

DECLARATION de CONFLIT d'INTERET

- Soutiens financiers industriels reçus en 2006-2010
 - Optimer diagnostics, Sanofi Pasteur, Wyett, Astellas, Merck, Cepheid, Gloster santé Europe, BD Gene Ohm, Sanivap, BioMérieux

Analyse critique des tests diagnostiques des infections à *Clostridium difficile*

Frédéric Barbut, Valérie Lalande, Catherine Eckert

Laboratoire *Clostridium difficile*

Associé au CNR des bactéries anaérobies et du botulisme

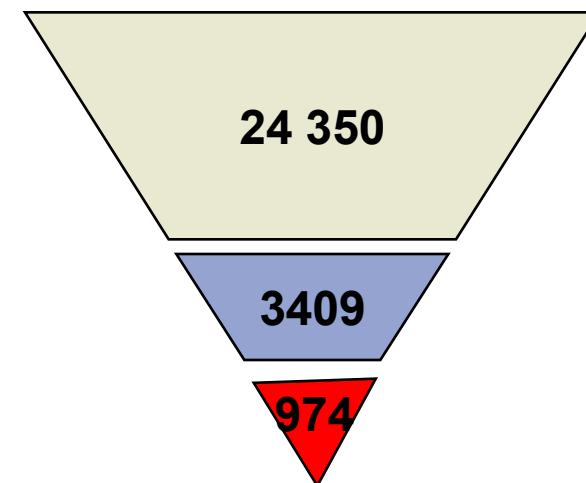
Hôpital Saint Antoine, Paris

Université Pierre et Marie Curie, Paris

LES INFECTIONS A *C. DIFFICILE* (ICD) en FRANCE

■ Milieu hospitalier (*ICD RAISIN 2009*)

- Incidence : **2,2 ICD/10 000 patient-jours (CS)**
- 24 350 cas d'ICD / an
- 3409 cas sévères /an
- 974 décès liés à l'ICD /an
- 2000-5000 € par épisode (*Dubberke, ICHE 2007*)



■ Milieu communautaire (*Beaugerie et al., Alim Pharmacol. Therap., 2005, 17, 905-912*)

- Taux d'ICD communautaire post-ATB = 1.5%
- Estimation de 1 620 000 cas d'ICD/an
- Bénignes, spontanément résolutives

L'EPIDEMIOLOGIE DES ICD A CHANGE

❖ Les ICD sont plus fréquentes

- Québec : x 8 (1994 -2004) (*Pépin et al., CMAJ, 2004*)
- Allemagne (Saxe) : x 4 (2002-04) (*Burckhardt et al., EID 2008*)
- Espagne : x 3 chez patients >65 a. (1997-2005) (*Soler et al., ICHE 2008*)

❖ Les ICD sont plus sévères (*Pépin et al., CMAJ, 2004*)

- Plus de chocs septiques, perforation, colectomie (6-7% vs 18.2%)
- Mortalité plus importante (5-6% en 1990 vs 13.8% en 2003)

❖ Une moins bonne réponse au métronidazole (*Musher DM et al., CID, 2005*)

- Echec clinique avec MTZ X2.5 entre 2002 et 2004 (9.6% vs 25.7%)
- Taux de récurrences X2 chez patients >65 a (28.9% vs 58.4%)

❖ Emergence et dissémination de nouveaux clones

- 027 (PCR-ribotypage)= BI= NAP1 (toxinothèque III), binaire +
- 078/126 (toxinothèque V), binaire + (*Rupnik M et al., JCM 2008*)

DIAGNOSTIC DES ICD

- Le diagnostic doit être rapide et fiable
 - Prise en charge du patient
 - Traiter rapidement les ICD
 - Éviter les traitements empiriques
 - Prévention de la transmission nosocomiale
 - Isolement contact
 - 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 MICROBIOLOGIQUE

■ *C. difficile* est sous-diagnostiqué

- La recherche des toxines de CD se fait sur demande du clinicien
- « Règle des 3 jours » :
 - Tester toutes les selles après 3 jours d'hospitalisation (*Crobach M., CMI 2009*)
 - Peut améliorer le diagnostic de 24% (*Van den berg, J Med Microbiol. 2007*)

Stratégie diagnostique	CS (N=10 5)	MLS (N=9 5)
Sur demande du clinicien seulement	69%	67%
Systematique*	30%	29%
- sur toutes les selles	9%	7%
- pour certains services	1%	2%
- sur les selles diarrhéiques	19%	18%
- si traitement antibiotique	8%	8%
- si diarrhée nosocomiale	9%	9%
- pour certaines classes d'âge	2%	0%

Source : étude ICD RAISIN, 2009

CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENTS

- La répétition des tests diagnostiques n'est pas utile
 - La répétition des tests est une **pratique courante**
 - 13.7% (pour EIA), 12.4% (PCR) des selles sont testées 2 fois (<7 jours)
(Aichinger et al., JCM 2008)
 - **Gain faible** quelle que soit la méthode utilisée (<2% en général)

Authors	Technique	No Patients	Gain diagnostic	
Aichinger, 2009	EIA A+B	5788	1.9%	(<7 jours)
	PCR	2827	1.7%	(<7 jours)
Cardona, 2008	EIA A+B	3749	0.9 %	(same day)
			1.8%	(<1 jour)
Renshaw, 1996	CTA	2009	10.6%	(7-10 jours)
			1%	
Luo et, 2010	PCR	293	1%	(<7 jour)

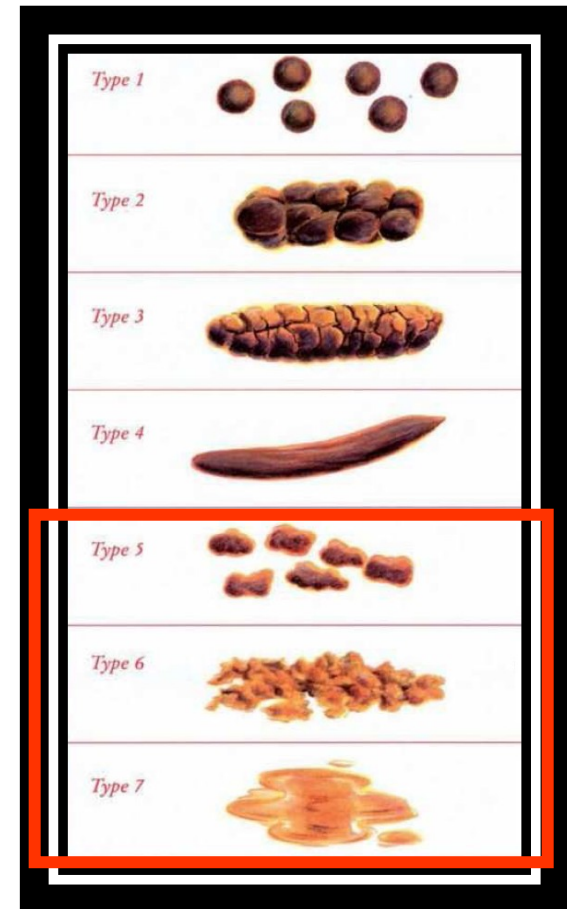
CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENTS

■ Prélèvement

- Selles diarrhéiques
- Ecouvillons rectaux et biopsies non recommandées pour les toxines
- Conservation + 4°C (Freeman & Wilcox, 2003)

■ Examen microscopique

- Leucocytes fécaux ou lactoferrin : 30-50%
(Marx, et al., 1993 , Miller, et al., 1994)
- Insuffisamment sensible ou spécifique pour être utilisé comme méthode de dépistage



Echelle de Bristol

OUTILS MICROBIOLOGIQUES POUR LE DIAGNOSTIC D'ICD

Histoire Clinique

SELLES



~~Sérologie~~

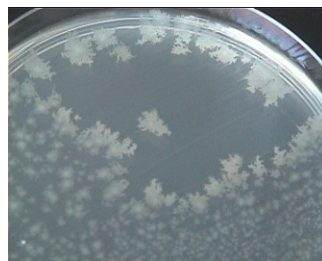
PRODUITS de
C. difficile

GDH
Acides gras
volatils



CULTURE

Culture
toxigénique



TOXINES

Test de cytotoxicité

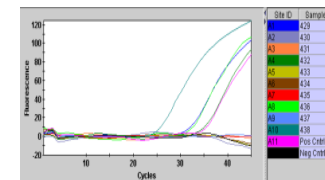


EIA



GENES

RT-PCR
16S RNA,
gdh, *tpi*
tcdA, *tcdB*



TEST DE CYTOTOXICITE DES SELLES (CTA)

■ Historiquement « Gold standard »

INFECTION AND IMMUNITY, Nov. 1978, p. 418-422
0019-9567/78/0022-0418\$02.00/0
Copyright © 1978 American Society for Microbiology

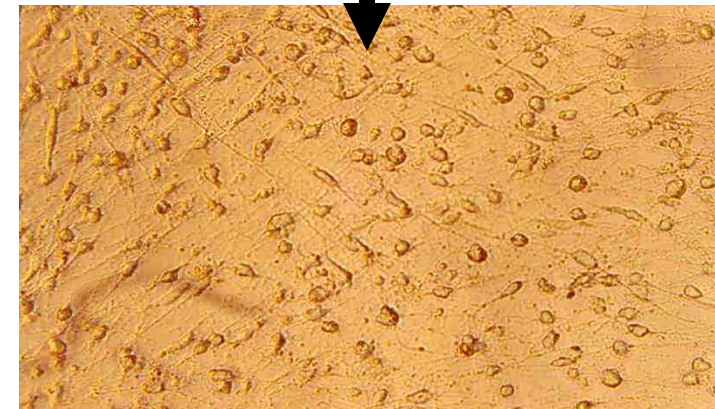
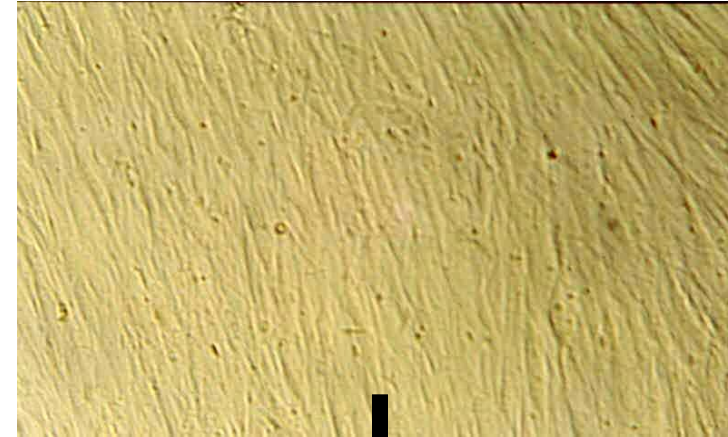
Vol. 22, No. 2

Printed in U.S.A.

Neutralization of *Clostridium difficile* Toxin by *Clostridium sordellii* Antitoxins

TE-WEN CHANG,* SHERWOOD L. GORBACH, AND JOHN B. BARTLETT

- Inoculation d'un filtrat de selles sur des cellules : Vero, MRC-5, McCoy, HeLa... : effet cytopathogène
- Sensibilité : pg de toxine B
- Spécificité : confirmée avec un antisérum anti *C. difficile* ou anti *C. sordellii*
- Inconvénients :
 - Manque de standardisation
 - Long
 - Chronophage
 - Nécessite une infrastructure adaptée



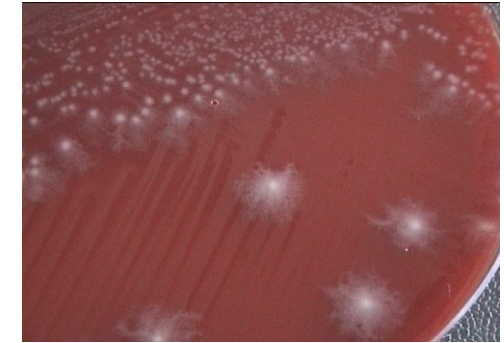
CULTURE TOXIGENIQUE

Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*

W. LANCE GEORGE,^{1, 2, 3*} VERA L. SUTTER,^{2, 3} DIANE CITRON,¹
AND SYDNEY M. FINEGOLD^{1, 2, 3}

■ Culture sur milieu sélectif

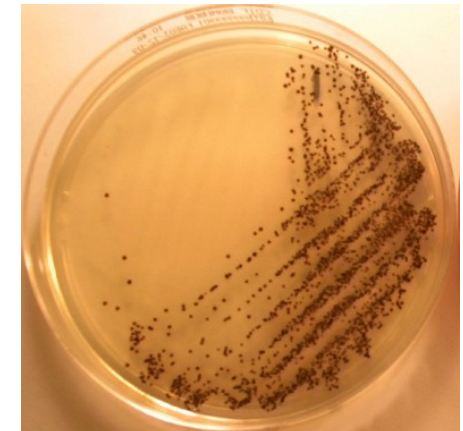
- CCA: cycloserine (250 mg/l), cefoxitine (8 mg/l)
- $\pm$ taurocholate 0,05-0,1% (germination spores) (Nerandzic et al, JCM 2009)
- Choc alcoolique ou thermique : sélection des spores
- Milieu chromogénique (Perry et al. JCM 2010)
- Seuil de détection $\approx$ 2000 bactéries /g selles (Marler et al. JCM 1992).



Colonies larges, non
hémolytiques, aspect
'verre brisé », fluorescence
sous UV, odeur de crottin
de cheval

■ Détection *in vitro* des toxines

- **CTA** long, 2 à 5 jours,
- **EIA** rapide mais non validé
- **PCR** *tcdA*, *tcdB*, *tpi*, *gdh*, ARN16S
- Tester une suspension de plusieurs colonies (car co-infections possibles)



CULTURE TOXIGENIQUE

- Nouveau « **gold standard** » (*Cohen et al. , ICHE 2010*)
- Très **sensible** (*Gerding, et al., 1986, Barbut, et al., 1993, Delmee, 2001; Lozniewski, et al., 2001*)
 - Permet de documenter la présence de souches toxigènes alors que les toxines libres sont négatives
 - 11% des patients suspects de CDI qui étaient toxine-culture+ avaient des pseudomembranes à l'endoscopie (*Gerding et al. Arch Int Med, 1986*)
- ... mais diminution de la spécificité
 - Portage asymptomatique =3 %
 - Faux positif : un patient diarrhéique peut aussi être par hasard porteur d'une souche de CD toxigène
- Détection de l'émergence de nouveaux clones
- Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques

DETECTION DE LA GLUTAMATE DEHYDROGENASE (GDH)

- Enzyme métabolique
- EIA (immuno-chromatographie ou ELISA 96 puits)
 - *C. diff* Quik Chek; *C. diff* chek60 (TechLab); Immunocard (Meridian)
- Rapide, facile
- Bonne corrélation avec la culture (*Crobach et al., CMI 2009*)

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)

- Méthode de screening : VPN > 99.5% (*Ticehurst, et al., 2006; Barbut et al., 1994*)
- Ne peut prédire si la souche est toxigène ou non
 - Faible PPV : les résultats positifs doivent être confirmés par un test de référence
 - Réactions croisées avec *C. bifermentans* et *C. sordellii*.

TESTS IMMUNO-ENZYMATIQUES (EIA)

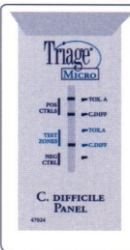
- Tests de 1^{ère} génération : détection de TcdA uniquement
- Tests de 2^{ème} génération : TcdA et TcdB
 - Emergence de souches A-B⁺ (1,5% à 10%)
(Barbut et al, JCM 2002; Kato et al., JCM 1998)
- Format : immuno-chromatographie ou plaque 96 puits
- Performances (Crobach M. et al. , CMI 2009, Planche T. et al, Lancet Inf Dis 2008)

■ vs. CTA

Type (no. studies)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Well-type EIA toxin A/B (22)	0.82 (0.79, 0.84)	0.97 (0.97, 0.98)
Membrane-type EIA toxin A/B (24)	0.72 (0.69, 0.74)	0.98 (0.97, 0.98)

■ vs. CT

Type (no. studies)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Well-type EIA toxin A/B (7)	0.66 (0.61, 0.71)	0.98 (0.97, 0.99)
Membrane-type EIA toxin A/B (7)	0.52 (0.47, 0.57)	0.98 (0.97, 0.99)



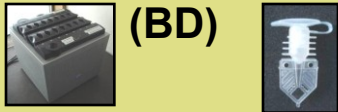
TESTS IMMUNO-ENZYMATIQUES (EIA)

- La VPP est inacceptable quand la prévalence de CDI est faible (< 10%)

Index test (no. studies)	Sensitivity	Specificity	Prevalence 5%		Prevalence 10%		Prevalence 20%		Prevalence 50%	
			PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
<i>Clostridium difficile</i> tox A/B II (2)	0.81	0.96	0.52	0.99	0.69	0.98	0.84	0.95	0.95	0.83
Premier tox A (15)	0.81	0.98	0.68	0.99	0.82	0.98	0.91	0.95	0.98	0.84
Premier tox A/B (3)	0.92	0.96	0.55	1.00	0.72	0.99	0.85	0.98	0.96	0.92
ProSpecT A/B (1)	0.91	0.97	0.61	1.00	0.77	0.99	0.88	0.98	0.97	0.92
Ridascreen <i>C. difficile</i> tox A/B (1)	0.57	0.97	0.50	0.98	0.68	0.95	0.83	0.90	0.95	0.69
<i>C. difficile</i> tox A test (3)	0.61	0.95	0.39	0.98	0.58	0.96	0.75	0.91	0.92	0.71
Clearview tox A (4)	0.82	0.92	0.35	0.99	0.53	0.98	0.72	0.95	0.91	0.84
ColorPac toxin A(1)	0.89	0.89	0.30	0.99	0.47	0.99	0.67	0.97	0.89	0.89
Immunocard tox A/B (3)	0.94	0.98	0.71	1.00	0.84	0.99	0.92	0.98	0.98	0.94
Immunocard tox A (5)	0.61	0.99	0.76	0.98	0.87	0.96	0.94	0.91	0.98	0.72
Triage tox A (6)	0.65	0.99	0.77	0.98	0.88	0.96	0.94	0.92	0.98	0.74

METHODES MOLECULAIRES :

Tests commercialisés

Essai	Cible	Extraction	PCR	Durée (incl. extrac. ADN)
C. diff Gene Ohm 	<i>tcdB</i>	Manuelle (actions chimiques et physiques)	Molecular beacon (FAM, TET)	2-3 h
Xpert C. diff (Cepheid) 	<i>tcdB</i> , Toxine binaire, <i>tcdC</i> (dél 117)	Préparation automatisée de l'ADN (cartouche)	TaqMan	1 h
(ProGastroCD, Prodesse 	<i>tcdB</i>	Easy MAG Nuclisens (BioMérieux)	TaqMan	3-4 h
Illumigene C. diff (Meridian) 	<i>tcdA</i>	Manuelle (chaleur)	Loop-mediated Isothermal Amplification (Lamp)	1h

METHODES MOLECULAIRES :

Tests commercialisés

Auteurs	Essais	Nb échantillons	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Gold standard	Preval. (%)
Barbut F. (2009)	BD geneOhm	300	93.9	97.7	CT	11%
Stamper P.(2009)		401	83.6	98.2	CT	15,2%
Kvach E. (2010)		400	91.4	100	CT	26,2%
Terhes G. (2009)		600	96.4	99.1	CTA (+ CT pour les résultats discordants)	9.2%
Huang H (2009)	Cepheid	220	97.1	93	CTA (+ CT pour les résultats discordants)	9.2%
Novak Weekley (2010)		432	94.4	96.3	CT	19.6%
Stamper P. (2009)	Prodesse	285	77.3	99.2	CT	15.7%
Lalande V. (2010)	<i>Illumigene</i>	472	91.8	99.1	CT	7.2%

METHODES MOLECULAIRES

■ Avantages

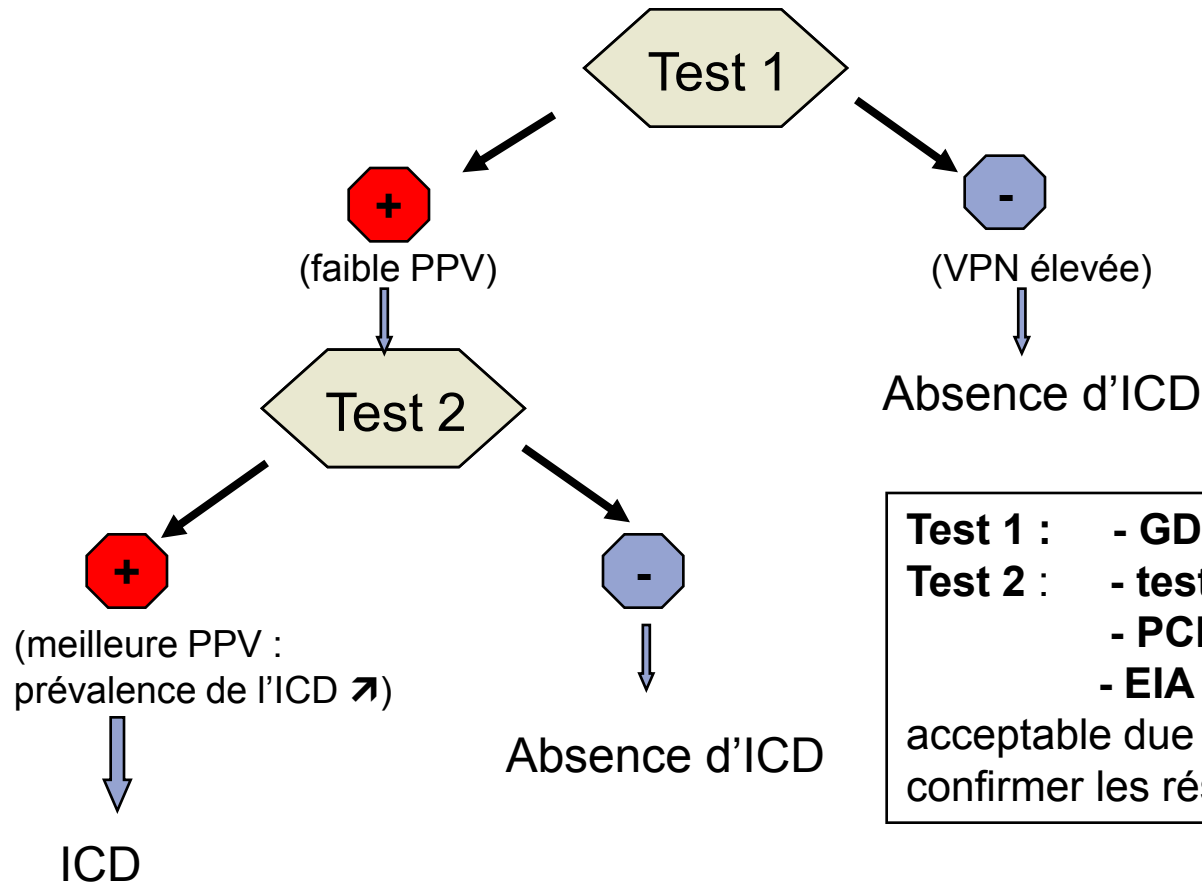
- Résultats dans la journée
- Très sensible : la PCR en temps réel est significativement plus sensible que l'EIA (*Peterson et al. , 2007, Novak-Weekley, JCM 2010, Tenover JCM 2010*)
- Détection de la toxine binaire et de la délétion en 117 dans *tcdC* (indication pour 027) (*Huang H. , JCM 2009*)
 - 100% sensibilité
 - 98,1% spécificité

■ Limites

- Coût unitaire élevé
- Spécificité clinique : le gène est détecté mais pas la toxine elle-même
- Possibles mutations *tcdB* ou *tcdA*
- De nouveaux clones hypervirulents émergent (126/078)

QUELLE STRATEGIE UTILISER ? *(Crobach et al. CMI 2009)*

- ❑ Objectif : combiner sensibilité, rapidité et faible coût
- ❑ Un algorithme en 2 ou 3 étapes est probablement le meilleur choix



Test 1 : - GDH
Test 2 : - test de référence
- PCR
- EIA (mais la VPN est moins acceptable due à la forte prévalence des ICD)
confirmer les résultats par un **3^{ème} test**

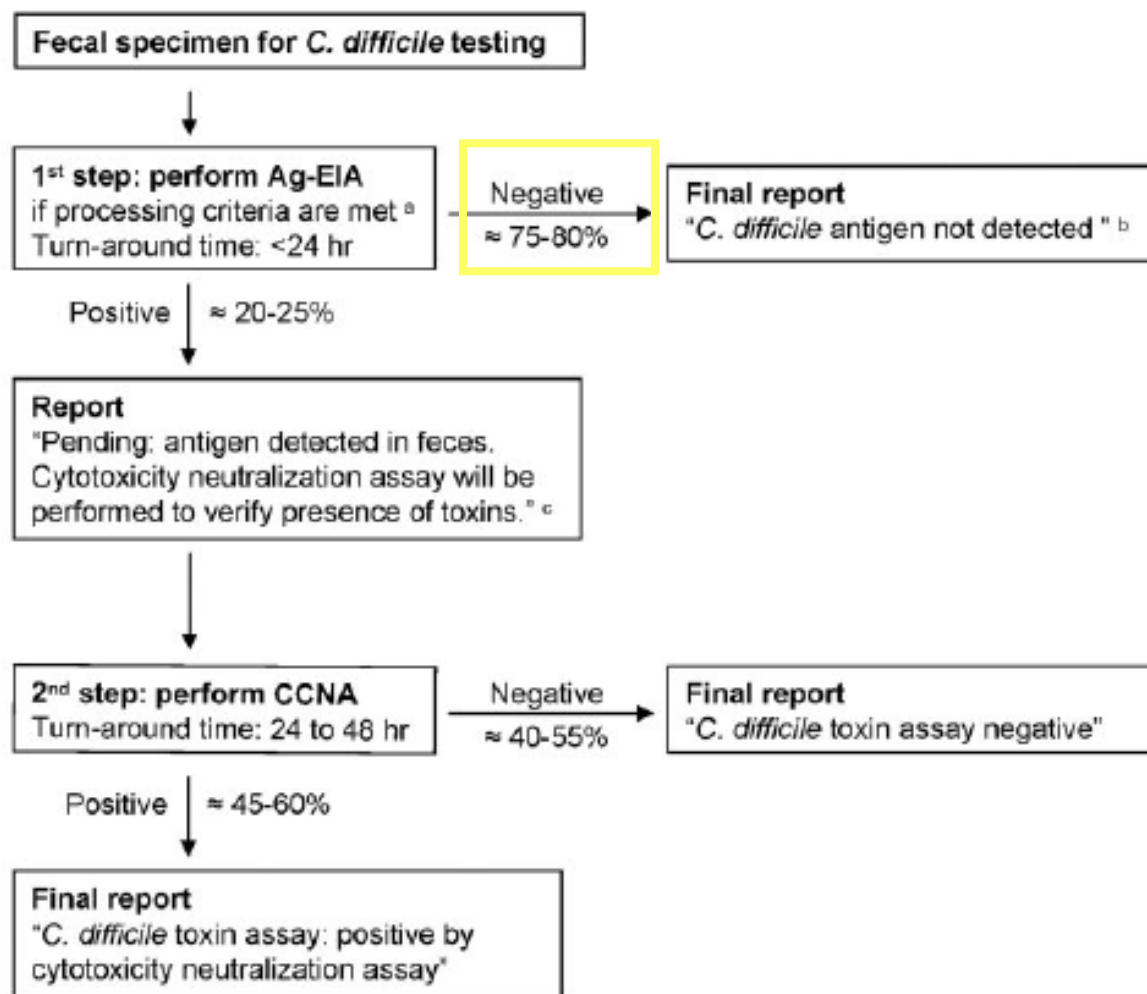
Effective Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* by a Two-Step Algorithm Including Tests for Antigen and Cytotoxin

John R. Ticehurst,^{1,2,3*} Deborah Z. Aird,¹ Lisa M. Dam,² Anita P. Borek,¹
John T. Hargrove,² and Karen C. Carroll^{1,3}

JCM, 2006

Pré-évaluation :
→ VPN : 99.7%

Algorithme en 2 étapes
Étude prospective 6 mois
5,887 échantillons
Economie : \$143 000



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

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

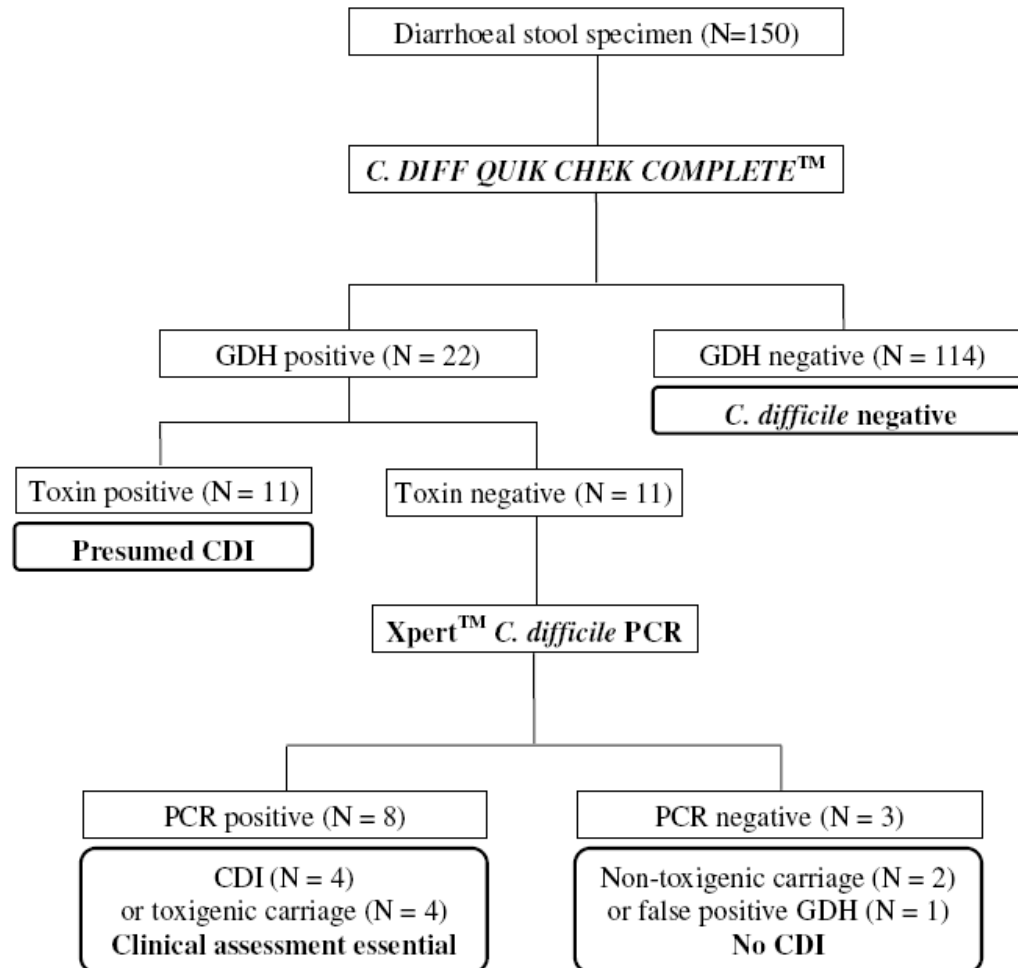
Department of Medical Microbiology, City Hospital, Birmingham, United Kingdom



Evaluation of the C.Diff Quik Chek Complete Assay, a New Glutamate Dehydrogenase and A/B Toxin Combination Lateral Flow Assay for Use in Rapid, Simple Diagnosis of *Clostridium difficile* Disease[▽]

Susan E. Sharp,* Lila O. Ruden, Julie C. Pohl, Patricia A. Hatcher, Linda M. Jayne, and W. Michael Ivie

JCM 2010



■ Comparaison à la culture toxigénique (n=284)

	2/3-step	PCR
Sensibilité :	100 %	100%
Spécificité :	99.6%	99.6%
Prix par test :	11.5\$ (88%) 44.8\$ (12%)	33,3\$

Clostridium difficile Testing in the Clinical Laboratory by Use of Multiple Testing Algorithms[▽]

Susan M. Novak-Weekley,^{1*} Elizabeth M. Marlowe,¹ John M. Miller,¹ Joven Cumpio,¹
Jim H. Nomura,² Paula H. Vance,³ and Alice Weissfeld³

(JCM 2010)

- 432 selles
 - Gold standard : culture toxigénique directe /enrichie
 - Prévalence : 16.6%
- *p <0.005 vs RT PCR
**P =0.03 vs RT PCR

	EIA seul (Premier A+B)	GDH + EIA (Techlab Cdiff Check)	GDH + EIA+CTA	GDH + RT PCR (Xpert, Cepheid)	RT PCR
Sensibilité (%)	58.3* (30 FN)	55.6 (32 FN)	83.1** (12 FN)	86.1 (10 FN)	94.4 (4 FN)
Spécificité (%)	94.7 (19 FP)	98.3 (6FP)	96.7 (12 FP)	97.8 (8 FP)	96.3 (13 FP)
VPP (%)	68.9	87	83.1	88.6	84
VPN (%)	91.9	91.7	96.7	97.2	98.8

LA SENSIBILITÉ DES METHODES DÉPEND DU TYPE DE SOUCHES *(Tenover et al., JCM 2010)*

- Etude multicentrique
- 2296 selles diarrhéiques

Sensibilité Cepheid vs GDH

Ribotype	Xpert <i>C. diff</i>	GDH	p
027	90,9	90,9	1.0
Non 027	91,7	69,4	0,0001

Sensibilité (%) Cepheid vs EIA A+B

Ribotype	Xpert <i>C. diff</i>	EIA A+B	p
001	100	75	NS
002	100	15,4	<0,0001
017	90,9	63,6	NS
027	100	78,4	<0,0001
053	100	66,7	NS
078	81,8	63,6	NS
104	83,3	50	NS
106	75	18,8	0,004
autres	92,7	57,3	<0,0005

COÛT DES STRATÉGIES - Projections

- **Hôpital Saint-Antoine** (780 lits)
- 1565 CD testing/an :
 - 84 toxines + culture + (5.4%)
 - 39 toxine – culture tox + (2.5 %)
 - 37 toxine – culture non tox (2.4%)

- **Estimations** (prix publics TTC non négociés)
 - ECP : 2.2 euros
 - Culture : 1 euro
 - GDH : 12.9 euros
 - GDH + toxines : 21.5 euros
 - PCR: 30-40 euros

**CTA +
Culture tox.**

5221 euros

RT-PCR

**46 950 à 62 600
euros**

**Si culture :
+123 euros**

**GDH+
RT PCR**

**24588 à 26588
euros**

**Si culture :
+123 euros**

**GDH/toxine AB
+RT PCR**

**36047 à 36847
euros**

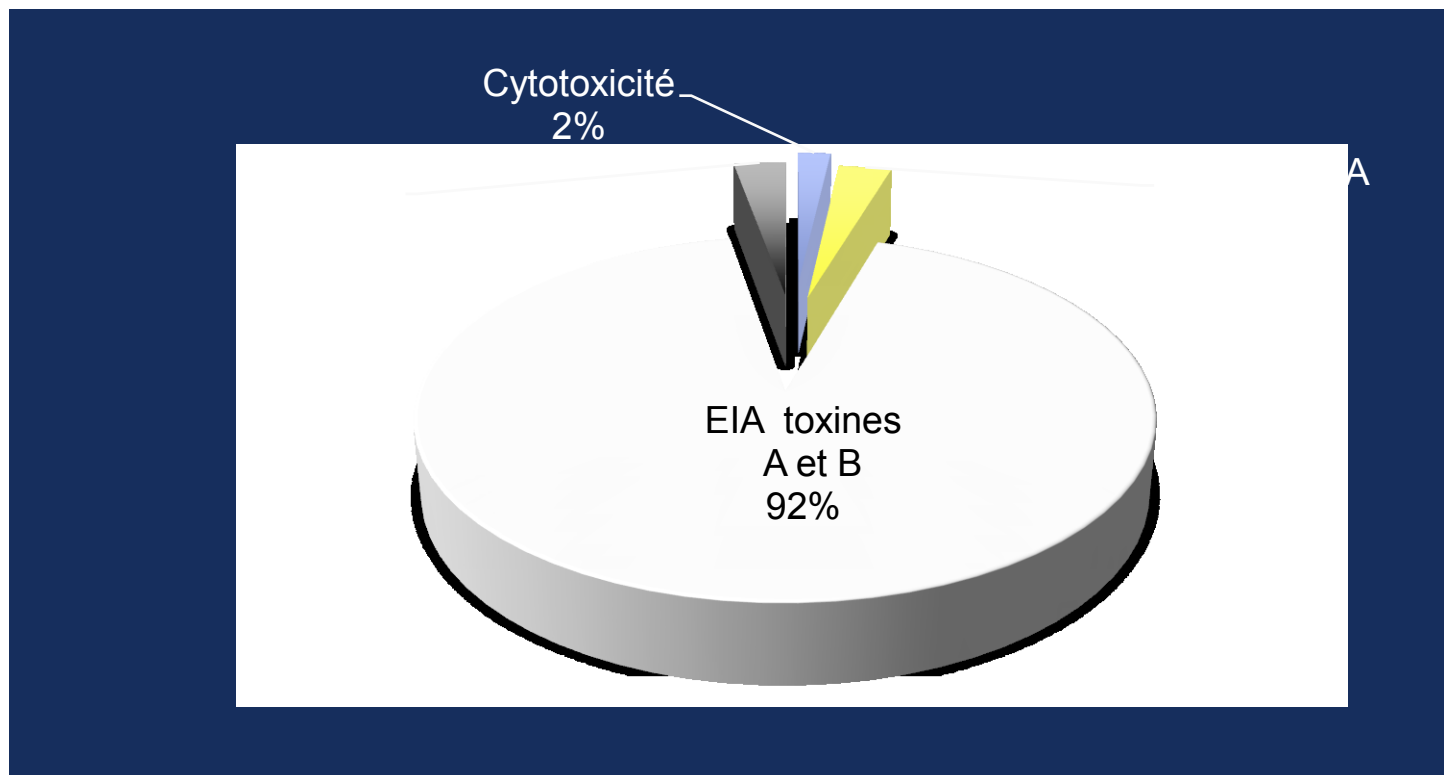
**Si culture :
+123 euros**

RECOMMANDATIONS

	ECDC (2009)	IDSA, SHEA (2010)
Selles diarrhéiques	+ (I)	+ (BII)
Règle des 3 jours	+ (I)	?
Pas de répétition de test	+ (endémique) (II)	+ (BII)
Pas de contrôle après traitement	implicite	+ (BIII)
Gold standard	CT et CTA (implicite)	CT (BIII)
EIA A+B	Peu sensible (I) ne doivent pas être utilisée seule	Méthode « suboptimale » car peu sensible (BII)
Algorithme en 2 étapes	+ (pas de recommandation sur le screening) (II)	+ (BII) avec GDH comme screening
PCR	« Méthode la plus sensible comparée à la CT » (I)	À évaluer (BII)

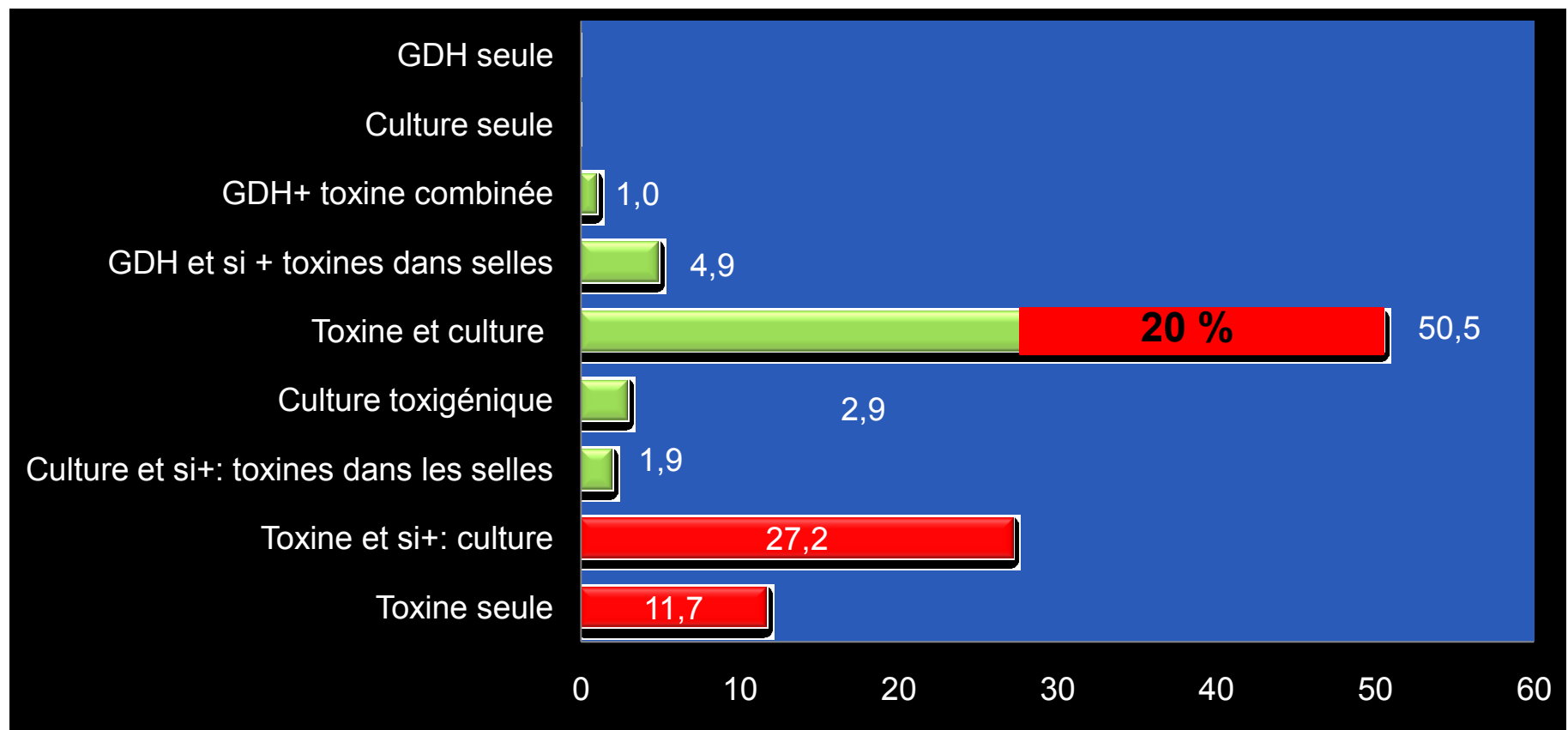
Que fait-on en France ?

■ Méthodes



Que fait-on en France ?

■ Stratégies diagnostiques



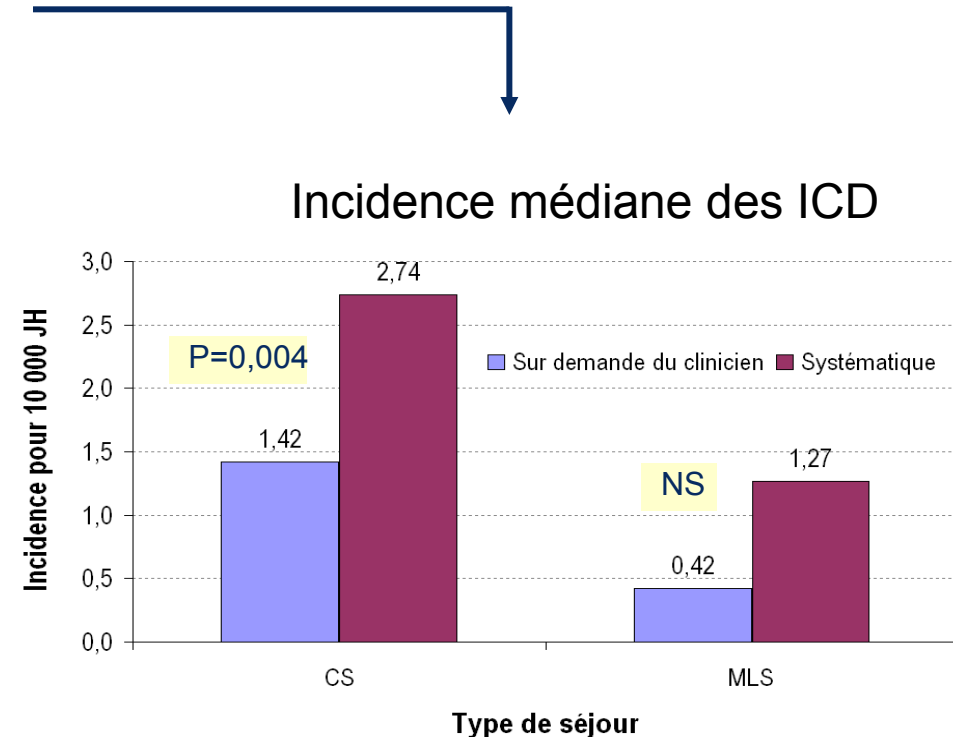
CONCLUSIONS

- Axes d'améliorations :
 - *tester systématiquement les diarrhées nosocomiales*
 - *écarter les selles non diarrhéiques*
- Ne pas utiliser les tests EIA seuls
- Un diagnostic en 2-étapes semble être le meilleur compromis
- Les méthodes moléculaires prometteuses mais coûteuses
 - *diagnostic rapide : amélioration de la prise en charge ?*
- La culture a toujours un rôle majeur pour :
 - *détecter l'émergence de nouveaux clones*
 - *surveiller la sensibilité aux antibiotiques.*

Résultats : impact des stratégies diagnostiques sur l'incidence des ICD

Stratégie diagnostique	CS (N=105)	MLS (N=95)
Sur demande du clinicien seulement	69%	67%
Systématique*	30%	29%
- sur toutes les selles	9%	7%
- pour certains services	1%	2%
- sur les selles diarrhéiques	19%	18%
- si traitement antibiotique	8%	8%
- si diarrhée nosocomiale	9%	9%
- pour certaines classes d'âge	2%	0%
- autre critères	4%	7%

* réponses multiples possibles



COMPARISON de 11 TESTS pour le DIAGNOSTIC d'ICD (*Eastwood et al., J Clin Microbiol., 2009, 47, 3211-3217*)

- N= 600 diarrheal stools
- Gold standard : toxigenic culture
- The mean sensitivity and specificity for toxin detection assays were 75.0% and 96.1%, respectively.
- The sensitivity and specificity of the GDH assay were 87.6% and 94.3%, respectively.

Assay	Sensitivity (%) (95% CI) ^a	Specificity (%) (95% CI) ^a
Cytotoxin test	86.4 (79.1–91.9)	99.2 (97.9–99.8)
Premier toxin A+B	80.8 (72.3–87.3)	97.5 (95.5–98.6)
GA <i>Clostridium difficile</i> antigen	68.8 (59.9–76.8)	91.4 (88.4–93.7)
Ridascreen toxin A/B	60.0 (50.9–68.7)	95.6 (93.2–97.2)
Techlab toxin A/B II	80.0 (71.9–86.6)	96.0 (93.7–97.5)
Remel ProSpecT	81.6 (73.7–87.9)	93.3 (90.6–95.4)
Vidas <i>C. difficile</i> Tox A/B	80.0 (71.9–86.6)	97.3 (95.2–98.5)
Remel Xpect	68.8 (59.9–76.8)	99.4 (98.2–99.9)
Techlab Tox A/B Quik Chek	74.4 (65.8–81.78)	98.9 (97.6–99.7)
Premier Immunocard A + B	68.8 (59.9–76.8)	93.0 (90.4–95.2)
Techlab <i>C. diff</i> Chek-60	87.6 (72.4–93.0)	94.3 (91.7–96.2)
BD GeneOhm <i>C. difficile</i>	88.5 (80.3–93.6)	95.4 (92.9–97.0)

LES INFECTIONS A *C. DIFFICILE* (ICD) dans LE MONDE

Québec :
2005-6: **10.5**/10000
2006-2007: **11.7**
2007-2008: **11.5**
2008-2009 : **6.9**

Ohio: (2006) (n=210 hop.)
7.5-9.9 /10 000

Minnesota, 1982-91
3-7.1/10 000 (n=1 hop)

MO, MA, OH, IL, UT, 2000
-2006 (n=5 hop.)
8,4/10 000

Europe : **5.5** /10 000 pt-j (2009)

Belgique: **1,9** /10 000 pt-j (2007-08)

France: **2,2** /10 000 pt-j (2009)

Germany: **6,6** /10 000 pt-j (2007)

Lambert ML, Eurorveill. 2009

Barbut F., ICHE 2009

Dubberke E, ICHE 2010

Notermans D., ECCMID 2010

Hensgens MP., Ned Tijdschr Geneeskd 2010

Gastmeier P, Int J Antimicrob Agents 2009