




Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



INFECTIONS BACTÉRIENNES/ANTIBIOTIQUES

Diagnostic des infections à *Clostridium difficile*

Clostridium difficile *infection diagnosis*

C. Eckert ^{a,*}, V. Lalande ^{a,b}, F. Barbut ^{a,c}

^a Laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des anaérobies et du botulisme, laboratoire de bactériologie, faculté de médecine Saint-Antoine, 27, rue de Chaligny, 75571 Paris cedex 12, France

^b Service de bactériologie, hôpital Saint-Antoine, AP–HP, 184, rue du Faubourg-Saint-Antoine, 75012 Paris, France

^c Unité d'hygiène et de lutte contre les infections nosocomiales, hôpital Saint-Antoine, AP–HP, 184, rue, du Faubourg-Saint-Antoine, 75571 Paris cedex 12, France

MOTS CLÉS

Clostridium difficile ;
Toxines ;
Diagnostic ;
GDH ;
PCR en temps réel ;
Culture

KEYWORDS

Clostridium difficile;
Toxins;
Diagnosis;
GDH;
Real-time PCR;
Culture

Résumé L'incidence des infections à *Clostridium difficile* a beaucoup augmenté ces dernières années, en Amérique du Nord et en Europe, mettant au premier plan l'importance d'un diagnostic rapide et fiable. Celui-ci repose sur la mise en évidence des toxines ou d'une souche toxigène de *C. difficile* directement à partir des selles diarrhéiques. De nombreux tests sont disponibles, détectant soit les toxines, soit la bactérie ou ses composants, soit les gènes des toxines. Cependant, la multiplicité des méthodes à notre disposition ne facilite pas le choix des laboratoires d'autant plus qu'à ce jour aucune des méthodes utilisées ne répond à toutes les attentes en termes de sensibilité, spécificité, rapidité et coût. Actuellement, le meilleur compromis est obtenu en adoptant un algorithme en deux étapes, voire trois étapes.

© 2011 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Incidence of *Clostridium difficile* infections has significantly increased in the US, Canada and Europe over the last 10 years, bringing to the forefront the need of a reliable and rapid diagnosis. This diagnosis is based on toxin detection or on the recovery of a toxigenic strain in diarrhoeal stools. Many tests are now available; some can detect toxins, bacteria or their components, and some detect the toxin genes. However, the multiplicity of methods does not facilitate the choice of clinical labs; moreover, none of the methods satisfy all the criteria of an ideal method in terms of sensitivity, specificity, rapidity and cost. Currently, the best strategy is based on a 2- or 3-step approach.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abréviations

ICD infection à *Clostridium difficile*
CPM colite pseudo-membraneuse
CTA test de cytotoxicité des selles (*cytotoxicity assay*)
CT culture toxigénique

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : catherine.eckert@sat.aphp.fr (C. Eckert).

PCR réaction de polymérisation en chaîne
IEA immuno-enzymatique
GDH glutamate deshydrogénase

Introduction

Le diagnostic d'ICD connaît un regain d'intérêt depuis l'émergence, il y a quelques années, d'une souche épidémique hypervirulente et épidémiogène (souche O27/NAP1/BI) à l'origine de formes sévères d'infections et d'une mortalité accrue [1,2]. Dans le même temps, l'incidence des ICD a augmenté, aussi bien en Amérique du Nord qu'en Europe [3].

Un diagnostic rapide et fiable des ICD est devenu indispensable afin de prendre en charge les patients le plus précocement possible et d'interrompre la transmission croisée. Le diagnostic d'ICD est actuellement le sujet de nombreuses publications, soulignant le manque de sensibilité des tests IEA et essayant de définir la place des nouveaux tests moléculaires récemment commercialisés. Le choix de tests disponibles est maintenant devenu large, les cibles (toxines, gènes codant ces toxines, la bactérie en elle-même ou ses constituants) et les moyens de détection (culture cellulaire, culture sur milieux sélectifs, immuno-enzymologie, PCR classique, PCR en temps réel...) étant nombreux, toute la difficulté réside dans le choix le plus juste et le mieux adapté à chaque laboratoire.

Clostridium difficile en bref

C. difficile est un bacille à Gram positif, sporulé, anaérobie strict, retrouvé dans l'environnement ainsi que dans l'intestin de l'homme et de l'animal. Cette bactérie est responsable de 10 à 25 % des diarrhées associées aux antibiotiques et de la quasi-totalité des CPM ; elle est la principale cause de diarrhée nosocomiale chez l'adulte dans les pays industrialisés [4]. En France, l'incidence des ICD retrouvée en 2009 était de 2,28 cas pour 10 000 patient-jours en court-séjour dont 66 % étaient associées aux soins et de 1,14 en moyen/long séjour (Eckert C., 50 th ICAAC, 12 à 15 septembre 2010, Boston). Les ICD surviennent volontiers sous forme d'épidémies notamment dans certains services où la pression antibiotique est élevée (réanimation, gériatrie, maladies infectieuses). La transmission de *C. difficile* se fait à partir des mains contaminées ou de l'environnement où les spores de *C. difficile*, résistantes aux traitements de désinfection classiques, peuvent persister pendant des mois. Les principaux facteurs de risque d'ICD sont l'âge supérieur à 65 ans, la prise d'antibiotiques et les antécédents d'hospitalisation. De plus en plus de cas d'ICD sont également rapportés chez des patients a priori à faible risque, incluant des enfants, des femmes enceintes et des individus en bonne santé sans antécédent d'hospitalisation ou sans exposition préalable à des antibiotiques [5,6]. La symptomatologie des ICD est très variable, allant du portage asymptomatique à la colite fulminante pouvant aboutir à la perforation digestive et au décès du patient [7]. En 2009, l'étude ICD-Raisin a retrouvé 14 % de formes sévères en court séjour ; 4 % des patients sont décédés, *C. difficile* étant la cause principale ou constitutive du décès dans 1 % des cas (Eckert C., 50 th ICAAC, 12 à

15 septembre 2010, Boston). Les toxines A et B produites par les souches toxigènes sont les principaux facteurs de pathogénicité. Le diagnostic d'ICD repose donc sur la mise en évidence dans les selles de ces toxines, de leur gène ou d'une souche de *C. difficile* productrice de ces toxines. Afin d'interrompre la transmission de *C. difficile* de patient à patient et de prendre en charge le plus précocement possible un patient atteint d'ICD (mesures d'isolement, arrêt éventuel de l'antibiotique inducteur, traitement approprié, etc.), un diagnostic rapide et fiable est indispensable.

Définition d'une ICD

Selon les recommandations européennes, un épisode d'ICD est défini par (i) un tableau clinique compatible avec une ICD et la preuve microbiologique de la présence d'une souche de *C. difficile* productrice de toxines dans les selles sans autre cause évidente responsable de la diarrhée ou (ii) une CPM (diagnostiquée lors d'une endoscopie, après une colectomie ou à l'autopsie) [8].

Méthodes de diagnostic disponibles au laboratoire et caractéristiques

Le diagnostic microbiologique repose sur la mise en évidence soit (i) des toxines ou des gènes codant les toxines de *C. difficile* directement à partir des selles diarrhéiques soit (ii) du caractère toxigène d'une souche isolée en culture [9]. En effet, seules les souches toxigènes sont pathogènes. De nombreux tests sont disponibles (Tableau 1), certains permettent de détecter les toxines (CTA, tests IEA), d'autres permettent de détecter la bactérie (CT) ou ses composants (glutamate deshydrogénase ou GDH), enfin certains mettent en évidence les composants génétiques de la production de toxines (méthodes moléculaires). D'autres techniques comme l'endoscopie sont utilisées pour voir les effets physiopathologiques (pseudomembranes) des toxines de *C. difficile*. Il existe également des marqueurs biologiques non spécifiques d'ICD comme la lactoferrine ou les leucocytes dans les selles qui témoignent d'une inflammation colique. Ne seront détaillées ici que les méthodes microbiologiques.

Il est également important de rappeler qu'un diagnostic correct des ICD nécessite non seulement de disposer des tests de laboratoire appropriés mais aussi de connaître le contexte clinique du patient [10]. Il ne faut pas oublier que de nombreux autres pathogènes peuvent être responsables de diarrhée et une coopération étroite entre le clinicien et le biologiste est donc indispensable pour une interprétation correcte des résultats.

Les méthodes de référence (gold standards)

Le test de cytotoxicité des selles (CTA)

Le CTA est le *gold standard* « historique » choisi par la Food and Drug Administration (FDA). Il est toujours considéré comme une technique de référence pour le diagnostic d'ICD [10]. Le CTA permet de mettre en évidence les effets biologiques des toxines libres dans les selles. Il repose sur l'observation d'un effet cytopathogène (caractérisé par une ballonnisation des cellules) en culture cellulaire (principalement dû à la toxine B) à partir d'un filtrat de selles. Les

Tableau 1 Méthodes de diagnostic des infections à *C. difficile*. Avantages et inconvénients.

	Méthodes				
	Test de cytotoxicité	Tests immuno-enzymatiques détectant les toxines	Biologie moléculaire	Culture toxigénique	GDH
Cible	Toxine B (+ Toxine A)	Toxine A ou toxines A + B	<i>tcdB</i> et/ou <i>tcdA</i>	Isolement de la bactérie et détermination de son pouvoir toxigène in vitro	Glutamate deshydrogénase (GDH)
Avantages	Sensibilité ++ Spécificité +++ Méthode de référence	Spécificité +++ Rapidité	Sensibilité +++ Rapidité Identification présumptive du clone 027 (Xpert <i>C. difficile</i> , Cepheid)	Sensibilité +++ Méthode de référence Permet de réaliser un antibiogramme et de typer les souches	Sensibilité +++ Rapidité Excellente VPN
Inconvénients	Long (min 48 h) Absence de standardisation et infrastructure lourde Neutralisation de l'ECP	Coût ++ Faible sensibilité	Coût + + + Peu spécifique (détection des porteurs asymptomatiques de souches toxigènes) Présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les selles	Long Peu spécifique (détection des porteurs asymptomatiques de souches toxigènes)	Coût + Peu spécifique (détection des souches toxigènes et non toxigènes)

ECP : effet cytopathogène ; VPN : valeur prédictive négative.

cellules utilisées peuvent varier (CHO, HeP2, MRC5, Vero). Cette méthode est sensible (seuil de détection de la toxine B de l'ordre du picogramme) et peu coûteuse mais comporte néanmoins de nombreux inconvénients. Elle requiert une infrastructure adaptée à la culture cellulaire et elle est longue (24 à 48 heures) ; elle nécessite de neutraliser l'effet cytopathogène obtenu par des anticorps afin de s'assurer de la spécificité de cet effet et enfin elle n'est pas standardisée. Très récemment, des essais de mesure de l'effet cytopathogène ont été réalisés s'appuyant sur la technique du *real time cell analysis* (RTCA) (ACEA Biosciences) qui utilise la technologie de l'impédance électronique et permet de détecter des changements dans la morphologie des cellules [11].

La culture toxigénique

La CT est également considérée comme un *gold standard* [12]. Cette technique en deux étapes consiste d'abord à isoler *C. difficile* sur des milieux sélectifs, puis à déterminer le caractère toxigène in vitro de la souche isolée.

La culture. Différents milieux de culture permettent l'isolement des souches de *C. difficile*. Les milieux disponibles sur le marché contiennent généralement une base gélosée

cœur cervelle additionnée d'antibiotiques (cyclosérine et céfoxitine). La sensibilité de la culture est de l'ordre de 2000 bactéries/g de selles. Certains milieux contiennent du taurocholate ou du lysozyme favorisant la germination des spores et qui permettent d'augmenter la sensibilité de la méthode [13]. Certains auteurs préconisent de procéder à un choc thermique ou à un choc alcoolique, favorisant la sélection des spores et ensuite d'utiliser des milieux contenant des facteurs de germination.

L'identification d'une souche de C. difficile. Après 48 heures d'incubation à 37 °C en anaérobiose, les colonies de *C. difficile* ont un aspect caractéristique en tâche de bougie (Fig. 1), avec une odeur facilement reconnaissable dite de « crottin de cheval ». Les colonies présentent une fluorescence « vert chartreuse » à la lumière ultra-violette. À la coloration de Gram, des bacilles à Gram positif sporulés (spore subterminale peu déformante) sont observés (Fig. 2). L'identification de *C. difficile* peut se faire par différentes techniques telles que l'analyse des caractères biochimiques (galeries pour bactéries anaérobies), la mise en évidence d'acides gras volatils par chromatographie en phase gazeuse (acide isocaproïque), l'utilisation de test d'agglutination avec un latex sensibilisé par un antigène

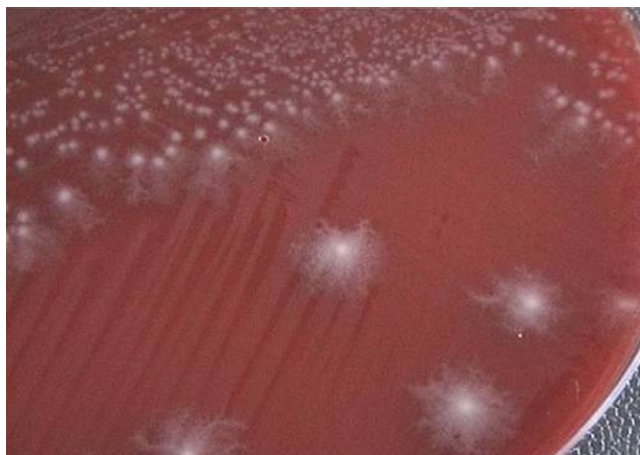


Figure 1 Aspect de *C. difficile* en culture. Cliché D. Decré.

de paroi commun à *C. difficile*, *C. sordellii* et *C. bifermentans*, l'utilisation d'un disque de proline ou encore l'utilisation de la PCR ARN16S.

La détermination du pouvoir toxigène. Le caractère toxigène d'une souche de *C. difficile* peut-être déterminé par différentes méthodes. La méthode de choix est le test de culture cellulaire à partir des colonies de *C. difficile* (suspension dense de colonies ou bouillon ensemencé).

Le caractère toxigène peut également être déterminé par la réalisation de PCR ciblant les gènes des toxines A et B directement à partir des colonies (après extraction de l'ADN).

Enfin, il existe une dernière méthode (qui n'est pas toujours validée par les fabricants) qui consiste à réaliser un test IEA à partir des colonies.

Il est important dans tous les cas de prendre plusieurs colonies (en général cinq), des co-infections par des souches toxigènes et non toxigènes ayant été décrites.

La CT présente les mêmes inconvénients que la CTA à savoir la nécessité de disposer d'une infrastructure et d'une



Figure 2 *C. difficile* à la coloration de Gram. Cliché F. Barbut.

expertise appropriées, et du délai assez long (minimum 48 heures) avant d'obtenir un résultat. La sensibilité de la CT peut également varier en fonction du milieu utilisé ou de l'utilisation de procédures préalables comme le choc alcoolique ou le choc thermique pour induire la germination des spores. Enfin, cette technique peut s'avérer « trop sensible » et détecter des patients porteurs mais non infectés. En effet la CT permet de documenter la toxigénicité des souches dans les situations où les toxines libres n'ont pas été détectées dans les selles. L'interprétation du résultat peut s'avérer délicate sachant que le pourcentage de porteurs asymptomatiques dans la population générale est de moins de 3 % mais qu'il peut atteindre 20 à 30 % chez le patient hospitalisé ; néanmoins, s'il est vrai que l'isolement d'une souche toxigène ne prouve pas formellement que le patient est infecté, il en demeure cependant la cause la plus probable [14]. Gerding et al. ont montré que 11 % des patients diarrhéiques porteurs d'une souche toxigène et pour lesquels la présence de toxine dans les selles n'a pu être mise en évidence, présentent des pseudomembranes à l'endoscopie témoignant d'un réel processus infectieux [14]. L'étape de culture préalable permet de disposer de la souche de *C. difficile* qui reste essentielle pour le typage lors d'investigation de cas groupés ou de formes sévères d'ICD. L'intérêt de la culture de *C. difficile* repose également sur la possibilité de réaliser un antibiogramme et de surveiller la résistance aux antibiotiques. La résistance au métronidazole reste exceptionnelle ; cependant, l'émergence de souches de sensibilité diminuée a notamment été rapportée au Royaume-Uni [8,15]. La CT reste donc utile pour la validation de nouvelles méthodes diagnostiques et pour les études épidémiologiques.

La glutamate deshydrogénase (GDH)

La GDH est une enzyme produite par les souches de *C. difficile*. La détection de cette enzyme par des tests IEA (unitaires ou en plaques de microtitration) dans les selles permet de renseigner sur la présence de la bactérie. Cette méthode est sensible (de l'ordre de 88 à 89 % comparée à la culture) mais manque de spécificité [10]. En effet, la GDH est produite aussi bien par les souches toxigènes que les souches non toxigènes de *C. difficile* : elle représente donc un bon marqueur de la présence de *C. difficile* dans les selles mais ne permet pas de prédire le caractère pathogène de la souche qui devra être confirmé ou infirmé par un deuxième test. La GDH représente donc une bonne méthode de dépistage avec une valeur prédictive négative excellente [16,17] ; un résultat négatif permettant d'exclure le diagnostic d'ICD. Pourtant, il a été récemment rapporté que la sensibilité de cette méthode de détection dépendrait du type de souche. En effet, selon le PCR-ribotype concerné, la sensibilité des algorithmes utilisant la GDH pourrait varier : elle serait significativement plus faible que celle de GeneXpert pour les PCR-ribotypes autres que 027 [18]. Ces résultats préoccupants méritent d'être confirmés par d'autres études.

Les méthodes immuno-enzymatiques

Historiquement, les tests IEA détectaient soit la toxine A soit les toxines A et B. Ces tests ont progressivement été rem-

placés par les tests détectant simultanément les deux toxines. Il est en effet devenu rapidement indispensable de détecter les deux toxines A et B en raison de l'existence de souches ne produisant que la toxine B (toxine A-négative, toxine B-positive ou A⁻B⁺) dont la prévalence est variable selon les pays et qui peuvent être à l'origine d'épidémies [19,20]. Chez les souches A⁻B⁺, une partie du gène de la toxine A est manquante et les tests IEA basés sur la seule détection de la toxine A ne détectent pas ces souches car ils utilisent des anticorps reconnaissant un épitope codé par cette région manquante.

Il existe plusieurs formats pour ces tests : tests unitaires immuno-chromatographiques ou tests en plaque de 96 puits.

Du fait de leur simplicité d'utilisation et de leur rapidité, ces tests IEA sont largement utilisés par les laboratoires. L'étude ICD-Raisin 2009 a montré que 95,2 % des laboratoires ont recours aux tests IEA. Leur spécificité est en général élevée (> 97 %) mais leur sensibilité est faible, allant en moyenne de 72 à 82 % comparée au test de cytotoxicité et de 52 à 66 % comparée à la CT [10]. Cette sensibilité varierait en fonction du type de souche et serait significativement plus faible que celle de GeneXpert pour les PCR-ribotypes 002, 027 et 106 [18]. Ces tests ne représentent donc qu'une alternative suboptimale pour faire le diagnostic d'ICD et ils ne peuvent être recommandés aujourd'hui comme seule méthode de diagnostic. Pourtant, 38,8 % des laboratoires français reconnaissent utiliser les tests IEA comme seul moyen de diagnostic.

Les méthodes moléculaires

Les techniques de PCR en temps réel

Plusieurs tests de PCR en temps réel ont été récemment commercialisés. Ils détectent les gènes codant les toxines directement à partir des selles. Ceux de BD (BDGeneOhm *C. diff*) et Prodesse (ProGastro Cd) ciblent une région conservée de *tcdB*. RIDA[®]GENE (R-Biopharm) est un test de PCR en temps réel qui permet la détection de fragments de gènes spécifiques de *C. difficile* et de ses toxines A et B dans les selles. Enfin, le test commercialisé par Cepheid, Xpert *C. difficile*, permet la détection simultanée des gènes codant la toxine B, la toxine binaire ainsi que la délétion en 117 sur le gène *tcdC*, marqueur présomptif de la souche 027. De nombreuses évaluations concernant des PCR en temps réel « maison » ont également été publiées.

Ces méthodes sont à la fois sensibles (avec une sensibilité moyenne de 92 % comparée au CTA et de 86 % comparée à la CT), et rapides [10]. Les premières évaluations de ces méthodes sont encourageantes et elles seront probablement amenées à prendre une place prépondérante dans l'arsenal diagnostic. Elles présentent néanmoins un certain nombre d'inconvénients à commencer par leur prix qui reste élevé. Par ailleurs, le risque de faux négatifs suite à l'évolution des souches est à craindre (mutations, délétions au niveau des cibles) et devra être surveillé. En ce qui concerne l'identification présomptive de la souche 027, il faut savoir que ce n'est pas la seule souche à avoir disséminé et à être responsable de formes sévères d'infections ; selon les pays, d'autres souches sont associées à des complications (PCR-ribotypes 018 et 056) [21]. Une étude récente rapporte également la faible valeur prédictive positive de ces techniques de PCR [22]. De plus, ces méthodes ne détectent pas les toxines libres dans les selles mais le gène des toxines. Comme

dans le cas de la CT, l'interprétation du résultat peut s'avérer délicate ; le portage asymptomatique d'une souche de *C. difficile* toxinogène peut être fréquent et la diarrhée est un symptôme relativement courant, en particulier chez les personnes âgées (prise d'antibiotiques fréquente, laxatifs, exposition à certains virus comme les norovirus). La sélection appropriée des échantillons et l'histoire clinique restent primordiales, sous peine d'une interprétation erronée des résultats.

La technologie LAMP

Le test Illumigène[™] *C. difficile* (Illumigène *C. difficile*, Meridian Bioscience) utilise la technique de l'amplification isotherme de l'ADN facilitée par boucle ou *loop-mediated isothermal DNA amplification* (LAMP) et cible une partie conservée du gène de la toxine A présente chez les souches toxinogènes y compris les souches A⁻B⁺. Les premières données suggèrent que les performances de ce test sont comparables à celles des méthodes basées sur la PCR en temps réel (sensibilité 91,8 % et spécificité 99,1 % comparativement à la CT) (Lalande V., 50 th ICAAC, 12 à 15 septembre 2010, Boston). Les mêmes difficultés d'interprétation que la PCR en temps réel sont retrouvées. Cet essai a l'avantage d'être rapide et de ne pas recourir à un équipement coûteux ce qui pourrait faire de ce test une option particulièrement attractive pour les laboratoires qui ne font pas de biologie moléculaire.

La sérologie

Aucun test permettant le dosage d'anticorps sériques anti-toxines A et B n'est pour l'instant commercialisé bien que l'importance de la réponse immunitaire dans la résistance à l'infection et la protection contre les récurrences a clairement été établie [23–25].

Algorithmes

Il existe depuis l'émergence d'épidémies d'ICD et le développement de nouvelles technologies, un large choix de méthodes. Malheureusement à ce jour, aucune méthode de diagnostic n'est à la fois rapide et fiable pour un coût raisonnable : la CT et le CTA sont trop longs, la détection de la GDH n'est pas assez spécifique, les tests IEA ne sont pas suffisamment sensibles et les tests de biologie moléculaire sont trop chers. Pour pallier à cette insuffisance, des algorithmes ont été proposés afin d'optimiser au mieux la balance entre coût, sensibilité et spécificité.

Un algorithme en deux, voire trois étapes, est actuellement préconisé par les recommandations américaines et européennes pour un diagnostic optimal en termes de sensibilité, spécificité, rapidité et coût (Fig. 3). Un premier test avec une très bonne sensibilité et une valeur prédictive négative excellente telle que la détection de la GDH permettrait d'éliminer rapidement tous les négatifs et écarterait ainsi le diagnostic d'ICD. Cette étape de dépistage par la GDH réduit considérablement le nombre d'échantillons qui requièrent une évaluation avec des méthodes plus spécifiques. Les résultats positifs, du fait de la faible valeur prédictive positive du premier test, sont en revanche à confirmer mais il n'y a pas à ce jour de consensus sur le choix du deuxième test (test IEA, méthodes moléculaires ou

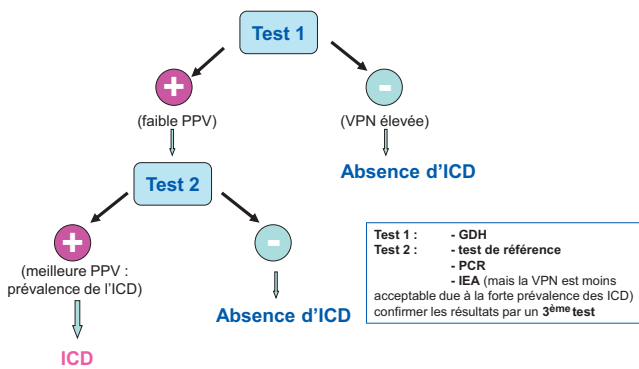


Figure 3 Algorithme de diagnostic des infections à *C. difficile*. VPP : valeur prédictive positive. VPN : valeur prédictive négative.

CT). Le choix d'un test IEA dont la valeur prédictive positive est augmentée lorsqu'il est appliqué à un échantillon de selles sélectionnées où la prévalence de l'infection est plus importante, nécessite cependant la réalisation d'un troisième test sur les selles négatives (car la valeur prédictive négative du test IEA diminue). Seuls 5,8 % des laboratoires français appliquent actuellement une telle stratégie basée sur l'utilisation de la GDH en test de *screening* (données ICD-Raisin 2009). La performance globale des algorithmes basés sur la GDH dépend des tests secondaires utilisés.

L'utilisation de méthodes moléculaires comme outil diagnostique semble très prometteuse mais nécessite plus de recul avant de pouvoir être recommandée en routine [12] et reste prohibitif en raison de leur coût.

Bonnes pratiques

Le prélèvement

Le prélèvement est un élément primordial du diagnostic, et ce dernier ne devrait être réalisé que sur des selles non moulées, c'est-à-dire prenant la forme du contenant [10,12]. Idéalement le prélèvement doit être analysé dans les deux heures après l'émission de la selle ou être gardé jusqu'à trois jours à +4 °C. La recherche des toxines de *C. difficile* peut également être réalisée à partir de liquide intestinal prélevé sous endoscopie.

La règle des trois jours

Il ne faut pas oublier que la recherche de *C. difficile* ne fait pas partie de la coproculture standard et se fait sur prescription spécifique du clinicien. Il est donc important que les laboratoires appliquent la règle des trois jours qui consiste à rechercher systématiquement les toxines de *C. difficile* sur les selles diarrhéiques des patients hospitalisés depuis trois jours ou plus [10]. Toute diarrhée d'origine nosocomiale, a fortiori si elle est associée aux antibiotiques, devrait faire penser à une ICD. D'après les données de l'étude ICD-Raisin 2009 portant sur 103 établissements de court séjour, deux tiers des laboratoires réalisent encore le diagnostic d'ICD uniquement sur prescription spécifique du clinicien. Seuls 8,7 % des laboratoires recherchent systématiquement la présence de *C. difficile* ou de ses toxines sur les selles correspondant à des diarrhées nosocomiales.

La répétition des tests est inutile

Pour pallier au manque de sensibilité de certains tests, les cliniciens demandent souvent plusieurs fois la recherche de *C. difficile* ; or la répétition des tests dans les sept jours suivant un premier résultat négatif est en général inutile, le gain apporté étant très limité quelle que soit la méthode utilisée [12,26,27].

Les porteurs asymptomatiques et le contrôle après traitement

Il est inutile de détecter les porteurs asymptomatiques [12]. Un portage asymptomatique de *C. difficile* est retrouvé chez 3 % de la population et ce chiffre peut être beaucoup plus élevé chez le patient hospitalisé. Lors d'une étude prospective, McFarland et al. ont montré que 21 % des patients hospitalisés acquièrent *C. difficile* au cours de leur hospitalisation et que parmi ceux-ci, 37 % seulement développent une diarrhée liée à ce germe [4]. L'acquisition nosocomiale de *C. difficile* est plus fréquente que ne l'est l'infection. Ce dépistage est d'autant plus inutile qu'il a été montré que ni la vancomycine ni le métronidazole ne permettaient l'éradication du portage [28].

Il n'est pas recommandé de réaliser des tests de contrôle après traitement [12]. En effet, 40 % des patients qui ont répondu cliniquement, après un traitement bien conduit, présenteront encore des résultats positifs. La guérison est affirmée sur les seuls critères cliniques.

Conclusion

Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de diagnostic idéale capable de répondre aux besoins de tous. La solution passe probablement par la combinaison de plusieurs tests.

Pour conclure, « si de nombreux tests sont recommandés pour une pathologie donnée, vous devriez en déduire que la maladie est difficile à diagnostiquer » : c'est peut-être cette phrase de Ferric C. Fang qui traduit le mieux la complexité du diagnostic d'ICD [29].

Déclaration d'intérêts

Catherine Eckert : BD, Cepheid ; Frédéric Barbut : BD, Cepheid, BioMérieux ; Valérie Lalande : Meridian bioscience, BioMérieux, Alere.

Références

- [1] Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, et al. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Euro Surveill* 2007;12(6):E1-2.
- [2] Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005;353:2442-9.
- [3] Dubberke ER, Butler AM, Yokoe DS, et al. Multicenter study of *Clostridium difficile* infection rates from 2000 to 2006. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(10):1030-7.
- [4] McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, et al. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989;320(4):204-10.

- [5] Wilcox, MH, Mooney L, Bendall R, et al. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(2):388–96.
- [6] Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(7):526–36.
- [7] Barbut F, Beaugerie L, Petit JC. « *Clostridium difficile* » et pathologie digestive. EMC (Elsevier Masson SAS Paris) Maladies infectieuses 2008. 8-038-H-20.
- [8] Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15(12):1067–79.
- [9] Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008;46 (Suppl. 1):S12–8.
- [10] Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 2009;15(12):1053–66.
- [11] Ryder AB, Huang Y, Li H, et al. Assessment of *Clostridium difficile* infections by quantitative detection of tcdB toxin by use of a real-time cell analysis system. *J Clin Microbiol* 2010;48(11):4129–34.
- [12] Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(5):431–55.
- [13] Nerandzic MM, Donskey CJ. Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2009;47(2):397–400.
- [14] Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis in adults. A prospective case-controlled epidemiologic study. *Arch Intern Med* 1986;146(1): 95–100.
- [15] Brazier JS, Raybould R, Patel B, et al. Distribution and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in English hospitals, 2007–08. *Euro Surveill* 2008; 13(41).
- [16] Reller ME, Alcabasa RC, Lema CA, et al. Comparison of two rapid assays for *Clostridium difficile* Common antigen and a *C. difficile* toxin A/B assay with the cell culture neutralization assay. *Am J Clin Pathol* 2010;133(1):107–9.
- [17] Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, et al. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3):1145–9.
- [18] Tenover FC, Novak-Weekley S, Woods CW, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. *J Clin Microbiol* 2010;48(10):3719–24.
- [19] Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, et al. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 2002;40(6):2079–83.
- [20] Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. *Int J Infect Dis* 2007;11(1):5–10.
- [21] Bauer, MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 2011;377(9759):8–9.
- [22] Knetsch CW, Bakker D, de Boer RF, et al. Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol* 2011;49(1):227–31.
- [23] Kyne L, Warny M, Qamar A, et al. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 2000;342(6):390–7.
- [24] Kyne L, Warny M, Qamar A, et al. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357(9251):189–93.
- [25] Lowy I, Molrine DC, Leav BA, et al. Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 2010;362(3):197–205.
- [26] Aichinger E, Schleck CD, Harmsen WS, et al. Nonutility of repeat laboratory testing for detection of *Clostridium difficile* by use of PCR or enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2008;46(11): 3795–7.
- [27] Luo RF, Banaei N. Is repeat PCR needed for diagnosis of *Clostridium difficile* infection? *J Clin Microbiol* 2010;48(10): 3738–41.
- [28] Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 1997;92(5):739–50.
- [29] Wilcox MH, Planche T, Fang FC. Point-Counterpoint: what is the current role of algorithmic approaches for the diagnosis of *C. difficile* infection? *J Clin Microbiol* 2010;48(12):4347–53.