

Clostridium difficile : apport des nouvelles techniques diagnostiques : aide ou dérive ?

C. Eckert

Laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des Bactéries Anaérobie
Hôpital Saint Antoine, Paris



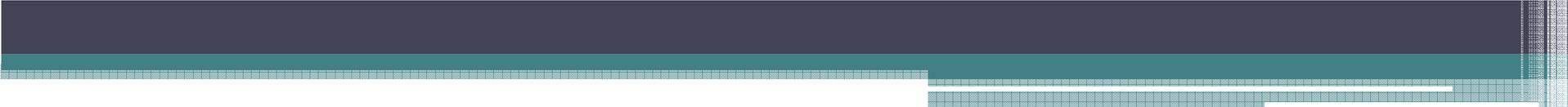
**III^{ème} Journée de Formation en antibiothérapie
Sous l'égide de L'Institut Maurice Rapin
Antibiothérapie et Résistance**

05 décembre 2013



Conflits d'intérêts

- bioMérieux
- DiaSorin
- Biosynex
- BD
- Cepheid
- R-Biopharm
- Eurobio
- Quidel Molecular
- Theradiag



Nouvelles techniques diagnostiques

- Principes généraux du diagnostic des infections à *Clostridium difficile* (ICD)
- Place des méthodes moléculaires
- Impact des méthodes moléculaires
- Détection des toxines libres?

Diagnostic des ICD

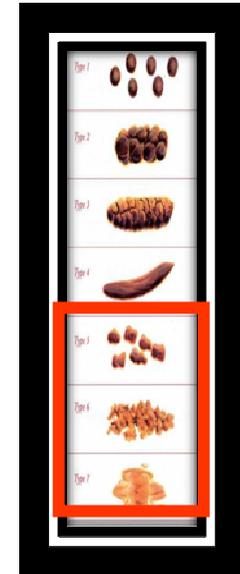
- **Définition** : **tableau clinique compatible** avec une ICD et la preuve microbiologique de la présence d'une **souche de *C. difficile* productrice de toxines** dans les selles sans autre cause évidente de diarrhée ou présence d'une **CPM**
(Bauer, CMI 2009)
- **Le diagnostic doit être rapide et fiable**
 - Prise en charge du patient
 - Prévention de la transmission nosocomiale
 - Précision des données épidémiologiques
- **Critères de choix pour une méthode diagnostique:**
 - Spécificité
 - Sensibilité
 - Rapide
 - Peu coûteux
 - Simple



**Aucune des méthodes actuelles
ne satisfait tous ces critères**

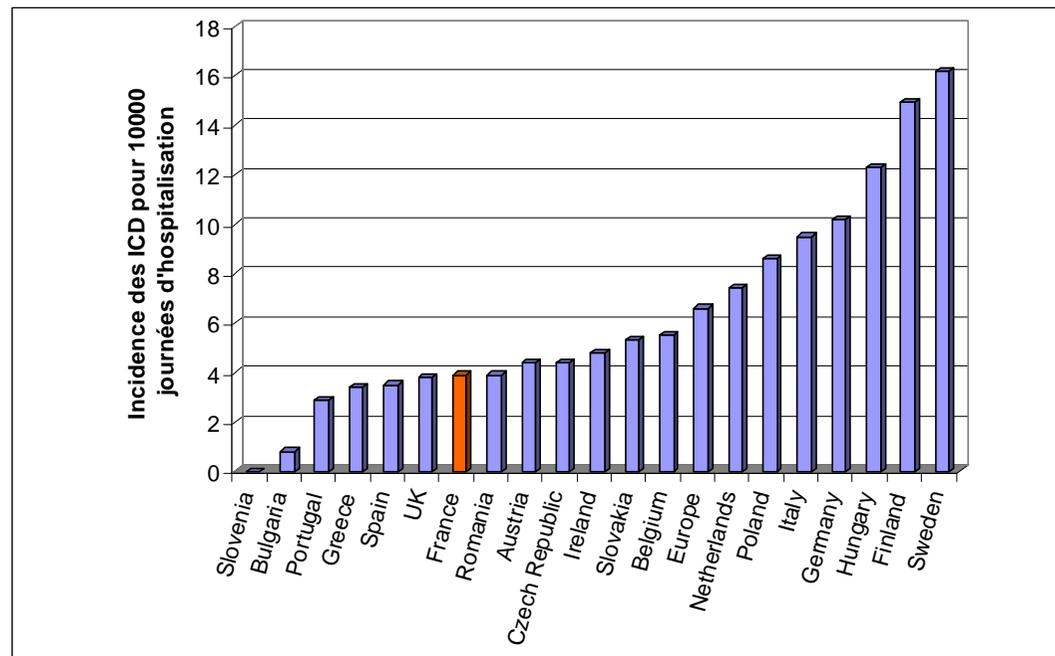
Diagnostic des ICD: ce qu'il faut savoir

- Selles **diarrhéiques** (échelle de Bristol, aspect 5, 6 ou 7)
- **Eviter la répétition des tests** dans les 7 jours :
 - La répétition des tests est une **pratique courante- Cher**
 - **Gain faible** quelle que soit la méthode utilisée (<2% en général) (Aichinger, JCM 2008)
 - Augmentation du nombre de **faux positifs (diminution de la VPP)** (Litvin ICHE 2009)
- **Pas de contrôle après traitement**
 - Spores détectables chez **7%** (2/28) des pts à la **fin du tt** (Sethi *et al.* ICHE 2010)
 - Cultures positives chez **56%** (15/27) après **1 à 4 sem après l'arrêt du tt**
- « **Règle des 3 jours** » : toutes les diarrhées nosocomiales devraient faire l'objet d'une recherche de *C. difficile*, quelle que soit la demande du clinicien
- **Tests EIA : sensibilité insuffisante**, ne devraient pas être utilisés comme seule méthode diagnostique
- **Interaction avec le clinicien**



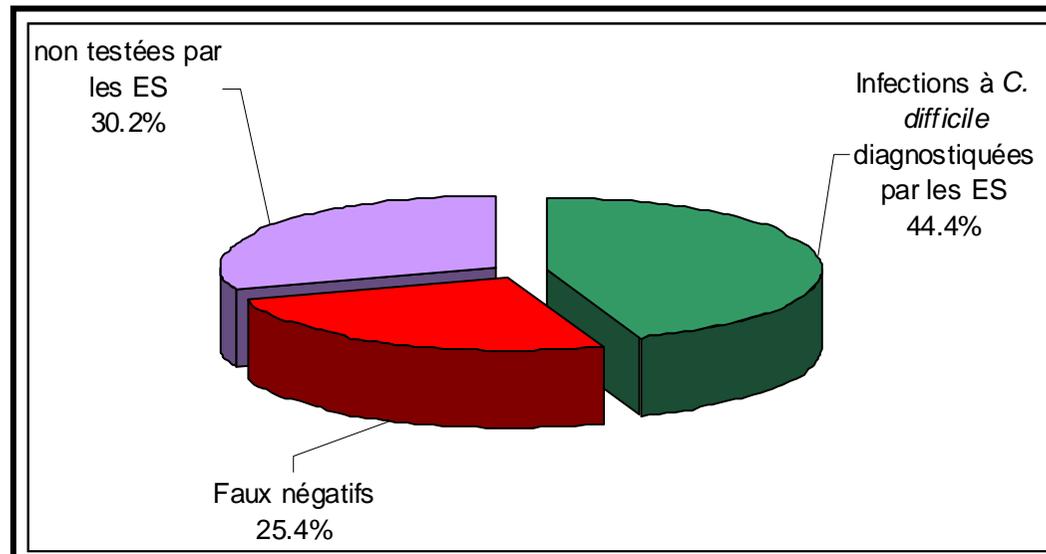
Le diagnostic en France : un état des lieux

- Enquête européenne de prévalence des infections à *Clostridium difficile* chez les patients hospitalisés avec une diarrhée : étude **EUCLID**
- 70 ES - 664 selles
- Incidence 3,6/10 000 pts-jours



Le diagnostic en France : un état des lieux

- Utilisation seule de EIA Tox A/B : 14.3% en 2012 vs 39% en 2009
- Utilisation des **tests moléculaires** : **36%** en 2012 vs 3% en 2009
- **Sous-détection** des ICD en France de **55.6%** dûe :
 - à défaut de sensibilité de la méthode de diagnostic (résultat faux négatif) (25.4%)
 - ou un manque de sensibilisation des cliniciens (selles non testées) (30.2%)



Diagnostic des ICD

2 méthodes de référence

Test de cytotoxicité des selles
(CTA)



Toxine libre (toxine B et A)

Très spécifique

⇒ **signe la maladie**

moins sensible

CPM chez 11% de pts sans toxine libre (CTA-)

(Gerding *et al.* Arch Intern Med 1986)

Culture toxigénique
(CT)



Souche toxigène

Très sensible

moins spécifique

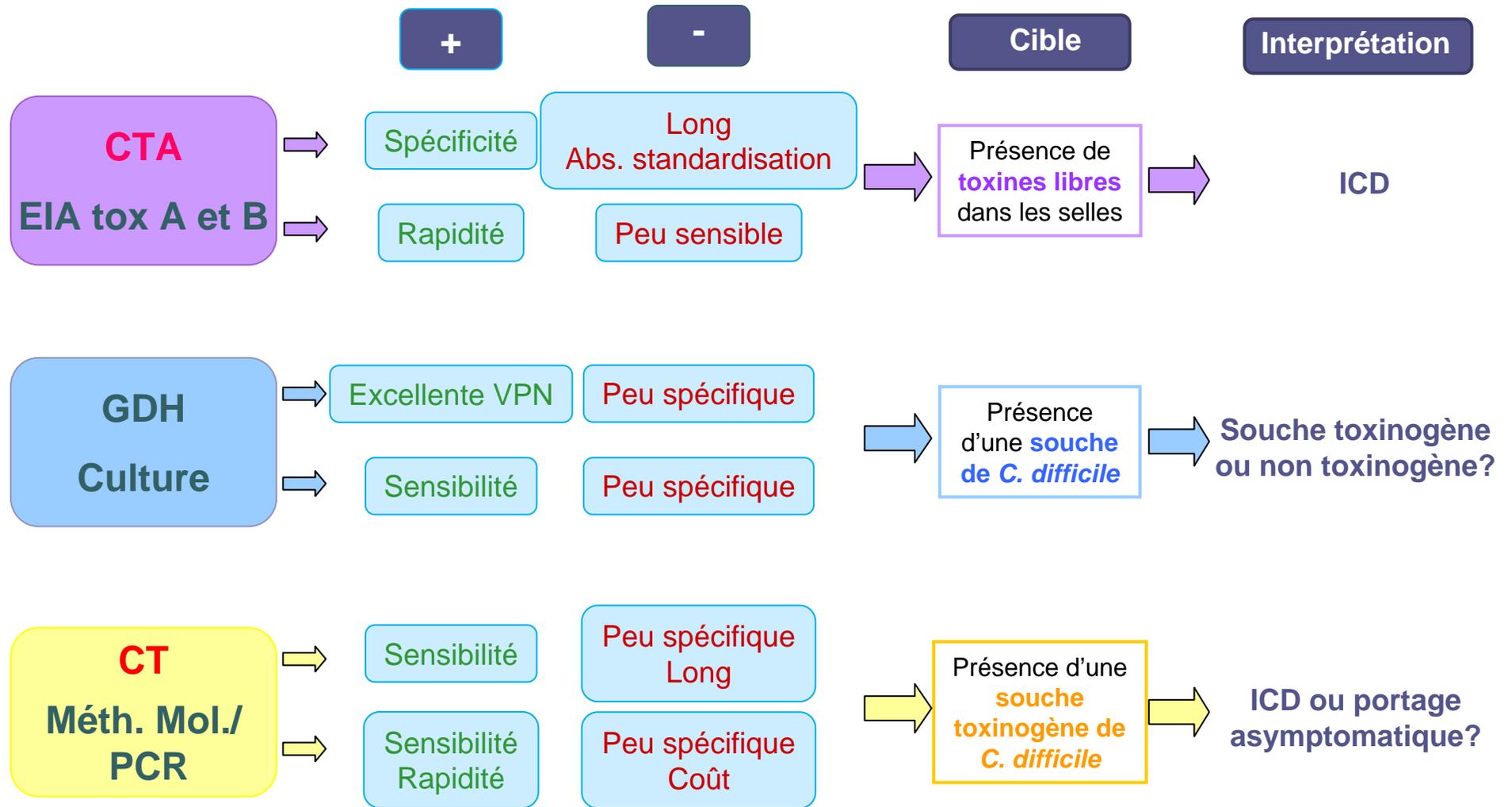
⇒ **Colonisation ou infection?**

Portage fréquent de *C. difficile* à l'hôpital

La **diarrhée peut être fréquente** (laxatifs, norovirus, ATB...)

Cible différente

Différentes méthodes diagnostiques



➔ **Cibles différentes**

Les méthodes moléculaires

Illumigene® C. difficile*
Meridian Bioscience



Amplification isotherme en boucle LAMP

tcdA

AmpliVue
Quidel® Molecular



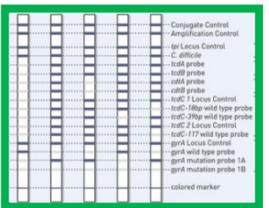
Amplification isotherme hélicase-dépendante (Biohelix®)



PaLoc

Plusieurs cibles

GenoType Cdifff
Hain lifescience



Xpert® C. difficile*
Cepheid



RIDA®GENE
Clostridium difficile
& Toxin A/B
R-Biopharm



Simplexa™ C. difficile
Universal Direct*
FOCUS Diagnostics



tcdB

Prodesse ProGastro Cd assay*
Gen-Probe



BD GeneOhm™ Cdiff Assay*
BD



Seeplex® Diarrhea ACE Detection
Seegene



Portrait Toxicogenic C. difficile Assay*
Portrait, Great Basin



Amplification isotherme hélicase-dépendante

BD MAX™ Cdiff
BD



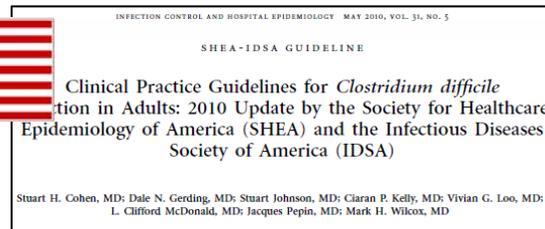
GREAT BASIN CORPORATION

Les méthodes moléculaires : recommandations

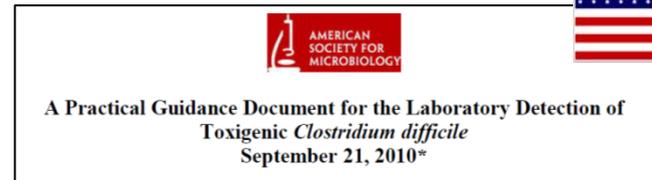
- Comparée à la culture toxigénique, tous les tests ont une sensibilité trop basse à l'exception des méthodes moléculaires (ESCMID)



- A évaluer (SHEA/IDSA)



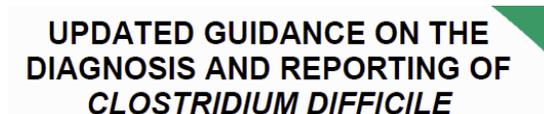
- Possibles comme seule méthode diagnostique (ASM)



- Sensibles et spécifiques mais chères (ASID)



- Screening (DH/ARHAI)



- Supérieures aux tests EIA (Surawicz et al.)

Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infections



Christina M. Surawicz, MD¹, Lawrence J. Brandt, MD², David G. Binion, MD³, Ashwin N. Ananthakrishnan, MD, MPH⁴, Scott R. Curry, MD⁵, Peter H. Gilligan, PhD⁶, Lynne V. McFarland, PhD⁷, Mark Mellow, MD⁸ and Brian S. Zuckerbraun, MD⁹

Les méthodes moléculaires: méthodes sensibles

Auteurs (année)	Test	Nb éch.	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Gold standard	Préval. (%)
Barbut <i>et al</i> (2009)	BD GeneOhm™ Cdiff Assay	300	93,9	97,7	CT	11
Stamper <i>et al</i> (2009)		401	83,6	98,2	CT	15,2
Knetsch <i>et al</i> (2010)		526	88,3	96,9	CT	19,2
Le Guern <i>et al</i> (2012)	BD MAX Cdiff	360	97,7	99,7	CT	12,2
Novak Weekley <i>et al</i> (2010)	Xpert® C. difficile	432	94,4	96,3	CT	16,7
Shin <i>et al</i> (2012)		253	100	94,6	CT	19,4
Stamper <i>et al</i> (2009)	Prodesse ProGastro Cd assay*	285	77,3	99,2	CT	15,7
Lalande <i>et al</i> (2012)	Simplexa™ C. difficile	301	85	99	CT	14,9
Lalande <i>et al</i> (2011)	Illumigene® C. difficile	472	91,8	99,1	CT	10,4
Noren <i>et al</i> (2011)		272	98	98	CTA (CT disc.)	18,4
Eckert <i>et al</i> (2013)	AmpliVue Quidel® Molecular	308	91,7	100	CT	11,7
Shin <i>et al</i> (2012)	Seeplex® Diarrhea ACE Detection	243	90	97,1	CT	28,8
Buchan <i>et al</i> (2012)	Portrait Toxigenic C. difficile Assay	540	98,2	92,8	CT	20,6
Eckert <i>et al</i> (2011)	RIDA®GENE Toxin A/B	462	81,4	97,6	CT	9,3

Les méthodes moléculaires: méthodes sensibles

- **Augmentation de l'incidence...?**

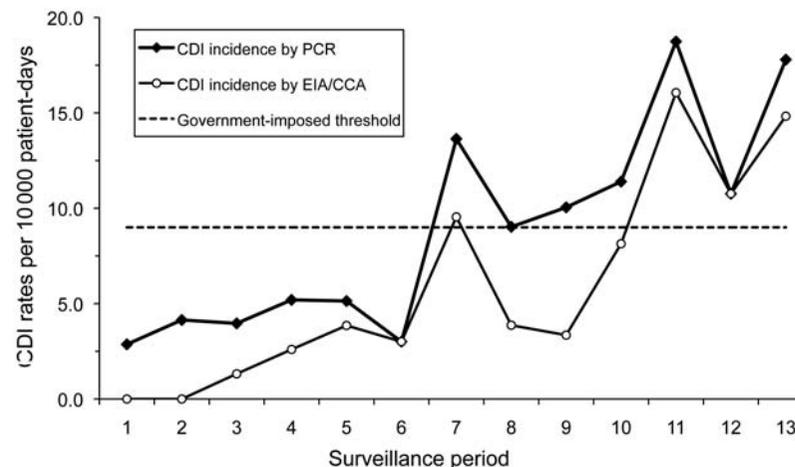
- 10,3 cas pour 10 000 pts-j (PCR) versus 4,9 (EIA) (Fong *et al.* ICHE 2011)
- **Augmentation de 50%** : 8,9/10 000 pts-j (PCR) versus 5,8 (GDH-toxine + CTA) (Longtin *et al.* CID 2012)

TABLE 1. Results of Testing of Consecutive Stool Samples for *Clostridium difficile* Using Enzyme Immunoassay (EIA) Toxin and Polymerase Chain Reaction (PCR) during a 3-Month Period

	EIA	PCR	<i>P</i>
No. of lab specimens	2,579	2,534	
Mean no. (%) positive	167 (6.5)	382 (15.1)	<.001
CDI rates ^a	4.9	10.3	<.001

NOTE. EIA toxin used before October 19, 2010, and PCR used after. CDI, *Clostridium difficile* infection.

^a Cases per 10,000 patient-days.



Les méthodes moléculaires: méthodes rapides

- Impact sur la prise en charge du patient? Changement des pratiques Atb?

- Etude prospective, Hôpital Saint Antoine, 750 lits, 3 périodes de 3 mois, (Barbut *et al.* CMI 2013)

Patients sans ICD



	P1 (CTA+TC) (N=329)	P2 (Xpert) (N=336)	P3 (GDH + III) (N=340)	p
Tps restitution résultats : heures, moy ± ET	84.9 ± 22.9	15.6 ± 16.8 (4)	17.3±22.9 (6)	< 0.0001
Ttnt empirique VA ou MTZ, n (%)	44 (13.6%)	21 (6.4%)	19 (5.6%)	0.0002
Tps (j) pour arrêt ttnt injustifié mean ± SD	5.5 ± 3.3	3.6 ± 4.2 (2)	3.8 ± 4.6 (2)	0.09
Nb j ttnt injustifié	243	75	73	
Précautions contact n (%)	18 (5.6%)	10 (3.1%)	15 (4.4%)	0.28
Durée précautions contact (j) moy ± ET	4.5 ± 1.8	4.7 ± 6.8 (1.5)	3.7 + 3.6 (2)	0.08
Nb j précautions contact injustifiées	82	47	55	

Patients avec ICD

	P1 (CTA+TC) (n=36)	P2 (Xpert) (n=45)	P3 (GDH + III) (n=45)	p
Tps restitution résultatsHeures, moy ± ET	75.7 + 61.9	15.4 + 15.4	31.4 + 38.7	<0.0001
Ttnt spécifique VA ou MTZ, n (%)	29 (80.6%)	42 (93.3%)	38 (84.4%)	0.21
Tps (j) entre Dg et ttnt spécifique moy± ET	2.00 + 1.68	0.49 + 0.56	1.03 + 1.80	0.0003
Précautions contact, n (%)	29 (80.6%)	42 (93.3%)	34 (77.3%)	0.09
Durée d'hospi (j) Moy ± ET	30.3 + 36.3	23.2 + 25.4	26.9 + 28.9	0.56

Les méthodes moléculaires: méthodes rapides et sensibles

- **Diminution des ICD nosocomiales?**
 - Catanzaro *et al.* (AJIC 2011) diminution des ICD nosocomiales durant la période PCR vs période EIA 0,9 vs 4,4/10 000 pts-j p=0,02

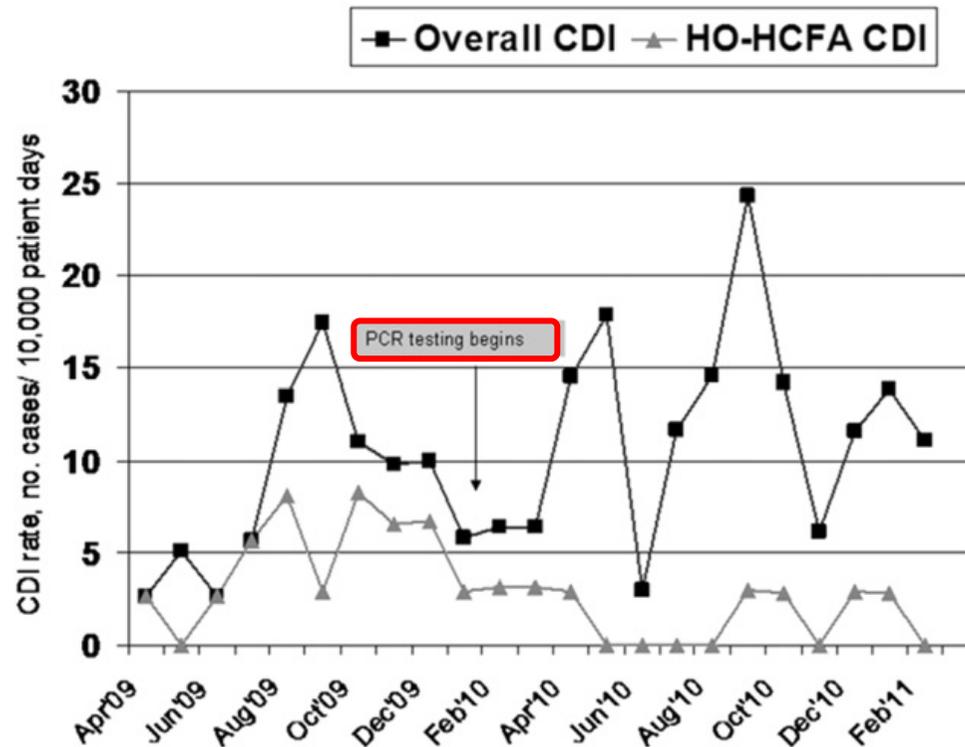
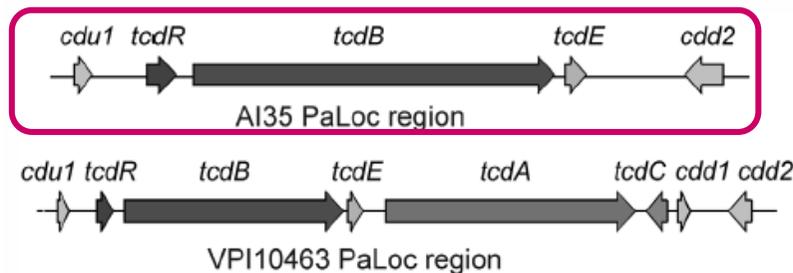
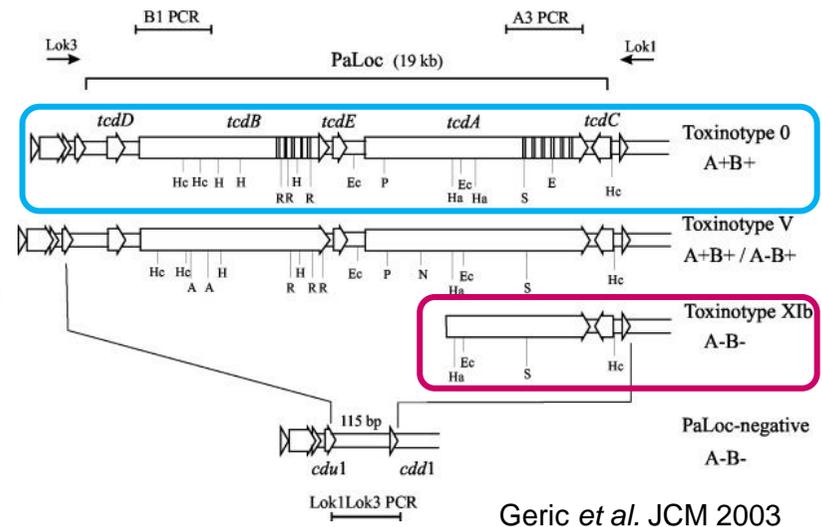


Fig 1. Distribution of health care-onset, health care facility-associated *C. difficile* infection rates.

Modifications génétiques?

- **Mutations** au niveau de la cible?
- Emergence de **nouvelles souches**?
 - Souches de toxinotype XI (A-B- binaire+)
 - Souches de PCR-ribotype 237 (A-B+ binaire+)



Squire *et al.* EID 2013

Novel Molecular Type of *Clostridium difficile* in Neonatal Pigs, Western Australia

Michele M. Squire, Glen P. Carter, Kate E. Mackin, Anjana Chakravorty, Torbjörn Norén, Briony Elliott, Dena Lyras, and Thomas V. Riley

Les méthodes moléculaires: coût

- Utilisation d'algorithmes pour diminuer les coûts?

- Evaluation d'un algorithme en 2 étapes (GDH + toxines et PCR sur les discordants) *versus* PCR seule (Vasoo *et al.* J Microbiol Immunol Infect 2012)

Table 3 Comparison of testing algorithms^a

Test algorithm	Estimated cost (US\$) ^b		False positives/ 1000 tests (95% CI)	False negatives/ 1000 tests (95% CI)	Turnaround time
	Per test	Per 1000 tests			
Wampole Toxin A/B EIA alone	7.89	7890 (only 1 EIA) 14,462 (1 repeat EIA for initially negative specimens) 20,348 (2 repeat EIAs for initially negative specimens)	82 (46–137)	15 (6–28)	30 minutes, batched
C. Diff QuikChek GDH Ag/ToxinEIA reflexed to GeneOhm RT-PCR for discordant results	11.50 (QuikChek alone) Additional 26.95 for RT-PCR	13,663 (using 2 step algorithm) ^c	0 (0–29)	0 (0–9)	25 minutes (QuikChek) real time, random access results
BD GeneOhm RT-PCR alone	26.95	26,950	0 (0–29)	0 (0–9)	2 hours, batched
Progastro Cd RT-PCR alone	25.00	25,000	6 (0–40)	6 (2–18)	3 hours, batched

^a Assuming 10% prevalence of CDI in specimens tested (based on recent prevalence rates at RUMC from February to March 2010).
^b Cost based on list prices.
^c Assuming 86% of tests can be initially resolved using the C. Diff QuikChek GDH Ag/Toxin EIA.
 CI = confidence interval.

Toxines libres versus souche toxinogène?

Présence des toxines libres mieux corrélée à la sévérité de la maladie?

- Pts ICD+ sans toxine libre (IEA-) **présentation clinique non différente** des pts avec toxine libre (IEA+) (Guerrero *et al.* CID 2011)
- **Pas de corrélation avec la sévérité** (âge, t°, alb., GB, USI, CPM) (Humphries *et al.* JCM 2013)
- La présence de toxine libre dans les selles de patients atteints d'ICD **n'est pas associée à des formes sévères ni au risque de décès à J+30** (Ramé *et al.* poster P 542 RICA 2013)

Variables	Odds ratio	Intervalle de confiance 95%	p
CRP (augmentation de 10 unités)	1,08	1,02 – 1,14	0,006
Leucocytes (>10 000 /mm ³)	6,34	1,25 – 32,28	0,03
IPP et/ou anti-acide	0,22	0,04 – 1,10	0,07
Toxines libres	1,99	0,44 – 9,10	0,37

Facteurs associés à la sévérité des ICD (analyse multivariée)

Toxines libres versus souche toxinogène?

Présence des toxines libres mieux corrélée à la sévérité de la maladie?

- Taux de mortalité à J30 (17 vs 10%) et GB plus élevés:
 - la présence de toxines libres définit mieux une ICD vraie (Planche *et al.* Lancet 2013)

	CTA positive	NAAT positive/ CTA negative	CTA and NAAT negative	CTA positive vs NAAT positive/CTA negative p value
Number	435	311	3943	..
Female (%)	243/435 (56%)	174/311 (56%)	2117/3941* (54%)	..
Mean age (years; SD)	69 (20)	64 (22)	64 (21)	..
Mean white cell count (x10 ⁹ /L; SD)	12.4 (8.9)	9.9 (6.6)	10.0 (12.0)	<0.0001
Mean rise in creatinine (%; SD)	37% (63)	49% (132)	34% (81)	0.0222
>100% rise in creatinine (%)	40/316 (13%)	30/245 (12%)	321/3163 (9%)	..
Mean albumin (g/L; SD)	31 (7)	33 (8)	33 (8)	0.0328
Albumin <20 g/L (%)	13/344 (4%)	15/258 (6%)	166/3223 (5%)	..
Died (%)	72/435 (16.6%)	30/311 (9.7%)	349/3943 (8.9%)	0.004
Mean length of stay before sample (days; SD)	17.9 (29)	13.6 (23)	11.2 (22)	0.0311
Mean length of stay after sample (days; SD)	19.4 (25)	16.5 (24)	15.1 (24)	0.1869
Death rate per 1000 inpatient days	9.03	6.04	6.05	0.0317

Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C difficile* infection

Timothy D Planche, Kerrie A Davies, Pietro G Coen, John M Finney, Irene M Monahan, Kirsti A Morris, Lily O'Connor, Sarah J Oakley, Cassie F Pope, Mike W Wren, Nandini P Shetty, Derrick W Crook, Mark H Wilcox

Conclusion

- **Nombreuses méthodes diagnostiques**
- **Nb tests moléculaires**
 - Méthodes sensibles
 - Résultats rapides
 - Possibles mutations
 - Mais plus chers
 - Spécificité faible si non utilisés correctement
- **Discussion avec le clinicien reste indispensable**

Algorithmes

- Algorithmes
 - Plusieurs stratégies possibles
 - GDH en test de screening (bonne corrélation avec la culture)

Type (no. studies)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Well-type EIA GDH (4)	0.89 (0.86, 0.91)	0.91 (0.90, 0.92)
Membrane-type EIA GDH (5)	0.88 (0.84, 0.91)	0.97 (0.96, 0.98)

Crobach *et al.*, CMI 2009

- GDH excellente VPN

Glutamate dehydrogenase (GDH) test characteristics from publications included in the meta-analysis

Study	'Gold standard' test	Prevalence	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Eastwood ⁵	CTA	15.2 (12.4, 18.3)	90.1 (82.1, 95.4)	92.9 (90.2, 95.1)	71.3 (62.1, 79.4)	98.0 (96.2, 99.1)
	TC	17.5 (14.5, 20.8)	87.6 (79.8, 93.2)	94.3 (91.8, 96.3)	78.0 (69.4, 85.1)	97.1 (98.0, 99.9)
Wren <i>et al.</i> ⁸	TC	8.6 (7, 10.5)	95.4 (88.6, 98.7)	95.7 (94.1, 96.9)	67.5 (58.4, 75.6)	99.5 (98.8, 99.9)
	C	12.0 (10.1, 14.2)	95.0 (89.5, 98.2)	99.1 (98.2, 99.6)	93.5 (87.6, 97.2)	99.3 (98.5, 99.8)
Vanpoucke <i>et al.</i> ¹³	CTA	15.3 (11.8, 19.4)	92.9 (82.7, 98.0)	91.9 (88.3, 94.7)	67.5 (55.9, 77.8)	98.6 (96.5, 99.6)
Reyes <i>et al.</i> ¹⁴	TC	21.9 (18, 26.3)	79.5 (69.6, 87.4)	100 (98.8, 100)	100 (94.9, 100)	94.6 (91.5, 96.7)
Ticehurst <i>et al.</i> ¹⁵	CTA	9.0 (5.9, 13.1)	95.8 (78.9, 99.9)	90.1 (85.6, 93.5)	48.9 (34.1, 63.9)	99.5 (97.5, 100)
Zheng <i>et al.</i> ¹²	CTA	13.8 (11.7, 16.1)	92.7 (87.0, 96.4)	89.1 (86.8, 91.1)	57.7 (50.9, 64.3)	98.7 (97.6, 99.4)
Fenner <i>et al.</i> ¹¹	C	10.4 (8.8, 12.0)	93.4 (88.2, 96.8)	96.6 (95.5, 97.5)	75.9 (69.2, 81.9)	99.2 (98.6, 99.6)
Snell <i>et al.</i> ¹⁶	C	19.1 (15.5, 22.7)	93.5 (86.5, 97.6)	98.0 (96.1, 99.1)	91.6 (84.1, 96.3)	98.5 (96.8, 99.5)
Barbut <i>et al.</i> ¹⁷	CTA	33.3 (27.2, 39.9)	90.8 (81.9, 96.2)	98.7 (96.2, 99.7)	95.8 (88.3, 99.1)	97.0 (93.9, 98.8)
Massey <i>et al.</i> ¹⁸	CTA	25.7 (22.1, 29.5)	97.2 (93.0, 99.2)	87.0 (83.3, 90.0)	72.0 (65.1, 78.2)	98.9 (97.2, 99.7)
Landry <i>et al.</i> ¹⁹	CTA	15.0 (8.6, 23.5)	100 (78.2, 100)	82.7 (72.2, 90.4)	53.6 (33.9, 72.5)	100 (94.2, 100)
Turgeon <i>et al.</i> ²⁰	CTA	10.1 (8.3, 12.1)	89.1 (81.1, 94.4)	89.7 (87.5, 91.6)	49.2 (41.7, 56.7)	98.7 (97.6, 99.3)
Alfa <i>et al.</i> ²¹	CTA	14.5 (11.2, 18.3)	91.4 (83.3, 98.1)	88.9 (85.1, 92.0)	58.2 (47.4, 68.5)	98.4 (96.3, 99.5)

Méta-analyse

VPN : 94,6 -100%

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; C, culture only; CTA, cell culture cytotoxin assay; TC, toxigenic culture. 95% confidence intervals are shown in parentheses.

Shetty *et al.*, JHI 2011

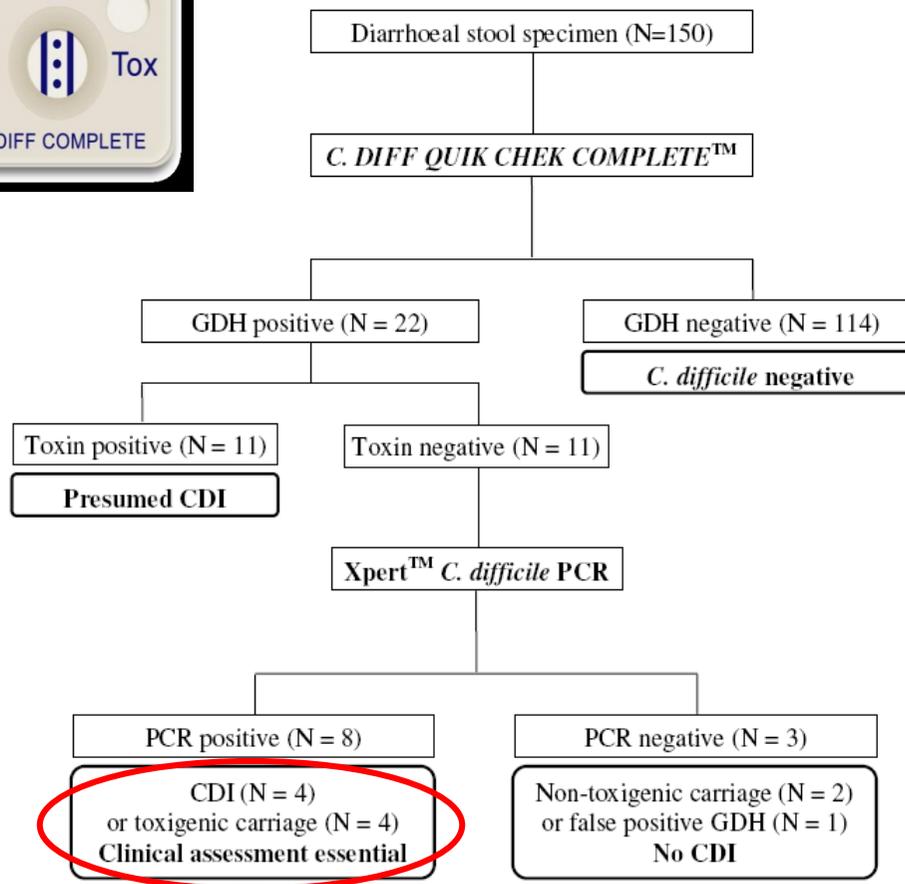
Exemples d'algorithmes

Evaluation of Diagnostic Tests for *Clostridium difficile* Infection[▽]

Jonathan Swindells, Nigel Brenwald, Nathan Reading, and Beryl Oppenheim*

Department of Medical Microbiology, City Hospital, Birmingham, United Kingdom

JCM 2010



N=150 - CTA, culture et CT

⇒ 85.3% GDH - : exclusion ICD

⇒ 7,3% pos GDH et toxine : ICD

⇒ 7,3% discordants : PCR