux. Ces deux toxines exercent leur fonction pathogène en glycosylant des petites GTPases des familles Rho et Ras de façon irréversible. Elles exercent une action cytotoxique en détruisant le cytosquelette d'actine ainsi qu'une activité pro-inflammatoire par libération de médiateurs, ce qui explique les symptômes cliniques d'ICD (inflammation de la muqueuse colique et diarrhée).

Des mutants isogéniques pour *tcdA* et *tcdB* ont été construits à partir d'une souche virulente de *C. difficile* (provoquant le décès chez les hamsters dans 100% des cas) et dans ce modèle animal il a été montré que la toxine B était le facteur de virulence clef : 94% des hamsters ayant reçu la souche TcdA-TcdB+ sont décédés contre 21% pour les hamsters ayant reçu la souche TcdA+TcdB- (43). Ces résultats

ont amené à reconsidérer ce qui était établi : jusqu'alors la toxine B n'était pas considérée comme responsable de signes cliniques chez les animaux sauf si elle était co-administrée avec la toxine A, suggérant une action synergique (42).

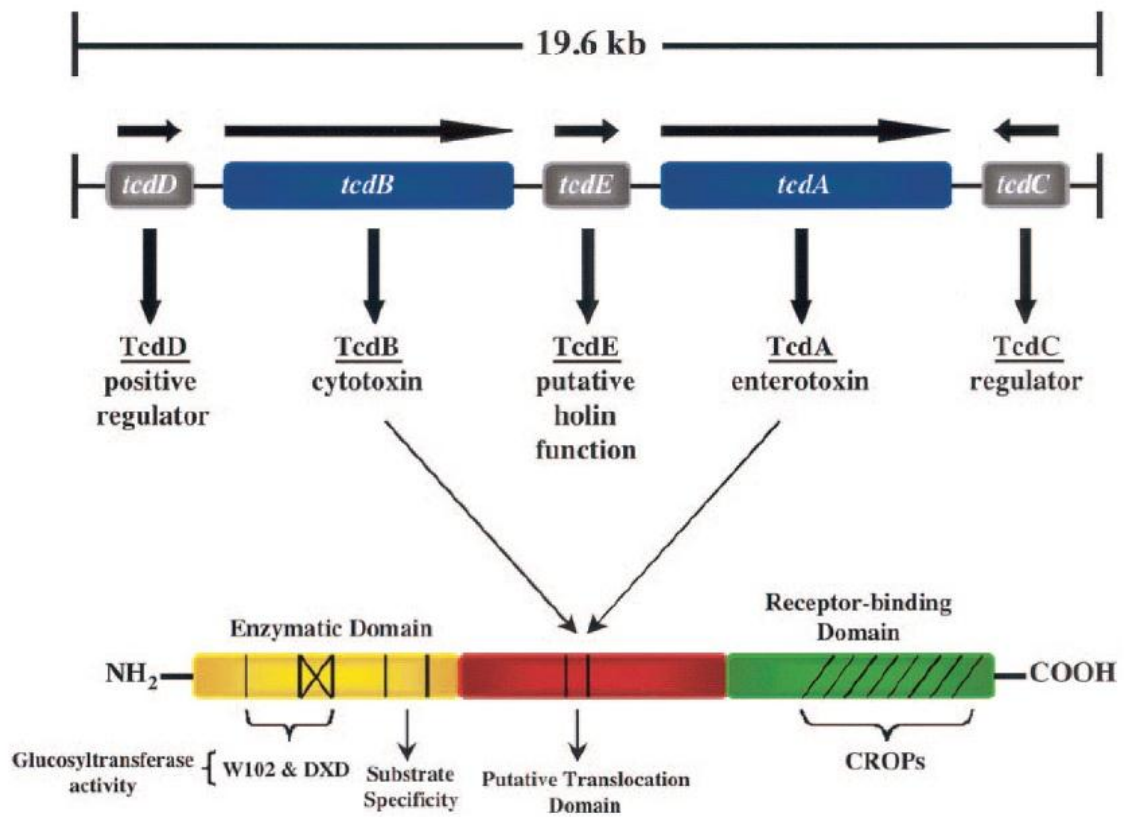


Figure 2 : Locus de pathogénicité de *C. difficile* (71)

En plus de *tcdA* et *tcdB* qui sont transcrits dans le même sens, le locus de pathogénicité comprend également 3 autres gènes impliqués dans la régulation de la production des toxines ou de leur libération hors de la bactérie : *tcdC* fonctionne comme un régulateur négatif de la synthèse de toxines, contrairement à *tcdR* (anciennement appelé *tcdD*) qui serait un régulateur positif de cette production. Le rôle de *tcdE* n'est pas encore clairement déterminé (71).

Le gène *tcdC* est transcrit dans le sens inverse des gènes codant pour les toxines, et il est hautement exprimé au début de la phase exponentielle de

croissance mais diminue en phase stationnaire. Ce déclin dans l'expression de TcdC correspond à une augmentation de la synthèse de TcdA et TcdB, d'où son rôle probable en tant que régulateur négatif de la production de toxines (35).

tcdR (anciennement appelé *tcdD*) est situé en amont de *tcdB* et il est transcrit dans le même sens que les deux gènes codant pour les toxines. TcdR est homologue à TetR et BotR qui servent de régulateur positif à la synthèse respective des toxines tétaniques et botuliniques. L'expression de TcdR est modulée en fonction du milieu extérieur : elle est réprimée par le glucose et significativement augmentée en phase stationnaire (35). En conclusion cette protéine semble être un régulateur positif majeur de l'expression de *tcdA* et *tcdB*.

TcdE est une protéine de 19kDa produite par *C. difficile* dont la séquence a été analysée en 1990 et qui présente des similitudes de structure avec des protéines holines. Les holines sont de petites protéines produites par les bactériophages qui permettent de déstabiliser la membrane interne des bactéries cibles, provoquant la lyse bactérienne grâce au passage d'une endolysine hydrolysant le peptidoglycane. Le rôle de TcdE n'a pas été clairement déterminé mais il a été supposé que TcdE provoquait la formation de pores dans la membrane de *C. difficile* permettant le relargage des toxines TcdA et TcdB dans le milieu extérieur. Récemment, un mutant déficient pour TcdE a été construit et aucune différence au niveau de la présence de toxines dans le milieu extérieur de *C. difficile* n'a pu être mise en évidence par rapport à la souche sauvage (55). Le transfert du gène *tcdE* à un *Escherichia coli* aboutissait à la production d'une protéine de 16k Da différente de celle produite par *C. difficile* car un autre site de liaison au ribosome est utilisé. Chez *E. coli* cette protéine provoquait systématiquement la lyse de la souche qui la produisait. Le rôle

hypothétique de *tcdE* serait finalement d'exercer une pression de sélection protégeant les souches de *C. difficile* de la perte du locus de pathogénicité.

La toxine binaire, CDT, est encodée par un autre locus de pathogénicité (CdtLoc). Elle est composée de deux protéines, CdtA et CdtB. CdtB permet la liaison aux cellules de l'hôte et la translocation de CdtA à l'intérieur du cytosol où elle peut exercer son action d'ADP-ribosylation des molécules d'actine. Le rôle de cette toxine n'est pas entièrement établi mais elle est cytotoxique *in vitro* pour les cellules Vero. Il a été montré en 2011 lors d'une analyse rétrospective de 265 patients atteints d'ICD que la production de toxine binaire en plus des toxines A et B par la souche de *C. difficile* multipliait le risque de décès dans les 30 jours par 1.8 (IC95 1.2-2.7) par rapport aux souches ne produisant uniquement que TcdA et TcdB, par contre aucune différence de mortalité n'avait été mise en évidence entre les souches 027 et non-027 (3).

Le rôle des protéines de surface (« surface layer protein », SLP) est primordial dans l'adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale de l'hôte. Cette couche externe de protéines est constituée principalement de deux molécules : une de bas poids moléculaire LMW-SLP (« low molecular weight-SLP ») et une autre de haut poids moléculaire HMW-SLP (« high molecular weight-SLP »). Ces deux protéines dérivent d'un seul gène (*slpA*), fortement transcrit pendant toute la phase de croissance, et dont le produit SlpA va être clivé en LMW-SLP et HMW-SLP par l'intermédiaire de la protéase Cwp84 (37).

Il existe 27 toxinotypes différents de *C. difficile* en fonction des variations au niveau de la séquence du locus de pathogénicité (PaLoc). Ces variations peuvent être mineures ou au contraire résulter de larges délétions vis-à-vis de *tcdA* qui

conduisent à la production d'une forme tronquée de cette toxine (toxinoypes X et XVII). Environ 11% des isolats cliniques produisent uniquement la toxine B. Il existe un seul isolat de *C. difficile* (P-829) pour lequel *tcdA* a été retrouvé en l'absence de *tcdB*, mais ni la toxine A ni la toxine B n'étaient détectées par test ELISA (17). Il est possible que cette souche produise une toxine A altérée non détectable par des méthodes conventionnelles.

Epidémiologie

L'âge influence fortement la fréquence du portage asymptomatique et des ICD : à la naissance on ne retrouve pas de *C. difficile* dans les selles des nouveau-nés mais très rapidement 25 à 45% des nouveau-nés de 4 à 20 jours sont colonisés par cette bactérie (25). Cette prévalence va rester stable pendant les deux premières années de la vie puis décroître graduellement jusqu'à se rapprocher de celle de l'adulte qui est de 3% (7). Actuellement on considère que pour des enfants de moins de 2 ans il n'est pas pathogène d'isoler *C. difficile* dans les selles, même si la souche est productrice de toxines. Il y a des exceptions à cette règle générale comme le montrent certaines études de cas publiées dans la littérature (59). La forte prévalence de la colonisation des enfants de moins de 2 ans avec des souches de même génotype que celles retrouvées par les adultes implique qu'ils peuvent jouer un rôle de réservoir dans la propagation des ICD (66).

En Amérique du Nord (Canada et Etats-Unis) l'augmentation des cas d'ICD a été attribuée à un clone particulier, *C. difficile* BI/NAP1/027, fréquemment responsable d'épidémies hospitalières et présentant une virulence accrue. Cette souche possède la particularité d'être résistante à la clindamycine ainsi qu'à la lévofloxacine. Elle produit la toxine binaire CDT et présente une délétion de 18 paires de bases au niveau de *tcdC* ce qui augmente sa virulence (44).

Selon l'épidémiologie locale du pays, d'autres souches ont été responsables d'épidémies et de cas sévères (principalement les PCR-ribotypes 001, 053 et 106). Récemment on a assisté à l'émergence en Europe du PCR-ribotype 078 qui atteint une population plus jeune et est plus fréquemment retrouvé chez des patients communautaires (9). Ce PCR-ribotype 078 est également retrouvé chez les animaux de ferme (porcs et bovins) et les souches humaines et animales sont très proches au niveau génétique (30). La consommation de viande et le contact avec les animaux ont été évoqués comme modes possibles de contamination chez les patients communautaires mais ce ne sont à l'heure actuelle que des hypothèses.

Typage des souches

Différentes dénominations de la souche hypervirulente 027 existent selon la technique employée pour le typage :

- L'analyse par endonucléase de restriction : souche BI. L'utilisation d'endonucléases permet d'obtenir un grand nombre de petits fragments d'ADN, plus important que pour le champ pulsé. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette méthode a l'avantage de présenter un grand pouvoir de discrimination mais peut être d'interprétation difficile et peu reproductible.
- L'électrophorèse en champ pulsé : souche NAP1 (« North American Pulse-field type I »). Une enzyme produit de grands fragments d'ADN en exerçant son action restrictive de façon peu fréquente sur le génome bactérien. Ils sont ensuite individualisés sur un gel de polyacrylamide soumis à un champ électrique dont l'orientation est alternée au cours du temps. Chaque

changement réoriente la molécule d'ADN ce qui permet aux différents fragments de migrer à des distances fonction de leur taille.

- Le PCR ribotypage : souche 027. Cette technique exploite les différences entre les espaces intergéniques 16S et 23S de l'ADN ribosomal. Des amorces spécifiques sont utilisées pour l'amplification par PCR de l'ADN qui encode ces régions d'ARN. Cette méthode génère un faible nombre de bandes d'ADN mises en évidence par électrophorèse qui sont spécifiques d'un PCR-ribotype donné.
- Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) : Complexe 8 (en utilisant le locus Birmingham 8). Cette méthode compte le nombre d'allèles répétés pour une série de loci très conservés après amplification par PCR. L'avantage du MLVA est son grand pouvoir de discrimination. La comparaison de résultats entre laboratoires est possible avec un résultat numérique (code) associé à chaque souche.
- Toxinotypage : Toxinotype III. Les souches de *C. difficile* sont classées par toxinotype en fonction de la taille des fragments B1 et A3 du PaLoc après restriction par des enzymes. Il y a 27 types de toxinotypes différents (de I à XXVII), certains d'entre eux sont plus souvent retrouvés au décours d'épidémies comme les toxinotypes III (PCR-ribotype 027), VIII (PCR-ribotype 017) et V (PCR-ribotype 078).
- La technologie HRM (« High Resolution Melting ») utilisant l'analyse haute résolution des courbes de fusion de produits d'amplification d'ADN semble très prometteuse pour déterminer de manière fiable, rapide et peu coûteuse si deux souches provenant de patients différents sont identiques. En effet, il

suffit d'une seule PCR pour pouvoir classer en différents groupes des souches d'une même espèce bactérienne en permettant la détection de mutations connues ou inconnues. Cette technologie a été appliquée avec succès entre autres pour *Listeria monocytogenes* en ciblant le gène *inlB*, permettant le classement en 15 groupes de 384 souches en moins de 2 heures (contre 3 jours pour l'électrophorèse en champ pulsé) (57).

Récemment une étude australienne a utilisé la technologie HRM sur *C. difficile* en ciblant la séquence comprise entre l'ADN ribosomal 16S et 23S ce qui a permis l'identification de 12 groupes dont un correspondait aux souches de PCR-ribotype 027. Toutefois, une des limites de cette étude pour son éventuelle application à Lille est liée à l'épidémiologie locale australienne : sur leurs 88 isolats, seul 1 isolat clinique et 4 souches de référence appartenaient au PCR-ribotype 027 (32). Le choix d'amplifier l'espace intergénique 16S-23S est logique car cette séquence est également utilisée pour le PCR-ribotypage des souches. Il serait intéressant de vérifier ces résultats lors de situations d'épidémies de *C. difficile* pour à terme rendre rapidement au clinicien des informations sur le typage des différentes souches isolées seulement 2 jours après que le prélèvement ait été envoyé (48 heures de culture et 2-3h de typage en utilisant l'HRM).

- Finalement il est désormais possible d'utiliser une technologie de séquençage rapide du génome entier des isolats cliniques de *C. difficile* (réalisable en moins de 48h sur un Illumina HiSeq 2500). Contrairement à ce que son nom indique cette technique ne séquence qu'environ 81% du génome et permet ensuite de regrouper les différents isolats sur un arbre phylogénétique en considérant qu'une souche subit 1 à 2 mutations par an. A l'intérieur d'un

groupe de MLST particulier, le séquençage du génome permettrait de délimiter des groupes spécifiques d'une ville donnée (22). C'est un outil intéressant pour la surveillance nationale ou l'investigation d'une épidémie.

Physiopathologie

La survenue d'une ICD nécessite la conjonction successive de plusieurs facteurs : une altération du microbiote intestinal, la contamination par une souche de *C. difficile* toxigène et le développement d'une réponse immunitaire insuffisante.

Le microbiote intestinal normal de l'adulte joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'implantation de *C. difficile*, il peut être déséquilibré au décours d'une antibiothérapie. Tous les antibiotiques ont été associés à un risque accru de développer une ICD mais pour certains ce risque est majeur, notamment pour la clindamycine, les céphalosporines et plus récemment les fluoroquinolones. En effet, toutes les souches sont résistantes aux céphalosporines mais la résistance aux fluoroquinolones est surtout associée au PCR-ribotype émergent 027. A l'arrêt du traitement la concentration intestinale en antibiotiques diminue rapidement, mais le microbiote local reste perturbé pendant une période de latence variable qui est fonction de l'antibiotique utilisé et du patient. Plus rarement, cette perturbation peut être due à une chimiothérapie anti-cancéreuse. La flore intestinale des enfants de moins de 2 ans est encore immature et ne joue pas le rôle protecteur du microbiote intestinal normal de l'adulte.

Chez les patients atteints d'ICD, on observe une réduction du nombre de *Bacteroides* spp et une augmentation majeure des *Parabacteroides* spp (pouvant représenter jusque 97% de la flore fécale). La diversité microbienne était également

significativement réduite au niveau du genre par rapport aux patients sans *C. difficile* retrouvé ou simplement porteurs asymptomatiques (61).

La contamination par une souche de *C. difficile* toxigène se fait le plus souvent par voie exogène, surtout en cas d'hospitalisation. Elle peut être d'origine environnementale avec la présence de spores au niveau des surfaces entourant le patient ou sur les mains du personnel. Si un patient souffrant d'ICD n'a pas été correctement diagnostiqué, les mesures de nettoyage spécifiques nécessaires à l'élimination des spores (eau de javel) ne seront pas mises en place et les patients occupant ultérieurement la même chambre seront exposés à un risque potentiellement accru d'ICD. Les spores étant résistantes aux solutions hydro-alcooliques, un protocole d'hygiène des mains spécifique doit être instauré : le retard au diagnostic d'ICD expose les autres patients du service à une contamination par les soignants (manuportage). Ajouté à cela, les patients hospitalisés reçoivent fréquemment des antibiotiques ce qui fait de l'hôpital l'environnement idéal pour la propagation d'épidémies d'ICD difficiles à juguler.

Le dernier facteur est l'incapacité à développer une réponse immunitaire de qualité vis-à-vis de la souche de *C. difficile* (absence de production d'IgG anti-TcdA) (39) ce qui se produit volontiers chez des patients de plus de 65 ans et explique la forte prévalence des ICD pour cette tranche d'âge. Il a également été observé un taux plus élevé de récurrence lorsque le taux d'IgM anti-TcdA à 3 jours est inférieur à 2.22 unités ELISA (risque multiplié par 9) (38).

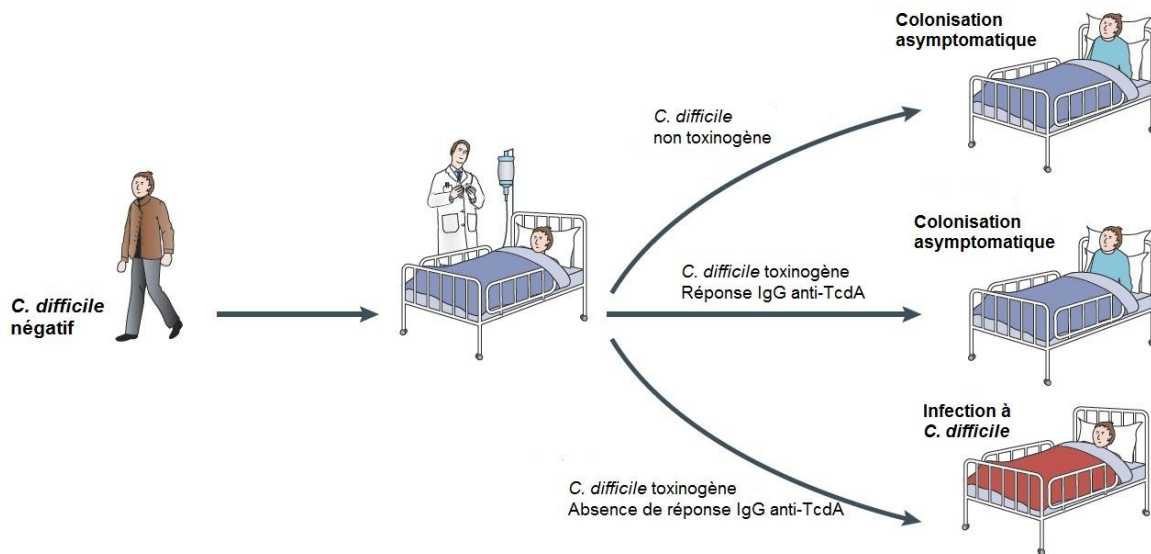


Figure 3 : Modèle d'acquisition d'infection liée à *C. difficile* (62). Les patients hospitalisés sont exposés aux spores de *C. difficile* environnementales ou manuportées. Suite à une antibiothérapie, ils pourront développer une ICD s'ils acquièrent une souche toxigène et que leur réponse immunitaire IgG vis-à-vis de la toxine A (TcdA) est insuffisante.

Aspects cliniques

La présence de *C. difficile* toxigène au niveau intestinal n'est pas suffisante pour provoquer une symptomatologie clinique : 3 à 5% des adultes sains et 30% des nouveau-nés sont colonisés par cette bactérie (67). Pour les formes mineures d'ICD, la diarrhée reste modérée et il n'y a pas de signes systémiques, on peut retrouver une vague douleur abdominale.

La colite pseudo-membraneuse (CPM) associe une diarrhée liquide abondante et des signes généraux : fièvre, douleur abdominale, nausées, déshydratation. L'hématochézie est rare, le plus souvent la diarrhée reste non

sanglante. On retrouve souvent des signes biologiques tels que l'hyperleucocytose et l'hypoalbuminémie chez les patients atteints. Si une sigmoïdoscopie est réalisée, elle peut mettre en évidence des plaques aphtoïdes jaunâtres (pseudo-membranes) au niveau du colon distal (ou plus rarement elles peuvent se situer au niveau du colon proximal et passer inaperçues). La létalité estimée d'une ICD est estimée entre 0.6% et 1.5% chez des patients hospitalisés (51, 56).

Les patients présentant une CPM sont à risque de développer un mégacôlon toxique (dilatation du colon) ou un iléus paralytique, qui peuvent de manière paradoxale diminuer les signes de diarrhée. Sur 11 patients souffrant de mégacôlon toxique, 64% nécessitaient un traitement chirurgical en urgence (colectomie) (68). La létalité chez les patients pour qui la chirurgie est nécessaire au décours d'une ICD est beaucoup plus élevée, variant de 32 à 50% (45).

Les récurrences (nouvelle ICD provoquée par la même souche de *C. difficile*) ou les réinfections (par une souche différente) sont fréquentes (12 à 24% (67)). Une définition proposée pour différencier ces deux entités tient compte de la durée entre le diagnostic d'ICD et la réapparition des symptômes : moins de 2 mois pour la récurrence et plus de 2 mois pour la réinfection. Néanmoins il a été montré que 48.4% des récurrences survenant dans les 2 mois sont dues à une souche différente (4). Au niveau de la prise en charge thérapeutique du patient cette différence importe peu, mais on peut supposer que de nombreux cas de récurrence dus à une autre souche auraient pu être évités à l'aide de mesures d'hygiène strictes.

Le Haut Conseil de Santé Publique recommande d'évoquer le diagnostic d'ICD devant la présence de toute diarrhée post-antibiotique, mais aussi en cas d'iléus accompagné de fièvre, de douleurs abdominales ou d'hyperleucocytose. Il est

également recommandé de mettre en place une recherche systématique des toxines de *C. difficile* dans les selles de tout patient présentant une diarrhée nosocomiale (48 heures après le début de son hospitalisation) (34).

Selon l'ESCMID (« European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases »), un épisode d'ICD est défini par un tableau clinique compatible (diarrhée, iléus ou mégacolon toxique) et la mise en évidence par le laboratoire d'une souche toxigène de *C. difficile* dans les selles ou par le diagnostic d'une colite pseudomembraneuse (après endoscopie, colectomie ou autopsie) (8).

Traitement

Si possible, il faut arrêter d'administrer l'antibiotique responsable de la diarrhée : cette simple mesure peut suffire pour guérir jusqu'à 25% des patients souffrant d'ICD.

Il est également important de débiter précocement une antibiothérapie active sur *C. difficile*, 97% des patients répondant de manière favorable (5) :

- métronidazole *per os* (500 mg x3 / jour) : en première intention
- vancomycine *per os* (250mg à 500mg x4 /jour) : en cas de forme sévère, de contre-indication au métronidazole, de récurrence ou de non-réponse après 3-5 jours de traitement.

En effet, le métronidazole est moins cher et aussi efficace que la vancomycine sur les ICD modérées. Cette stratégie permet également d'éviter l'utilisation systématique de la vancomycine et les problèmes de résistances associés à la forte pression de sélection, notamment avec le risque d'émergence d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine.

L'administration de fidaxomicine (auparavant appelée OPT-80) *per os* constitue une nouvelle alternative thérapeutique. C'est un antibiotique macrocyclique qui est 8 fois plus efficace *in vitro* que la vancomycine et dont l'absorption systémique est très faible. Son activité serait également plus spécifique vis-à-vis de *C. difficile* en perturbant peu le microbiote intestinal (40). Une étude de non-infériorité comparant la fidaxomicine avec la vancomycine a conclu que la fidaxomicine avait une efficacité similaire (18). Cette molécule s'avère particulièrement intéressante car le taux de récurrence à la fin du traitement n'était que de 12.7% pour le groupe ayant reçu la fidaxomicine contre 26.9% pour la vancomycine ($p=0.0002$). Il n'y avait pas de différence entre les deux groupes concernant la guérison clinique excepté dans le sous-groupe de patients recevant une antibiothérapie concomitante au traitement de l'ICD : la guérison clinique était alors obtenue dans 90.2% des cas pour la fidaxomicine contre 73.3% pour la vancomycine.

L'ICD peut s'aggraver rapidement, même lorsqu'une antibiothérapie adaptée a été débutée. Il est nécessaire d'examiner le patient régulièrement : la fièvre doit diminuer en 24 à 48h et la diarrhée devrait être résolue en 2 à 5 jours (29). Si ce n'est pas le cas et que l'état du patient d'ICD empire ou qu'il présente des signes de mégacôlon toxique, de péritonite ou de sepsis il faut envisager un traitement chirurgical (colectomie).

Parfois il est impossible d'utiliser la voie orale chez des patients en réanimation ou en post-opératoire. Dans cette situation il est possible d'utiliser la vancomycine de manière intracolique par lavements (1). Même si ce n'est pas la voie à privilégier, des injections intraveineuses de métronidazole sont utilisables : il a été montré qu'on le retrouvait en grande quantité dans les selles peu après l'injection (11).

Des stratégies thérapeutiques alternatives sont développées avec un succès variable, parmi lesquelles on peut citer les probiotiques, les résines échangeuses d'ions, les bactériophages, l'immunothérapie ou la bactériothérapie fécale.

L'utilisation des probiotiques en complément du traitement antibiotique est intéressante dans la mesure où certaines souches produisent des protéases dégradant les toxines de *C. difficile* ou améliorent la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de ces toxines (46). Les microorganismes suivants peuvent être utilisés : *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii*, *Clostridium butyricum* ou des souches non toxigènes de *C. difficile*. En 2006 une méta-analyse de 6 études randomisées concluait que les probiotiques diminuaient le risque relatif de développer une ICD (RR= 0.59, p=0.005) (47).

Les résines échangeuses d'ions présentent la propriété de se lier aux toxines de *C. difficile* et donc pourraient diminuer les symptômes présentés par les patients atteints d'ICD. La cholestyramine, le Synsorb 90 ou le tolevamer ont été évalués, malheureusement aucune de ces molécules n'a démontré d'effets satisfaisants lors d'études de phase III (73).

Un traitement par un cocktail de bactériophages (des virus s'attaquant aux bactéries avec une spécificité d'hôte étroite) pourrait être utilisé chez des patients atteints d'ICD sans perturber leur microbiote intestinal ou à visée préventive en cas d'épidémie avec une souche connue. Les études sur le sujet sont rares, chez des hamsters ayant subi un challenge par une souche toxigénique de *C. difficile* l'administration concomitante de bactériophages permettait la survie de plus de 80% des sujets contre 0% pour le groupe contrôle (60).

Les immunoglobulines intraveineuses (IVIg) sont obtenues à partir de plasma provenant de donneurs de sang et peuvent être utilisées dans les cas graves de colite fulminante. Chez la souris, elles amélioraient la survie lorsqu'elles étaient injectées 6h après l'administration de toxine de *C. difficile* ($p=0.02$) (63). Chez l'homme de nombreuses études de cas considèrent cette thérapeutique comme efficace.

La bactériothérapie fécale est utilisée depuis 1958, c'est-à-dire avant même que l'implication de *C. difficile* dans la survenue de colites pseudomembraneuses ne soit reconnue (24). La procédure consiste à implanter au moins 50 grammes de selles d'un donneur sain chez un patient atteint d'ICD récidivante pour corriger le déséquilibre de son microbiote intestinal. Les modalités pratiques diffèrent selon les centres : l'administration est possible par coloscopie, lavement ou fibroscopie duodénale. Le donneur doit être testé au préalable : sérologie virale, recherche de parasites et de bactéries entéropathogènes dans les selles. Ce traitement est très efficace, rapide et peu coûteux, par contre il reste encore difficile à accepter pour les patients et les cliniciens. Avec un taux de succès thérapeutique de 92% sur plus de 317 cas décrits dans la littérature (31), il devient de plus en plus difficile d'ignorer cette alternative thérapeutique.

Mesures d'hygiène

Dès que le diagnostic d'ICD est réalisé, il faut que le médecin en charge du patient prescrive des précautions complémentaires de type « contact » en plus des précautions « standard » (34). Il est recommandé de porter une surblouse à manche longue, lors de contacts directs avec le patient, ses excréta ou son environnement. Elle doit être mise en place avant d'entrer dans la chambre, retirée avant de la quitter et elle sera complétée d'un tablier plastique imperméable en cas de soins mouillants.

Concernant l'hygiène des mains, la simple utilisation de produits hydro-alcoolique n'est pas suffisante car ils ne sont pas actifs sur les spores de *Clostridium*. Il est recommandé de se désinfecter les mains par friction hydro-alcoolique avant d'entrer dans la chambre puis de porter des gants à usage unique. Avant de quitter la chambre, il faut jeter les gants, réaliser un premier lavage au savon doux (qui permet l'élimination mécanique des spores) suivi d'une friction hydro-alcoolique (pour éliminer les autres bactéries ainsi que les formes végétatives de *Clostridium*).

Il est également recommandé de désinfecter l'environnement du patient colonisé ou infecté au moins une fois par jour par un bionettoyage complet des sols et des surfaces : détertion, rinçage, séchage puis désinfection avec de l'eau de javel diluée au 1/5^e en respectant un temps de contact d'au moins 10 minutes

Les mesures d'hygiène sont considérées comme primordiales pour éviter une épidémie qui peut se révéler dramatique pour les patients hospitalisés et représenter des coûts importants pour l'hôpital.

Il a été démontré récemment qu'en typant tous les isolats retrouvés par MLST en période endémique on ne retrouvait un lien entre un nouveau cas d'ICD et un autre patient hospitalisé que dans 25% des cas (72). Néanmoins dans cette étude des mesures d'hygiène strictes étaient appliquées, donc il est difficile de savoir si habituellement un patient développe une ICD avec sa propre souche suite à un déséquilibre de la flore intestinale ou si cette faible transmission croisée prouve l'efficacité des mesures d'hygiène implémentées.

Diagnostic

Chez les patients symptomatiques, le rôle du laboratoire est de déterminer s'il y a présence de *C. difficile* producteur de toxine A ou B dans les selles. Seules les selles de consistance anormale (prenant la forme du pot, échelle de Bristol de 5 à 7) doivent être testées par le laboratoire car le taux de colonisation chez des patients sains est élevé : une recherche de toxines positive sur un prélèvement de consistance normale prouve que le patient est colonisé avec *C. difficile* mais pas forcément infecté. La principale exception à cette règle est la suspicion d'ICD chez un patient présentant un ileus : cette situation étant rare (moins de 1% des cas) le clinicien en charge du patient est tenu d'informer le laboratoire de ce contexte clinique spécifique pour que le prélèvement ne soit pas rejeté. Les recommandations actuelles ne précisent pas quelle technique utiliser alors que la sensibilité des différents tests peut varier de 30 à 100%.

Deux *gold standard* coexistent pour la mise en évidence des souches toxigènes. Le plus ancien est le test de cytotoxicité des selles, reposant sur l'observation d'un effet cytopathogène (ballonisation des cellules) sur une culture cellulaire en présence d'un filtrat de l'échantillon de selles à tester. Plusieurs lignées cellulaires peuvent être utilisées : Vero, MRC5, CHO, HeP2. Cette méthode présente cependant de nombreux inconvénients : elle est assez longue (1 à 2 jours), elle nécessite une infrastructure adaptée à la culture cellulaire, et elle se révèle moins sensible que ce qui était admis lors de sa mise au point.

Le deuxième *gold standard* est la culture toxigénique (CT). D'abord une culture sur milieux sélectifs est réalisée pour isoler les colonies de *C. difficile* puis on détermine le pouvoir toxigène de la souche isolée, idéalement en observant un effet cytopathogène sur une culture cellulaire. Il est possible également de

rechercher les gènes codant pour les toxines A et B en PCR à partir des colonies mais dans ce cas on met en évidence une séquence génétique et non la production de toxine. Certains laboratoires réalisent un test immunoenzymatique à partir d'une suspension de colonies ou d'un bouillon néanmoins cette méthode n'est pas validée par les fabricants et fonctionne avec plus ou moins de succès selon les études. La CT est très sensible mais elle nécessite également 48 heures au minimum avant de pouvoir rendre les résultats. Un autre problème est que la sensibilité peut varier en fonction de la procédure de mise en culture utilisée : réalisation ou non d'un choc alcoolique, composition du milieu sélectif (ajout de taurocholate pour améliorer la germination des spores), utilisation d'un bouillon d'enrichissement. Cette technique détecte aussi les colonisations et le résultat doit être interprété en fonction de la clinique.

Lorsqu'on recherche les toxines de *C. difficile*, la sensibilité du test mis en œuvre devrait être supérieure à 90% et le taux de faux-positifs inférieur à 3% d'après les critères retenus par Planche et al (58). Le choix du test dépend donc de la prévalence des ICD dans un établissement donné, la valeur prédictive positive étant liée à la prévalence.

Il est possible de rechercher dans les selles par un test immunoenzymatique une enzyme produite par *C. difficile* : la glutamate deshydrogenase (GDH). La sensibilité est acceptable (85-90%) mais cette technique manque de spécificité et le caractère toxigène de la souche doit être confirmé par un second test. En effet, cette enzyme n'est pas produite exclusivement par *C. difficile* : les anticorps dirigés contre cette GDH peuvent également interagir avec celle produite par d'autres bactéries anaérobies tels que *Clostridium sporogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius* ou *Clostridium botulinum* (75). De plus, la recherche de la GDH ne fournit aucun

renseignement sur la présence du PaLoc (41). De nombreux algorithmes de test ont été publiés ces dernières années en utilisant la GDH en première ligne puis en confirmant par une seconde technique plus spécifique. Les principaux problèmes présentés par cette approche de tests successifs est la diminution de la sensibilité globale de l'algorithme, l'accroissement du délai de rendu de résultat et l'augmentation du temps technicien nécessaire.

Le test le plus employé est la recherche des toxines par méthode immunoenzymatique. Historiquement ces tests recherchaient uniquement la toxine A mais depuis que des souches TcdA-TcdB+ ont été décrites et que le rôle de la toxine B est mieux connu, sont apparus des tests recherchant la présence des deux toxines. Ces tests commercialisés peuvent être réalisés de façon unitaire ou en plaques de 96 puits. Une méta-analyse a été réalisée pour objectiver les caractéristiques des tests immunoenzymatiques, en incluant à la fois les études utilisant comme méthode de référence la CCNA ou la CT (58). Leur sensibilité est globalement insuffisante (de 69 à 99%) et leur spécificité varie de 92 à 100%, ce qui peut sembler acceptable mais correspond en fait la plupart du temps à de faibles valeurs prédictives positives pour une prévalence de la maladie inférieure à 10% dans la population testée (Figure 4). Selon le test immunoenzymatique utilisé par le laboratoire et la prévalence locale des ICD, les laboratoires peuvent se tromper une fois sur deux lorsqu'ils rendent une recherche positive de toxines de *C. difficile* (74). Lorsqu'on compare ces tests à la culture toxigénique uniquement les résultats sont encore moins bons : sensibilité de 32 à 86%, spécificité de 76 à 100% (19). Il est important de noter que les tests immunoenzymatiques proposés par les différents fournisseurs ne sont pas équivalents, certains possédant de meilleures

caractéristiques diagnostiques. Globalement ces tests ne peuvent pas être recommandés comme seule méthode de diagnostic d'une ICD.

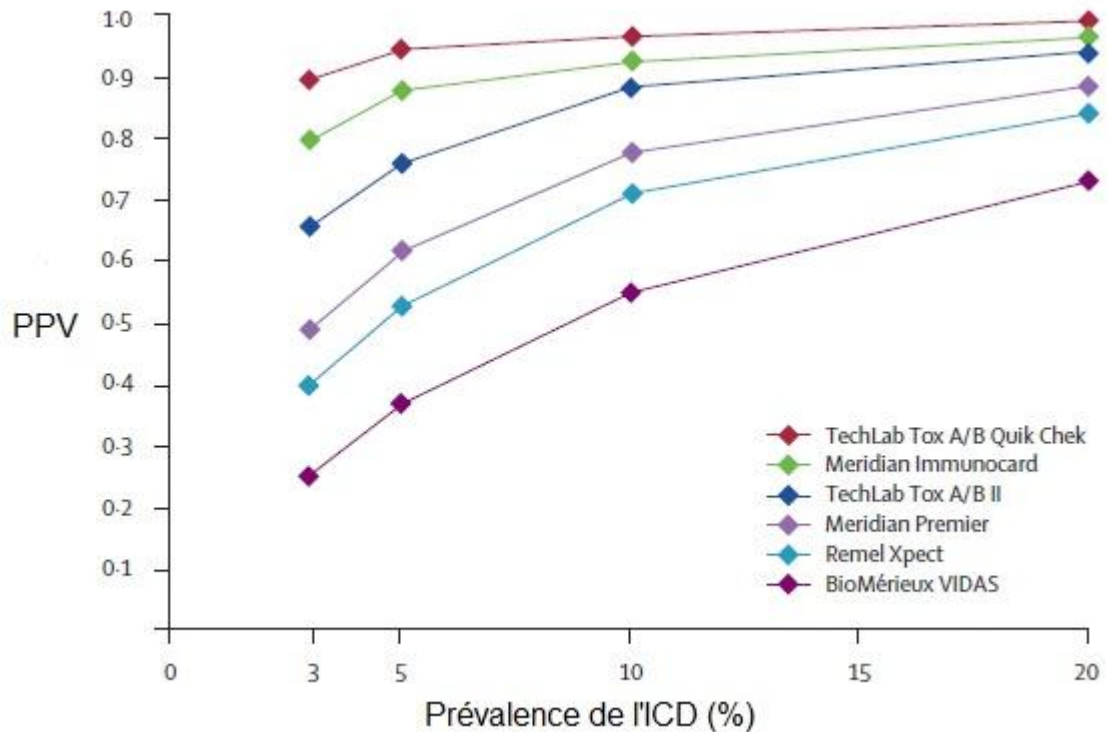


Figure 4 : Valeur Prédictive Positive de différents tests immunoenzymatiques en fonction de la prévalence de la maladie (toutes les études ayant pour référence la CT ou la CCNA ont été incluses) (58)

Le développement des techniques de biologie moléculaire recherchant le gène *tcdB* permet un diagnostic rapide (comparable aux techniques immunoenzymatiques) mais pour un coût supérieur aux autres tests disponibles. Des kits commerciaux ont été développés permettant de réaliser la recherche 24h/24 par un opérateur ayant une expertise limitée en biologie moléculaire. Comme pour la culture toxigénique, la PCR détecte également les patients colonisés : il est donc primordial de ne tester que les échantillons de selles de consistance anormale et d'interpréter les résultats en fonction de la clinique présentée par le patient. C'est le meilleur test au niveau de la sensibilité, elle a été estimée à 90% par rapport à la culture

toxigénique lors d'une méta-analyse réalisée en 2011 (21). La spécificité a été estimée à 97% vis-à-vis du CCNA et à 96% contre la culture toxigénique.

Le test Illumigene *C. difficile* utilise une technique d'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle (« loop-mediated isothermal DNA amplification ») et cible une partie conservée du gène *tcdA* qui reste présente même chez les souches TcdA-TcdB+. Les performances de ce test sont comparables à celles des techniques de biologie moléculaire.

La sérologie pourrait avoir un intérêt (en plus de la clinique) pour différencier une infection d'une colonisation pour les cas difficiles. En effet les patients colonisés par *C. difficile* développent une réponse immunitaire se traduisant par un taux d'IgG anti-TcdA de plus de 3 unités ELISA, contrairement aux patients infectés pour qui le taux d'IgG anti-TcdA est inférieur à 3 unités ELISA. Cette technique n'est pour l'instant pas utilisée en routine (39).

En France, les laboratoires recherchent la présence de toxines dans les selles par technique immunoenzymatique dans 98.1% des cas (toxine A+B pour 95.2% et toxine A seule pour 2.9%), par le test de cytotoxicité sur lignées cellulaires dans 1.9% des cas ou par PCR dans 2.9% des cas. 9% des laboratoires recherchent l'antigène GDH, 79% réalisent une culture sur milieu sélectif et 72% recherchent la présence de toxine à partir de la souche isolée (23).

Seulement 30% des laboratoires recherchent *C. difficile* de manière systématique en cas de diarrhée nosocomiale comme le recommande le Haut Conseil de Santé Publique (34).

Plusieurs stratégies diagnostiques sont employées (23) (Figure 5) :

- culture + recherche de toxines dans les selles + pouvoir toxinogène de la souche isolée : 31% des laboratoires
- culture + recherche de toxines dans les selles : 19%
- recherche de toxines dans les selles et si positive culture : 27%
- recherche de toxines dans les selles uniquement : 12%
- GDH et si positive recherche de toxines dans les selles : 5%
- Culture et si positive recherche de toxines dans les selles : 2%
- Culture et si positive pouvoir toxinogène de la souche isolée : 3%
- GDH et recherche de toxines : 1%

L'antibiogramme est réalisé de façon systématique dans 54% des cas.

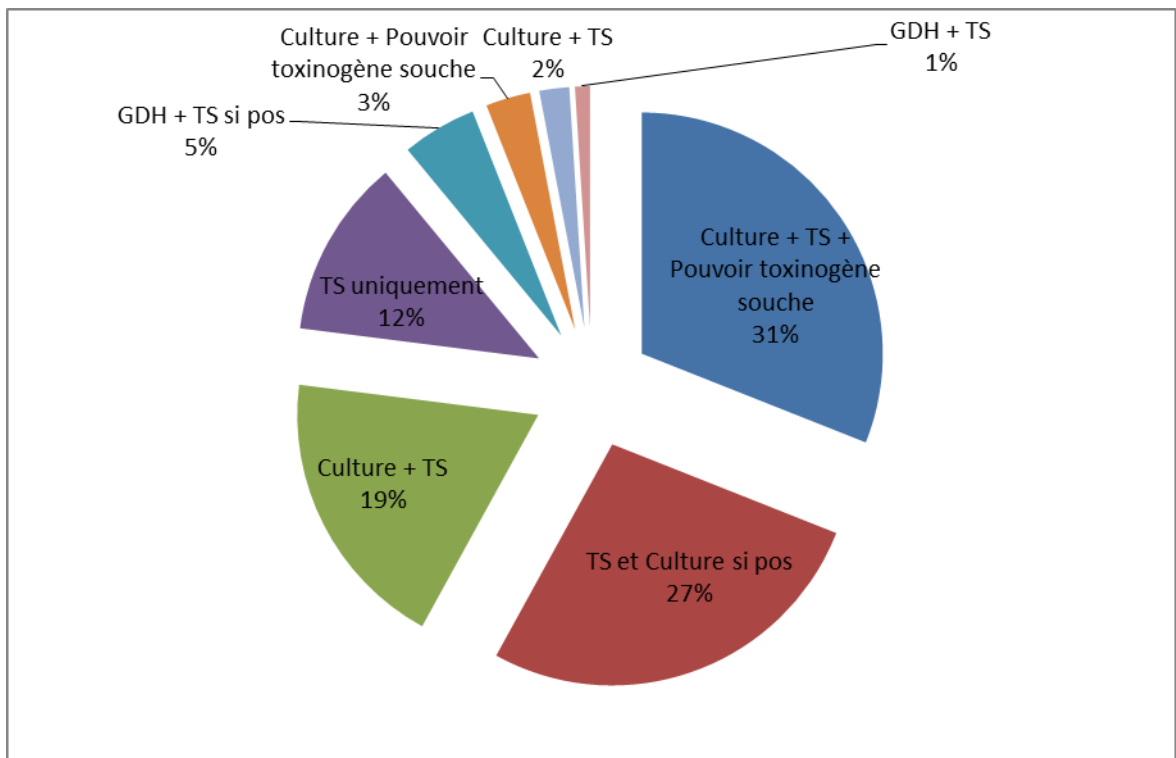


Figure 5 : Stratégies employées par les laboratoires français pour le diagnostic d'ICD. TS : Recherche de toxines sur les selles.

La situation actuelle du diagnostic d'ICD est préoccupante car la recherche se fait par des techniques dont la sensibilité est mauvaise, et qu'elle n'est pas effectuée systématiquement en cas de diarrhée nosocomiale contrairement aux recommandations.

Biologie moléculaire

En 2010, l'IDSA (« Infectious Disease Society of America ») concluait que les techniques de biologie moléculaire semblaient rapides, sensibles et spécifiques mais que de nouvelles études étaient nécessaires avant d'émettre des recommandations sur un éventuel passage en routine (16). Deux ans plus tard, les techniques de PCR ne sont pas encore recommandées en première intention par les sociétés savantes américaines ou européennes bien que les études publiées aient confirmé leur intérêt : elles permettent d'obtenir des performances quasi-équivalentes à la culture toxigénique en 2 heures contre 72 heures pour la technique de référence. Le prix de ces techniques de PCR a chuté et l'offre commerciale s'est développée, leur facilité d'utilisation permettant leur mise en œuvre dans tout type de laboratoire.

Les techniques de PCR ciblant les gènes des toxines de *C. difficile* sont développées depuis une vingtaine d'années. Le problème majeur auquel on est confronté lorsqu'on souhaite amplifier de l'ADN à partir d'échantillons de selles est la présence d'inhibiteurs qui interfèrent avec la réaction de PCR. En 1993, une équipe rapportait 30% d'inhibiteurs avec une procédure d'extraction rudimentaire consistant à chauffer à 100°C un échantillon de selles dilué, centrifuger pour éliminer les particules solides et récupérer le surnageant (12). Ces inhibiteurs sont variés : sels biliaires, produits de dégradation de l'hémoglobine ou encore polysaccharides complexes.

Pour améliorer la qualité de l'extraction, des kits commerciaux ont été développés et leur utilisation s'est généralisée. En 2002, 4 de ces kits d'extraction d'ADN bactérien à partir des selles ont été testés par rapport à la méthode historique de référence mise au point par Boom. A l'époque seul le kit QIAamp (conçu spécifiquement pour être utilisé sur des selles) permettait une extraction fonctionnelle pour une PCR primaire (50), les 4 autres méthodes testées ne fonctionnaient que pour des PCR nichées (« nested PCR »), une méthode plus sensible mais considérée comme moins spécifique et plus lourde à mettre en œuvre (Tableau 1).

Primary [1°] and secondary nested [2°] PCR products from DNA extracted from pure bacterial culture and faecal samples, H1 and H2, spiked with known concentrations [1–10⁷] of (A) *L. acidophilus* or (B) *B. uniformis* prior to DNA extraction

Method	1		2		3		4		5	
	Fast DNA®		Nucleospin®		Aquapure		QIAamp®		Boom et al.	
PCR	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Faeces H1										
10 ⁷	–	+	–	+	–	+++	++	+++	+	+++
10 ⁶	–	+	–	+	–	++	+	+++	–	–
10 ⁴	–	+	–	++	–	++	+	+++	–	–
10 ³	–	+	–	+	–	++	+	+++	–	–
10 ²	–	+	–	+	–	++	+	+++	–	–
10	–	+	–	+	–	++	+	+++	–	–
1	–	+	–	+	–	++	++	+++	–	–

Tableau 1 : Densité des produits d'amplification sur gel d'agarose exprimée semi-quantitativement après une PCR spécifique de *Bacteroides uniformis* à partir d'un échantillon de selles contenant différentes concentrations de *B. uniformis* pour 5 méthodes d'extraction différentes. 1°: PCR primaire. 2°: PCR nichée (« nested PCR ») (50)

Depuis, d'autres kits d'extraction aussi efficaces que le QiaAmp DNA StoolKit ont été commercialisés comme le Mobio Ultra Clean® Fecal DNA Isolation (2) ou le ZR Fecal DNA Kit (65). Cette étape d'extraction doit impérativement être optimisée lorsque l'on travaille avec un milieu aussi complexe que les selles, d'autant plus que

les coûts de ces différents kits sont faibles (de 3.14\$ à 3.70\$). Il a également été montré que l'ajout de BSA et la qualité de la *Taq* polymérase influent sur l'amplification de l'ADN extrait à partir d'échantillons cliniques de selles (69).

Il existe plusieurs automates permettant la recherche de *C. difficile* toxigènes à partir de selles diarrhéiques en ciblant des gènes spécifiques. Pour le BD GeneOhm Cdiff, l'ADN est extrait manuellement par lyse mécanique (billes de silice) puis thermique à 98°C, la recherche du gène *tcdB* se réalise sur un Smartcycler. La procédure d'extraction dure 1 heure, la réaction de PCR se fait également en 1 heure. Par rapport à la culture toxigénique, une première étude évalue la sensibilité du BD GeneOhm à 90% et sa spécificité à 99%. Le taux d'inhibiteurs est de 3.19% mais il diminue fortement si on travaille sur des selles congelées (53).

Le ProGastro CD utilise un tampon conçu spécifiquement pour éliminer les inhibiteurs de la réaction de PCR présents dans les selles (« Stool Transport and Recovery Buffer», Roche), l'extraction est réalisée sur la plateforme NucliSENS easyMAG (bioMérieux). Il recherche également le gène *tcdB*.

Pour le Cepheid Xpert *C. difficile*, il suffit d'ajouter le prélèvement à un tampon contenu dans une cartouche à usage unique qui sera chargée dans un GeneXpert, les résultats sont disponibles en une heure. L'intérêt de ce test est que non seulement le gène de la toxine B (*tcdB*) est détecté, mais également les gènes *cdtA* et *cdtB* correspondant aux toxines binaires, ainsi que la présence d'une délétion au niveau de *tcdC* ce qui permet l'identification présomptive du PCR-ribotype 027.

Une seconde étude comparant les 3 techniques précédentes a respectivement évalué les sensibilités du BD GeneOhm Cdiff, du ProGastro CD et du

Cepheid Xpert *C. difficile* à 96.2%, 88.5% et 96.2% et leurs spécificités à 100%, 100% et 96.4% (15). Cette étude utilise comme référence un résultat positif dans au moins 2 techniques sur les 5 testées (3 techniques de biologie moléculaire et 2 techniques immunoenzymatiques) ce qui est loin d'être idéal : il aurait été plus judicieux d'utiliser un des deux *gold standard* reconnus. Néanmoins aucune autre étude n'a testé de manière concomitante ces automates de biologie moléculaire, il est donc difficile de comparer leurs performances.

**ETAT DES LIEUX DU DIAGNOSTIC
D'ICD AU CHU DE LILLE**

Jusqu'à présent le laboratoire de microbiologie du CHU de Lille employait pour la recherche de *C. difficile* toxinogène la stratégie diagnostique la plus communément utilisée par les laboratoires français : une recherche des toxines A ou B de *C. difficile* sur la selle suivie d'une culture systématique avec la recherche du pouvoir toxinogène des souches isolées (pour lesquelles la recherche de toxines était négative sur la selle). Cet examen est automatiquement rajouté pour toutes les selles molles ou liquides, quelle que soit la demande du clinicien.

Nombre de prélèvements annuel

Ces 4 dernières années, le nombre de coprocultures sur lesquelles a été réalisée la recherche de *C. difficile* a doublé (Figure 6), passant de 1718 en 2008 à 3497 en 2011 (+103.5%) soit 10 demandes par jour en moyenne.

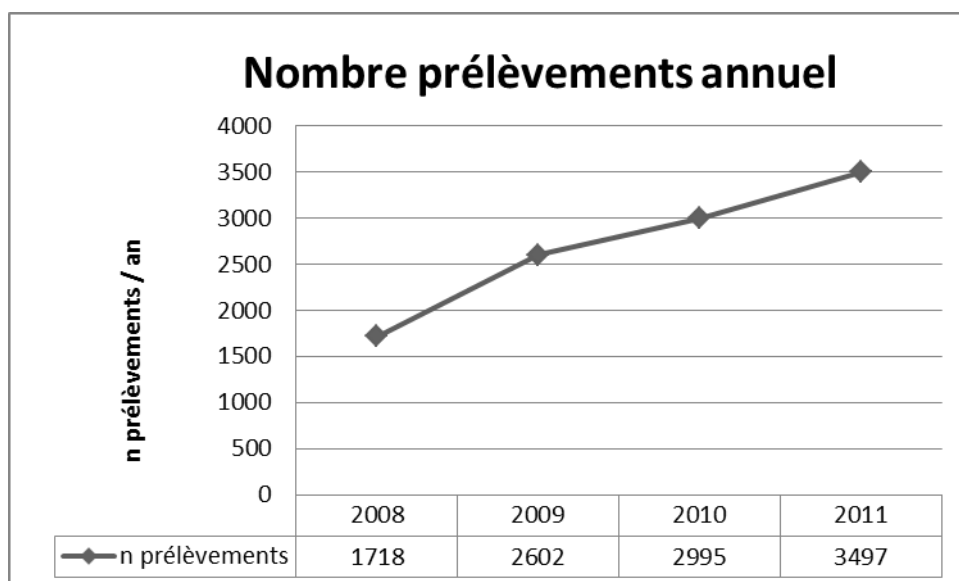


Figure 6 : Nombre de recherches de *C. difficile* réalisées annuellement au CHU de Lille

Résultats des tests immunochromatographiques

La recherche de toxines réalisée directement sur les selles permet un diagnostic rapide qui peut être réalisé 24h / 24. Le pourcentage de tests positifs est relativement faible, compris entre 3.11 et 5.85% (Figure 7). Il est décrit dans la littérature que la sensibilité de ce test est mauvaise (de l'ordre de 50%) : la prévalence locale des ICD est donc probablement 2 fois plus élevée.

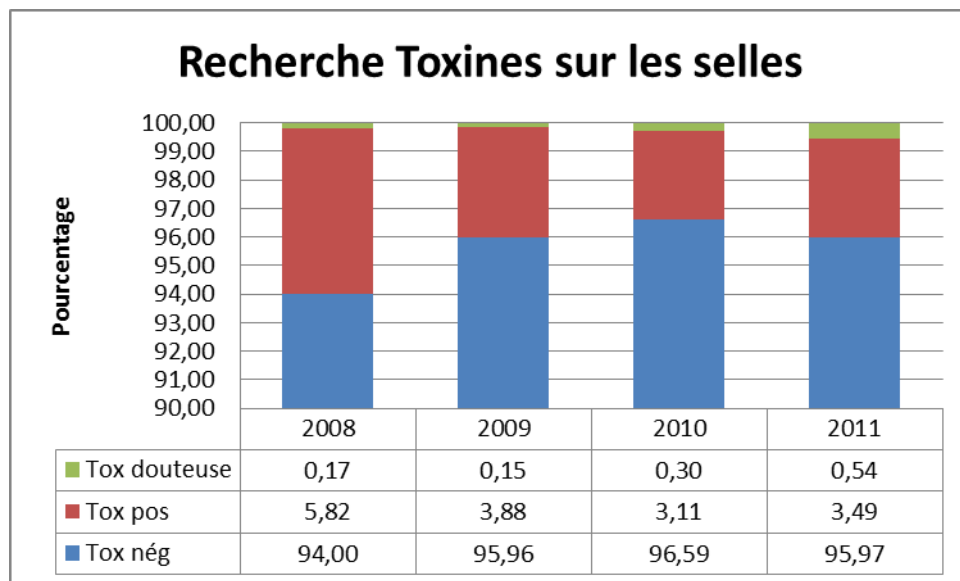


Figure 7 : Résultats de la recherche des toxines A et B réalisée directement sur les selles ces 4 dernières années au CHU de Lille

Recherche de toxine positive sur la selle sans *C. difficile* isolé en culture

Avec une spécificité des tests immuno-enzymatiques estimée entre 76 et 100%, on s'attend à retrouver du *C. difficile* en culture lorsque la recherche de toxines est positive sur la selle. Néanmoins, on observe en particulier en 2010 un pourcentage élevé d'échantillons pour lesquels aucune culture de *C. difficile* n'a pu être obtenue (44%) alors que la recherche de toxines était positive sur la selle (Figure 8).

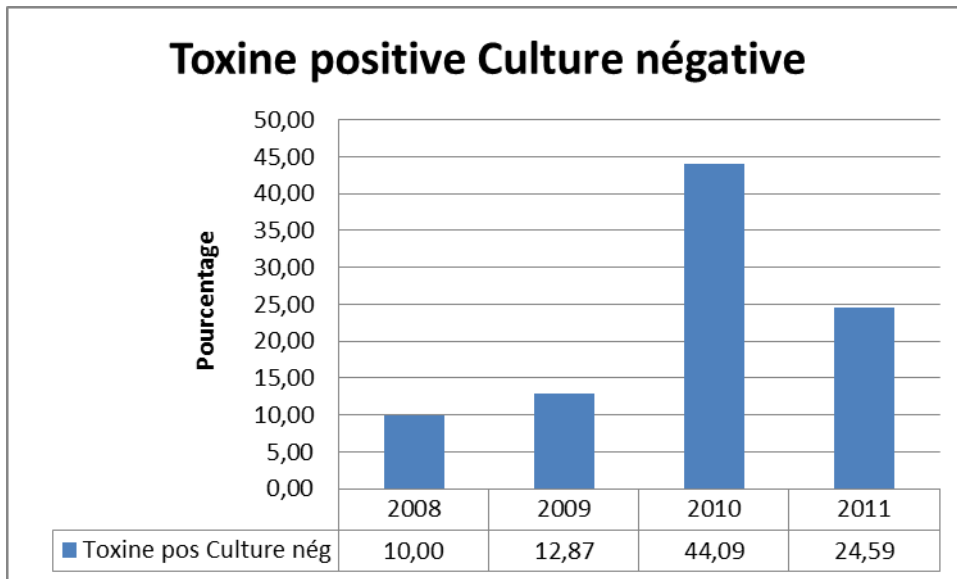


Figure 8 : Pourcentage d'échantillons où *C. difficile* n'a pas été retrouvé en culture alors que la recherche de toxines sur la selle était positive

Il est difficile d'expliquer cette discordance entre recherche de toxines et résultats de culture en 2010 car les milieux CCFA et le test immuno-enzymatique utilisés sont restés les mêmes. Il est peu probable que ce soit lié à une mauvaise valeur prédictive positive du test immuno-enzymatique utilisé car le taux de positifs était similaire en 2010 et en 2009. La recherche de *C. difficile* par culture était probablement moins performante en 2010 pour des raisons qu'on ignore.

Intérêt et limites de la culture systématique

La faible sensibilité des examens immunochromatographiques amène le laboratoire à réaliser de manière systématique une culture, même lorsque la recherche de toxines est négative. Si on en croit les données de la littérature, la culture systématique des échantillons devrait permettre d'obtenir 2 fois plus d'échantillons positifs par rapport à des tests immunochromatographiques possédant une sensibilité d'environ 50%. La figure 9 montre que ce n'est pas le cas, la culture

ne permettant au total de récupérer seulement 1.11 à 1.24 fois plus de vrais positifs (échantillons contenant du *C. difficile* toxigène).

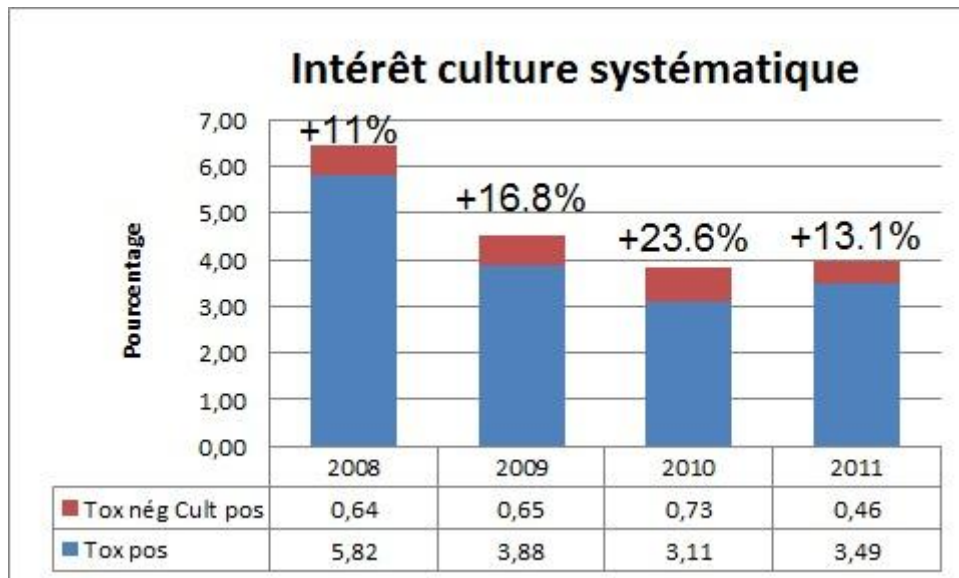


Figure 9 : Apport de la culture systématique des échantillons dans le diagnostic d'ICD. Tox = Recherche de toxines sur les selles, Cult = Culture

Ces derniers résultats impliquent que soit la culture n'est pas réalisée de manière optimale, soit le test du pouvoir toxigène de la souche tel qu'il est réalisé au laboratoire (immunochromatographie à partir d'une suspension de colonies ou du surnageant d'un milieu liquide incubé pendant 48-72h) n'est pas adapté.

Recherche du pouvoir pathogène des souches isolées

Il est étonnant que 36 à 58% de l'ensemble des souches de *C. difficile* retrouvées soient rendues non-toxigènes (Figure 10). En effet, dans une étude récente où le caractère toxigène ou non d'un isolat était déterminé par test de cytotoxicité cellulaire seulement 11% des souches étaient non-toxigènes (13). Il est donc probable que notre test du pouvoir toxigène des souches ne soit pas

adapté (manque de sensibilité) à moins que notre épidémiologie locale ne soit très différente par rapport aux hôpitaux américains.

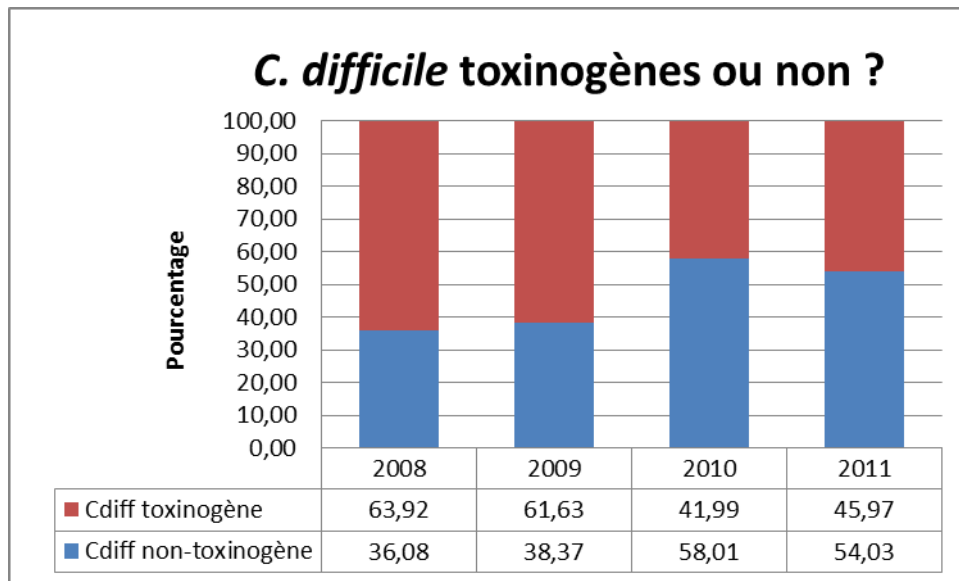


Figure 10 : Pourcentage de *C. difficile* isolés en culture s'avérant être non-toxinogènes

L'analyse de nos résultats locaux impliquait donc d'optimiser nos techniques de culture des échantillons et de détermination du pouvoir pathogène des souches isolées pour disposer d'un *gold standard* de culture toxigénique valable afin d'évaluer le BD Max Cdiff.

MATERIEL ET METHODES

360 échantillons provenant de patients hospitalisés au CHU de Lille ont été inclus de manière prospective de janvier à février 2012. Toutes les selles diarrhéiques ont été incluses, même si le prescripteur n'avait pas demandé spécifiquement une recherche de *C. difficile*. Les échantillons étaient rejetés si les selles avaient une consistance considérée comme normale (ne prenant pas la forme du pot, correspondant aux types 1 à 4 de l'échelle de Bristol) ou si l'analyse avait déjà été réalisée pour un même patient dans les 7 jours précédents.

Technique employée en routine au laboratoire

Les échantillons étaient stockés à +4°C et testés dans les 36 heures suivant leur arrivée suivant le protocole utilisé au moment de l'étude dans le laboratoire :

- Technique immunoenzymatique recherchant la production de toxine A ou B (Wampole TOX A/B QUIK CHEK®)
- Suivie d'une culture de 10 µl de selles sur milieu CCFA incubé en anaérobiose pendant 48 heures

Un échantillon était rendu positif aux cliniciens si la technique immuno-enzymatique était positive dans les selles, ou si des colonies de *C. difficile* étaient retrouvées en culture et qu'elles présentaient un pouvoir toxigène. Pour le mettre en évidence, deux méthodes étaient employées selon les unités du laboratoire faisant toutes deux appel au même kit immuno-enzymatique :

- Incubation 48 à 72h en anaérobiose des colonies isolées de *C. difficile* dans un bouillon type Rosenow, puis test du surnageant avec le kit Wampole TOX A/B QUIK CHEK

- Ou réalisation d'une suspension dense à partir de plusieurs colonies et test avec le kit Wampole TOX A/B QUIK CHEK

Aucune de ces deux méthodes de détermination du pouvoir pathogène des souches n'est validée par le fabricant qui précise que le test doit être réalisé sur des selles, néanmoins de nombreux laboratoires procèdent de cette façon faute d'alternative (test de cytotoxicité sur lignées cellulaires ou détection du gène *tcdB*) malgré le faible nombre d'études disponibles. La réalisation d'une suspension à partir de 4 à 6 colonies suivie d'un test immuno-enzymatique semble présenter une sensibilité satisfaisante (89% par rapport au test de cytotoxicité) mais la reproductibilité n'est que de 79% (64). Le fabricant affirme que la reproductibilité de son test immunoenzymatique sur les selles est de 100%, mais il n'a testé que 6 échantillons positifs et 2 négatifs.

Culture après choc alcoolique

En plus de la mise en culture de 10 µl de selles sur milieu CCFA réalisée en routine par le laboratoire, les échantillons ont été égalementensemencés sur milieu CCFA après choc alcoolique pour améliorer la sensibilité de la technique de culture. Approximativement 300 µl de selles ont été ajoutés à 300 µl d'éthanol absolu et laissés à température ambiante pendant 30 minutes. Deux gouttes (100 µl) du mélange ont étéensemencées sur milieu CCFA (sans taurocholate) qui était ensuite incubé en anaérobiose pendant 48 heures. Le volume de sellesensemencé était donc 5 fois supérieur à la technique utilisée en routine au laboratoire.

Biologie Moléculaire

BD MAX

Le test BD Max CDiff RUO a été réalisé sur les échantillons stockés à +4°C, dans les 36 heures après réception de l'échantillon, selon les recommandations du constructeur. Une oese de 10 µl de selles est transférée dans le tube échantillon BD Max qui sera ensuite vortexé vigoureusement pendant une dizaine de secondes. La procédure d'extraction et de PCR est ensuite réalisée automatiquement sur le BD Max sans intervention humaine nécessaire une fois que l'échantillon à tester est inséré. La procédure d'extraction dure 50 à 90 minutes selon le nombre d'échantillons à tester et utilise de l'achromopeptidase, une enzyme présentant une forte activité lytique vis-à-vis des bactéries Gram positives (26). L'éluat est ensuite ajouté à un « Master mix » lyophilisé puis 4 µl du mélange est pipeté dans une chambre où se fait la réaction de PCR. Elle consiste en 45 cycles de 30.3 secondes pour une durée totale inférieure à 30 minutes, grâce au système microfluidique qui permet des échanges thermiques rapides.

Pour les 280 premiers échantillons les courbes ont été interprétées de la façon suivante : un échantillon était considéré inhibiteur si le Ct du contrôle était supérieur à 37 et il était considéré comme positif si le Ct du gène *tcdB* était inférieur à 37 avec une fluorescence supérieure à 200 unités. Pour les 80 échantillons suivants, une nouvelle version du test C Diff RUO a été installée qui interprétait automatiquement les courbes en positif, négatif ou non-résolu. Les échantillons inhibiteurs ont été retestés après une étape de congélation. Le résultat de ce test en cours de validation CE-IVD n'a pas été transmis au clinicien.

BD GENE OHM

Ce test homologué CE-IVD a été réalisé de manière rétrospective sur des échantillons congelés à -20°C étant donné que l'automate n'était pas disponible au laboratoire au début de l'étude. Il est validé sur des échantillons ayant subi une étape de congélation/décongélation (ce qui a un effet favorable sur la disparition des substances inhibitrices de la réaction de PCR présentes dans l'échantillon). Comme le fabricant le conseille, l'extraction manuelle a été réalisée en transférant l'échantillon dans un tampon à l'aide d'un écouvillon. Après une étape de vortex, 10 µl du mélange ont été insérés dans un tube de lyse contenant des billes et de la protéinase K. Ce tube sera vortexé pendant 5 minutes puis chauffé à 98°C pendant 7 minutes et congelé à -20°C. Après une brève centrifugation, 3 µl de l'éluat ont été ajoutés à 25 µl du Mix fourni et chargés dans un tube spécifique sur le SmartCycler. Les résultats étaient interprétés automatiquement par le logiciel en positif, négatif ou non résolu. Ce test a également permis de déterminer le caractère toxigène des souches de *C. difficile* isolées.

PCR MAISON

50 échantillons consécutifs sur les 360 ont été testés par la technique de PCR mise au point par le laboratoire de manière prospective sur des échantillons stockés à +4°C dans les 36 heures suivant leur réception. L'extraction a été réalisée en utilisant le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel), un kit d'extraction généraliste utilisable selon le fabricant pour un grand nombre de prélèvements différents (queue de souris, sang séché, racines de cheveux, selles, insectes...) selon un protocole optimisé par notre laboratoire, le taux d'inhibition en utilisant le protocole

recommandé par le fabricant pour les selles retrouvés lors d'une précédente étude menée par le laboratoire étant de 37.7% (52).

L'extraction a été réalisée en diluant la selle au 1/10ème puis en utilisant le MagnaLyser, qui permet d'effectuer une lyse mécanique des parois cellulaires des bactéries à l'aide de billes de verre. Après une courte centrifugation pour faire descendre les billes et les particules solides, on diluait l'échantillon obtenu au 1/2 dans du tampon. De la protéinase K était ajoutée et on la laissait agir pendant 3 heures à 56°C pour l'étape de pré-lyse, puis la lyse pouvait avoir lieu à 70°C. L'ADN était lié sur une membrane de silice, soumis à des multiples lavages puis élué. Les différences principales entre ce protocole et le protocole recommandé par le fabricant étaient l'utilisation du MagnaLyser et une dilution de l'échantillon 10 fois plus importante, ce qui améliore les problèmes d'inhibition mais diminue la sensibilité de la réaction de PCR. Une fois l'extraction réalisée, l'éluat était conservé à -20°C.

Le couple amorce / sonde avait été sélectionné préalablement à cette étude par le laboratoire de biologie moléculaire pour détecter le gène *tcdB*. Les séquences des amorces et la composition du « Master Mix » sont détaillées dans une thèse antérieure portant sur ce sujet (52). 5 µl de l'échantillon étaient ajoutés à 20 µl de mix puis insérés dans un automate Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR.

Gold standard

Pour évaluer le nouveau test BD Max Cdiff, un vrai positif était défini par la présence de *C. difficile* toxigène en culture après choc alcoolique. Le pouvoir toxigène des souches de *C. difficile* isolées était déterminé par la présence du gène *tcdB* à l'aide du BD GeneOhm.

RESULTATS

1. Technique employée en routine au laboratoire

Les résultats de la technique employée en routine au laboratoire associant immunochromatographie à une mise en culture systématique des échantillons sont repris dans le Tableau 2. Le test immunoenzymatique seul présentait les moins bonnes performances diagnostiques de l'étude avec seulement 19 vrai-positifs contre 44 pour la technique de référence, soit une sensibilité de 43.18% (IC95 28.35 à 58.97%). La spécificité du test était par contre excellente, estimée à 99.68% (IC95 98.25 à 99.99%). La culture telle qu'elle était réalisée au laboratoire (sans prétraitement de la selle) a permis de détecter 6 échantillons vrai-positifs supplémentaires : globalement la sensibilité de notre technique de routine était de 54.55% (IC95 38.85 à 69.61%) et la spécificité de 99.68% (IC95 98.25 à 99.99%). 3 souches de *C. difficile* retrouvées en culture par le laboratoire ont été rendues à tort comme non-toxinogènes après test immunochromatographique directement sur les colonies, alors que le gène *tcdB* était présent.

2. Culture après choc alcoolique

C. difficile a été isolé en culture pour 55 échantillons (15%). Parmi ceux-ci, 44 souches (12.2%) possédaient le gène *tcdB* après réalisation du test BD GeneOhm sur les colonies, ce qui constituait notre *gold standard*. Les résultats de bactériologie conventionnelle et des différentes techniques évaluées sont présentées dans le Tableau 2.

Parmi les 44 échantillons positifs, 28 souches de *C. difficile* (63.64%) ont été retrouvées après ensemencement d'un CCFA directement à partir de la selle et 44 (100%) après choc alcoolique.

	Culture Toxigénique Positive	Culture Toxigénique Négative	Total
Routine (IC+cult) positif	25	1	26
Routine (IC+cult) négatif	19	315	334
IC positive	19	1	20
IC négative	25	315	340
BD Max positif	43	1	44
BD Max négatif	1	315	316
BD GeneOhm positif	42	1	43
BD GeneOhm négatif	2	315	317
Total	44	316	360

Tableau 2 : Résultats des différentes techniques évaluées par rapport à notre *gold standard* (culture toxigénique après choc alcoolique). IC = immunochromatographie, cult = Culture.

3. Biologie Moléculaire

- Limite de détection

Les limites de détection du BD Max et du BD GeneOhm ont été évaluées. Une culture de *C. difficile* de 36 heures a été utilisée pour obtenir un 0.5 MacFarland (approximativement 10^8 CFU / mL) qui a été ensuite dilué de manière décimale dans un bouillon de Rosenow pré-réduit. Les différentes dilutions bactériennes en bouillon de Rosenow ont été mises en culture pour décompter les colonies de *C. difficile* et vérifier l'inoculum de départ puis diluées au $1/10^{\text{ème}}$ dans un échantillon de selles liquides préalablement testé négatif en BD Max et BD GeneOhm. La limite de détection était de 10^4 UFC / mL de selles pour le BD Max et de 10^5 UFC / mL pour le BD GeneOhm.

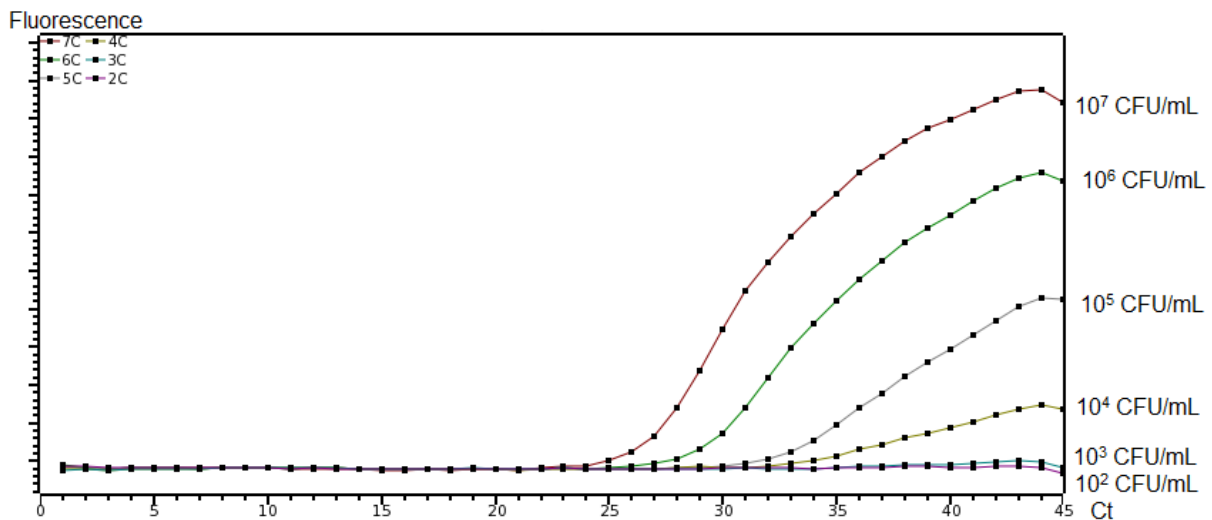


Figure 11 : Limite de détection du BD Max : Résultats des tests effectués à partir d'une selle liquide à laquelle ont été ajoutées différentes concentrations de *C. difficile* toxigène (positif pour des concentrations allant de 10^7 à 10^4 CFU / mL, et négatif pour 10^3 à 10^2 CFU / mL).

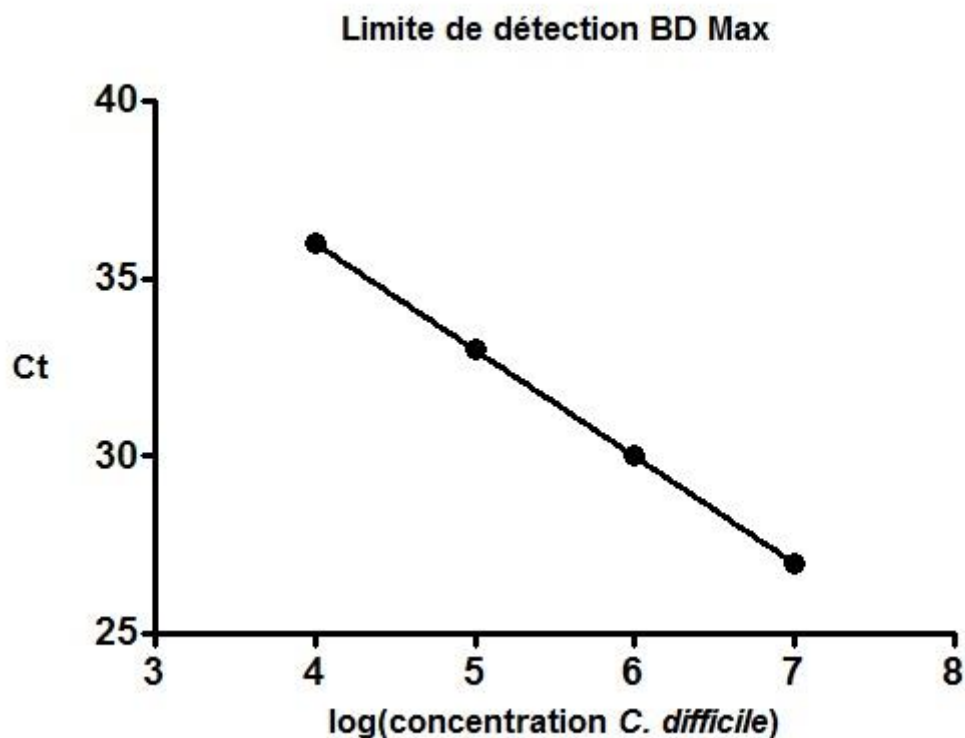


Figure 12 : Limite de détection du BD Max : échelle logarithmique.

- Différences de Ct

Les Ct obtenus pour les 42 échantillons à la fois positifs en BD Max et en BD GeneOhm étaient significativement différents avec un Ct moyen inférieur de 9.1 pour le BD Max ($p < 0.0001$, test de Mann-Whitney). La médiane des valeurs de Ct est de 23.6 pour le BD Max contre 33.0 pour le BD GeneOhm. Ces résultats sont représentés sur la figure 13. Cette différence reste à nuancer car un échantillon n'est considéré comme positif sur BD Max que pour un Ct < 37 alors que la limite est de 45 pour le BD GeneOhm (soit 8 Ct d'écart). Le BD Max utilise une technique microfluidique avec un volume utilisé pour la réaction de PCR de 4 μ l seulement, ce qui peut expliquer des Ct plus précoces.

La détermination de la limite de détection a permis d'objectiver que le BD Max était 10 fois plus sensible que le BD GeneOhm mais en pratique cela n'a permis de ne détecter qu'un cas supplémentaire sur 360. En effet, 75% des patients positifs sur le BD Max ont un Ct compris entre 26.25 et 18.87 soit un inoculum compris entre 10^7 et 10^9 UFC / mL de selles de *C. difficile* d'après la gamme de dilution réalisée.

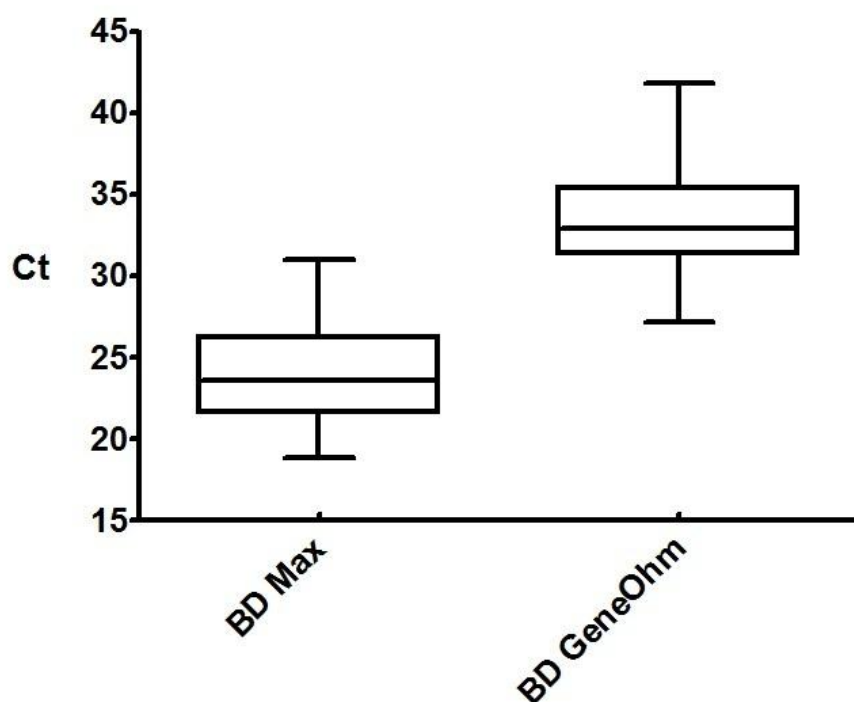


Figure 13 : « Box-plot » représentant les valeurs de Ct des BD Max et BD GeneOhm

- **PCR maison**

La technique de PCR maison a été réalisée sur 50 échantillons seulement, on retrouvait 4 échantillons inhibiteurs (8%), une sensibilité de 66.67% (IC95 9.43 à 99.16%) et une spécificité de 100% (IC95 92.45 à 100%). Sur les 2 échantillons positifs, 1 est sorti avec un Ct de 44 pour 45 cycles au total : il pourrait être considéré comme douteux.

- **BD Max**

La sensibilité du BD Max était de 97.73% (IC95 87.98 à 99.94%) et sa spécificité de 99.68% (IC95 95.25 à 99.99%). 13 échantillons (3.6%) étaient rendus comme « non résolus » (présence d'inhibiteur ou problème technique) après un premier passage sur l'automate, dont 3 (0.83%) avec une cause évidente identifiée (bulle d'air dans la chambre de PCR, billes métalliques dans la chambre de PCR, couleur marron de l'éluat). Aucun de ces 13 échantillons n'était inhibiteur de la réaction de PCR lors d'un 2nd passage après congélation / décongélation des selles. Une Valeur Prédictive Positive (VPP) et Négative (VPN) ont pu être calculées : elles représentent ici la probabilité de trouver du *C. difficile* toxinogène en culture lorsque le test est positif (Tableau 3).

- **BD GeneOhm**

La sensibilité du GeneOhm calculée à 95.45% (IC95 84.53 à 99.44%) était proche de celle du BD Max, de même que sa spécificité de 99.68% (IC95 98.25 à 99.99%). Sur les 360 échantillons aucun n'était inhibiteur ce qui s'explique car on travaillait à partir de selles congelées. Un échantillon (0.27%) a tout de même été repassé suite à un défaut de fabrication d'une des cupules en plastique qui n'avait pas été vu au moment de lancer la série.

Les performances des différentes techniques évaluées sont indiquées dans le Tableau 3.

	Se	Sp	VPP	VPN	RV+	RV-
IC	43,18	99,68	95	92,65	136,45	0,57
BD Max	97,73	99,68	97,73	99,68	308,82	0,02
BD GeneOhm	95,45	99,68	97,68	99,37	301,64	0,05

Tableau 3 : Sensibilité (Se), Spécificité (Sp), Valeur Prédictive Positive (VPP) et Négative (VPN), Rapport de Vraisemblance Positif (RV+) et Négatif (RV-) des principales techniques évaluées. IC = immunochromatographie

DISCUSSION

Dans notre étude, la sensibilité des techniques de biologie moléculaire (97.73% pour le BD Max, 95.45% pour le BD GeneOhm) est clairement supérieure à celle du test immunochromatographique évalué (43.18%). Ces résultats sont en partie liés au type de *gold standard* utilisé : les techniques détectant la présence de toxines libres dans les selles ont une bonne concordance entre elles (test de cytotoxicité ou technique immuno-enzymatique), de même que la biologie moléculaire avec la culture toxigénique (20). Toutefois, cette limite ne permet pas d'expliquer à elle seule le nombre 2.26 fois plus faible de vrai-positifs détectés par immunochromatographie par rapport à la biologie moléculaire. Les techniques immuno-enzymatiques ne peuvent pas être utilisées comme seul test diagnostic d'ICD du fait de leur sensibilité trop faible.

Nous n'avons inclus que des échantillons de consistance anormale mais la détection de *C. difficile* toxigène dans les selles n'implique pas forcément que le patient soit atteint d'une ICD. Il est possible que certains patients soient porteurs sains de *C. difficile* toxigène et présentent une symptomatologie clinique de diarrhée liée à un autre agent microbiologique (en particulier aux *Norovirus* responsables d'épidémies hospitalières) ou due à une cause non-infectieuse.

Pour évaluer un test diagnostic, on peut utiliser les rapports de vraisemblance négatif et positif (RV- et RV+) qui présentent l'intérêt d'être indépendants de la prévalence de la maladie dans la population (48). Les rapports de vraisemblance positifs de l'immunochromatographie comme de la biologie moléculaire sont très bons (RV+ > 10, ce qui équivaut à un apport diagnostique très fort) par contre le rapport de vraisemblance négatif de l'immunochromatographie est insuffisant (RV- entre 0.5 et 1, ce qui correspond à un apport diagnostique faible). Les rapports de vraisemblance négatifs des techniques de biologie moléculaire sont quant à eux

excellents ($RV- < 0.1$). En résumé, le gain diagnostique d'un résultat d'immunochromatographie négatif est insuffisant pour servir au clinicien : en cas de forte probabilité clinique d'ICD un test immunochromatographique négatif ne doit pas remettre en cause le diagnostic car son $RV-$ n'est que de 0.57, la probabilité post-test que le patient soit atteint d'ICD reste élevée.

Culture et Choc alcoolique

La réalisation d'un choc alcoolique préalable à la mise en culture augmentait considérablement le nombre de *C. difficile* toxinogènes isolés (44 avec choc contre 28 sans). Cette différence peut s'expliquer en partie car la quantité de sellesensemencée était plus importante pour le choc alcoolique (100 μ l de mélange éthanol/selles soit 50 μ l de selles contre 10 μ l en l'absence de choc alcoolique). Néanmoins d'autres facteurs entrent en compte : sur les 15 échantillons retrouvés uniquement après choc alcoolique 9 avaient un Ct inférieur à 26.25 (de 21 à 26) sur BD Max et correspondaient donc à un inoculum important (75^{ème} percentile). Les milieux CCFA utilisés n'étaient peut-être pas suffisamment sélectifs car de nombreux *Lactobacillus* et certains *Clostridium* appartenant à d'autres espèces que *C. difficile* étaient capables de se développer. Cela entraînait une compétition freinant le développement de *C. difficile* et rendant son isolement problématique lorsque cette bactérie n'était pas majoritaire.

Même en améliorant la sensibilité de la culture par un choc alcoolique un échantillon rendu positif par le BD Max n'a pas été retrouvé en culture, et pour des échantillons avec des Ct tardifs (29 à 32) on pouvait ne retrouver que de rares colonies sur le milieu CCFA. Comme le choc alcoolique sélectionne les spores présentes dans le prélèvement et tue les formes végétatives, il est important

d'optimiser le milieu pour favoriser leur germination. Il serait intéressant par la suite d'inclure du taurocholate dans les milieux CCFA préparés au laboratoire à une concentration de 0.1 à 0.05% pour obtenir un nombre de colonies plus important (6 fois plus de spores retrouvées en culture) et donc augmenter la sensibilité de la culture (54). Il est possible que la sensibilité des techniques évaluées soit moins élevée en utilisant comme méthode de culture de référence des milieux CCFA additionnés de taurocholate ou des bouillons d'enrichissement (CCFA liquide).

L'optimisation du *gold standard* employé était donc primordiale car les résultats de l'étude auraient été très différents en prenant comme référence la culture directement sur CCFA avec détermination du caractère toxigène des souches par immunochromatographie telle qu'elle est pratiquée en routine au laboratoire (seulement 25 vrai-positifs contre 44 lorsqu'on réalise un choc alcoolique et une détermination de caractère toxigénique par PCR).

Comparaison du coût des différentes techniques

Le coût unitaire de la technique immunochromatographique est modéré (7.20 € par test) par rapport aux kits BD Max CDiff RUO qui coûtent 24€ TTC. Avec un taux d'inhibiteurs estimé à 3.6% dans notre étude lors d'un premier passage et de 0% sur échantillons congelés dans un 2nd temps, il faut compter sur un coût prévisible de 24.86€ par échantillon pour le BD Max.

Il est clair que le BD Max CDiff RUO a une VPN suffisante (99.68%) pour ne pas mettre en culture les échantillons rendus négatifs en PCR (88% des échantillons). Le coût des milieux de culture est relativement faible : 2.50 € pour un milieu CCFA additionné de 0.05% de taurocholate + 1.1€ pour un générateur d'atmosphère anaérobie (1 pour 2 boîtes en moyenne). Le temps technicien

nécessaire à l'analyse est estimé à 7 min ce qui représente un coût de 3.5€. Ne pas réaliser de culture systématique permet donc d'économiser 5.76€. L'utilisation en routine du BD Max représentera donc un coût supplémentaire de 12€ par échantillon pour le laboratoire.

Toutefois, à l'échelle de l'hôpital il est possible que ce surcoût pour le laboratoire permette de réduire les dépenses globales liées aux ICD. En effet, le coût pour l'hôpital d'un patient développant une ICD pendant son hospitalisation a été estimé à 10 187 \$ par une équipe américaine, soit un peu plus de 7 500 € (49). De plus le meilleur rapport de vraisemblance négatif des techniques de biologie moléculaire par rapport à l'immunochromatographie permettrait d'arrêter les précautions complémentaires chez des patients suspects d'ICD rapidement tout en minimisant le risque d'erreur, le coût de ces mesures étant estimé à 200€ / journée d'hospitalisation (10).

Avant de conclure définitivement il faudrait que des études à long terme sur l'impact des techniques de PCR associées à des mesures d'hygiène adaptées sur l'épidémiologie des ICD dans les hôpitaux soient menées, mais il est probable que le coût global pour l'hôpital de l'implémentation d'une technique sensible et rapide telle que le BD Max soit moindre que prévu.

Au-delà de l'aspect économique, les patients atteints d'ICD pourraient recevoir un traitement plus précoce grâce à la biologie moléculaire. La létalité étant d'environ 1% il ne faut pas sous-estimer la gravité potentielle de cette infection.

CONCLUSION

La sensibilité des techniques de biologie moléculaire (97.73% pour le BD Max, 95.45% pour le BD GeneOhm) est supérieure à celle du test immunochromatographique évalué (43.18%). Les valeurs prédictives positive et négative du BD Max sont respectivement de 97.73% et 99.68% contre 95% et 92.65% pour l'immunochromatographie. Le faible rapport de vraisemblance négatif de l'immunochromatographie ($RV^- = 0.57$) ne permet pas d'éliminer une infection à *C. difficile* en cas de suspicion clinique, contrairement aux techniques de biologie moléculaire ($RV^- < 0.1$). Cette étude confirme la mauvaise sensibilité des techniques immunochromatographiques par rapport à la biologie moléculaire ou à la culture toxigénique.

Au total, le BD Max Cdiff RUO présente des performances similaires à la culture toxigénique avec des résultats disponibles en seulement 2 heures au lieu de 2 à 3 jours. Il serait également important d'optimiser les techniques de culture employées pour rechercher *C. difficile* actuellement en place au laboratoire en réalisant un choc alcoolique et en utilisant des milieux CCFA contenant du taurocholate. Un diagnostic plus rapide permet de traiter aussi tôt que possible une infection potentiellement létale et d'implémenter des mesures d'hygiène nécessaires à la prévention des épidémies hospitalières.

Cependant, cette étude n'a utilisé que des données microbiologiques (présence de *C. difficile* toxigène) comme référence : la place des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic d'ICD reste encore à définir. Il serait intéressant d'inclure des renseignements tels que la mortalité à 30 jours ou la sévérité des signes cliniques pour objectiver l'intérêt de la détection des cas supplémentaires par biologie moléculaire par rapport aux techniques recherchant les toxines libres dans les selles.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Apisarnthanarak, A., H. Khoury, W. R. Reinus, J. S. Crippin, and L. M. Mundy.** 2002. Severe *Clostridium difficile* colitis: the role of intracolonic vancomycin? *Am. J. Med.* **112**:328-329.
2. **Ariefdjohan, M. W., D. A. Savaiano, and C. H. Nakatsu.** 2010. Comparison of DNA extraction kits for PCR-DGGE analysis of human intestinal microbial communities from fecal specimens. *Nutr. J.* **9**:23.
3. **Bacci, S., K. Molbak, M. K. Kjeldsen, and K. E. Olsen.** 2011. Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg. Infect. Dis.* **17**:976-982.
4. **Barbut, F., A. Richard, K. Hamadi, V. Chomette, B. Burghoffer, and J. C. Petit.** 2000. Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2386-2388.
5. **Bartlett, J. G.** 1984. Treatment of antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Rev. Infect. Dis.* **6 Suppl 1**:S235-241.
6. **Bartlett, J. G., T. W. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach, and A. B. Onderdonk.** 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *N. Engl. J. Med.* **298**:531-534.
7. **Bartlett, J. G., and T. M. Perl.** 2005. The new *Clostridium difficile*--what does it mean? *N. Engl. J. Med.* **353**:2503-2505.
8. **Bauer, M. P., E. J. Kuijper, and J. T. van Dissel.** 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:1067-1079.
9. **Bauer, M. P., D. W. Notermans, B. H. van Benthem, J. S. Brazier, M. H. Wilcox, M. Rupnik, D. L. Monnet, J. T. van Dissel, and E. J. Kuijper.** 2011. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* **377**:63-73.
10. **Beclin, E.** 2007. Conséquences financières de la mise en place d'unité de cohorting pour la gestion de l'épidémie d'infections à *Clostridium difficile* dans le nord Pas de Calais. Lille, Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques.
11. **Bolton, R. P., and M. A. Culshaw.** 1986. Faecal metronidazole concentrations during oral and intravenous therapy for antibiotic associated colitis due to *Clostridium difficile*. *Gut* **27**:1169-1172.
12. **Boondeekhun, H. S., V. Gurtler, M. L. Odd, V. A. Wilson, and B. C. Mayall.** 1993. Detection of *Clostridium difficile* enterotoxin gene in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* **38**:384-387.
13. **Boone, J. H., M. Goodykoontz, S. J. Rhodes, K. Price, J. Smith, K. N. Gearhart, R. J. Carman, T. M. Kerkering, T. D. Wilkins, and D. M. Lyerly.** 2011. *Clostridium difficile* prevalence rates in a large healthcare system stratified according to patient population, age, gender, and specimen consistency. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**:1551-1559.
14. **Borriello, S. P., and P. Honour.** 1981. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. *J. Clin. Pathol.* **34**:1124-1127.
15. **Chapin, K. C., R. A. Dickenson, F. Wu, and S. B. Andrea.** 2011. Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin. *J. Mol. Diagn.* **13**:395-400.

16. **Cohen, S. H., D. N. Gerding, S. Johnson, C. P. Kelly, V. G. Loo, L. C. McDonald, J. Pepin, and M. H. Wilcox.** 2010. 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.* **31**:431-455.
17. **Cohen, S. H., Y. J. Tang, and J. Silva, Jr.** 2000. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J. Infect. Dis.* **181**:659-663.
18. **Cornely, O. A., D. W. Crook, R. Esposito, A. Poirier, M. S. Somero, K. Weiss, P. Sears, and S. Gorbach.** 2012. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet. Infect. Dis.* **12**:281-289.
19. **Crobach, M. J., O. M. Dekkers, M. H. Wilcox, and E. J. Kuijper.** 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:1053-1066.
20. **Davies, K., T. Planche, P. Coen, D. Crook, N. Shetty, M. Wren, and M. Wilcox.** 2012. The largest ever study to define a testing algorithm to optimise the laboratory diagnosis of *C. difficile* infection, 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London.
21. **Deshpande, A., V. Pasupuleti, D. D. Rolston, A. Jain, N. Deshpande, C. Pant, and A. V. Hernandez.** 2011. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of *Clostridium difficile* in the stool samples of patients with suspected *Clostridium difficile* Infection: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **53**:e81-90.
22. **Didelot, X., W. Fawley, A. S. Walker, R. M. Harding, M. Cule, A. Vaughan, D. Griffiths, K. E. Dingle, D. W. Crook, T. E. Peto, and M. Wilcox.** 2012. *Clostridium difficile* whole genome sequences from patients in Leeds and Oxfordshire demonstrate substantial geographical segregation of clinical strains, 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, London.
23. **Eckert, C., B. Coignard, D. Rahib, and F. Barbut.** 2010. Méthodes et stratégies utilisées en France pour le diagnostic d'une infection digestive à *Clostridium difficile*, Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse, Paris.
24. **Eiseman, B., W. Silen, G. S. Bascom, and A. J. Kauvar.** 1958. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* **44**:854-859.
25. **Enoch, D. A., M. J. Butler, S. Pai, S. H. Aliyu, and J. A. Karas.** 2011. *Clostridium difficile* in children: colonisation and disease. *J. Infect.* **63**:105-113.
26. **Ezaki, T., and S. Suzuki.** 1982. Achromopeptidase for lysis of anaerobic gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.* **16**:844-846.
27. **Fournier, R., F. Wallet, B. Grandbastien, L. Dubreuil, R. Courcol, C. Neut, and R. Dessein.** 2012. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* **18**:294-297.
28. **George, W. L., V. L. Sutter, D. Citron, and S. M. Finegold.** 1979. Selective and differential medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **9**:214-219.

29. **Gerding, D. N.** 2005. Metronidazole for *Clostridium difficile*-associated disease: is it okay for Mom? Clin. Infect. Dis. **40**:1598-1600.
30. **Goorhuis, A., D. Bakker, J. Corver, S. B. Debast, C. Harmanus, D. W. Notermans, A. A. Bergwerff, F. W. Dekker, and E. J. Kuijper.** 2008. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin. Infect. Dis. **47**:1162-1170.
31. **Gough, E., H. Shaikh, and A. R. Manges.** 2011. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. Clin. Infect. Dis. **53**:994-1002.
32. **Grando, D., M. M. Said, B. C. Mayall, and V. Gurtler.** 2012. High resolution melt analysis to track infections due to ribotype 027 *Clostridium difficile*. J. Microbiol. Methods **89**:87-94.
33. **Hall, I., and E. O'Toole.** 1935. Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. Am. J. Dis. Child. **49**:390-402.
34. **HCSP.** 2008. Avis relatif à la maîtrise de la diffusion des infections à *Clostridium difficile* dans les établissements de santé français, Haut Conseil de la Santé Publique.
35. **Hundsberger, T., V. Braun, M. Weidmann, P. Leukel, M. Sauerborn, and C. von Eichel-Streiber.** 1997. Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. Eur. J. Biochem. **244**:735-742.
36. **Jousimies-Somer, H., P. Summanen, D. Citron, E. Baron, H. Wexler, and S. Finegold.** 2002. *Anaerobic Bacteriology Manual*. Star Publishing Company.
37. **Kirby, J. M., H. Ahern, A. K. Roberts, V. Kumar, Z. Freeman, K. R. Acharya, and C. C. Shone.** 2009. Cwp84, a surface-associated cysteine protease, plays a role in the maturation of the surface layer of *Clostridium difficile*. J. Biol. Chem. **284**:34666-34673.
38. **Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, and C. P. Kelly.** 2001. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. Lancet **357**:189-193.
39. **Kyne, L., M. Warny, A. Qamar, and C. P. Kelly.** 2000. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. N. Engl. J. Med. **342**:390-397.
40. **Louie, T. J., J. Emery, W. Krulicki, B. Byrne, and M. Mah.** 2009. OPT-80 eliminates *Clostridium difficile* and is sparing of bacteroides species during treatment of C. difficile infection. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:261-263.
41. **Lyerly, D. M., D. W. Ball, J. Toth, and T. D. Wilkins.** 1988. Characterization of cross-reactive proteins detected by Culturette Brand Rapid Latex Test for *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. **26**:397-400.
42. **Lyerly, D. M., K. E. Saum, D. K. MacDonald, and T. D. Wilkins.** 1985. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. Infect. Immun. **47**:349-352.
43. **Lyras, D., J. R. O'Connor, P. M. Howarth, S. P. Sambol, G. P. Carter, T. Phumoonna, R. Poon, V. Adams, G. Vedantam, S. Johnson, D. N. Gerding, and J. I. Rood.** 2009. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature **458**:1176-1179.
44. **McDonald, L. C., G. E. Killgore, A. Thompson, R. C. Owens, Jr., S. V. Kazakova, S. P. Sambol, S. Johnson, and D. N. Gerding.** 2005. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N. Engl. J. Med. **353**:2433-2441.

45. **McFarland, L. V.** 2005. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: what really works? *J. Med. Microbiol.* **54**:101-111.
46. **McFarland, L. V.** 2009. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* **15**:274-280.
47. **McFarland, L. V.** 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am. J. Gastroenterol.* **101**:812-822.
48. **McGee, S.** 2002. Simplifying likelihood ratios. *J. Gen. Intern. Med.* **17**:646-649.
49. **McGlone, S. M., R. R. Bailey, S. M. Zimmer, M. J. Popovich, Y. Tian, P. Ufberg, R. R. Muder, and B. Y. Lee.** 2012. The economic burden of *Clostridium difficile*. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**:282-289.
50. **McOrist, A. L., M. Jackson, and A. R. Bird.** 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods* **50**:131-139.
51. **Miller, M. A., M. Hyland, M. Ofner-Agostini, M. Gourdeau, and M. Ishak.** 2002. Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **23**:137-140.
52. **Morvan, P.** 2009. Détection du gène *tcdB* par PCR en temps réel pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile*. Lille, Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques.
53. **Munson, E., D. Bilbo, M. Paul, M. Napierala, and J. E. Hryciuk.** 2011. Modifications of commercial toxigenic *Clostridium difficile* PCR resulting in improved economy and workflow efficiency. *J. Clin. Microbiol.* **49**:2279-2282.
54. **Nerandzic, M. M., and C. J. Donskey.** 2009. Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **47**:397-400.
55. **Olling, A., S. Seehase, N. P. Minton, H. Tatge, S. Schroter, S. Kohlscheen, A. Pich, I. Just, and R. Gerhard.** 2012. Release of TcdA and TcdB from *Clostridium difficile* cdi 630 is not affected by functional inactivation of the *tcdE* gene. *Microb. Pathog.* **52**:92-100.
56. **Olson, M. M., C. J. Shanholtzer, J. T. Lee, Jr., and D. N. Gerding.** 1994. Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA Medical Center, 1982-1991. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **15**:371-381.
57. **Pietzka, A. T., A. Stoger, S. Huhulescu, F. Allerberger, and W. Ruppitsch.** 2011. Gene Scanning of an Internalin B Gene Fragment Using High-Resolution Melting Curve Analysis as a Tool for Rapid Typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Mol. Diagn.* **13**:57-63.
58. **Planche, T., A. Aghaizu, R. Holliman, P. Riley, J. Poloniecki, A. Breathnach, and S. Krishna.** 2008. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review. *Lancet. Infect. Dis.* **8**:777-784.
59. **Price, E. H., V. M. Wright, J. A. Walker-Smith, and S. Tabaqchali.** 1988. *Clostridium difficile* and acute enterocolitis. *Arch. Dis. Child.* **63**:543-545.
60. **Ramesh V, Fralick JA, and Rolfe RD.** 1999. Prevention of *Clostridium difficile*-induced ileocectitis with bacteriophage. *Anaerobe* **5**:69-78.
61. **Rea, M. C., O. O'Sullivan, F. Shanahan, P. W. O'Toole, C. Stanton, R. P. Ross, and C. Hill.** 2012. *Clostridium difficile* carriage in elderly subjects and associated changes in the intestinal microbiota. *J. Clin. Microbiol.* **50**:867-875.

62. **Rupnik, M., M. H. Wilcox, and D. N. Gerding.** 2009. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**:526-536.
63. **Saito, T., S. Kimura, K. Tateda, N. Mori, N. Hosono, K. Hayakawa, Y. Akasaka, T. Ishii, Y. Sumiyama, S. Kusachi, J. Nagao, and K. Yamaguchi.** 2011. Evidence of intravenous immunoglobulin as a critical supportive therapy against *Clostridium difficile* toxin-mediated lethality in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:1096-1099.
64. **She, R. C., R. J. Durrant, and C. A. Petti.** 2009. Evaluation of enzyme immunoassays to detect *Clostridium difficile* toxin from anaerobic stool culture. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**:81-84.
65. **Stauffer, S. H., A. J. Birkenheuer, M. G. Levy, H. Marr, and J. L. Gookin.** 2008. Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* **20**:639-641.
66. **Stoesser, N., D. W. Crook, R. Fung, D. Griffiths, R. M. Harding, M. Kachrimanidou, S. Keshav, T. E. Peto, A. Vaughan, A. S. Walker, and K. E. Dingle.** 2011. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* strains in children compared with that of strains circulating in adults with *Clostridium difficile*-associated infection. *J. Clin. Microbiol.* **49**:3994-3996.
67. **Sunenshine, R. H., and L. C. McDonald.** 2006. *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen. *Cleve. Clin. J. Med.* **73**:187-197.
68. **Trudel, J. L., M. Deschenes, S. Mayrand, and A. N. Barkun.** 1995. Toxic megacolon complicating pseudomembranous enterocolitis. *Dis. Colon Rectum* **38**:1033-1038.
69. **Tyler, K. D., G. Wang, S. D. Tyler, and W. M. Johnson.** 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **35**:339-346.
70. **von Eichel-Streiber, C., R. Laufenberg-Feldmann, S. Saringen, J. Schulze, and M. Sauerborn.** 1992. Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. *Mol. Gen. Genet.* **233**:260-268.
71. **Voth, D. E., and J. D. Ballard.** 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**:247-263.
72. **Walker, A. S., D. W. Eyre, D. H. Wyllie, K. E. Dingle, R. M. Harding, L. O'Connor, D. Griffiths, A. Vaughan, J. Finney, M. H. Wilcox, D. W. Crook, and T. E. Peto.** 2012. Characterisation of *Clostridium difficile* hospital ward-based transmission using extensive epidemiological data and molecular typing. *PLoS Med.* **9**:e1001172.
73. **Weiss, K.** 2009. Toxin-binding treatment for *Clostridium difficile*: a review including reports of studies with tolevamer. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**:4-7.
74. **Wilcox, M. H.** 2011. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection: in a state of transition or confusion or both? *J. Hosp. Infect.* **79**:1-3.
75. **Wilkins, T. D., and D. M. Lyerly.** 2003. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *J. Clin. Microbiol.* **41**:531-534.
76. **Wilson, K. H., M. J. Kennedy, and F. R. Fekety.** 1982. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* **15**:443-446.

LE GUERN Rémi

Date de Soutenance : 05 juillet 2012

Titre de la Thèse : Détection de *Clostridium difficile* toxigène par biologie moléculaire avec le BD Max Cdiff RUO

Thèse, Médecine, Lille, 2012

Cadre de classement : DES de Biologie Médicale

Mots-clés : gène *tcdB*, infection à *Clostridium difficile*, ICD, diarrhée nosocomiale

Résumé :

Clostridium difficile est l'agent pathogène le plus fréquemment retrouvé en cas de diarrhée nosocomiale. Cette étude a pour but d'évaluer le BD Max Cdiff RUO, un nouvel automate en finalisation de marquage CE-IVD recherchant le gène *tcdB* dans les selles par rapport à la méthode d'immunochromatographie actuellement employée par le laboratoire de bactériologie du CHU de Lille. Les échantillons ont également été testés sur le BD GeneOhm, un autre automate détectant la présence du gène *tcdB*. La méthode de référence choisie est l'isolement en culture après choc alcoolique d'une souche de *C. difficile* toxigène.

360 échantillons de selles diarrhéiques provenant de patients hospitalisés au CHU de Lille ont été inclus de manière prospective de janvier à février 2012. La sensibilité des techniques de biologie moléculaire (97.73% pour le BD Max, 95.45% pour le BD GeneOhm) est supérieure à celle du test immunochromatographique évalué (43.18%). Les valeurs prédictives positive et négative du BD Max sont respectivement de 97.73% et 99.68% contre 95% et 92.65% pour l'immunochromatographie. Le faible rapport de vraisemblance négatif de l'immunochromatographie (RV = 0.57) ne permet pas d'éliminer une infection à *C. difficile* en cas de suspicion clinique, contrairement aux techniques de biologie moléculaire (RV < 0.1).

Le BD Max Cdiff RUO a des performances similaires à la culture toxigénique avec des résultats disponibles en seulement 2 heures au lieu de 2 à 3 jours. Un diagnostic rapide et fiable permet de traiter aussi tôt que possible une infection potentiellement létale ainsi que d'implémenter des mesures d'hygiène nécessaires à la prévention des épidémies hospitalières.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur René COURCOL

**Asseseurs : Monsieur le Professeur Luc DUBREUIL
Monsieur le Docteur Bruno GRANDBASTIEN**

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Frédéric WALLET

Adresse de l'auteur :

████████████████████
████████████████████████████████████████
████████████████
████████████████████████████████████████