



**HAL**  
open science

# Extension et accréditation d'un test commercial moléculaire pour le diagnostic des infections à Clostridioides difficile

Cécile Juillard

► **To cite this version:**

Cécile Juillard. Extension et accréditation d'un test commercial moléculaire pour le diagnostic des infections à Clostridioides difficile. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02447413

**HAL Id: dumas-02447413**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02447413>**

Submitted on 21 Jan 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES**

Année 2019

Thèse n° 3113

THESE POUR L'OBTENTION DU

**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE**

Présentée et soutenue publiquement

Par Cécile JUILLARD

Née le 13 octobre 1988 à Nantes

Le 26 septembre 2019

**Extension et accréditation d'un test commercial  
moléculaire pour le diagnostic des infections à  
*Clostridioides difficile***

Sous la direction du Docteur Julien GORET

Membres du jury :

Madame BEBEAR Cécile, Professeur  
Madame LAFON Marie Edith, Professeur  
Madame ECKERT Catherine, Docteur  
Madame GARANDEAU Caroline, Docteur  
Monsieur GORET Julien, Docteur

Présidente  
Juge  
Rapporteur et Juge  
Juge  
Directeur

## REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Cécile Bébéar, de me faire l'honneur d'assurer la présidence de cette thèse. J'ai eu la chance de pouvoir bénéficier de vos enseignements lors de mes semestres au laboratoire de bactériologie, et je vous en remercie. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude et de tout mon respect.

A Julien, pour ton encadrement, ta patience et ta compréhension. Tu m'as guidée et épaulée tout au long de l'élaboration de cette thèse et je t'en remercie.

A Madame le Docteur Catherine Eckert, d'avoir accepté de juger ce travail en étant rapporteur de cette thèse, et d'avoir eu la gentillesse de venir de Paris pour cette soutenance.

A Madame le Professeur Marie Edith Lafon, pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci de ta gentillesse et de tes enseignements lors de mon semestre en virologie.

A Madame le Docteur Caroline Garandeau, pour avoir accepté de faire partie de ce jury et d'avoir eu la gentillesse de venir d'Angoulême pour cette soutenance.

Au Docteur Laurent Cavalié, pour s'être rendu disponible en répondant à mes questions concernant les techniques utilisées au laboratoire de bactériologie du CHU de Toulouse.

A Julie Blanchi, pour ses précieuses bases de bibliographie sur *C. difficile*.

A Madame Vermander et Madame Quignard de la société Meridian, pour leur disponibilité et leurs réponses.

### ***A mes enseignants, professeurs et assistants,***

A Monsieur Derache, Marie-Lise Bats, Jean-Philippe Vial, Delphine Chrisment, Olivia Peuchant, Pauline Floch, Monsieur Moreau, Nicolas Lechevalier, Stéphanie Dulucq, Vanessa Augis, Marie Canteloup, Tanguy Flao, Julien Goret, Philippe Lehours, Cécile Bébéar, Véronique Dubois, Sabine Peyreyre, Monsieur Fleury, Marie-Edith Lafon, Isabelle Garrigues, Pascale Trimoulet, Camille Tumiotto et Alice Vilain-Parcé. Merci de m'avoir appris ce qu'est le métier de biologiste médical.

Aux laboratoires m'ayant enseigné les bases du métier : de Biochimie, d'Hématologie et de Bactériologie Haut-Lévêque ; d'Immunologie, d'Hématologie, de Bactériologie et de Virologie Pellegrin ; ainsi que le laboratoire du CH de Marmande.

### ***A ma famille,***

A mes parents, pour votre soutien et votre amour. Je suis heureuse et fière d'être votre grande fille. Je vous aime.

A Aline et Raphaël, mes petits frère et sœur d'amour. Pour notre complicité et notre capacité à rire de tout. Les mois peuvent défiler avant de se retrouver, les moments passés ensemble sont toujours agréables. Je vous aime. Et comme dirait un (humble) chanteur (anciennement) célèbre : « A tous les grands frères / les grandes sœurs, servons de modèle à nos petits frères / à nos petites sœurs (wech heu) ».

A mes grands parents.

A mon Papy. Je n'ai pas suivi le chemin que tu me prédestinais lorsque j'étais petite, mais je ne doute pas du fait que tu aurais été heureux qu'il y ait un autre Docteur Juillard dans la famille.

A Mamie.

A Mamoune et Papounet.

A mes oncles et tantes. Véronique, Jean-Michel et Eric particulièrement.

## ***A mes collègues, anciens cointernes et amis,***

A mes collègues de Cedibio, Arnaud, Carole (Tof), Alice-Anne et Tiphaine. C'est un plaisir de travailler avec vous.

A tous mes anciens co-internes, et particulièrement Barnabé (ou Barni : « best co-interne ever »), Julian, Hugo, Pierre M, Camille (Bigou), Jules, Thibaut C, Alexandre, Benoit, Adrien (alias Fabrounet, « alors ma poule ? »), Morgane L (ma Brenda), Léna, Laurent (« j'ai un coup de cœur »), Morgane D, Sarah B, Florian, Célia, Muriel, Yohan D, Jessica (Teeed).

A tous les anciens internes que j'ai pu cotoyer durant mon parcours : ma petite Marie, Alice, Mariya, Marine LG, Yohan B (« Tadadadadadadaaaa »), Chloé B (Chéwie), Marine et Samuel (« Bido-bido-bido-bido »), Reda, Xavier, France, Julie, Charlotte, Cécile, Camille M, Edona, Raoul, Pierre B, Louise, Anne D, Morgane P, Céline, Manu (Brandon), Arnaud et Julien (JG).

A Marine, Marinouche. A notre amitié depuis la maternelle. Bien qu'on se soit perdues de vue un temps, je suis contente de pouvoir désormais compter sur notre traditionnel verre en péniche lorsque nous sommes à Lyon.

A mes amies de longue date, Marion, Charlotte et Anaïs (les Bibiches). Les années ont défilé depuis l'école primaire et le collège. Je suis heureuse qu'on garde contact malgré la distance, et j'ai hâte de continuer à partager les grands moments de nos vies respectives.

A Jérémie, mon binôme de choc au lycée et en P1 (« Saaaaale sale »).

A Camille et Amine, pour les moments de rire et les passages « studieux » à Millery.

A Catherine, ma Roudi. Que de souvenirs depuis toutes ces années (au Cha, à l'Ameuso, à NYC baby !). J'espère te voir plus souvent avec Jérémy et Margaux.

A Jessica et Charly, ou Ted et gros Tok. Merci pour votre gentillesse et votre humour, « C'est tout pour moi ! ».

A Chloé, ou Chéwiiiie. Merci pour ces délires et ces bons moments passés ensemble (« Nuuuut-nuuut »).

A Laurent, ou Lolo. Merci pour tous ces « Définitivement... ! » et ces remakes de « Tutotal ». Et à Vincent, « On est suuu-per contents ! ».

A David, ma biiiche. Merci pour ces cours mémorables du DU d'infectio (« Excellent... ça change de d'habitude »), ces fous-rires et ces bons moments. Et à Jérémy, pour ta bonne humeur, ton écoute et ta gentillesse.

A Chloé, ou Bourgui. Merci pour ton soutien, ta bonne humeur et ton humour. Merci pour ces heures de discussions, et ces bon moments passés (à Biarraiitz ou ailleuuurs) ainsi que ceux à venir.

A Catherine, ma petite frite. Ma seule, unique et meilleure colocataire. Merci de m'avoir rendu l'arrivée à Toulouse plus qu'agréable. J'ai de la chance de te connaître. Merci pour tout mon Fricadou.

A Oriane, ma Coquinou. Ma touteuh belle de longue date. Il est bien loin le temps où nous nous regardions du coin de l'œil au Cha, en se demandant si la P1 allait porter ses fruits ! Je suis si contente de t'avoir auprès de moi depuis toutes ces années. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Merci de ta bonne humeur et de rendre toutes mes blagues (même les moins drôles) hilarantes. Je suis heureuse de vous savoir dans le coin avec Vianney et Agathe, j'espère pour encore quelques temps. Merci pour tout ma biche.

A Camille, mon Bigou, toi qui m'a suivie presque tout le long de mon internat, qui m'a si souvent épaulée et soutenue (« Pas de ça entreuh nous héhéhé hohoho »), accompagnée durant nos « cafés » sur la majeure partie des terrasses de Bordeaux. Que de discussions, que de bons moments. Tu as toujours été là, et je ne te remercierai jamais assez pour ça. Merci à Louis pour sa gentillesse et son aptitude à te rendre la vie si belle (...et à tolérer nos heures passées au téléphone). « Et tu as... ?! Raiiisooooon ».

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ADR : Analyse des risques

AFLP : *Amplified fragment-length polymorphism* ou polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

AMDEC : Analyse des modes de défaillance, de leur effet et de leur criticité

ANSM : Agence Nationale de Sécurité des Médicaments et des produits de santé

AP-PCR : *Arbitrarily primed-polymerase chain reaction* ou réaction en chaîne par polymérase amorcée arbitrairement

ARN : Acide ribonucléique

CDT : *Clostridioides difficile* transférase ou toxine binaire

CDTa : Composant enzymatique de CDT

CDTb : Composant ligand de CDT

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIQ : Contrôle interne de qualité

CLIA : *Chemiluminescent immunoassay* ou chimiluminescence

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CNR : Centre national de référence

COFRAC : Comité français d'accréditation

CPM : Colite Pseudo Membraneuse

CT : Culture toxigénique

CTA : *Cytotoxicity assay* ou test de cytotoxicité

ECDC : *European Center for Disease prevention and Control* ou Centre européen de prévention et contrôle des maladies

ECP : Effet cytopathogène

EEQ : Evaluation externe de la qualité

EIA : *Enzyme Immuno Assay* ou dosage immuno-enzymatique

ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

ES : Etablissement de santé

ESCMID : *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* ou Société européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses

EUCLID : *European point-prevalence study of Clostridium difficile Infection in hospitalised patients with diarrhoea*

GDH : Glutamate Déshydrogénase

GTPase : Guanosine-triphosphatase

IAS : Infection associée aux soins

ICD : Infection à *C. difficile*

IC : Intervalle de confiance  
IDSA : Infectious Diseases Society of America ou Société américaine de maladies infectieuses  
InVS : Institut de veille sanitaire  
IPP : inhibiteurs de pompe à protons  
IV : Intraveineux  
Kb : Kilo base  
LAMP : *Loop-mediated isothermal amplification* ou Amplification isotherme médiée en boucle  
LBM : Laboratoire de biologie médicale  
LSR : *Lipolysis stimulated lipoprotein receptor*, récepteur de lipoprotéines stimulé par la lipolyse  
McF : Mac Farland  
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin  
MLST : *Multi locus sequence typing* ou séquençage multi-locus  
MLVA : *Multi locus variable-number tandem-repeat analysis* ou analyse multi-locus de répétition en tandem polymorphe  
NA : Non applicable  
NAP1 : *North American pulsotype 1*  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
*PaLoc* : Locus de pathogénicité  
pb : paire de bases  
PCR : *Polymerase chain reaction*, amplification par polymérase en chaîne  
PGFE : *Pulsed field gel electrophoresis* ou électrophorèse en champ pulsé  
PO : *Per os*  
PR : PCR Ribotype  
QUAMIC : Comité qualité de la société française de microbiologie  
RAISIN : Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales  
RAPD : *Random amplified polymorphic DNA* ou amplification aléatoire d'ADN polymorphe  
REA : *Restriction endonuclease analysis* ou analyse de restriction par endonucléase  
REMIC : Référentiel en microbiologie médicale  
Rep-PCR : Amplification de séquences répétitives  
RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism* ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction  
SFM : Société française de microbiologie  
SHEA : *Society for Healthcare Epidemiology of America* ou Société pour l'épidémiologie des soins de santé de l'Amérique  
SIL : Système informatique du laboratoire  
SIMOA : *Single molecule array*  
TA : Température ambiante  
TAAN : Tests d'amplification d'acides nucléiques  
TcdA : Toxine A  
TcdB : Toxine B



TDM : Tomodensitométrie

TMF : Transplantation du microbiote fécal

UFC : Unité formant colonie

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	2
LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
TABLE DES MATIERES .....	9
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	12
INTRODUCTION.....	13
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	15
<b>1 Un peu d'histoire.....</b>	<b>15</b>
<b>2 Clostridioides difficile .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Caractéristiques générales .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Ecologie, réservoir et mode de transmission.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Réservoir humain.....	17
2.2.2 Réservoir environnemental.....	18
2.2.3 Réservoir animal.....	19
2.2.4 Réservoir alimentaire.....	19
<b>2.3 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence.....</b>	<b>20</b>
2.3.1 Spores .....	20
2.3.2 Adhésines.....	21
2.3.3 Toxines A et B et locus de pathogénicité.....	21
2.3.4 Souche BI/NAP1/027.....	24
2.3.5 Toxine binaire ou CDT.....	25
<b>2.4 Typage moléculaire.....</b>	<b>27</b>
<b>3 Infections à C. difficile.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Epidémiologie.....</b>	<b>28</b>
3.1.1 Europe .....	28
3.1.2 France.....	30
<b>3.2 Physiopathologie .....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Dysbiose intestinale.....	32
3.2.2 Contamination par une souche toxigène .....	33
3.2.3 Réponse immunitaire de l'hôte .....	34
<b>3.3 Facteurs de risque .....</b>	<b>35</b>
3.3.1 Facteurs de risque d'un premier épisode d'ICD .....	35

3.3.2	Facteur de risque de récurrence .....	36
<b>3.4</b>	<b>Manifestations cliniques.....</b>	<b>37</b>
3.4.1	Manifestations coliques et complications.....	37
3.4.2	Manifestations extra-coliques .....	38
3.4.3	Sévérité.....	39
3.4.4	Récurrence et/ou rechute.....	39
<b>4</b>	<b>Diagnostic microbiologique des ICD .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Définition d'un cas d'ICD.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Indications de l'exploration microbiologique.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Sélection des échantillons au laboratoire .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Prélèvement et transport.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Méthodes de diagnostic microbiologiques .....</b>	<b>42</b>
4.5.1	Méthodes de référence.....	42
4.5.2	Autres tests diagnostiques.....	45
4.5.3	Les algorithmes diagnostiques recommandés .....	50
<b>4.6</b>	<b>Algorithme diagnostique Meridian Bioscience .....</b>	<b>55</b>
4.6.1	Principe.....	55
4.6.2	Caractéristiques techniques .....	56
4.6.3	Performances analytiques de l'algorithme.....	62
4.6.4	Stratégie algorithmique Meridian .....	62
<b>4.7</b>	<b>Accréditation des algorithmes diagnostiques .....</b>	<b>64</b>
<b>4.8</b>	<b>Sensibilité aux antibiotiques.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>Traitement des ICD .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Traitements médicamenteux recommandés .....</b>	<b>66</b>
5.1.1	Cas non sévère.....	67
5.1.2	Cas sévère.....	67
5.1.3	Première récurrence ou risque de récurrence.....	68
5.1.4	ICD récurrentes et multiples .....	68
<b>5.2</b>	<b>Alternatives thérapeutiques .....</b>	<b>69</b>
5.2.1	Vaccination .....	69
5.2.2	Biothérapies.....	69
5.2.3	Antibiotiques .....	69
<b>5.3</b>	<b>Mesures associées et prévention.....</b>	<b>70</b>
5.3.1	Gestion des antibiotiques .....	70
5.3.2	Gestion des patients et de l'environnement.....	70
<b>CHAPITRE 1 : VALIDATION DU TEST ALETHIA™ C. DIFFICILE SUR COLONIES DE CLOSTRIDIODES DIFFICILE ISOLEES EN CULTURE .....</b>		<b>72</b>
<b>Contexte .....</b>		<b>73</b>

<b>1. Introduction.....</b>	<b>74</b>
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>76</b>
2.1. Souches de <i>C. difficile</i> .....	76
2.2. Culture .....	76
2.3. Test <i>Alethia</i> <sup>TM</sup> <i>C. difficile</i> .....	76
2.4. Etendue de mesure : limite de détection.....	77
2.5. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire.....	77
2.6. Contamination.....	77
2.7. Robustesse.....	77
2.8. Sensibilité analytique .....	78
<b>3. Résultats .....</b>	<b>79</b>
<b>4. Discussion .....</b>	<b>82</b>
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>84</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE 2 : ACCREDITATION DE L'ALGORITHME MERIDIAN BIOSCIENCE POUR LE DIAGNOSTIC DES ICD .....</b>	<b>88</b>
<b>Contexte .....</b>	<b>89</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>90</b>
<b>2. Matériel et méthode.....</b>	<b>92</b>
<b>3. Proposition de SH FORM 43 pour l'algorithme diagnostique des ICD par Meridian     Bioscience .....</b>	<b>94</b>
<b>4. Discussion .....</b>	<b>122</b>
<b>5. Conclusion .....</b>	<b>124</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>125</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>127</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>129</b>

## LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes d'antibiotiques et fréquence d'association aux ICD .....	33
Tableau 2 : Principes, avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques des ICD	48
Tableau 3 : Sensibilité et spécificité des différentes méthodes disponibles pour le diagnostic d'ICD..	48
Tableau 4 : Techniques cibles, durée, sensibilité et spécificité de TAANs disponibles .....	49
Tableau 5 : Classification des stratégies diagnostiques des ICD.....	52

### Liste des figures

Figure 1 : Coloration de Gram de <i>C. difficile</i> .....	16
Figure 2 : Spore de <i>C. difficile</i> en microscopie électronique .....	17
Figure 3: Schéma d'une spore de <i>C. difficile</i> .....	21
Figure 4 : Mécanisme d'action des toxines de TcdA et TcdB .....	23
Figure 5 : Locus de pathogénicité ( <i>PaLoc</i> ) de <i>Clostridioides difficile</i> .....	25
Figure 6 : Locus de la toxine binaire (CDT) de <i>Clostridioides difficile</i> : <i>CdtLoc</i> .....	26
Figure 7 : Mécanisme d'action de CDT ou toxine binaire.....	26
Figure 8 : Distribution géographique des PR de <i>C. difficile</i> par pays sur l'étude EUCLID en 2012 et 2013 .....	29
Figure 9 : Physiopathologie des ICD.....	32
Figure 10 : Etapes du cycle de <i>C. difficile</i> dans le tube digestif humain .....	33
Figure 11 : Modalités d'action des toxines de <i>C. difficile</i> .....	34
Figure 12 : Echelle de Bristol .....	37
Figure 13 : CPM : aspect endoscopique .....	38
Figure 14 : Test de cytotoxicité .....	43
Figure 15 : Milieu de culture sélectif et milieu de culture chromogène de <i>C. difficile</i> .....	44
Figure 16 : Colonies de <i>C. difficile</i> sur milieu TCCA .....	45
Figure 17 : Proposition d'algorithme diagnostique en 2 étapes d'une ICD .....	50
Figure 18 : Proposition d'algorithme diagnostique d'une ICD .....	51
Figure 19 : Mode opératoire du test ImmunoCard® <i>C. difficile</i> GDH .....	57
Figure 20 : Principe de la technique LAMP .....	59
Figure 21 : Mode opératoire du test Alethia™ <i>C. difficile</i> .....	61
Figure 22 : Synthèse des recommandations thérapeutiques de l'ESCMID .....	66

## INTRODUCTION

*Clostridioides* (anciennement *Clostridium*) *difficile* est une bactérie gram positif anaérobie sporulée et productrice de toxines. Cette bactérie ubiquitaire persiste dans l'environnement grâce à la résistance conférée par ses spores, et est disséminée par transmission féco-orale chez l'homme. Jusqu'à 3% de la population générale est colonisée par *C. difficile* de manière asymptomatique (Bartlett, 1994; Rousseau et al., 2012).

A l'occasion d'un déséquilibre de la flore intestinale, souvent provoqué par la prise d'antibiotiques, *C. difficile* colonise le tube digestif et sécrète ses toxines A et B au contact de la paroi intestinale. L'action des toxines entraîne la survenue de tableaux cliniques d'intensité variable. En effet, les infections à *C. difficile* (ICD) peuvent se traduire par une diarrhée sans retentissement sur l'état général, voire une colite pseudomembraneuse (CPM) pouvant se compliquer de mégacôlon toxique, de perforation digestive et de syndrome de choc infectieux. Les formes sévères et les complications surviennent dans moins de 10% des cas, avec une mortalité pouvant atteindre jusqu'à 30% (Eckert et al., 2015). *C. difficile* est le principal agent pathogène responsable de diarrhées associées aux soins dans les pays industrialisés. Il est à l'origine de 15 à 25% des diarrhées post-antibiotiques et de la quasi-totalité des CPM (Magill et al., 2014). La forte proportion de récurrences (25% dans les deux mois suivant un premier épisode d'ICD) complique l'éradication de la bactérie lorsqu'elle est présente (Eckert et al., 2015). Sur les quinze dernières années, la survenue d'épidémies à mortalité élevée ainsi que l'incidence croissante de cas communautaires ont renforcé l'intérêt porté à *C. difficile* et intensifié son étude en tant que pathogène.

Le diagnostic d'une ICD est défini par la présence d'un tableau clinique compatible et de la preuve microbiologique de la présence des toxines libres ou d'une souche toxigène de *C. difficile* dans les selles, ou bien lors du diagnostic de CPM réalisé par endoscopie ou histopathologie lors d'une colectomie ou d'une autopsie (Cohen et al., 2010; Debast et al., 2014). Pour toutes les raisons évoquées dans le paragraphe précédent, le diagnostic d'une ICD doit être rapide et fiable, afin de pouvoir traiter et mettre en place les précautions contact du patient concerné au plus vite. Plusieurs tests diagnostiques sont disponibles, tels que la détection de l'antigène glutamate déshydrogénase (GDH) et des toxines libres par méthode immuno-enzymatique (EIA), ainsi que la détection des gènes codant pour les toxines par amplification d'acides nucléiques (TAAN). Aucun de ces tests n'est suffisamment sensible et spécifique pour être utilisé seul, c'est pourquoi les sociétés savantes ont émis des recommandations proposant des algorithmes diagnostiques en deux ou trois étapes (Barbut et al., 2018; Crobach et al., 2016). Ces recommandations permettent d'optimiser l'utilisation de ces tests pour un meilleur diagnostic des ICD.

L'algorithme diagnostique des ICD commercialisé par la société Meridian Bioscience a été mis en place au laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux en 2014. Il est composé de deux étapes, la première étape de dépistage consiste à détecter la présence de GDH (Immunocard® *C. difficile* GDH), l'étape suivante de confirmation consiste à détecter et amplifier les régions conservées du locus de pathogénicité *PaLoc*, comportant les gènes codant pour les toxines A et B (Alethia™

*C. difficile*). Face à la survenue, bien que peu fréquente, de résultats invalides avec le test Alethia à deux reprises sur selles, il a été décidé d'envisager la réalisation du test Alethia sur les colonies obtenues après mise en culture de *C. difficile* (culture toxigénique). Cette alternative permet de s'affranchir de potentiels effets inhibiteurs d'amplification génique dans les selles.

L'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) est rendue obligatoire par l'article L. 6221-1 du Code de la santé publique. Elle doit porter sur 100% des examens biologiques que les LBM réalisent en 2020. Cette accréditation est délivrée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) et repose sur les exigences de la norme NF EN ISO 15189. Pour se faire, les examens biologiques doivent être validés. Les validations des méthodes à accréditer sont guidées, le COFRAC mettant à disposition des guides techniques d'accréditation, ainsi que référentiels et formulaires pour effectuer ces validations. Le référentiel SH REF 08 (COFRAC, 2017) établit la portée d'accréditation de l'examen concerné, tandis que le guide technique SH GTA 04 (COFRAC, 2015a) présente l'ensemble des points à aborder lors de la validation de méthode. Les données sont listées au sein du formulaire SH FORM 43 (COFRAC, 2015b). Les informations fournies par le SH GTA 04 peuvent être complétées par les recommandations des sociétés savantes telles que la Société Française de Microbiologie (SFM) qui propose un référentiel spécifique pour la microbiologie appelé QUAMIC (QUAMIC, 2016). Ces référentiels ne fournissent pas d'exemples de dossiers de validation de méthode.

Dans cette thèse, nous nous sommes dans un premier temps intéressés au test Alethia développé par le fournisseur dans les selles et à son application à la culture toxigénique. Nous avons ainsi effectué les essais permettant de vérifier la performance et la mise en fonction du test en routine. Nous avons respecté les exigences relatives au SH GTA 04 afin de soumettre cette technique à l'accréditation. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés à la validation de méthode de l'algorithme diagnostique complet proposé par la société Meridian Bioscience. Nous avons effectué les essais relatifs aux trois étapes de l'algorithme, l'analyse de risque globale et traité l'ensemble de ces données afin de répondre aux exigences du SH GTA 04. Nous avons rédigé un SH FORM 43 pré-rempli, nous permettant de soumettre à accréditation l'algorithme diagnostiqué des ICD utilisé au CHU de Bordeaux, et de le proposer aux laboratoires utilisant ce même algorithme et souhaitant eux aussi l'accréditer.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 Un peu d'histoire

La première description de colite pseudomembraneuse (CPM), symptôme pathognomonique d'une infection à *C. difficile* (ICD) fut décrite par Finney en 1893. Il s'agissait d'une patiente de 22 ans opérée d'une gastro-entérostomie, pour un tableau d'obstruction sur ulcère gastrique (Finney, 1893). Il a fallu attendre la généralisation de l'utilisation des antibiotiques pour mettre en évidence le lien entre antibiothérapie et CPM.

L'hypothèse selon laquelle une antibiothérapie préalable favorisait une « entérocolite staphylococcique » fut d'abord évoquée (Bartlett and Gorbach, 1977; George *et al.*, 1982; Tedesco, 1982). En effet *Staphylococcus aureus* était suspecté de coloniser la flore intestinale après altération de cette dernière par antibiothérapie, et Khan et Hall (Khan and Hall, 1966) avaient décrit la guérison des entérocolites à *S. aureus* après traitement oral par vancomycine (antibiotique également actif sur *C. difficile*). Au début des années 1970, Tedesco *et al.* avaient étudié la survenue de diarrhées et CPM chez 200 patients sous clindamycine, en utilisant l'endoscopie digestive comme outil diagnostique de routine. Leurs résultats furent concluants (incidence de 21% concernant la diarrhée, et de 10% concernant la CPM à l'endoscopie) et c'est à partir de cette étude que CPM et colite à clindamycine devinrent synonymes (Tedesco, 1974). Le point de l'étude de Tedesco *et al.* permettant d'écarter l'hypothèse précédemment émise était que les cultures de selles de ces patients étaient négatives à *S. aureus*. Néanmoins le rôle de *C. difficile* n'était pas encore établi.

*C. difficile* avait pourtant été isolé pour la première fois à partir de selles de nouveau-nés dès 1935 (Hall IC and O'Toole E., 1935). La bactérie avait été alors baptisée *Bacillus difficilis* afin de traduire la difficulté rencontrée à l'isoler et à la mettre en culture. La production de toxines et l'effet létal observé en les injectant chez des souris et des cochons d'Inde est décrite deux ans plus tard (Snyder, 1937). Entre 1940 et 1962, seules deux études font référence à *C. difficile* chez l'homme, sans preuve établie de son pouvoir pathogène (Snyder, 1940; Smith and King, 1962). Il faut attendre l'année 1977 pour que Bartlett *et al.* incriminent le pouvoir pathogène de *C. difficile* dans la survenue des CPM (Bartlett *et al.*, 1977). Les auteurs établirent le lien entre les CPM post-antibiothérapie et la production de toxine B de *C. difficile*, sur un modèle animal d'abord, puis chez l'homme. Ils observèrent la transmission de la maladie à des hamsters sains via les selles d'animaux malades et de patients atteints traités par clindamycine (Bartlett *et al.*, 1978a). L'équipe se pencha ensuite sur la caractérisation de l'agent responsable de la CPM. Ils mirent d'abord en évidence la grande taille de la toxine car elle était retenue par un filtre de moins de 10 pm. Pour en déterminer la nature, ils testèrent sa neutralisation par différentes antitoxines. Les antitoxines de la gangrène gazeuse (et notamment celle de *Clostridium sordellii*) fonctionnèrent, contrairement à l'antitoxine de *S. aureus* (Chang *et al.*, 1978). L'étape suivante consistait à trouver, parmi les différentes bactéries présentes dans les selles animales du genre Clostridioides (anciennement Clostridium), laquelle était précisément à l'origine de la production de toxines, et donc de la maladie. C'est ainsi que Bartlett *et al.* conclurent à la



responsabilité de souches de *C. difficile* productrices de toxines dans la survenue des CPM associées aux antibiotiques (Bartlett et al., 1978b).

Les années 1970 ont vu naître l'ère des infections post antibiotiques à *C. difficile*. Sa mise en évidence fut laborieuse et nécessita presque un siècle, mais *C. difficile* fait désormais partie des agents bactériens les plus étudiés. Actuellement responsable de la majorité des diarrhées infectieuses associées aux soins chez l'adulte dans les pays industrialisés (Magill et al., 2014), de 10 à 25 % des diarrhées post-antibiotiques et de la quasi-totalité des cas de CPM (Bartlett, 2006), *C. difficile* constitue aujourd'hui un problème de santé publique majeur.

## 2 *Clostridioides difficile*

### 2.1 Caractéristiques générales

*C. difficile* fait partie du genre *Clostridioides*, de la famille des Peptostreptococcaceae, de l'ordre des Clostridiales, de la classe des Clostridia, du phylum des Firmicutes (Knight et al., 2015; Lawson et al., 2016). *Clostridium difficile* a officiellement été rebaptisé *Clostridioides difficile* en 2016 (Lawson et al., 2016) afin de confirmer son éloignement phylogénétique du genre *Clostridium*. Cependant, les deux dénominations *Clostridium difficile* et *Clostridioides difficile* restent valables (Oren and Rupnik, 2018). C'est un bacille gram positif anaérobie strict et sporulé, dont la spore est subterminale, ovale et déformante (Figures 1 et 2). Sa mobilité est lente grâce à des flagelles péritriches.

Sous sa forme végétative, il se présente sous l'aspect de bacille pléomorphe en paire ou en chaînettes courtes. Il peut également, afin de survivre aux conditions environnementales hostiles, prendre la forme de spores.

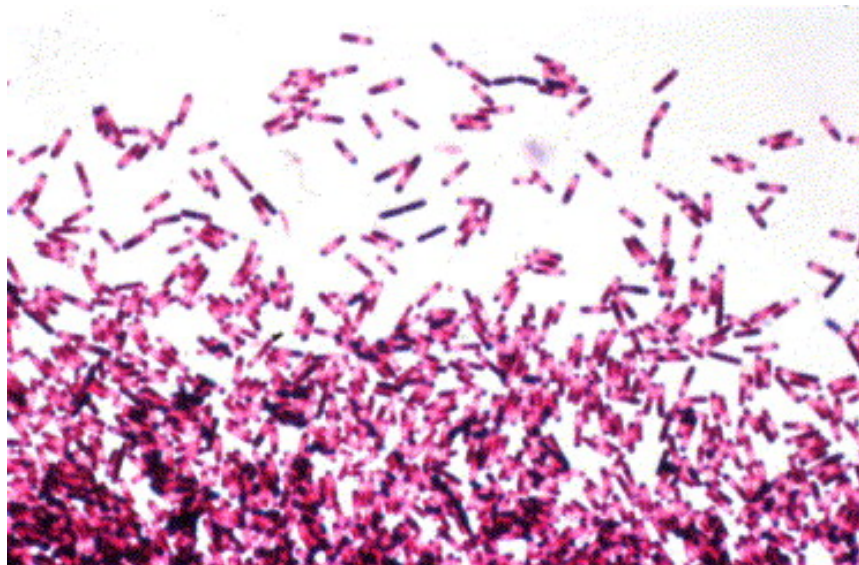


Figure 1 : Coloration de Gram de *C.difficile* (Buyse et al., 2005)

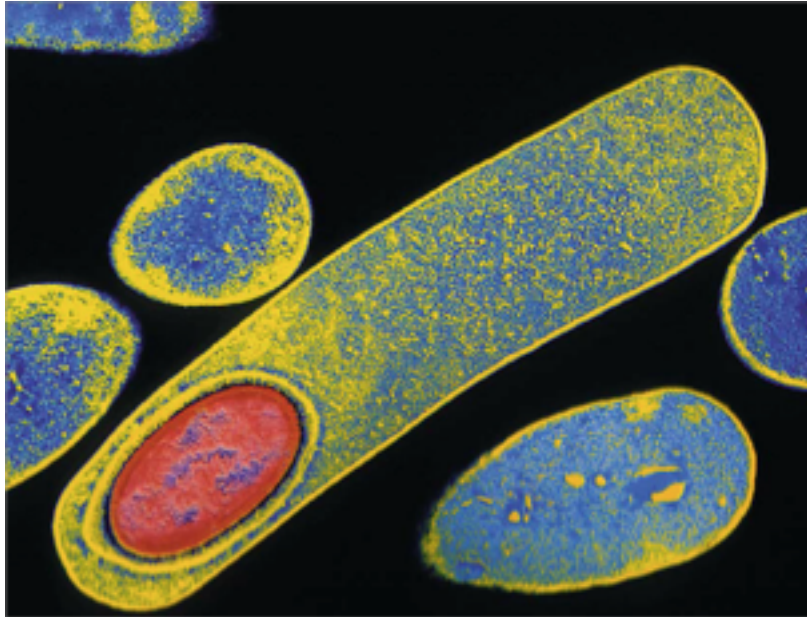


Figure 2 : Spore de *C. difficile* en microscopie électronique (Aslam et al., 2005) La spore est colorée en rouge au sein de la bactérie colorée en bleu et jaune.

## 2.2 Ecologie, réservoir et mode de transmission

Le caractère résistant des spores permet à *C. difficile* de persister dans l'environnement. Ses réservoirs multiples contribuent à faciliter sa dissémination et sa transmission par voie féco-orale chez l'homme (Leffler and Lamont, 2015).

### 2.2.1 Réservoir humain

Le tube digestif humain constitue l'un des réservoirs principaux de la bactérie. D'après Barbut et al., *C. difficile* a une faible prévalence dans la population générale (Barbut et al., 2015) puisqu'il fait partie de la flore microbienne intestinale normale de 0 à 3 % des adultes sains (Bartlett, 1994).

Durant les douze premiers mois de vie, 60 à 70 % des nourrissons sont porteurs de la bactérie sans développer de symptômes (Jangi and Lamont, 2010). Dès le plus jeune âge, la flore fécale est vulnérable aux phénomènes de colonisation par *C. difficile*. En effet, cette dernière se fait majoritairement pendant la période néonatale puis entre l'âge de quatre et six mois. Ces deux périodes sont associées à un microbiote intestinal favorable à la colonisation par *C. difficile*. Celle-ci se ferait plus par contact environnemental que par transmission maternelle (Al-Jumaili et al., 1984). Elle est asymptomatique chez les enfants de moins de trois ans. En effet, ils sont insensibles aux toxines produites par la bactérie en raison de l'immaturation des récepteurs de surface des entérocytes (Al-Jumaili et al., 1984; Borriello, 1990; Eglow et al., 1992). De plus, le passage d'anticorps antitoxines maternels par voie placentaire et leur transmission pendant l'allaitement constitueraient des facteurs

de protection (Lamont, 2002). La composition du mucus intestinal empêcherait également les toxines de se lier à leurs récepteurs. Enfin le manque de recrutement et d'activation des neutrophiles dû à l'immaturation du système immunitaire chez ces enfants (Rolfe and Song, 1993; Tamma and Sandora, 2012) pourraient également expliquer ce portage asymptomatique. Chez les enfants de moins de trois ans, la colonisation moyenne asymptomatique est de 60 % (Rousseau et al., 2012) puis la prévalence devient la même que chez les adultes (McFarland, 2008; Rousseau et al., 2012).

A l'âge adulte, jusqu'à 3% des sujets sont colonisés et porteurs sains (Bartlett, 1994; Rousseau et al., 2012).

Les personnes de plus de 65 ans présentent un taux supérieur à l'adulte sain avec 10 à 20 % des personnes colonisées. Ceci s'explique par la plus grande fréquence d'exposition à la bactérie (hospitalisation, cf. paragraphe 2.2.2), de médication, d'altération du microbiote intestinal et des comorbidités (Salles, 2009). La colonisation des patients hospitalisés, en institutions, ou grabataires est plus élevée avec un pourcentage pouvant atteindre 15 à 30 % (McFarland, 2008; Simor, 2010; Ziakas et al., 2015).

### 2.2.2 Réservoir environnemental

*C. difficile* est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans tout l'environnement.

Xu et al. ont décrit sa présence dans de nombreux échantillons d'eau prélevés dans des rivières et stations de traitement d'eaux usées au Canada (Xu et al., 2014). Simango et al. l'ont également mis en évidence au niveau des eaux et des sols au Zimbabwe (Simango, 2006) tandis que Al Saif et Brazier l'ont retrouvé au niveau de l'eau des plages, de fleuves, de l'eau courante et des piscines de la région de Cardiff en Angleterre (Al Saif and Brazier, 1996). Il est aujourd'hui admis que le réservoir environnemental de la bactérie est global et pléthorique.

L'environnement intérieur au sein des maisons et résidences est également un lieu où l'on retrouve *C. difficile* : Alam et al. ont mis en évidence la contamination de 25 maisons sur 30 étudiées, avec une moyenne globale de 32% des surfaces échantillonnées positives (Alam et al., 2014). Les maisons étudiées faisaient partie de la communauté urbaine d'une grande ville américaine (Houston, Texas) et la population concernée était saine.

Les établissements de soins constituent un réservoir plus stratégique encore. Les spores qui peuvent persister plusieurs mois sur les surfaces sèches en milieu hospitalier (Otter et al., 2013) sont transmises d'une chambre à l'autre via les mains et gants du personnel soignant (Jullian-Desayes et al., 2017). Elles sont retrouvées dans les chambres de patients atteints d'ICD, mais également dans celles de patients non-infectés, du fait de la contamination des surfaces (Yui et al., 2017) et de leur dissémination aérienne (Best et al., 2010). Des données anciennes concernant le taux de colonisation des chambres allaient de 23 à 29 % selon les études, avec une augmentation significative pouvant aller jusqu'à 49 % dans les chambres de patients atteints d'ICD (Dubberke et al., 2007; McFarland et al., 1989; Verity et al., 2001).

### 2.2.3 Réservoir animal

Le tube digestif des animaux constitue également un réservoir pour *C. difficile*, qu'ils soient sauvages ou domestiques. Plusieurs études font état de la présence de *C. difficile* chez les animaux de compagnie, d'élevage ou bien sauvages (Hensgens et al., 2012; Jardine et al., 2013; Rabold et al., 2018). La transmission de l'animal à l'homme et inversement pose question. La présence simultanée de souches caractérisées à la fois chez des porcs d'élevage et des personnes au contact de ces derniers a été démontrée (Keessen et al., 2013). Une étude récente menée par Dingle et al établit la présence de souches PR 078 chez les éleveurs et porcs d'élevage (Dingle et al., 2019). Cette étude va plus loin, en associant le rôle des antibiotiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et l'émergence de résistances au sein des souches de *C. difficile* responsables d'infections chez l'homme. En effet, l'usage abondant des tétracyclines dans l'élevage porcin entraînerait, par sélection positive, l'émergence de souches résistantes à ces dernières. Ces souches PR 078 dissémineraient dans la population par contact direct des porcs avec les éleveurs et *via* la consommation des viandes issues de ces élevages (Dingle et al., 2019). Ces données récentes renforcent l'hypothèse émise aujourd'hui que *C. difficile* peut être responsable de zoonose (Rodriguez et al., 2016).

### 2.2.4 Réservoir alimentaire

*C. difficile* est retrouvé dans les aliments, tels que la viande (Curry et al., 2012; Esfandiari et al., 2014), les légumes (Bakri and al., 2009; Eckert et al., 2013a) et les fruits de mer (Metcalf et al., 2011).

La contamination des patients *via* l'alimentation en milieu hospitalier a été évaluée par Kwon *et al* (Kwon et al., 2016). Ces auteurs ont montré que 0,2 % des échantillons de nourriture testés étaient positifs à *C. difficile*. Une modélisation stochastique indiquait que moins d'un patient sur 1000 hospitalisations pourrait être colonisé par *C. difficile* par voie alimentaire. Cette étude concluait que l'alimentation en milieu hospitalier constituait un faible facteur de risque de contamination.

Ce moyen de contamination a également été évalué par Rodriguez-Palacios *et al* en milieu communautaire (Rodriguez-Palacios et al., 2017). L'étude montrait une prévalence de 1 % de *C. difficile* dans les aliments, soit cinq fois plus élevée qu'en milieu hospitalier (Kwon et al., 2016). Le risque réel de transmission de *C. difficile* *via* les spores contenues dans les aliments est aujourd'hui non quantifié d'autant que la quantité infectante de *C. difficile* pour l'homme n'est pas connue (Hoover and Rodriguez-Palacios, 2013). Rodriguez et al précisent que seuls les patients présentant des perturbations gastro-intestinales pourraient être vulnérables à la colonisation et à l'infection par *C. difficile* par voie alimentaire (Rodriguez et al., 2016).

## 2.3 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

### 2.3.1 Spores

La spore constitue la forme dormante et de résistance de la bactérie. Elle constitue également un facteur de virulence puisqu'elle facilite la transmission de la bactérie. *C. difficile* acquiert ce morphotype lorsque les conditions environnementales sont hostiles. En effet, les spores sont résistantes à la chaleur jusqu'à 73°C (Rodriguez-Palacios and Lejeune, 2011), au pH acide, aux antibiotiques et à la dessiccation (Leffler and Lamont, 2015), et permettent à *C. difficile* de survivre en aérobiose (Jump et al., 2007). Elles résistent également aux désinfectants usuels utilisés jusqu'alors en Etablissements de santé (ES) (Ali et al., 2011) et dans la communauté notamment aux alcools éthyliques et propyliques (Rutala et al., 2012). Les spores sont efficacement détruites par des solutions sporicides adaptées à base de peroxyde d'hydrogène (Barbut, 2015), au glutaraldéhyde à 2 %, au formaldéhyde à 8 % et à l'hypochlorite de sodium à 20 ppm (Awad et al., 2014; Barra-Carrasco et al., 2014).

Les spores de *C. difficile* ont une structure commune aux spores décrites pour les autres bactéries (Paredes-Sabja et al., 2014). Elles possèdent différentes couches qui contribuent aux propriétés de résistance des spores (figure 3), le facteur le plus important y contribuant étant son faible contenu en eau. Les spores sont généralement composées d'un exosporium externe en contact avec l'environnement. Il modulerait les interactions avec l'épithélium et régulerait la germination (Lawley et al., 2009). Une couche protéique dense constituée d'anneaux concentriques appelée manteau entoure la membrane externe, elle est dérivée de la cellule mère et ne possède aucune propriété de résistance. Le cortex constitué de peptidoglycane protège la membrane de germination qui renferme le noyau. Celui-ci contient une copie complète du génome, des ribosomes et une multitude de complexes nucléoprotéiques et de nombreuses enzymes (Permpoonpattana et al., 2011).

L'analyse protéomique des spores de la souche 630 de *C. difficile* révèle l'existence d'environ 336 protéines associées aux spores dont 88 sont communes aux clostridies et 29 sont spécifiques de *C. difficile*. Elles sont impliquées dans les processus de traduction, sporulation/germination et dans la dégradation/stabilisation des protéines. Des protéines métaboliques associées à la production d'énergie sont aussi largement représentées. Cinq protéines associées à la couche externe de la paroi des spores ont été également identifiées : CotA, CotB, CotCB, CotD et CotE. CotD possèderaient une activité catalase et CotE aurait une fonction peroxydase. Les activités catalase et peroxydase pourraient être impliquées dans le pouvoir antioxydant des spores leur permettant de réduire la toxicité du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lawley et al., 2009).

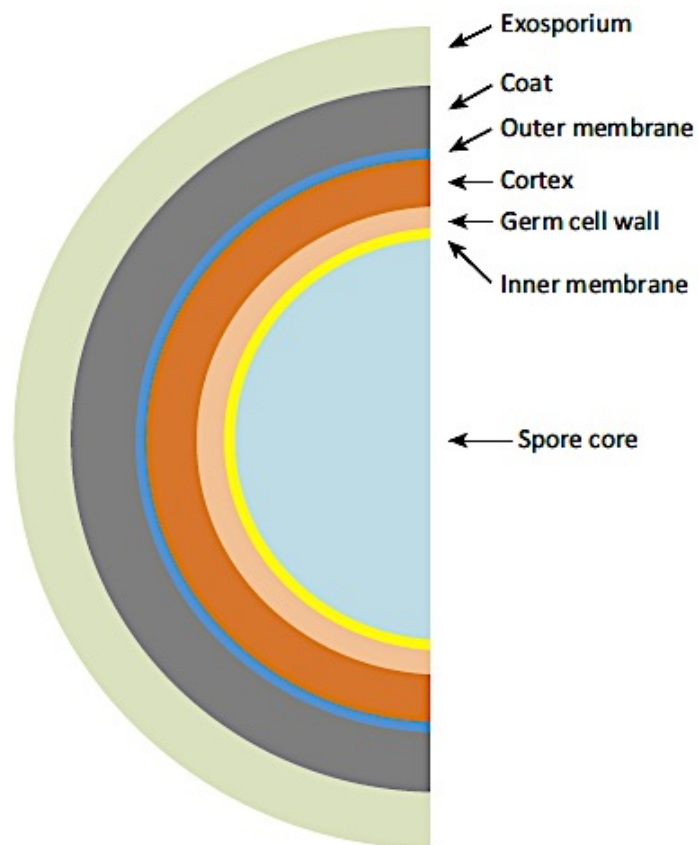


Figure 3: Schéma d'une spore de *C. difficile*. De l'extérieur vers l'intérieur : exosporium, manteau, cortex, membrane de germination et noyau (Paredes-Sabja et al., 2014)

### 2.3.2 Adhésines

Les adhésines jouent un rôle important dans la colonisation digestive, point de départ de la physiopathologie des ICD. Parmi les principales adhésines impliquées sont retrouvées les protéines de la paroi cellulaire (Cell wall proteins ou Cwp) (Fagan et al., 2011) dont font partie des S-layer proteins (Slp) (Calabi et al., 2001). Sont également retrouvées les adhésines Fibronectin binding protein 68 (Fbp68) (Hennequin et al., 2003), Collagen binding protein A (CbpA) (Tulli et al., 2013), la protéine de choc thermique GroEL (Hennequin et al., 2001), et la lipoprotéine CD0873 (Kovacs-Simon et al., 2014).

### 2.3.3 Toxines A et B et locus de pathogénicité

Les toxines libres A et B, aussi appelées TcdA et TcdB constituent le principal facteur de virulence. Les souches de *C. difficile* « non toxigènes » sont considérées comme avirulentes et ne sont pas pathogènes (Geric et al., 2006; Kuehne et al., 2010).

TcdA et TcdB sont des exoprotéines de grande taille. Elles ont un poids moléculaire de 308 et

270 kDa, respectivement. TcdA possède des caractéristiques d'entérotoxine létale et cytotoxique et TcdB de cytotoxine. La production de l'une ou des deux toxines varie d'une souche à l'autre. L'expression de TcdA et de TcdB peut être simultanée (souches A+B+) mais la présence de TcdB seule (souches A-B+) (Burke and Lamont, 2014) et plus rarement de TcdA seule (souches A+B-) (Monot et al., 2015) ont été décrites dans la littérature.

TcdA et TcdB agissent en synergie mais des analyses utilisant des mutants délétés en toxines suggèrent que seule TcdB serait un facteur de virulence essentiel (Carter et al., 2015; Lyras et al., 2009). Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux que la virulence de TcdB seule serait 1000 fois supérieure à celle de TcdA (Kuehne et al., 2014; Lyras et al., 2009). Lorsqu'elles sont toutes deux exprimées, TcdA et TcdB agissent en synergie. Leur internalisation et leur transport dans l'entérocyte sont décrits en figure 4. Les toxines catalysent de façon irréversible la monoglycosylation de la thréonine en 35/37 des petites guanosine-triphosphatases (GTPases) de la famille Rho. Leur inactivation empêche la polymérisation des filaments d'actine. La conformation du cytosquelette des cellules cibles est modifiée, aboutissant à leur désorganisation structurale. Au niveau des entérocytes, ceci se traduit par une globulisation des cellules (illustrée en figure 14 du paragraphe 4.5.1.1), une inhibition de leur division et une destruction des jonctions serrées (Gerhard et al., 2008; Just and Gerhard, 2004). La mort de ces cellules induit une réaction inflammatoire intense. L'afflux de polynucléaires neutrophiles au niveau de la *lamina propria* participe à une importante réaction inflammatoire et entraîne la formation de pseudomembranes (Eckert et al., 2015a)

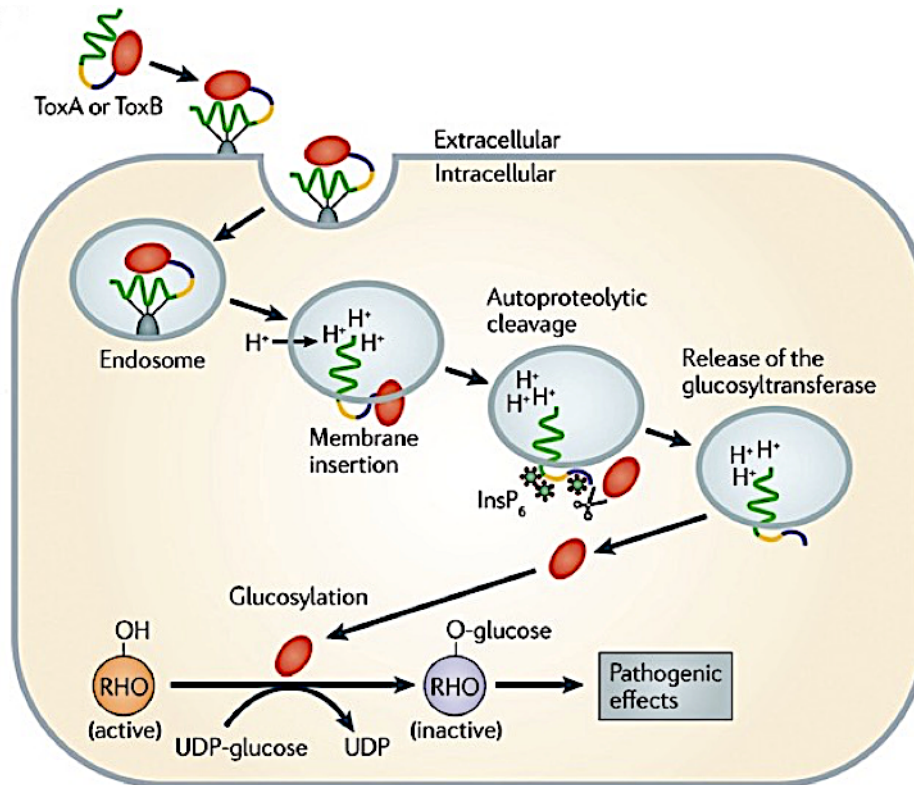


Figure 4 : Mécanisme d'action des toxines de TcdA (Tox A) et TcdB (Tox B) (Awad et al., 2014)

UDP = Uridine diphosphate, en rouge : le domaine catalytique N terminal ; en bleu : le domaine de la cystéine protéase ; en jaune : le domaine central hydrophobe et la région formant les pores (PFR) ; en vert : le domaine C terminal de la liaison au récepteur.

La première étape met en jeu la liaison de TcdA (Tox A) ou TcdB (Tox B) à des récepteurs cellulaires non connus, suivi de l'endocytose des toxines au sein de l'endosome. L'acidification de l'endosome entraîne l'insertion de la toxine et la formation de pore dans la membrane endosomale.

Des phénomènes de clivage InsP6 (inositol hexakiphosphatase) dépendants, médiés par la cystéine protéase permettent la libération de la glycosyltransférase active dans le cytosol. La glycosyltransférase libérée induit la glucosylation et l'inactivation des GTPases de la famille Rho, induisant l'effet pathogène au sein de la cellule.

Les gènes codant pour les toxines TcdA et TcdB présentent un haut degré d'homologie (66 %). Ils se situent au niveau du locus de pathogénicité, aussi appelé *PaLoc* (figure 5) (Eckert and Barbut, 2010). Cette région longue de 19,6 kilo bases (Kb) est présente chez les souches toxigènes. Elle est remplacée par une région non codante de 115 paire de bases (pb) chez les souches non toxigènes (Gerding et al., 2018; Rupnik et al., 2009). Son apparition chez *C. difficile* résulterait de la fusion de *loci* de deux souches distinctes, codants indépendamment pour la toxine A et pour la toxine B (Monot et al., 2015).

Plusieurs gènes accessoires font également partie du *PaLoc* (figure 5) Parmi eux : *tcdR* code pour la protéine TcdR, facteur sigma jouant un rôle dans la régulation positive de l'expression des toxines A et B, *tcdC* code pour la protéine TcdC jouant un rôle répresseur de la transcription des toxines A et B (Matamouros et al., 2007) et *tcdE* coderait pour une protéine impliquée dans la



formation de pores transmembranaires et intervenant dans la libération des toxines A et B (Govind and Dupuy, 2012).

#### 2.3.4 Souche BI/NAP1/027

Au début des années 2000, l'Amérique du Nord voit apparaître des épidémies d'ICD dont la morbidité, la mortalité et l'incidence des cas n'avaient pas été observées jusqu'alors (Loo et al., 2005; Pépin et al., 2005a). Ces épidémies ont gagné l'Europe peu de temps après. La caractérisation des souches en cause a révélé une production accrue de toxines et un niveau de résistance élevé aux antibiotiques.

Un clone dit « hyper virulent » BI/NAP1/027 (Kuijper et al., 2006a) a été caractérisé. La dénomination de ce clone est en lien avec les caractéristiques suivantes : BI par analyse de restriction par endonucléase, NAP1 pour le pulsotype *North American pulsotype 1* en électrophorèse à champ pulsé, et 027 pour le PCR-ribotype (PR) 027 (cf. paragraphe 2.4 Typage moléculaire). Il présente une délétion non spécifique de 18 pb au sein du gène *tcdC* du *Paloc* ou une délétion ponctuelle en position 117. Celles-ci mènent à une protéine tronquée ou l'apparition d'un codon stop, respectivement. TcdC est inactive, ne pouvant assurer son rôle de répression de la transcription des toxines (Dupuy et al., 2008). Cette absence de répression de transcription entraîne l'hyperproduction des toxines A et B à des taux de 16 à 23 fois supérieurs aux taux observés chez les souches toxigènes autres que BI/NAP1/027 (Warny et al., 2005). De plus, la virulence de clone peut être liée à la production d'une toxine binaire aussi appelée CDT pour *Clostridioides difficile* transférase. Les particularités de la toxine binaire sont développées dans le paragraphe suivant. Elle constituerait, avec l'hyperproduction des toxines A et B, un des facteurs majeurs de virulence du clone (McDonald et al., 2005) et la synergie suspectée de l'action de TcdA, TcdB et CDT serait à l'origine de la sévérité des tableaux cliniques induits (Loo et al., 2005).

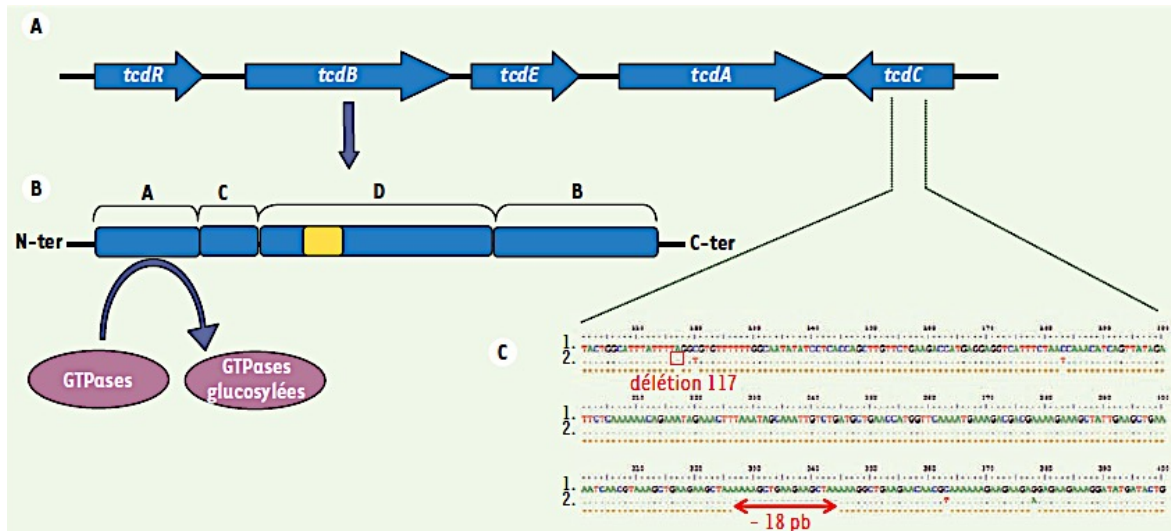


Figure 5 : Locus de pathogénicité (*PaLoc*) de *Clostridioides difficile*, structure de TcdB et séquence partielle de *tcdC* (Eckert and Barbut, 2010)

- A. Locus de pathogénicité = *PaLoc*. Les flèches indiquent le sens de la transcription.
- B. Représentation schématique de TcdB d'après (Jank and Aktories, 2008). A= *biological activity*, domaine amino-terminal à activité glucosyltransférase – C= *cutting*, domaine cystéine protéase – D= *delivery*, domaine de translocation avec région hydrophobe en jaune – B= *binding*, domaine de liaison au récepteur.
- C. Séquence d'une partie du gène *tcdC* de la souche VPI10463 (1) et d'une souche épidémique 027 (2). La souche 027 est caractérisée par la présence d'une délétion non spécifique de 18 pb et d'une délétion ponctuelle en position 117 introduisant un codon stop prématuré.

### 2.3.5 Toxine binaire ou CDT

Environ 6 à 10 % des souches de *C. difficile* possèdent la toxine binaire CDT (Eckert and Barbut, 2010). Elle a été décrite pour la première fois en 1988 (Popoff et al., 1988). Cette toxine de 4,3 kb possède une activité ADP ribosyl-transférase spécifique de l'actine (Popoff et al., 1988). Elle est composée de deux sous unités non liées : CDTa (composant enzymatique) et CDTb (partie ligand) codées respectivement par les gènes *cdtA* et *cdtB*. Ces deux gènes constituent, avec le gène *cdtR*, le locus *CdtLoc* (figure 6). *cdtR* code pour une protéine régulatrice nécessaire à l'expression de CDT (Carter et al., 2007).

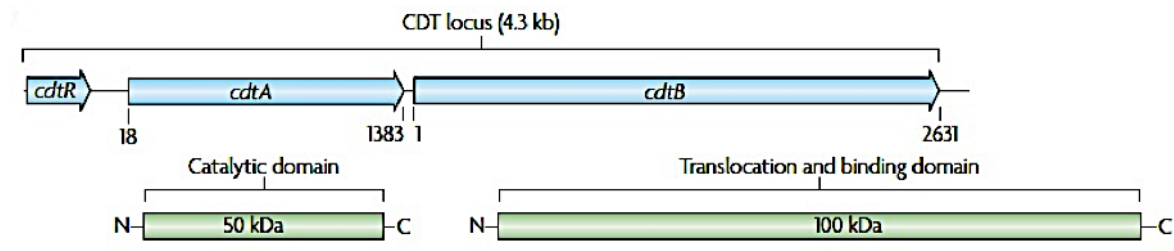


Figure 6 : Locus de la toxine binaire (CDT) de *Clostridioides difficile* : CdtLoc. Structure de CDTa (composant enzymatique) et CDTb (fonction ligand) (Rupnik et al., 2009)

La protéine CDTb se lie sous forme monomérique au récepteur cellulaire LSR (*Lipolysis-Stimulated lipoprotein Receptor*) présent à la surface des entérocytes (figure 7). La formation d'heptamères à partir de complexes CDTb-LSR permet la fixation du composant enzymatique CDTa, et l'internalisation du complexe par endocytose. CDTa est libérée dans le cytosol après passage par l'endosome et exerce sa fonction en ribosylant les molécules d'actine en position 177. Il en résulte une inhibition de polymérisation et une dépolymérisation des complexes d'actine déjà formés, entraînant une désorganisation puis une destruction du cytosquelette cellulaire et aboutissant à la mort cellulaire (Barth et al., 2004; Smits et al., 2016).

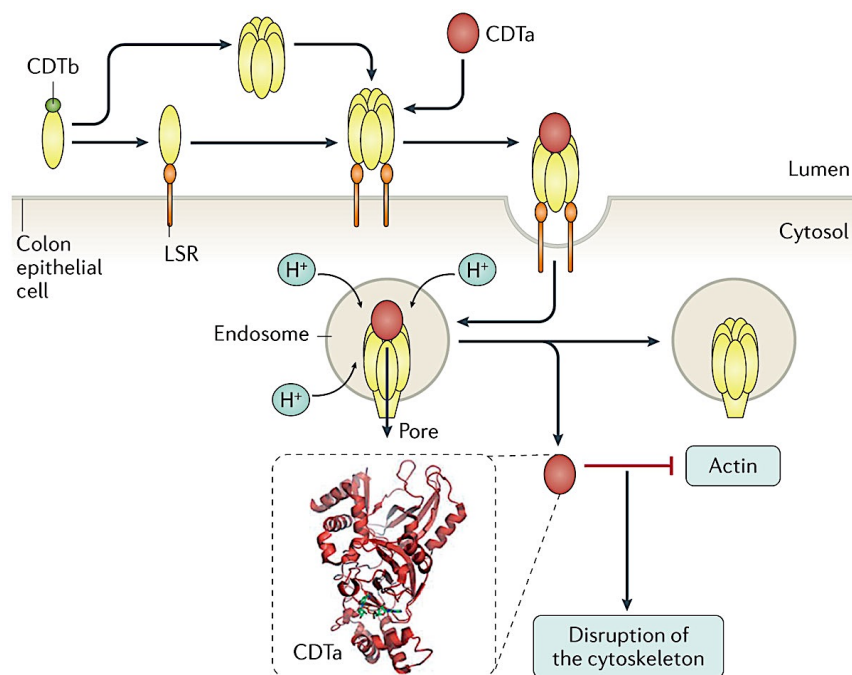


Figure 7 : Mécanisme d'action de CDT ou toxine binaire, (Smits et al., 2016). CDTa = ADP-ribosyltransferase (rouge) ; CDTb = protéine de liaison (jaune et vert) ; LSR : Récepteur de lipoprotéines, stimulé par la lipolyse

Le rôle de la toxine binaire lors d'ICD n'est pas encore bien établi, mais elle potentialiserait les effets cytotoxiques de *tcdA* et *tcdB* (Goldenberg and French, 2011; Monot et al., 2015). Cowardin et al ont également démontré son rôle dans la suppression de la réponse éosinophile chez l'hôte, hypothèse supplémentaire avancée pour expliquer la corrélation de la présence de CDT aux cas graves d'ICD (Cowardin et al., 2016). Enfin, la toxine binaire entraînerait une augmentation de l'adhérence entre *C. difficile* et les entérocytes, en induisant la formation de protrusions à la surface des entérocytes, la libération de fibronectine par ces derniers et la création d'un maillage dense à leur pôle apical. Cet effet induit par CDT facilite l'adhérence et la colonisation de l'épithélium digestif par *C. difficile* (Schwan et al., 2009, 2014). Des cas d'ICD sévères ont été rapportés en présence de souches de *C. difficile* ne sécrétant que la toxine CDT (A-B-C+) (Androga et al., 2015; Eckert et al., 2014a).

## 2.4 Typage moléculaire

La caractérisation et le typage des souches de *C. difficile* circulantes reposaient historiquement sur l'analyse des profils protéiques en immunoblot et le sérogroupage (Lemée and Pons, 2004).

Les typages moléculaires ont été ensuite développés, avec des méthodes fondées sur l'analyse de l'ADN chromosomique après action d'enzyme de restriction comme la REA (*restriction endonuclease analysis*) et la PGFE (électrophorèse en champs pulsé). Des méthodes fondées sur la PCR telles que l'AP-PCR (*arbitrarily primed-polymerase chain reaction*), la RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), le PCR-ribotypage, l'AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), la rep-PCR (amplification de séquences répétitives) sont également utilisées.

Parmi ces méthodes, la PCR ribotypage (PR), méthode la plus souvent utilisée en Europe, est fondée sur l'amplification des régions d'espacement intergénique des ARN ribosomiaux 16S et 23S (Bidet et al., 1999). La variation de la taille de ces régions définit un groupe de souches produisant un motif de bande identique. Le laboratoire de santé publique et de référence des bactéries anaérobies de Cardiff (Grande-Bretagne) a établi une base de données de référence sur la nomenclature du ribotypage de souches de *C. difficile*. Cette nomenclature est désignée par un numéro à trois chiffres commençant par 001, et un total de 150 ribotypes a déjà été décrit (Kuijper et al., 2006a). Lors d'une étude de prévalence des souches circulantes en Europe en 2012 et 2013, 125 ribotypes différents avaient été identifiés (Davies et al., 2014).

L'étude plus particulière des gènes de virulence a permis d'établir un lien entre épidémiologie et virulence. Ainsi 31 toxinotypes différents (I à XXXI) ont été identifiés par l'analyse du polymorphisme des gènes *tcdA* et *tcdB* par PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou *Restriction Fragment Length Polymorphism*) sur les fragments B1 et A3 du *Paloc*. Les données recueillies sont comparées à celles de la souche de référence VPI 10463 (toxinotype 0) (Knight et al., 2015; Rupnik et al., 2009). La même technique peut être utilisée pour l'analyse du gène *slpA* des « S-layer proteins ». Enfin des méthodes comme le typage par MLST (*Multi locus sequence typing*) qui permet d'analyser à la fois le mode d'évolution génomique et phylogénique des facteurs de

virulence de *C. difficile*, et l'analyse MLVA (*MultiLocus Variable-number tandem-repeat Analysis*) peuvent être utilisées.

La caractérisation moléculaire des souches analysées révèle qu'une grande partie de celles retrouvées dans l'environnement est génétiquement différente des souches actuellement connues et impliquées en pathologie (Janezic et al., 2016).

## **3 Infections à *C. difficile***

### **3.1 Epidémiologie**

Les ICD constituent un véritable enjeu de santé publique à travers le monde. C'est pourquoi leur incidence dans la population générale, la survenue d'épidémies et la répartition des ribotypes de *C. difficile* en cause sont des éléments primordiaux à prendre en compte pour assurer leur surveillance. Nous n'aborderons dans cette thèse que l'épidémiologie européenne et française.

#### **3.1.1 Europe**

Depuis les deux dernières décennies, l'incidence globale des ICD est en augmentation constante. En 2005, elle était rapportée à 2,45 pour 10000 patients/jour (Barbut et al., 2007), puis à 4,1 en 2008 (Bauer et al., 2011). Les PR les plus fréquemment retrouvés en 2008 par Bauer et al sont 014/020 (16 %), 001 (10 %), 078 (8 %), 018 (6 %), 106 (5 %) puis 027 (5 %).

L'incidence des ICD continue d'augmenter sur les années suivantes pour atteindre 6,6 pour 10000 patients/jour en 2011-2012 puis 7,3 pour 10000 patients/jour en 2012-2013 (Davies et al., 2014). La répartition des PR retrouvés est décrite en figure 8 ci-dessous. Les PR 027 (19 %), le 001/072 (11 %) et le 014/020 (10 %) sont les plus fréquemment isolés sur cette période.

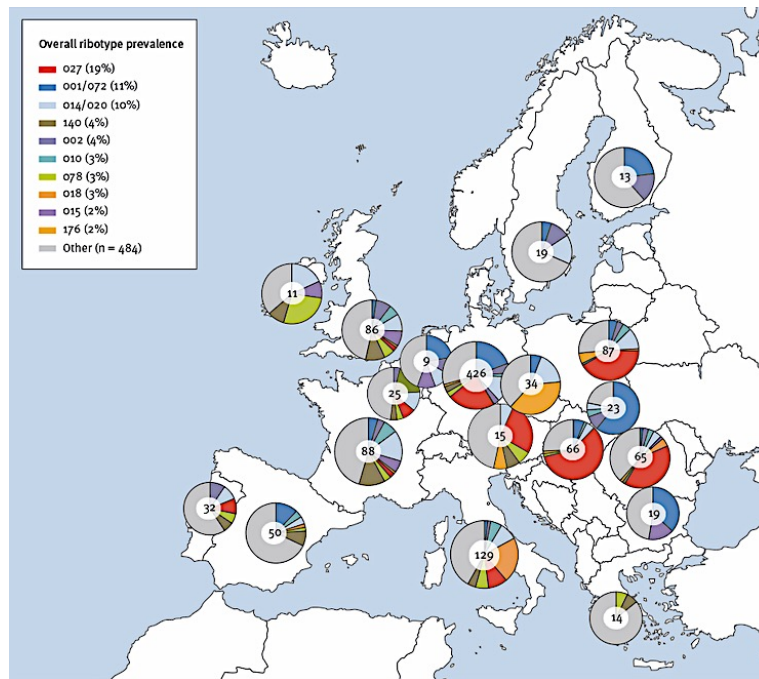


Figure 8 : Distribution géographique des PR de *C. difficile* par pays sur l'étude EUCLID en 2012 et 2013 (Davies et al., 2016) EUCLID : European point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea

Les épidémies européennes liées au PR 027 sont apparues en 2005 en Angleterre (Smith, 2005), aux Pays bas (Kuijper et al., 2006b) et en Belgique (Joseph et al., 2005), pour s'étendre à d'autres pays européens les années suivantes. L'étude de Davies et al (Davies et al., 2016) illustre la forte augmentation de prévalence du clone épidémique 027 en l'espace de quelques années : 5 % des souches isolées en 2008 (Bauer et al) contre 19 % en 2016.

L'enquête sur la prévalence des infections associées aux soins (IAS) et sur l'utilisation des antibiotiques dans les hôpitaux d'Europe en 2011-2012, menée par l'European Center for Disease prevention and Control (ECDC), classait *C. difficile* en 8<sup>ème</sup> position des bactéries en cause avec 5,4% du total des IAS recensées, derrière *E. coli* (15,9 %), *S. aureus* (12,3 %), *Enterococcus* spp (9,6 %), *P. aeruginosa* (8,9 %), *K. pneumoniae* (8,7 %), les staphylocoques coagulase négative (7,5 %) et *Candida* spp (6,1 %). Dans la catégorie des infections gastro-intestinales associées aux soins, *C. difficile* était tenue comme responsable de 48 % des IAS (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

Un quart des cas d'ICD serait potentiellement sous diagnostiqués chaque année en Europe, du fait de l'absence de suspicion clinique et/ou de l'utilisation de méthodes diagnostiques non optimales (Davies et al., 2014). Pour répondre à cette problématique, un protocole de surveillance a été proposé par l'ECDC en 2015 (Kola et al., 2015), mis en application à partir du 1<sup>er</sup> janvier 2016 et actualisé depuis (Sutens et al., 2017). Les objectifs du protocole sont de permettre une coordination de la surveillance de l'incidence des ICD en Europe (UE et hors UE) en proposant aux hôpitaux participants des outils standardisés pour mesurer et surveiller les taux d'incidence d'ICD, en lien avec

les informations épidémiologiques et microbiologiques (Sutens et al., 2017). C'est grâce à ce protocole de surveillance qu'en 2016 les hôpitaux provenant de 20 pays différents et ayant accepté de participer ont pu le mettre en application. Parmi les résultats mis en évidence, on retrouvait 7711 cas rapportés d'ICD, dont 74,6 % étaient associés aux soins. Les PR retrouvés les plus fréquents étaient 027 (22,9 %), 001 (7,5 %), 014 (6,7 %), 078 (5,1 %), 002 (4,2 %) et 020 (4,2 %) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

### 3.1.2 France

L'InVS (Institut de Veille Sanitaire), devenu depuis Santé publique France, a édité en 2006 des recommandations de contrôle afin d'optimiser la surveillance et le suivi des cas d'ICD (Institut de Veille Sanitaire - Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales, 2006). Ces recommandations ont fait suite aux premières épidémies liées au PR 027 (décrites plus loin) et ont permis le recueil minutieux des données épidémiologiques à partir de cette date.

En 2008, l'étude de Bauer et al. retrouvait une incidence française de 2,1 pour 10000 patients/jour contre une incidence européenne de 4,1 cas d'ICD pour 10000 patients/jour (Bauer et al., 2011). Les incidences retrouvées en Finlande, en Allemagne et en Grèce lors de cette même étude étaient de 19,1, 7,4 et 3,7 cas pour 10000 patients/jour respectivement. En 2009, l'étude prospective multicentrique française menée par Eckert et al. pour le réseau de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) retrouvait une incidence de 1,15 à 2,28 cas d'ICD pour 10000 patients/jour. Les ES participants avaient également fait parvenir au Centre National de Référence (CNR) les souches isolées ; les PR les plus fréquemment retrouvés étaient le 014/020/077 (18,7 %), le 078/126 (12,1 %), le 015 (8,5 %), le 002 (8 %) et le 005 (4,9 %). L'incidence globale retrouvée en France pour cette étude était moins élevée que celle rapportée en Europe un an plus tôt par Bauer et al, ce qui suggérait un impact positif des recommandations de contrôle éditées par l'InVS de 2006 (Bauer et al., 2011; Eckert et al., 2013b).

Le rapport InVS de 2010 recensait les signalements d'ICD effectués par les ES entre juillet 2009 et juin 2010, ainsi que les souches de *C. difficile* envoyées au CNR pour PR sur la même période. Les signalements émanaient de 83 ES de 41 départements répartis dans 18 des 22 régions de France métropolitaine, tandis que les souches envoyées au CNR provenaient de 131 ES différents implantés dans 19 des 22 régions de France métropolitaine. Parmi l'ensemble des souches typées par le CNR, 21,5 % appartenaient au clone épidémique 027. Ces dernières ont été identifiées dans cinq régions françaises métropolitaines, mais la région la plus concernée restait le Nord-Pas-de-Calais, région initialement touchée par l'épidémie de 2006, avec 69,1 % des souches 027 identifiées (Institut de Veille Sanitaire, 2010). En effet, la première épidémie rattachée au clone 027 fut décrite dans le Nord de la France, regroupant 41 patients atteints d'ICD entre janvier et mai 2006. Le taux de mortalité observé lors de cette épidémie était de 34 %, (Coignard et al., 2006). L'étude épidémiologique des ICD en lien avec le PR 027 s'étendant sur presque 4 ans révélait une incidence globale de 1,63 pour 10000 patients/jour (Birgand et al., 2010). Les rapports annuels d'activité du CNR révélaient l'apparition pour la première fois en 2013 d'une souche épidémique PR 027 dans les

régions d'Alpes Maritimes et Bouches du Rhône, mais également en Bretagne et en Ile de France. La souche épidémique PR 027 n'était donc plus majoritairement localisée dans le Nord de la France. Enfin, en 2014, sa diffusion s'est largement répandue à travers le territoire français. Une seule souche avait été identifiée comme PR 027 en Gironde en 2012 (Centre National de Référence Bactéries anaérobies et botulisme and Laboratoires associés *C. difficile*, 2013, 2014, 2015). Après l'épidémie du Nord de la France, la deuxième grande épidémie liée au clone PR 027 a été observée en région Provence-Alpes-Côte d'Azur, et notamment à Marseille, où 144 cas d'ICD liés au PR 027 ont été décrits entre janvier 2013 et décembre 2015. Le point de départ de l'épidémie semblait être un service d'hospitalisation de long séjour où 6 des 10 patients atteints par l'épidémie initiale avaient séjourné (Cassir et al., 2016).

En 2012, 70 ES français participaient à une étude de prévalence biannuelle en adressant systématiquement au CNR l'ensemble des selles diarrhéiques de patients hospitalisés reçues au laboratoire sur deux journées (une en décembre 2012 et une en juillet 2013). L'incidence moyenne retrouvée des ICD par le CNR était de 3,6 pour 10000 patients/jour. Cette étude a permis de confirmer la tendance observée au niveau européen sur la même période (Davies et al., 2014) en mettant en lumière la sous-estimation des cas réels d'ICD : plus de la moitié (55,6%) des ICD diagnostiquées par le CNR ne l'avaient pas été par les laboratoires participants. Cela s'expliquait par le manque de sensibilité des méthodes utilisées (25,4 % des cas) et le manque de suspicion clinique d'ICD (30,2 % des cas) (Barbut et al., 2015). Sur la même période, l'étude de Davies et al. retrouvait une incidence des ICD de 3,9 (2011-2012) et 3,3 (2012-2013) pour 10000 patients/jour en France, contre 6,6 et 7,3 pour 10000 patients/jour respectivement en Europe (Davies et al., 2014). Les incidences observées en Finlande, Allemagne et Grèce lors de cette étude étaient respectivement de 14,9 à 28,7, de 10,2 à 11, et de 3,4 à 3,9 cas pour 10000 patients/jour. Enfin, pour l'année 2014, le CNR rapportait l'ensemble des souches de *C. difficile* adressées par les ES français, et la répartition des ribotypes était la suivante : 014/020/077 (16,1 %), 027 (13,5 %) et 078/126 (11,9 %) (Centre National de Référence Bactéries anaérobies et botulisme and Laboratoires associés *C. difficile*, 2015).

Concernant la mortalité imputable aux ICD, Barbut et al ont étudié grâce aux données de l'assurance maladie deux cohortes de patients (l'une constituée de patients ayant présenté au moins une ICD, l'autre constituée de patients « contrôle » n'ayant jamais présenté d'ICD) sur une période allant de 2007 à 2014. Leur conclusion était sans appel en démontrant une augmentation significative de la mortalité chez les patients atteints d'ICD par comparaison avec le groupe contrôle, avec un risque relatif de 1,58 (IC 95 % : 1,27-1,97) (Barbut et al., 2018a).

Le rôle de *C. difficile* dans les IAS ayant déjà été évoqué, il n'est pas surprenant de lui voir attribuer la responsabilité de 1,7 à 2,1 % des IAS en France en 2011 et 2012 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013; Thiolet et al., 2012), augmentant jusqu'à 3,8 % en 2013 (Dorp et al., 2016). Enfin, sur la période de 2001 à 2017, *C. difficile* arrivait en 6<sup>ème</sup> place des micro-organismes responsables d'infection nosocomiale en France, avec 7,1 % du total des cas d'IAS signalées (Maugat et al., 2018).



## 3.2 Physiopathologie

La physiopathologie des ICD repose sur trois éléments intervenant de manière concomitante ou successive lors de l'infection (figure 9). Le premier élément est le déséquilibre de la flore intestinale, aussi appelé dysbiose intestinale, préparant un terrain propice à l'acquisition de *C. difficile*. Le deuxième est l'acquisition d'une souche productrice de toxines, dite toxino-gène. Le troisième est la réponse de l'hôte à l'acquisition du pathogène et vis-à-vis des toxines.

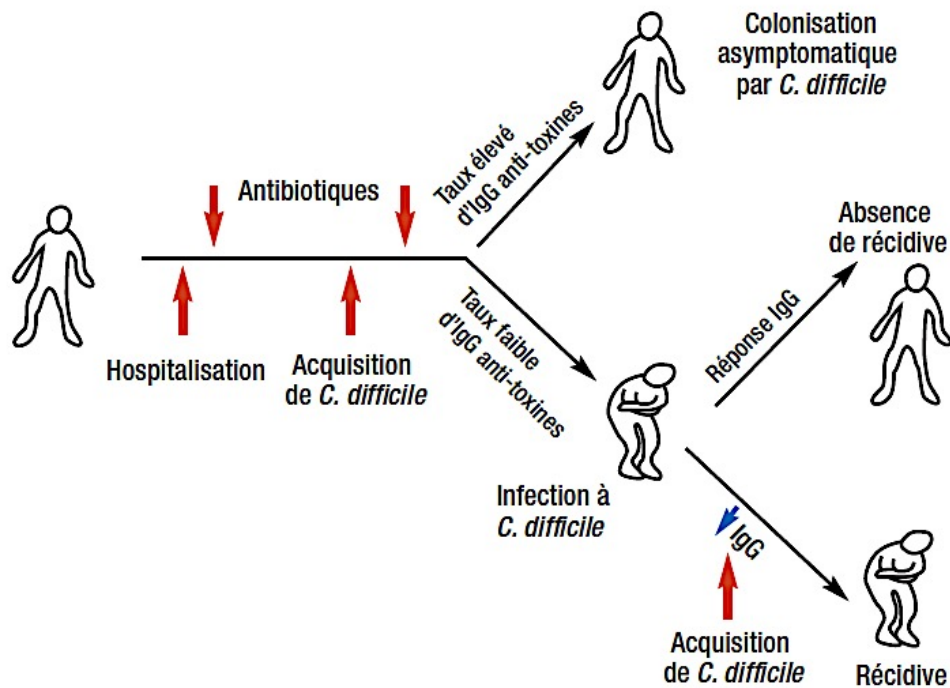


Figure 9 : Physiopathologie des ICD (Eckert et al., 2015a)

### 3.2.1 Dysbiose intestinale

L'altération de la flore intestinale et la diminution de résistance à la colonisation qui s'en suit constituent la première étape du développement d'une ICD. Elle est classiquement liée à la prise d'antibiotiques. Tous les antibiotiques sont susceptibles d'entraîner une ICD et une seule dose peut suffire, bien que le risque augmente avec la durée du traitement (Eckert et al., 2015b). Les classes d'antibiotiques et leur fréquence d'association avec la survenue d'ICD sont présentées en tableau 1.

Le déséquilibre de la flore intestinale induit par l'antibiothérapie entraîne une modification du métabolisme au niveau du tube digestif. En effet, les bactéries de la flore intestinale permettent la déconjugaison et la 7 alpha-hydroxylation des acides biliaires primaires, induisant la formation d'acides biliaires secondaires. En l'absence de ces bactéries de la flore intestinale, les acides biliaires secondaires diminuent, les acides biliaires primaires (tels que le taurocholate) et conjugués augmentent. La fermentation bactérienne est également altérée, entraînant une diminution des acides gras à chaîne courte et un excès de glucides et d'acides aminés. Les acides biliaires primaires, les

glucides et acides aminés facilitent la germination des spores et la croissance des formes végétatives (Blanchi et al., 2016).

Tableau 1 : Classes d'antibiotiques et fréquence d'association aux ICD (Seksik, 2019)

Classe d'antibiotiques	Association avec ICD
Ampicilline, Amoxicilline, Céphalosporines, Clindamycines, Fluoroquinolones	Fréquente
Autres pénicillines, Sulfamides, Triméthoprimé, Triméthoprimé-sulfaméthoxazole, Macrolides	Assez fréquente
Tétracyclines, Vancomycine, Métronidazole, Bacitracine, Chloramphénicol, Aminosides, Teicoplanine, Rifampicine, Daptomycine, Carbapénèmes	Rare

### 3.2.2 Contamination par une souche toxigène

Après ingestion par contamination oro-fécale, les spores de *C. difficile* vont résister à l'acidité gastrique et atteindre le duodénum où elles vont germer pour reprendre leur forme végétative. Les formes végétatives vont alors gagner le colon (Smits et al., 2016) où elles colonisent la muqueuse digestive (figure 10).

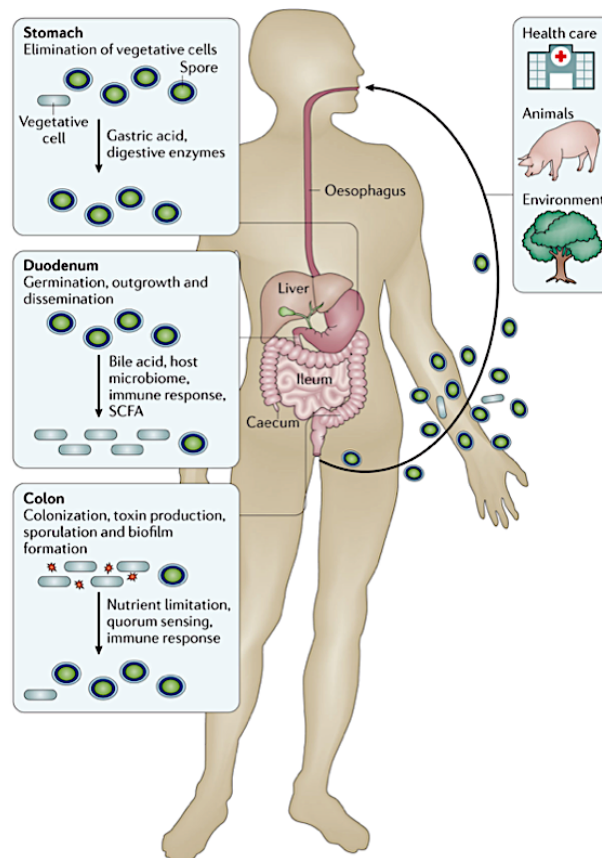


Figure 10 : Etapes du cycle de *C. difficile* dans le tube digestif humain (Smits et al., 2016) SCFA : Short-Chain Fatty acid ou acide gras à chaîne courte

Cette colonisation est favorisée par l'adhésion aux cellules épithéliales du colon grâce à leurs adhésines (décrites en paragraphe 2.3.2) et la dégradation du mucus digestif à l'aide de enzymes hydrolytiques et protéolytiques (Eckert and Barbut, 2010).

Une fois la colonisation de l'hôte réalisée, la souche toxigène peut commencer à sécréter ses toxines au contact de la paroi intestinale. Comme décrit précédemment, les propriétés cytotoxiques et entérotoxiques de ces dernières aboutissent, grâce à leur action synergique, à la destruction des jonctions serrées entre les entérocytes, une destruction des cellules, la production de cytokines pro-inflammatoires, la destruction cellulaire, l'afflux des polynucléaires neutrophiles au sein de la *lamina propria*, et la formation de pseudo-membranes (figure 11).

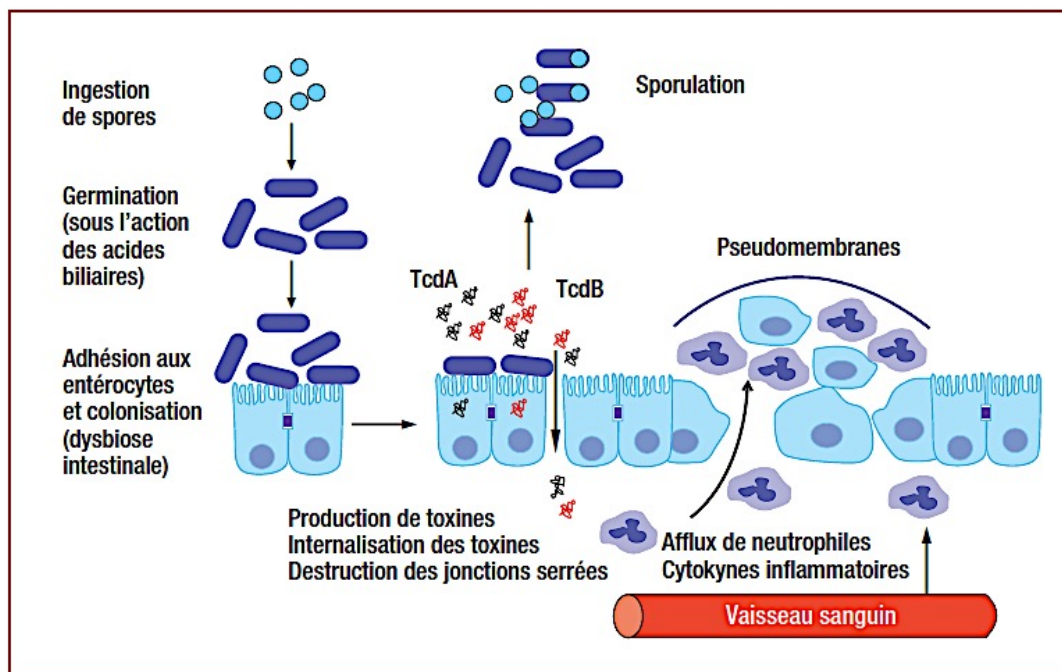


Figure 11 : Modalités d'action des toxines de *C. difficile* (Eckert et al., 2015a)

Les spores ingérées au moment de la contamination reprennent leur forme végétative dans le colon sous l'action des acides biliaires. La dysbiose intestinale favorise la colonisation de l'épithélium digestif par les formes végétatives de *C. difficile*. Les toxines TcdA et TcdB sont sécrétées et agissent, après internalisation au sein des entérocytes, en empêchant la polymérisation des filaments d'actine et en détruisant les jonctions serrées entre les entérocytes. La réaction inflammatoire induite est intense, on observe un recrutement de polynucléaires neutrophiles au niveau de la lamina propria, aboutissant à la nécrose des entérocytes et à la formation de pseudo-membranes.

### 3.2.3 Réponse immunitaire de l'hôte

La dernière étape entrant en jeu dans l'acquisition d'une ICD concerne la réponse immunitaire de l'hôte. En effet, il a été décrit que les patients développant une ICD ont un taux plus faible d'anticorps dirigés contre la toxine A que les sujets porteurs asymptomatiques (Kyne et al., 2000). En

parallèle, l'élévation du taux d'anticorps dirigés contre la toxine A lors d'un premier épisode d'ICD est associée à une protection contre les récurrences (Kyne et al., 2001). Ces réponses immunitaires décrites chez l'homme ont aussi été décrites sur le modèle murin (Sun et al., 2011).

Au cours de l'ICD, *C. difficile* et ses toxines conduisent à la production de multiples cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-12, l'IL-18, l'interféron gamma, l'IL-1 $\beta$ , le TNF alpha, MIP-1a, MIP-2, l'IL-8 et la leptine, participant à l'importante réaction inflammatoire et à la création des lésions de l'épithélium digestif (Bibbò et al., 2014).

### 3.3 Facteurs de risque

#### 3.3.1 Facteurs de risque d'un premier épisode d'ICD

##### 3.3.1.1 Facteurs de risques endogènes

L'âge constitue un facteur de risque important de survenue d'ICD. Loo et al estimaient à 2 % par an l'augmentation du risque d'acquérir une ICD après l'âge de 18 ans (Loo et al., 2011). Ce risque serait multiplié par 10 à 20 après 65 ans (Bartlett and Gerding, 2008; Lessa et al., 2012) du fait de nombreux facteurs tels que la sénescence du système immunitaire, le nombre d'hospitalisations et des comorbidités.

Les pathologies sous-jacentes telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique), les greffes d'organes, les chimiothérapies anti-cancéreuses, les maladies rénales chroniques et les déficits immunitaires constituent également des facteurs de risques d'acquisition d'ICD (Chitnis et al., 2013; Leffler and Lamont, 2009).

Dans la population pédiatrique, les enfants atteints de la maladie de Hirshsprung sont plus à risque que les enfants sains du même âge à développer une ICD (Thomas et al., 1982).

Enfin, les personnes de sexe féminin seraient plus souvent concernées par les ICD communautaires que les patients masculins, ce qui attribuerait au sexe féminin le rôle potentiel de facteur de risque d'ICD (Khanna et al., 2012).

##### 3.3.1.2 Facteurs de risques exogènes

Induisant un déséquilibre de la flore intestinale, l'administration d'antibiotiques constitue le facteur de risque le plus important d'ICD, aussi bien associées aux soins que communautaires (Chitnis et al., 2013; Deshpande et al., 2013). Parmi les antibiotiques incriminés, l'ampicilline, l'amoxicilline, les céphalosporines, les fluoroquinolones et la clindamycine sont les plus fréquemment retrouvés au moment du diagnostic d'une ICD (Leffler and Lamont, 2015; Pépin et al., 2005b). L'usage fréquent des fluoroquinolones est particulièrement rattaché à la survenue et à l'extension des épidémies liées au PR 027, ce dernier étant résistant à cette classe d'antibiotiques (Loo et al., 2005; Pépin et al., 2005b). Dans le cadre d'ICD communautaires, la prise d'antibiotiques dans les 3 derniers mois ( $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones et clindamycine) pour traitement d'infections de la sphère

otorhino laryngée, respiratoires hautes ou dentaires constitue un facteur de risque d'acquisition (Chitnis et al., 2013).

Une méta-analyse recensant l'ensemble des études réalisées de 1990 à 2017 a permis d'établir le lien entre la consommation d'IPP (inhibiteurs de la pompe à protons) et l'acquisition d'ICD (Trifan et al., 2017). La prise d'IPP constitue un facteur de risque à part entière du fait de la modification de l'acidité gastrique.

Un autre facteur de risque important réside dans le fait d'une hospitalisation récente et prolongée, avec un risque relatif de 2,11 (IC pour intervalle de confiance 95 % : 1,08-4,13) (Ziakas et al., 2015). L'exposition aux soins en ambulatoire constitue également un facteur de risque d'acquisition d'ICD communautaire comme démontré par l'étude de Chitnis et al, où sur le total de 984 patients atteints d'ICD communautaires, 400 (40,7 %) avaient eu une consultation médicale ou paramédicale dans les 12 semaines précédant l'épisode, et 407 (41,4 %) avaient eu une intervention ambulatoire, une hospitalisation de jour, un passage aux urgences ou une profession les mettant en contact avec des patients (Chitnis et al., 2013).

Hors ES, le contact prolongé intrafamilial ou sous le même toit avec des enfants de moins de 2 ans (Wilcox et al., 2008) potentiellement colonisés, mais également avec des sujets plus âgés, colonisés ou victimes d'ICD, sont des facteurs de risque d'acquisition d'ICD communautaire du fait de la contamination environnementale induite par la dissémination des spores de *C. difficile*. Enfin la contamination de certains aliments a été décrite (cf. paragraphe 2.2.4) (Chitnis et al., 2013).

### 3.3.2 Facteur de risque de récurrence

#### 3.3.2.1 Facteurs de risque endogènes

L'âge supérieur à 65 ans constitue un facteur de risque de récurrence (Debast et al., 2014; Garey et al., 2008) en plus d'être un facteur de risque de premier épisode d'ICD, tout comme la présence de comorbidités telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Carpenter et al., 2016) et/ou l'insuffisance rénale (Hu et al., 2009).

La faible réponse immunitaire observée après un premier épisode d'ICD, traduite par l'ascension insuffisante du taux des anticorps dirigés contre les toxines de *C. difficile*, est prédictive de récurrence (Kyne et al., 2001). Le degré de sévérité de l'épisode initial (Hu et al., 2009) et la survenue d'une ICD antérieure voire d'une ou plusieurs récurrences constituent également des facteurs de risque (Fekety et al., 1997).

#### 3.3.2.2 Facteurs de risques exogènes

Le maintien d'une antibiothérapie pour le traitement d'une infection autre que l'ICD constitue un facteur de risque de récurrence d'ICD (Carpenter et al., 2016) ainsi que l'administration d'IPP (Garey et al., 2008).

### 3.4 Manifestations cliniques

Le tableau clinique des ICD est très variable et peut aller du portage asymptomatique à la diarrhée aiguë simple sans signes généraux, jusqu'à CPM pouvant se compliquer de colite aiguë grave, de mégacôlon toxique, de perforation digestive, voire d'un état de choc dont l'issue peut être fatale (Eckert and Barbut, 2010). Les critères cliniques actuels sont décrits par la Société Européenne de Microbiologie et de Maladie infectieuse (ESCMID) (Debast et al., 2014).

#### 3.4.1 Manifestations coliques et complications

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la diarrhée est définie comme la survenue d'au moins 3 selles molles par jour, ou à une fréquence anormale pour le patient concerné (WHO, 2013). Les selles molles ou liquides sont définies par le fait de prendre la forme du récipient, ou de correspondre aux types 5, 6 ou 7 de l'échelle de Bristol (figure 12).








Type 1		petites boules dures et détachées, comme des noisettes- difficiles à évacuer
Type 2		forme d'une saucisse, dures et grumeleuses.
Type 3		comme une saucisse, avec des craquelures sur la surface
Type 4		comme une saucisse ou un serpent, lisse et douce
Type 5		petits fragments mous, avec des bords nets- néanmoins aisés à évacuer
Type 6		petits fragments, duveteux aux bords irréguliers, selles détrempées
Type 7		entièrement liquides, aucun fragment solide

Figure 12 : Echelle de Bristol (Thabit and Nicolau, 2015)

L'ICD simple peut ainsi être révélée par une diarrhée aqueuse, sans sang ni glaires visibles, sans retentissement sur l'état général ni signes généraux, accompagnée parfois de douleurs abdominales. L'endoscopie montrerait une muqueuse digestive normale ou érosive sans pseudomembrane (CMIT, 2018).

Bien que *C. difficile* soit responsable de 95 % des CPM, cette dernière ne survient que dans 7 % des cas d'ICD avec un tableau clinique plus bruyant : la diarrhée est abondante (>7 selles/jour) et s'accompagne de douleurs abdominales (70 %), de fièvre (75 %), de déshydratation et de signes

biologiques non spécifiques (hyperleucocytose dans 40% des cas, hypoalbuminémie) (Knoop et al., 1993). A l'endoscopie des plaques jaunes friables éparses ou confluentes signent la présence de pseudomembranes, signe pathognomonique de la CPM (figure 13).

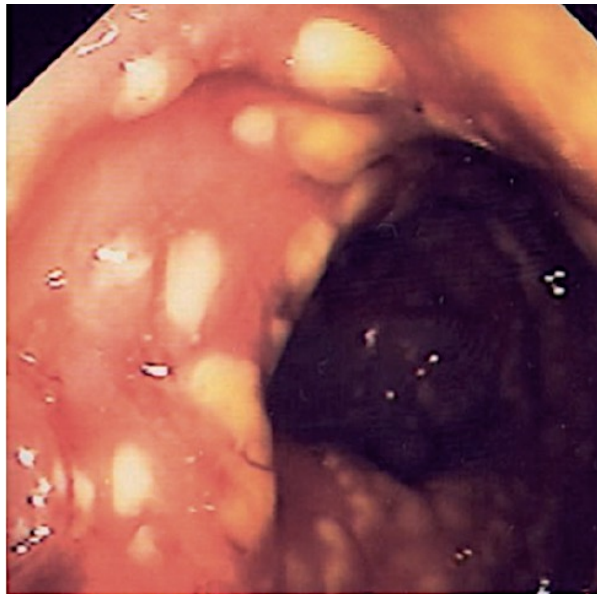


Figure 13 : CPM : aspect endoscopique (cliché L.Beaugerie) (Eckert et al., 2015a)

Les complications surviennent dans moins de 10 % des cas. Elles sont représentées par la colite aiguë grave et le mégacôlon toxique, pouvant aboutir à une perforation digestive (Barbut et al., 2008). Le tableau clinique présenté retrouve une altération profonde de l'état générale, avec diarrhée profuse et déshydratation pouvant aller jusqu'au choc hypovolémique. L'abdomen est douloureux et tendu, et l'hyperleucocytose fréquente. L'imagerie par TDM (tomodensitométrie) permet de déceler les signes de perforation colique devant entraîner une prise en charge médico-chirurgicale urgente (colectomie) et la présence d'ascite qui constitue un signe de gravité. Ces complications sont responsables de 30 à 50 % de mortalité malgré un traitement approprié (Eckert et al., 2015b).

La colite peut aussi prendre la forme atypique d'iléus, c'est à dire un arrêt du péristaltisme intestinal pouvant donner un tableau d'occlusion, sans diarrhée préalable.

#### 3.4.2 Manifestations extra-coliques

Les manifestations extra-digestives d'ICD sont rares mais décrites dans la littérature. Garcaa-Lechuz et al. étudièrent rétrospectivement les souches de *C. difficile* isolées entre 1990 et 2000 au sein d'un hôpital de Madrid (Espagne). Sur 2034 souches retrouvées, seulement 21 (1,08 %) provenaient de sites autres que digestifs. Parmi ces souches, 20 provenaient de cultures multi-microbiennes et 5 seulement étaient toxigènes. Les sites de provenance étaient des péritonites, des abcès intra-abdominaux, des plaies abdominales, des abcès cérébraux, des bactériémies, des

ostéomyélites et des nécroses ischémiques tissulaires au niveau du pied (García-Lechuz et al., 2001). Les patients concernés ne présentaient pas de signes cliniques d'ICD.

Mattila et al. récoltèrent les mêmes informations entre 2002 et 2012 dans un hôpital d'Helsinki (Finlande), et retrouvèrent seulement 0,17 % de souches provenant de sites extra-intestinaux, avec parmi eux des bactériémies, des infections intra-abdominales en période pré ou post-chirurgie, des abcès péri-anaux, des plaies surinfectées et des colonisations de sonde urinaire. 85 % des souches isolées l'étaient au sein d'une flore pluri-microbienne (Mattila et al., 2013).

En plus des sites extra-intestinaux précédemment cités, *C. difficile* a aussi été décrit dans des case reports pour arthrite réactionnelle (Garrigues et al., 2016), abcès hépatique (Ulger Toprak et al., 2016), infection de prothèse de hanche (McCarthy and Stingemore, 1999), abcès splénique (Saginur et al., 1983), empyème pulmonaire (Simpson et al., 1996), et syndrome hémolytique et urémique (Alvarado et al., 2014).

### 3.4.3 Sévérité

Une ICD est qualifiée de sévère lorsqu'elle est accompagnée d'au moins un critère parmi : la présence d'une colite sévère, d'un état de choc secondaire aux toxines, de la nécessité d'admission en soins intensifs, d'une colectomie ou de la survenue du décès. Une colite sévère est définie, en l'absence d'autres causes possibles, par des caractéristiques cliniques (fièvre, frissons, hémodynamique instable et signes de choc, détresse respiratoire nécessitant l'intubation, signes de péritonite, signes d'iléus, présence de sang dans les selles), de caractéristiques biologiques (hyperleucocytose > 15G/L, polynucléose > 20 %, élévation de la créatinine de plus de 50 % du taux de base, hyperlactatémie > 5 mM), des caractéristiques endoscopiques (présence d'une CPM, d'un œdème, d'un érythème, d'une friabilité et/ou ulcération de la muqueuse) et de caractéristiques d'imagerie (distension de plus de 6 cm du colon transverse, diminution de l'épaisseur de la paroi colique, engorgement de la graisse péri-colique et présence d'un ascite) (Debast et al., 2014).

Plusieurs facteurs de mauvais pronostic peuvent être associés au tableau d'ICD sévère, parmi : l'hyperleucocytose (>15 G/L), l'hypoalbuminémie (<30 g/L), et l'élévation de la créatinine ( $\geq 133 \mu\text{M/L}$  ou  $\geq 1,5$  fois la limite supérieure) (Debast et al., 2014).

### 3.4.4 Récidive et/ou rechute

Les récurrences sont définies par un nouvel épisode d'ICD survenant dans les deux mois suivant le premier épisode (Debast et al., 2014). Elles apparaissent dans environ 25 % des cas (Eckert et al., 2015a). Cliniquement, il n'y a pas été démontré de différences notables entre le premier épisode et les récurrences (Kim et al., 2014).

Elles sont liées dans la moitié des cas à une rechute « vraie », du fait de la persistance de la souche ayant causé l'épisode initial malgré un traitement efficace, et dans l'autre moitié des cas à une réinfection avec une souche de *C. difficile* différente de la première (Barbut et al., 2000). Il est en



pratique très difficile de différencier une rechute d'une récurrence. Seul un typage permet de faire la différence mais les équipements d'une grande partie des laboratoires ne permettant pas le ribotypage des souches en routine.

## 4 Diagnostic microbiologique des ICD

Les premières recommandations diagnostiques pour les ICD ont été publiées en 2009 par la Société Européenne de Microbiologie Clinique et de Maladie Infectieuse (Crobach et al., 2009). De nombreux tests ayant des cibles et des performances différentes ont été développés et commercialisés depuis : c'est notamment le cas des techniques de biologie moléculaires appelée TAAN pour test d'amplification des acides nucléiques. Les experts se questionnent sur les différents tests proposés intégrés au sein d'algorithmes. Dans ce paragraphe, nous présentons les recommandations actuelles pour le diagnostic biologique des ICD.

### 4.1 Définition d'un cas d'ICD

Selon les recommandations américaines et européennes, la définition d'une ICD repose sur un des critères suivants (Cohen et al., 2010; Debast et al., 2014) :

- Un tableau clinique compatible avec celui d'une ICD (diarrhée, iléus, mégacôlon toxique) et un test bactériologique positif pour la présence de toxines libres de *C. difficile* dans les selles ou mise en évidence d'une souche toxigène, sans autre cause de diarrhées.
- Soit un diagnostic de CPM réalisé par endoscopie ou histopathologie lors d'une colectomie ou d'une autopsie.

### 4.2 Indications de l'exploration microbiologique

Le diagnostic d'ICD doit être fondé sur des signes cliniques et sur les symptômes en combinaison avec des tests de laboratoire. La décision de traitement de l'ICD est une décision clinique et peut être justifiée même si tous les tests de laboratoire sont négatifs (Crobach et al., 2016). L'ICD doit être évoquée en cas de diarrhée survenant au cours ou au décours d'une antibiothérapie, de CPM ou de mégacôlon toxique, de diarrhée associée aux soins, ou de diarrhée aiguë d'origine communautaire (Barbut et al., 2018b). L'exploration microbiologique initiale peut être entreprise dans ces contextes.

Crobach et al. (Crobach et al., 2016) ont défini les conditions de répétition des tests. Il n'est pas recommandé de réitérer la recherche d'ICD au cours d'un même épisode diarrhéique si la première recherche s'est révélée négative dans les 7 jours précédant (Aichinger et al., 2008; McDonald et al., 2018), mais cela peut être discuté en situation d'épidémie (Crobach et al., 2016). Il n'est pas non plus recommandé de réaliser la recherche en contrôle post-traitement d'une ICD (test

de cure), puisque 30 à 40 % des patients répondant favorablement à un traitement adapté présenteront encore des résultats positifs à l'issue de ce dernier (Cohen et al., 2010; Manabe et al., 1995).

Dans le cadre d'une suspicion de récurrence, les recommandations ne sont pas établies. Si l'on suit la définition clinique, la réapparition d'épisodes de diarrhée dans les deux mois suivant l'épisode initial d'ICD signe une récurrence. Une nouvelle recherche de *C. difficile* ne serait donc pas utile.

La recherche d'ICD n'est pas recommandée chez l'enfant de moins de 3 ans (McDonald et al., 2018) du fait du taux élevé de colonisation asymptomatique (Jangi and Lamont, 2010), à l'exception des enfants atteints de maladie de Hirschsprung ou toute autre maladie digestive altérant la mobilité intestinale (Crobach et al., 2016). La recherche peut être entreprise chez ces jeunes patients en cas de suspicion d'épidémie (Committee on Infectious Diseases, 2013).

### 4.3 Sélection des échantillons au laboratoire

La recherche de *C. difficile* s'effectue à partir de selles ou de liquide intestinal prélevé au cours d'un examen endoscopique. Les écouvillons rectaux ne sont pas adaptés pour la recherche de toxines libres dans les selles, du fait du manque de sensibilité (Cohen et al., 2010). Les recommandations actuelles précisent que la recherche d'ICD ne doit pas être limitée aux seules prescriptions des cliniciens. En effet, les ICD sont sous-diagnostiquées (Davies et al., 2014) : il est donc préconisé que les laboratoires de microbiologie testent l'ensemble des selles diarrhéiques des patients de plus de 3 ans qui leur sont adressées (Crobach et al., 2016).

La recherche d'ICD ne doit être réalisée que sur des selles diarrhéiques et ne doit pas l'être sur selles moulées. Les laboratoires sont tenus de mettre en place une politique de rejet des échantillons pour cibler efficacement les cas potentiels d'ICD, optimiser les examens diagnostiques réalisés et améliorer le taux de positivité (Goret et al., 2018). En effet, une étude menée par Elkafrawy et al. mettait en évidence une diminution de 35 % des cas reportés d'ICD sur deux années consécutives, après la mise en application des recommandations américaines en matière de sélection des échantillons (McDonald et al., 2018). Cette diminution du nombre rapporté d'ICD s'explique par la diminution du nombre de faux diagnostics d'ICD chez les patients porteurs asymptomatiques (Elkafrawy et al., 2019).

Un échantillon de selles doit être systématiquement privilégié. Cependant, en cas d'iléus, l'examen peut être réalisé sur un écouvillon rectal.

### 4.4 Prélèvement et transport

Les prélèvements de selles fraîches doivent être analysés rapidement du fait de la labilité des toxines libres : dans les deux heures suivant l'émission de la selle idéalement, ou bien dans les trois jours maximum si la selle est conservée à +4°C. Les analyses de biologie moléculaire permettent de rallonger les délais de réalisation jusqu'à cinq jours si les échantillons sont conservés entre +2°C et

+8°C. Des conditions de transport inappropriées sont délétères pour les toxines libres, alors qu'elles affectent peu la viabilité des spores (Barbut et al., 2018b).

Il n'existe pas de recommandations quant aux milieux de transports de selles devant préférentiellement être utilisés pour dépister *C. difficile*. Les milieux de type Cary-Blair ont fait l'objet de différentes études pour la recherche de *C. difficile* (Brown et al., 2011; Hirvonen and Kaukoranta, 2015; Mashock et al., 2017). Leur utilisation est compatible avec les tests diagnostiques puisque les résultats obtenus avec ces milieux sont identiques à ceux retrouvés lors de l'utilisation de selles sans additif. En absence de recommandations de la part du fournisseur et d'étude comparative entre milieux de transports spécifiques et milieux sans additif pour une technique donnée, il est recommandé d'utiliser des récipients stériles sans additifs pour le transport des selles.

## 4.5 Méthodes de diagnostic microbiologiques

L'ensemble des méthodes diagnostiques est présenté dans le tableau 2. Dans ce paragraphe, nous n'aborderons que les techniques recommandées actuellement. La sérologie et les tests anecdotiques tels que la détection de l'odeur des selles contenant *C. difficile* par des chiens (Bomers et al., 2012) ne sont pas traités dans cette thèse. Les avantages et les inconvénients des différentes méthodes et les performances analytiques sont respectivement présentés en tableaux 2 et 3.

### 4.5.1 Méthodes de référence

#### 4.5.1.1 Test de cytotoxicité des selles (CTA)

Il s'agit de la technique de référence pour mettre en évidence le rôle de toxines libres dans les selles. Cet examen est réalisé à partir d'un filtrat de selles. Les toxines produites par *C. difficile* sont détectées par la mise en évidence de leur effet cytopathogène (ECP) sur une culture cellulaire. Plusieurs lignées cellulaires pouvant être utilisées parmi CHO, HeP2, MRC5 et Vero. L'ECP se manifeste par la dislocation du cytosquelette et la ballonnisation cellulaire (figure 14). Cette méthode permet de détecter de l'ordre du picogramme de toxine B dans les selles. Sa spécificité est bonne lorsqu'elle est confirmée par une neutralisation par un antisérum spécifique de *C. sordellii* ou de *C. difficile* (Dupont, 2013; Eckert et al., 2011). Il n'existe pas de standardisation pour cette méthode. Sa durée est longue (24 à 48 h) et implique la mise à disposition d'une structure adaptée pour la culture cellulaire, ainsi qu'un personnel qualifié (Lalande et al., 2004).

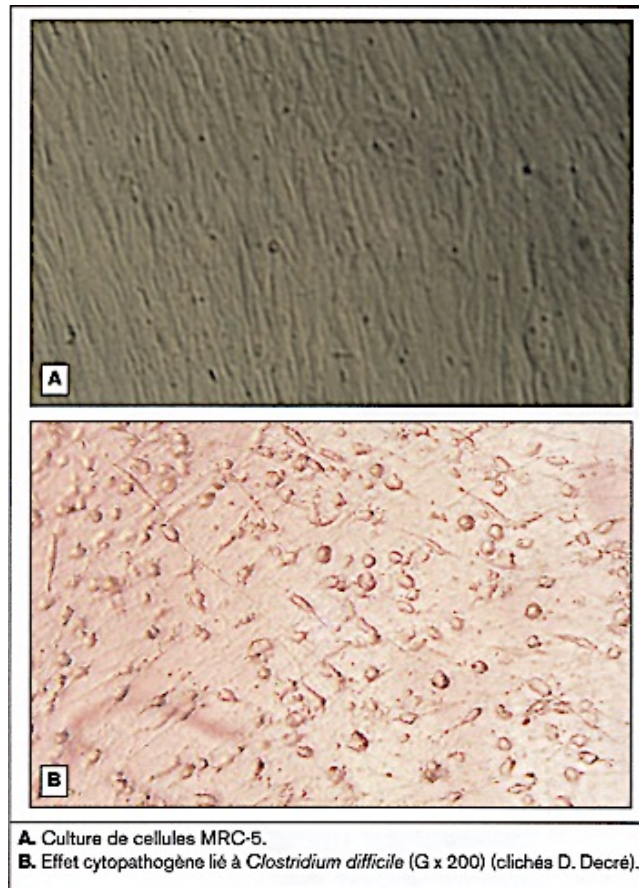


Figure 14 : Test de cytotoxicité (Lalande et al., 2004), MRC-5 : Medical Research Council cell strain-5

#### 4.5.1.2 Culture toxigénique (CT)

Il s'agit de la technique de référence pour mettre en évidence des souches de *C. difficile* toxigènes. Cette méthode consiste à isoler *C. difficile* à partir de milieux sélectifs, puis de déterminer *in vitro* son caractère toxigène. Cette méthode est très sensible mais longue (48 h minimum) (Eckert and Barbut, 2010).

Dans un premier temps l'isolement de *C. difficile* est réalisé sur un milieu de culture solide sélectif. De nombreux milieux sélectifs sont disponibles prêt à l'emploi. Leur sensibilité est de l'ordre de 2000 bactéries par gramme de selles (Marler et al., 1992). Les milieux contenant du taurocholate ou du lysozyme favorisent la germination des spores et augmentent la sensibilité de lecture (Rousseau et al., 2010). Il existe des milieux chromogéniques (*chromID*<sup>™</sup> *C. difficile*, bioMérieux, Marcy l'étoile, France) permettant de repérer plus facilement et plus rapidement les colonies de *C. difficile* (Figure 15).

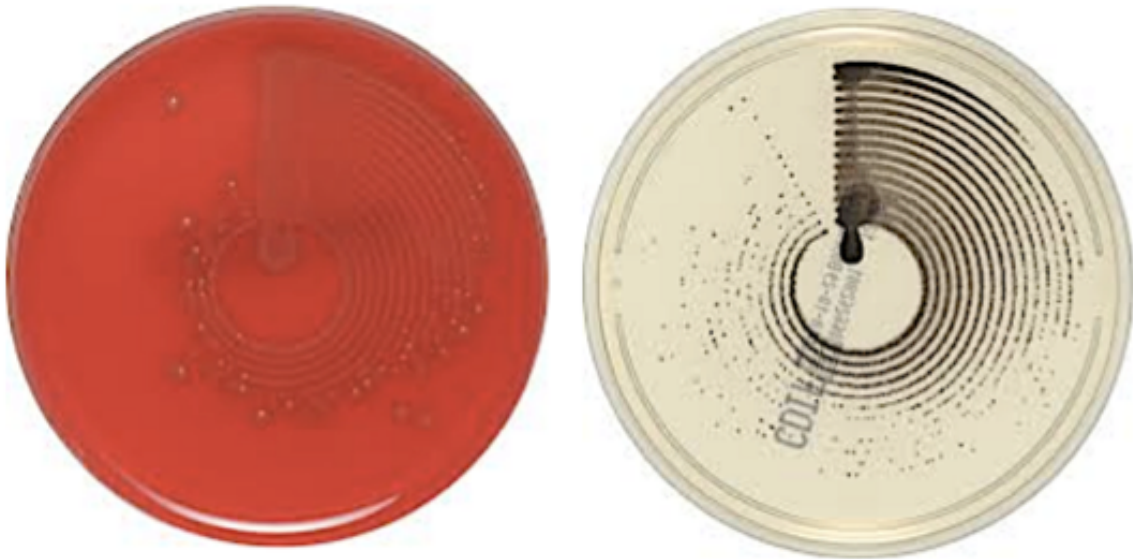


Figure 15 : Milieu de culture sélectif de *C. difficile* (CLO<sup>®</sup>) et milieu de culture chromogène de *C. difficile* (chromID<sup>™</sup> *C. difficile*) du laboratoire bioMérieux ([www.biomerieux.fr](http://www.biomerieux.fr))

Après 48 h de culture en anaérobiose à 37°C, l'identification de *C. difficile* est macroscopique avec un aspect typique des colonies en « tâches de bougies » ou « verre brisé » (Figure 15) et une odeur caractéristique de « crottin de cheval » liée à l'émission de crésol.

En microscopie, la coloration de Gram retrouve des bacilles gram positif présentant parfois une spore terminale ou subterminale non déformante (figure 1).

En cas de doute l'identification peut être confirmée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, par analyse des caractères biochimiques à l'aide des galeries d'identification (API2A et Rapid ID32A bioMérieux), par chromatographie en phase gazeuse (production d'acide isocaproïque) ou agglutination (*C. difficile* kit, Oxoid) (Barbut et al., 2018b).

Dans un deuxième temps, la mise en évidence du caractère toxigène de la souche de *C. difficile* isolée se fait directement à partir des colonies, en prenant soin de sélectionner plusieurs colonies différentes. Les méthodes de mise en évidence des toxines disponibles sont : le CTA (décrit dans le paragraphe précédent), les tests immuno-enzymatiques détectant les toxines libres A et B et les tests de biologie moléculaire détectant les gènes codant pour les toxines (décrits plus loin).

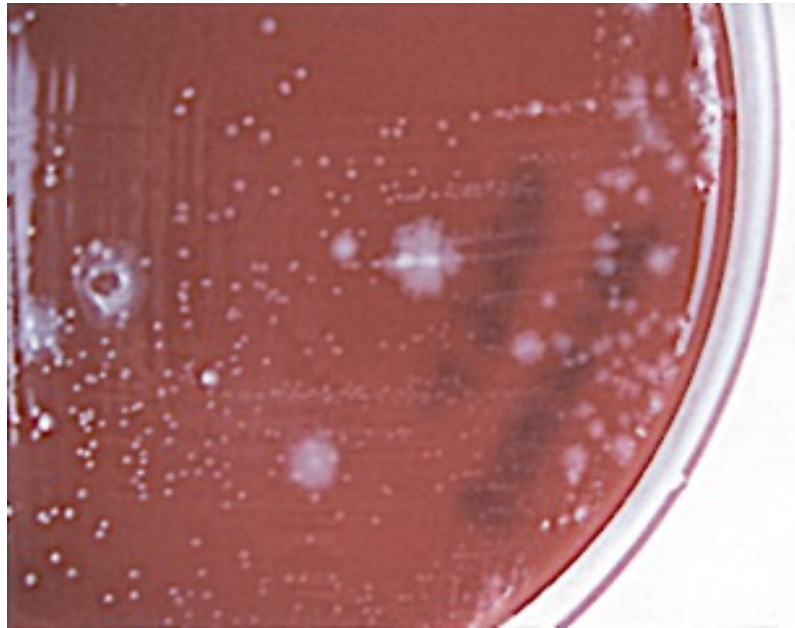


Figure 16 : Colonies de *C. difficile* sur milieu TCCA (cliché V.Lalande). TCCA : Taurochlorate cyclosérine cefoxitine agar (Lalande et al., 2004)

La CT présente une grande sensibilité mais celle-ci peut varier selon la procédure de mise en culture utilisée (Carson et al., 2013). Hormis son intérêt diagnostique, la culture est indispensable pour pouvoir étudier et suivre l'évolution de la sensibilité des souches aux antibiotiques, documenter la transmission d'une même souche de patient par typage moléculaire et détecter l'émergence d'un nouveau clone épidémique.

#### 4.5.2 Autres tests diagnostiques

##### 4.5.2.1 Glutamate déshydrogénase (GDH)

La GDH est une enzyme métabolique produite par tous les ribotypes de *C. difficile*, et révèle la présence de la bactérie dans les selles. Elle est présente chez toutes les souches de *C. difficile*, toxigènes ou non. Il existe plusieurs méthodes permettant sa détection : méthode immuno-enzymatique (EIA) (*C. DIFF QUIK CHEK*<sup>®</sup>, Abbott, North Chicago, IL, Etats-Unis ; Immunocard<sup>®</sup> *C. difficile* GDH, Meridian Bioscience<sup>TM</sup>, Cincinnati, OH, Etats-Unis), immuno-chromatographique (RIDA<sup>®</sup>QUICK *Clostridium difficile* GDH, R-Biopharm AG, Allemagne), technique ELISA « classique » (RIDASCREEN<sup>®</sup> *Clostridium difficile* GDH, R-Biopharm; Premier<sup>®</sup> *C. difficile* GDH, Meridian Bioscience<sup>TM</sup>) ou par chimiluminescence (CLIA) (LIAISON<sup>®</sup> *C. difficile* GDH, DiaSorin, Saluggia, Italie). Ces tests présentent une excellente sensibilité, avec une valeur prédictive négative (VPN) entre 97 et 98% (Arimoto et al., 2016), ce qui permet d'éliminer le diagnostic d'ICD en cas de résultat négatif. Lorsque le résultat est positif, puisqu'il ne renseigne que sur la présence de *C. difficile* sans

prédire de son caractère toxigène, le test doit être complété par la recherche des toxines libres ou des gènes codant pour les toxines (Crobach et al., 2016; McDonald et al., 2018).

#### 4.5.2.2 Détection des toxines libres

Les tests immuno-enzymatiques tels que les tests ELISA (ELISA RIDASCREEN® *Clostridium difficile* Toxin A/B, R-Biopharm AG, Pfungstadt, Allemagne ; Premier® Toxins A&B, Meridian Bioscience™, Cincinnati, Etats-Unis) ou les tests EIA (Immunocard® Toxins A&B, Meridian Bioscience™) dépistent les toxines A et B. Leur détection simultanée est recommandée depuis l'émergence de souches ne présentant que la toxine B (Barbut et al., 2002).

Les tests EIA présentent l'avantage d'être rapides, peu coûteux et faciles d'utilisation. Il en existe de nombreux sur le marché, mais leur défaut principal réside en leur manque de sensibilité. En effet, leur sensibilité est de 83 % en moyenne en prenant pour référence le CTA (Cohen et al., 2010; Humphries et al., 2013) et varie de manière importante d'un fournisseur à l'autre, de 44 à 99 % (Bartlett and Gerding, 2008; Crobach et al., 2009). La valeur prédictive positive (VPP) est inacceptable lorsque la prévalence est faible (Barbut et al., 2018b; Planche et al., 2013). Leur utilisation doit donc être combinée à la recherche de GDH, ou intégrée dans les algorithmes diagnostiques (Barbut et al., 2018b; Crobach et al., 2016) décrits plus loin (paragraphe 3.5.5). Certains fournisseurs commercialisant ces tests EIA proposent la recherche combinée des toxines libres et de l'antigène GDH sur un test unitaire (C diff Quik Chek COMPLETE®, Abbott).

Pour pallier au manque de sensibilité des EIA, des tests ELISA en milieu liquide ont été développés. L'étude réalisée en 2015 par Goret et al. évaluait les performances de l'algorithme diagnostique comprenant la détection de GDH et des toxines A et B par chimiluminescence ou CLIA proposé par la société DiaSorin. Les données étaient comparées à celles de l'algorithme proposé par Abbott comprenant la détection de GDH (C diff Quik Chek GDH®) et des toxines (TOX A/B Quik chek®) en EIA. L'algorithme DiaSorin par CLIA présentait une sensibilité bien supérieure (86,7 %) à celle de l'algorithme par EIA proposé par Abbott (60 %). Une étude similaire menée par Blaich et al. retrouvait également une meilleure sensibilité pour la détection de GDH en ELISA par Diasorin (98,7 %) qu'en EIA par Abbott (93,6 %) (Blaich et al., 2017).

Des méthodes dites ultra-sensibles ont vu le jour, afin de détecter la présence des toxines libres de l'ordre du pg/mL de selles. Ces techniques sont basées sur le principe de SIMOA (*single molecule array*), et reposent sur la capture, le marquage et la détection des toxines grâce à des billes paramagnétiques, avec une détection de l'ordre du femtolitre. Elles présentent une sensibilité supérieure aux EIA (84,8 à 95,5 % contre 71,2%) et bénéficient d'une spécificité excellente (96 à 100 %) (Banz et al., 2018; Sandlund et al., 2018; Song et al., 2015).

Planche et al suggèrent que la présence de toxines libres serait mieux corrélée à la sévérité de l'infection. Elle définirait mieux des ICD vraies à l'opposé de la mise en évidence de souches de *C. difficile* toxigènes effectuée par TAAN (Planche et al., 2013). Cette hypothèse est aujourd'hui beaucoup discutée. Elle est prise en compte dans les recommandations par les sociétés savantes européennes et françaises pour la stratégie diagnostique. Cependant, l'étude de Pollack et al vient contrecarrer cette hypothèse, en ne retrouvant pas de différence significative entre les concentrations

de toxines dans les selles de deux cohortes de patients. L'une était exclusivement composée de porteurs asymptomatiques, l'autre exclusivement composée de patients infectés, et les cohortes présentaient toutes deux des tests de biologie moléculaire positif dans les selles (Pollock et al., 2019). L'absence d'étude similaire portant sur la concentration des toxines libres dans les selles et leur corrélation à la présentation clinique des patients testés ne permet pour l'instant pas de favoriser cette hypothèse plutôt qu'une autre.

#### **4.5.2.3 Techniques d'amplification des acides nucléiques ou TAAN**

Les TAAN regroupent les techniques de biologie moléculaires telles que les PCR classiques en temps réel, ou isothermiques. Apparues en 2008, les TAAN sont de plus en plus utilisés. Suivant les trousseaux commercialisés, différentes séquences de gènes sont ciblées. Un récapitulatif des TAAN commercialisés est présenté en tableau 4. Ces méthodes présentent une sensibilité de 95 % en comparaison à la CT, et constituent donc une technique plus sensible de la mise en évidence d'ICD que la recherche de toxines libres par EIA (57 %) (Crobach et al., 2016). Le temps de réalisation des TAAN est rapide, entre 30 et 120 minutes, et leur réalisation est facile.

La principale limite des TAAN est qu'elles ne détectent que la présence des gènes codant pour les toxines et non les protéines exprimées. Les désavantages de ces tests sont liés au risque de mettre en évidence des souches toxigènes. En effet, ils ne préjugeraient pas de la réelle production des toxines. Ceci pourrait être à l'origine d'erreurs de diagnostic avec des résultats considérés comme faussement positifs chez des porteurs sains souffrant notamment de diarrhées non associées à *C. difficile*. Comme précisé précédemment, les patients présentant un TAAN et un test EIA positifs pour les toxines libres seraient plus sujets à développer des ICD sévères (Planche et al., 2013; Pollock et al., 2019).

Les TAAN présentent d'autres inconvénients. Leur coût était initialement très élevé avec une valeur 4 à 10 fois supérieure à celle de l'EIA (Eckert et al., 2013c) mais cette différence tend à diminuer aujourd'hui. Comme pour toute technique de biologie moléculaire, les régions de gènes ciblées par ces techniques sont susceptibles de muter et peuvent donner lieu à des résultats faussement négatifs (Deshpande et al., 2011). Une surveillance doit être assurée, et les fournisseurs doivent redoubler de vigilance en tenant compte des nouveaux clones circulants afin de créer des amorces adaptées.



Tableau 2 : Principes, avantages et inconvénients des différentes méthodes diagnostiques des ICD

Méthode diagnostique	Antigène détecté	Avantages	Inconvénients
Test de cytotoxicité (CTA)	Toxine B (+/- toxine A)	Sensibilité ++ Spécificité +++ Méthode de référence	Long (>24H) - Non standardisé Infrastructure adaptée Neutralisation de l'ECP
Culture toxigénique (CT)	Isolement et détermination du pouvoir toxigène de la souche <i>in vitro</i>	Sensibilité +++ Méthode de référence Antibiogramme - Typage	Long (>48h) Peu spécifique (porteurs asymptomatiques)
Test de détection de la GDH (EIA ou ELISA)	Glutamate déshydrogénase (GDH)	Sensibilité +++ VPV>99% Rapide - Simple	Peu spécifique (pas de différenciation des souches toxigènes / non toxigènes)
Tests de détection des toxines (EIA ou ELISA)	Toxines A + B	Spécificité +++ Rapide Simple	Faible sensibilité
Tests d'amplification des acides nucléiques (TAAN)	Gène <i>tcdB</i> et/ou <i>tcdA</i>	Sensibilité +++ Rapide	Peu spécifique (porteurs asymptomatiques) Présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans les selles Coûteux

Tableau 3 : Sensibilité et spécificité des différentes méthodes disponibles pour le diagnostic d'ICD

(Crobach et al., 2016)

Type	Test	Compared to CCNA			Compared to TC			Compared to culture		
		No. of studies	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	No. of studies	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	No. of studies	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
EIA GDH	Total	12	0.94 (0.89–0.97)	0.90 (0.88–0.92)	8	0.96 (0.86–0.99)	0.96 (0.91–0.98)	11	0.94 (0.86–0.97)	0.96 (0.92–0.98)
	Well type	5	0.94 (0.91–0.97)	0.92 (0.92–0.93)	1	0.94 (0.93–0.96)	0.94 (0.94–0.95)	4	0.89 (0.86–0.91)	0.91 (0.90–0.92)
	Membrane type	7	0.98 (0.78–1.00)	0.90 (0.87–0.93)	7	0.97 (0.84–1.00)	0.96 (0.90–0.99)	7	0.93 (0.84–0.97)	0.98 (0.95–0.99)
EIA toxins A/B	Total	27	0.83 (0.76–0.88)	0.99 (0.98–0.99)	29	0.57 (0.51–0.63)	0.99 (0.98–0.99)			
	Well type	18	0.85 (0.77–0.91)	0.98 (0.96–0.99)	16	0.60 (0.52–0.68)	0.98 (0.97–0.99)			
	Membrane type	9	0.79 (0.66–0.88)	0.99 (0.98–0.99)	13	0.53 (0.45–0.61)	0.99 (0.97–1.00)			
NAAT		14	0.96 (0.93–0.98)	0.94 (0.93–0.95)	32	0.95 (0.92–0.97)	0.98 (0.97–0.99)			

CI, confidence interval; CCNA, cell cytotoxicity neutralization assay; EIA, enzyme immunoassay; GDH, glutamate dehydrogenase; NAAT, nucleic acid amplification test; TC, toxigenic culture.

Tableau 4 : Techniques cibles, durée, sensibilité et spécificité de TAANs disponibles (Crobach et al., 2016; Eckert et al., 2014b; Le Guern et al., 2013; Martínez-Meléndez et al., 2017) La liste des TAANs n'est pas exhaustive, les tests présentés sont ceux pour lesquels il existe de la bibliographie indépendante. RT : real time ; HDA : helicase-dependent amplification ; TM : temps de manipulation (mins) ; TRT : temps de réalisation du test (mins) ; N/A : non applicable ; M : manuelle ; A : automatisée ; NBM : Nanoparticle-based microarray

Nom	Technique	Cible	Extraction ADN	TM	TRT	Sensibilité	Spécificité
<i>BD GeneOhm Cdiff</i> , Becton Dickinson	RT-PCR	tcdB	M	45	120	89.6%-97.4%	96.7%-98.5%
<i>Alethia™ C. difficile</i> , Meridian Bioscience	LAMP	tcdA	M	10	60	93.3%-100%	95.1%-100%
<i>Xpert C. difficile</i> , Cepheid	Multiplex RT-PCR	tcdB, cdt, tcdC, del 117	A	10	60	90%-100%	92.9%-98.6%
<i>BD MAX Cdiff</i> , Becton Dickinson	RT-PCR	tcdB	A	10	100	81.6%-96.9%	95%-95.8%
<i>Portrait C. difficile</i> , Great Basin	HDA	tcdB	A	10	100	98.2%	92.8%
<i>ProGastro Cd</i> , Hologic	RT-PCR	tcdB	A	45	180	77.9%-100%	93.4%-99.2%
<i>Seeplex Diarrhea ACE</i> , Seegene	Multiplex PCR	tcdB	M	N/A	240	80%-96%	93%-99%
<i>Amplivue</i> , Quidel® Molecular	HDA	tcdA	M	10	80	91%-96%	89%-100%
<i>Verigene® CDF</i> , Luminex	PCR NBM	tcdA, tcdB, cdt, tcdC, del 117	A	5	120	95.2%-98.7%	87.5%-99.4%
<i>GenomEra</i> , Abacus Diagnostica	RT-PCR	tcdB	A	5	50	95%-100%	96%-100%
<i>AdvanSure CD</i> , LG Life Sciences	RT-PCR	tcdA tcdB	M	10	180	85%-100%	98%

### 4.5.3 Les algorithmes diagnostiques recommandés

Les recommandations européennes et françaises (Barbut et al., 2018b; Crobach et al., 2016) sont similaires et seront présentées de manière conjointe. Les différences avec les recommandations émanant d'autres pays seront présentées dans un second temps.

#### 4.5.3.1 Recommandations françaises et européennes

Les recommandations françaises et européennes préconisent un algorithme diagnostique des ICD en deux ou trois temps. Ces algorithmes sont décrits sur deux figures selon si la première étape est constituée de TAAN ou de recherche de GDH seule (figure 17), ou si la première étape est constituée de la détection concomitante de la GDH et des toxines A et B (figure 18).

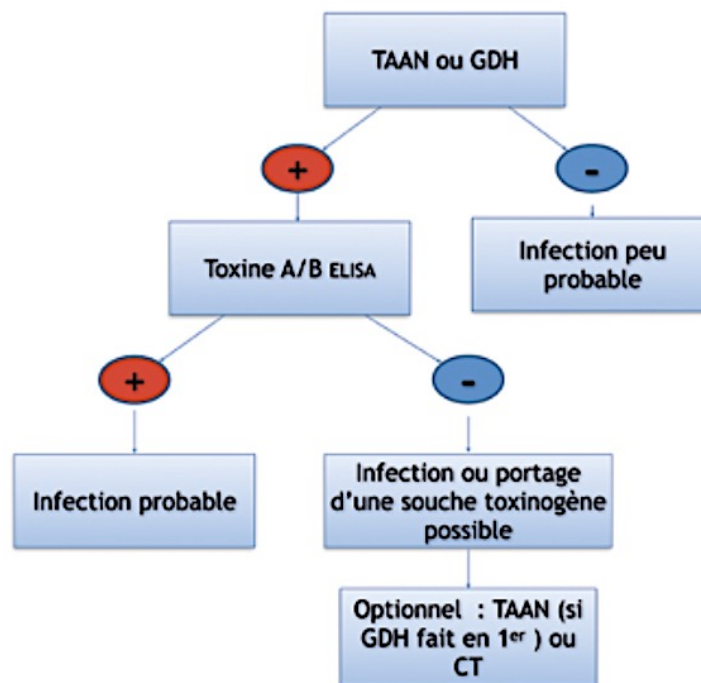


Figure 17 : Proposition d'algorithme diagnostique en 2 étapes d'une ICD d'après le référentiel en microbiologie médicale (REMIC) (Barbut et al., 2018b; Seksik, 2019)

La première étape consiste à dépister la présence de *C. difficile* par la détection de GDH dans les selles par EIA ou ELISA. Compte tenu de l'excellente VPN de ce test, un résultat négatif permet d'exclure le diagnostic d'ICD. Si le résultat est positif, il doit être confirmé par une seconde méthode pour confirmer le caractère toxigène ou non. Une autre alternative est de réaliser d'emblée un TAAN sur les selles, cependant le coût engendré par la réalisation de ces tests peut constituer un frein à leur mise en place en première ligne. Dans les deux cas, face à un résultat positif en première ligne, il est recommandé de rechercher les toxines libres en deuxième ligne. Les toxines libres sont

recherchées par EIA. En raison de leur faible sensibilité, un résultat négatif n'écarte pas avec certitude la suspicion d'ICD. Nous avons vu précédemment que la VPN des tests EIA pour la recherche de toxines n'était pas bonne. Dans ce cas de figure, il faut effectuer un TAAN ou une CT en troisième ligne, ce qui permettrait de conclure sur la présence ou non de *C. difficile* toxinogène. Un résultat de toxines négatif après TAAN positif pose la question d'une possible infection ou d'un portage asymptomatique de *C. difficile* toxinogène. Les résultats sont à confronter au contexte clinique et les autres causes de diarrhée à explorer.

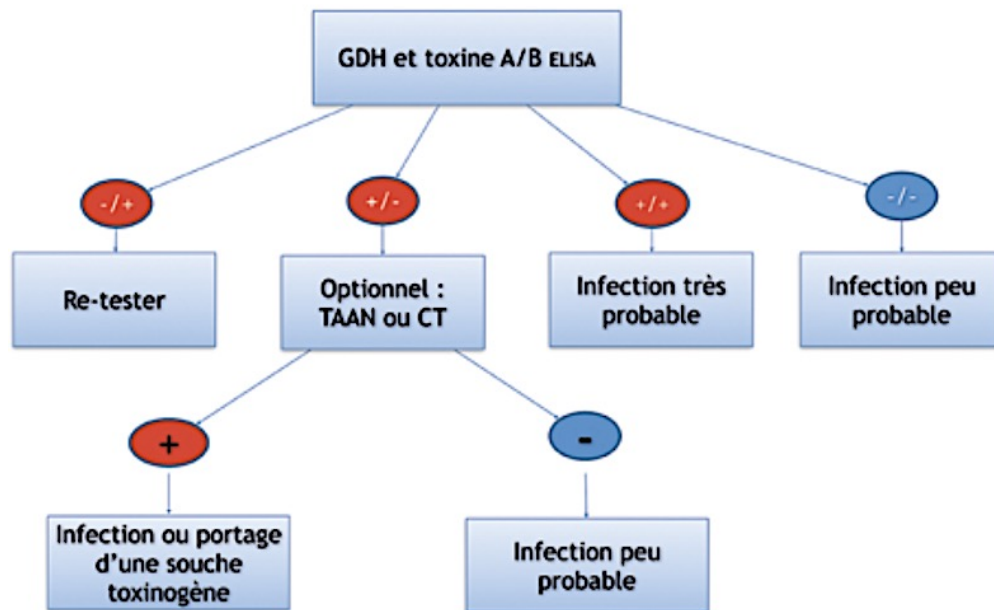


Figure 18 : Proposition d'algorithme diagnostique d'une ICD d'après le REMIC (Barbut et al., 2018b; Seksik, 2019)

Une alternative propose de dépister conjointement la présence de GDH et de toxines A et B par EIA (figure 18). Si les deux reviennent négatifs, l'ICD est peu probable. S'ils sont positifs, l'ICD est très probable. Si la GDH est négative alors que les toxines sont positives, le test n'est pas valide et doit être réalisé de nouveau. Enfin, si la GDH est positive et les toxines négatives, un test complémentaire doit être réalisé. La réalisation de TAAN ou de CT en seconde ligne permet de confirmer ou non l'ICD. En cas de TAAN ou de CT négatif, l'ICD est peu probable. En cas de TAAN positif, la présence des gènes codant pour les toxines est confirmée, sans confirmation de la présence de toxines libres. Le résultat doit être confronté au contexte clinique et aux autres causes potentielles de diarrhée.

Les avantages de ces algorithmes résident en leur rapidité d'exécution par rapport aux deux tests de référence (quelques heures versus 48 h) et une sensibilité élevée. Ces algorithmes permettent un diagnostic rapide avec une excellente VPN.

Les inconvénients de ces algorithmes sont leur complexité et leur évolution rapide au cours des dernières années. Les recommandations des sociétés savantes n'ont cessé d'évoluer ces dernières années avec l'arrivée des TAAN. Leurs rééditions successives sont difficiles à appliquer par les microbiologistes et cliniciens. Le coût des algorithmes est également un désavantage depuis l'introduction des TAAN (Planche et al., 2013). Enfin, la difficulté la plus grande réside en l'information et l'éducation des cliniciens concernant l'indication de ces algorithmes diagnostiques et l'interprétation de leurs résultats. La réponse au sous diagnostic des ICD évoqué en 2014 (Davies et al., 2014) tend vers le surdiagnostic aujourd'hui. Cette tendance est expliquée par la réalisation de « faux diagnostics » chez des patients porteurs asymptomatiques, par demande de recherche d'ICD sur selles non diarrhéiques (Goret et al., 2018), ou avec une diarrhée non liée à *C. difficile* chez des porteurs sains (Polage et al., 2015).

Les algorithmes diagnostiques des ICD peuvent être classés pour les laboratoires exécutants d'après Eckert *et al.* en stratégie optimale, suboptimale ou incomplète selon leur capacité à détecter la présence de souche toxigène et/ou de toxines libres dans les selles (tableau 5), l'idéal étant d'allier la détection des deux par une stratégie optimale (Eckert et al., 2015c).

Tableau 5 : Classification des stratégies diagnostiques des ICD (Eckert et al., 2015c)

	Test de dépistage	Test de confirmation
<b>Stratégie optimale :</b> Détection des toxines libres <u>ET</u> d'une souche toxigène ou des gènes codant les toxines ( <i>stratégie sensible et spécifique</i> )	Méthode moléculaire (TAAN)	Détection des toxines (EIA)
	GDH <b>et</b> détection des toxines (EIA)	Méthode moléculaire (TAAN) ou culture toxigénique (CT)
<b>Stratégie suboptimale :</b> Détection d'une souche toxigène <u>ou</u> des gènes codant les toxines ( <i>stratégie sensible mais moins spécifique qu'une stratégie optimale</i> )	GDH (EIA)	Méthode moléculaire (TAAN) ou culture toxigénique (CT)
	Méthode moléculaire (TAAN)	Aucun
<b>Stratégie incomplète</b>	Autres algorithmes	

Le choix de ces différents algorithmes dépend donc de la stratégie diagnostique désirée par le laboratoire et du coût de ces derniers. L'étude de Bartsch et al (Bartsch et al., 2015) corrèle les performances diagnostiques de 4 algorithmes différents aux coûts potentiellement engendrés (diagnostic, traitement, hospitalisations, complications). Les 4 algorithmes étaient les suivants : la recherche de toxines seule par EIA, la détection combinée de GDH-toxines par EIA (stratégies incomplètes selon le tableau 5), la réalisation d'un TAAN seul (stratégie suboptimale) et la recherche combinée de GDH-toxines libres par EIA suivie d'un TAAN (stratégie optimale). Un modèle de

variation statistique de Monte-Carlo a montré que l'algorithme GDH-toxines libres EIA puis TAAN (figure 18) demeure l'approche la moins coûteuse, l'approche TAAN seule coûtant selon l'étude 4 à 53 dollars de plus par patient testé. Lors de l'évaluation du délai avant mise sous traitement adapté du patient, l'algorithme GDH-toxines libres EIA puis TAAN (figure 18) était également le plus performant, conduisant à des traitements en temps opportun et générant les coûts les plus faibles. L'approche TAAN seule fournissait des résultats comparables. Ces données ont été confirmées par l'étude de Bartsch et al qui décrivaient l'algorithme GDH-toxines par EIA puis TAAN (figure 17) comme l'algorithme optimal en termes de performance diagnostique, de coût et d'optimisation de prise en charge des patients. Cet algorithme répond donc en effet à une stratégie optimale sur le plan diagnostique (Eckert et al., 2015c), mais également sur le plan financier (Bartsch et al., 2015). Les approches toxines seules et GDH-toxines par EIA fournissaient toutes deux des résultats insuffisants. L'évaluation de l'algorithme GDH-EIA puis TAAN (algorithme suboptimal) n'a pas été réalisée.

La recherche des toxines libres systématique serait un élément complémentaire pour l'interprétation de l'algorithme. Nous avons vu précédemment que leurs performances diagnostiques à l'heure actuelle étaient faibles avec une sensibilité insuffisante et la possibilité de faux négatifs. De plus, selon Barbut (Barbut et al., 2018b) et Planche (Planche et al., 2013), la VPP de la détection des toxines libres est inacceptable lorsque la prévalence est faible (<10%). Planche et al stipulent dans leur étude portant sur plus de 12000 échantillons testés que la recherche des toxines libres est un point essentiel dans le diagnostic d'une ICD, afin de différencier les patients réellement infectés des patients porteurs excréant *C. difficile* toxigène du fait d'une autre cause de diarrhée. Il est également rappelé l'importance de l'interprétation clinique des résultats obtenus et de la confrontation au tableau clinique avant toute mise sous traitement (Planche et al., 2013). L'étude de Polage et al complète ce postulat en évaluant les résultats de TAAN et détection de toxines libres chez 1416 patients hospitalisés. 293 présentaient un TAAN positif dans les selles, et 44,7 % d'entre eux (131/293) présentaient un test positif pour les toxines libres. La présence de facteurs de risques d'ICD tels que l'exposition à une antibiothérapie, et de signes cliniques tels qu'une diarrhée étaient significativement inférieure dans le groupe TAAN positif et toxines négatives que dans le groupe TAAN et toxines positifs ( $p < 0,001$ ). Aucune complication relative à une ICD n'a été retrouvée dans le groupe TAAN positif et toxines négatives, tandis que 7,6 % de complications en lien avec une ICD ont été observées dans le groupe TAAN et toxines positives ( $p < 0,001$ ). Les auteurs s'appuient sur ces chiffres pour mettre en lumière le risque de surdiagnostic d'ICD. L'utilisation croissante d'algorithmes avec réalisation de TAAN s'accompagne logiquement d'un plus grand nombre de résultats positifs, de par leur meilleure sensibilité. Cependant, l'absence de données sur la présence de toxines libres, qui définissent historiquement la présence de la maladie, peut amener à de « faux diagnostics » d'ICD chez des patients diarrhéiques porteurs de souches toxigènes. Ce surdiagnostic engendre des surcoûts liés aux soins par mise en place de traitements non adaptés (Polage et al., 2015).

Afin de répondre à cette problématique, il est proposé de suivre les recommandations émises par la société européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses (Crobach et al., 2016), à savoir de ne pas réaliser de dépistage de *C. difficile* sur selles moulées, lors de demandes redondantes (tests négatifs dans les 7 jours précédant), et lors de demandes après traitement d'une

ICD. Il est également proposé de sensibiliser les cliniciens prescripteurs, par le biais d'une formation et/ou d'un rappel, sur les indications de recherche de *C. difficile*, modalités de diagnostic et interprétation des résultats de l'algorithme (présence de gènes codant pour les toxines pouvant être interprétée à tort comme présence de toxines libres). Enfin, en vue d'une aide immédiate à l'interprétation des résultats de l'algorithme, et ce pour chaque demande, il peut être proposé d'ajouter une phrase type en conclusion des compte-rendus lorsque la détection de GDH et des gènes codant pour les toxines est positive, telle que « La présence de GDH et des gènes codant pour les toxines de *C. difficile* ne présage pas de la présence de toxines libres, le diagnostic d'ICD ne peut être formel sur ces éléments seuls. La présence de *C. difficile* toxino-gène sur ce prélèvement doit s'accompagner d'une interprétation clinico-biologique. Le contexte clinique (antibiothérapie, terrain à risque, situation d'épidémie...) les signes cliniques et de gravité (diarrhée, CPM...), ainsi que la prise en compte des diagnostics différentiels doivent entrer en compte avant d'établir le diagnostic et de débiter le traitement d'une ICD ».

#### 4.5.3.2 *Recommandations internationales*

##### 4.5.3.2.1 Américaines

Les Société américaine de maladies infectieuses (*Infectious Diseases Society of America* ou IDSA) et la Société pour l'épidémiologie des soins de santé de l'Amérique (*Society for Healthcare Epidemiology of America* ou SHEA) ont édité leurs dernières recommandations pour le diagnostic des ICD en 2018 (McDonald et al., 2018).

Les différences concernant les algorithmes diagnostiques sont basées sur l'accord institutionnel entre les cliniciens et les biologistes. Cet accord stipule que seules les selles de patients présentant une diarrhée inexplicée peuvent être soumises à une exploration diagnostique, et que ne seraient jamais soumises les selles de patients sous laxatifs. S'il est applicable, cet accord permet de ne pouvoir réaliser qu'un TAAN en première ligne diagnostique de recherche d'ICD, sans réaliser de tests de seconde ligne, quel qu'en soit le résultat. Cela s'oppose aux recommandations européenne (Crobach et al., 2016) et française (Barbut et al., 2018b) qui préconisent la recherche de toxines libres par EIA en deuxième intention après un TAAN positif, afin de différencier les patients porteurs asymptomatiques des ICD vraies.

Dans le cas où l'accord institutionnel évoqué précédemment n'est pas applicable, les algorithmes proposés et l'interprétation des résultats sont similaires à ceux des recommandations françaises et européennes.

#### 4.5.3.2.2 Anglaises

Les dernières recommandations anglaises du Comité consultatif associé aux infections concernant le diagnostic des ICD datent de 2012 (Advisory Committee Associated Infection (ARHAI), 2012). Elles recommandent le recours aux algorithmes similaires à ceux proposés par l'ESCMID (Crobach et al., 2016) et le REMIC (Barbut et al., 2018b). Les tests EIA-GDH ou les TAAN sont employés en première ligne, suivis par la recherche des toxines libres par EIA lorsqu'ils sont positifs. L'algorithme est éventuellement complété par un TAAN lorsque la détection de GDH a été réalisée initialement. Les critères d'interprétation sont similaires à ceux des algorithmes proposés par les recommandations européennes et françaises. Il est rappelé au sein de ces recommandations qu'aucun test ni algorithme diagnostique n'est infaillible, et que l'état clinique du patient doit toujours être pris en considération dans sa prise en charge.

#### 4.5.3.2.3 Australiennes

Les recommandations émises par la Société Australienne de Maladies Infectieuses (*Australian Society of Infectious Diseases* ou ASID) concernant le diagnostic des ICD datent de 2011 (Ferguson et al., 2011). La seule différence observée avec les algorithmes diagnostiques proposés en Europe concerne la réalisation de TAAN en première ligne, qui selon les recommandations australiennes n'a pas besoin d'être confirmé par une seconde méthode. Cette caractéristique rejoint les préconisations de l'IDSA et de la SHEA mais ne fait pas mention d'accord institutionnel entre cliniciens et biologistes pour ne soumettre à l'exploration diagnostique que les selles des patients présentant une diarrhée. L'utilisation de TAAN seule après un résultat positif s'oppose donc aux préconisations de l'ESCMID, du REMIC et de l'ARHAI qui justifient la recherche de toxines libres par EIA en complément.

## 4.6 Algorithme diagnostique Meridian Bioscience

### 4.6.1 Principe

La société Méridian propose un test de détection ImmunoCard<sup>®</sup> *C. difficile* GDH-EIA et un TAAN Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* ayant pour cible l'îlot de pathogénicité *PaLoc* portant les gènes codant pour les toxines A et B. Méridian fournit donc un algorithme en deux temps « prêt à l'emploi ». C'est la seule société proposant actuellement à la fois un test de dépistage et un test de confirmation pour le diagnostic de *C. difficile*.

Selon les recommandations du fournisseur, lorsque le test de détection de GDH est négatif, les investigations concernant une éventuelle ICD s'arrêtent et il est conclu à une absence de *C. difficile* dans les selles. En revanche, lorsque la GDH est positive, la présence de *C. difficile* dans les selles est établie. L'investigation est poursuivie en réalisant un test de détection des acides nucléiques Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* afin de déterminer le caractère toxigène ou non. Si son résultat est « Négatif »,



il est conclu à la présence de *C. difficile* non toxigène. S'il est rendu « Positif », il est conclu à la présence de *C. difficile* producteur de toxines et potentiellement pathogène. La présence de toxines libres produites par la souche potentiellement toxigène n'est pas évaluée par cet algorithme. La société Meridian possède un test de détection des toxines libres A et B, Immunocard® Toxins A&B. Celui-ci n'est pas proposé dans l'algorithme et n'est pas décrit dans cette thèse.

#### 4.6.2 Caractéristiques techniques

##### 4.6.2.1 ImmunoCard® *C. difficile* GDH

L'ImmunoCard® *C. difficile* GDH consiste en une membrane maintenue dans un cadre en plastique avec deux puits d'échantillon et deux puits de réaction. Des anticorps vis-à-vis de la GDH sont immobilisés sur la membrane. Le conjugué enzymatique consiste en des anticorps de la GDH couplés à de la peroxydase de raifort. Pour réaliser le test, l'échantillon de selle du patient est dilué à l'aide du diluant échantillon auquel est ajouté le conjugué enzymatique, puis le mélange est incubé pendant 15 minutes. Durant l'incubation, l'antigène GDH, s'il est présent, est lié aux anticorps anti-GDH du conjugué. À l'issue de l'incubation, une aliquote de mélange est ajoutée à chacun des deux puits d'échantillon, puis le test est incubé pendant cinq minutes supplémentaires entre 20 et 26°C. Durant la seconde incubation, le complexe GDH-conjugué est séparé des matières particulaires tandis que la portion liquide de l'échantillon migre à travers la membrane vers les puits de réaction. Les complexes GDH-conjugué sont alors capturés par des anticorps immobilisés sur la membrane de réaction. Un second puits de réaction sert de contrôle interne. Les deux puits sont ensuite lavés avec une solution de lavage afin de diminuer l'interférence des protéines contaminantes avant l'ajout du substrat. Les tests de réaction sont incubés pendant cinq minutes supplémentaires, durant lesquelles le conjugué enzymatique réagit avec le substrat. Il en résulte l'apparition d'une couleur bleue. Les réactions sont lues visuellement. L'apparition d'une couleur bleue dans le puits de réaction TEST indique que le test est positif. Dans le puits CONTROLE, les anticorps anti-GDH du conjugué se lient directement aux anticorps immobilisés sur la membrane. L'apparition de bleu dans le puits de réaction CONTROLE indique que l'échantillon a été ajouté, que les réactifs étaient actifs au moment de l'utilisation et que la migration de l'échantillon s'est effectuée correctement. Le mode opératoire du test ImmunoCard® *C. difficile* GDH est présenté en figure 19.

**ImmunoCard®**  
**C. difficile GDH TEST PROCEDURE** *How to perform the test*



1. In a test tube, add 200 µL of Sample Diluent using the dropper assembly.



2. Add 25 µL of liquid stool (first mark on the transfer pipette) or 2 mm diameter of solid stool\* to the test tube. Vortex mixture for 10 seconds.



3. Hold Enzyme Conjugate vertically and add 3 drops to the test tube. Vortex for 10 seconds. Let the tube stand at 20-26 C for 15 minutes.



4. Vortex for 10 seconds. Using a transfer pipette, add 150 µL (second mark on the pipette) of diluted specimen to the right and left sample (lower) ports. Incubate 5 minutes at 20-26 C.



5. Hold Wash Reagent vertically and add 3 drops to each reaction (upper) port.



6. Once Wash Reagent is absorbed, hold Substrate Reagent vertically and add 3 drops to both reaction (upper) ports. Incubate for 5 minutes at 20-26 C. Visually read the results within 30 seconds of the end of incubation.

©2011 SN11085 REV. 10/16



This illustration is representative of the current Package Insert at the time of publication. Please refer to the most current version of the package insert for complete instructions.

**USA/CORPORATE OFFICE**  
 3471 River Hills Drive  
 Cincinnati, Ohio 45244 USA  
 Telephone: 513.271.3700

Orders / Customer Service: 1.800.543.1980  
 Technical Support: 1.800.343.3858  
 Information Fax: 513.272.5432  
 Ordering Fax: 513.271.0124  
[www.meridianbioscience.com](http://www.meridianbioscience.com)

**MERIDIAN BIOSCIENCE EUROPE**  
 Belgium/Luxembourg Tel: +32 (0) 67 89 59 59  
 France Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40  
 Germany Tel: +49 (0) 3371 681 900  
 Italy Tel: +39 0331 43 3636  
 Netherlands Tel: +31 (0) 411 62 11 66  
 United Kingdom Tel: +44 (0) 20 8453 7970

**Meridian**  
 Bioscience, Inc.  
 Inspired Science. Trained Scientists.™

\* The following illustration depicts approximate sample size when testing solid, semi-solid, or non-pipettable stools.

Figure 19 : Mode opératoire du test ImmunoCard® C. difficile GDH

#### 4.6.2.2 TAAN Alethia™ *C. difficile*

Le test d'amplification isothermique de l'ADN Alethia™ *C. difficile* est fondé sur la technique dite LAMP (Amplification isotherme médiée en boucle ou *Loop-mediated isothermal amplification*). Elle utilise des amorces spécifiques qui amplifient une région de 204 pb parmi la séquence conservée en 5' du gène *tcdA* dans le locus *PaLoc*, directement à partir d'échantillons de selles. La technique LAMP est une méthode d'amplification isotherme mise au point par l'équipe de Notomi au début des années 2000. Elle utilise une ADN polymérase et un ensemble de quatre amorces spécialement conçues pour reconnaître un total de six séquences distinctes sur l'ADN cible. Les différentes étapes sont schématisées en figure 18.

Une amorce interne contenant des séquences des brins sens et anti sens de l'ADN cible initie la LAMP. La synthèse d'ADN par déplacement de brin, amorcée par une amorce externe, libère un ADN simple brin. Celui-ci sert de matrice les deuxièmes amorces internes et externes qui s'hybrident et forment une structure d'ADN en « épingle à cheveux ». Lors du cycle suivant de LAMP, une amorce interne s'hybride à la boucle et initie la synthèse d'ADN, produisant ainsi l'ADN en « épingle à cheveux » avec une tige deux fois plus longue. La réaction cyclique se poursuit avec une accumulation de  $10^9$  copies de la cible en moins d'une heure. Les produits finaux sont des ADN en « épingles à cheveux » avec plusieurs répétitions inversées de la cible et une structure finale en forme de « chou-fleur ». Du fait de la reconnaissance initiale de la cible par six séquences distinctes, puis par quatre lors de l'initiation de l'amplification, la technique LAMP permet d'amplifier la séquence cible avec une grande spécificité (Notomi et al., 2000).

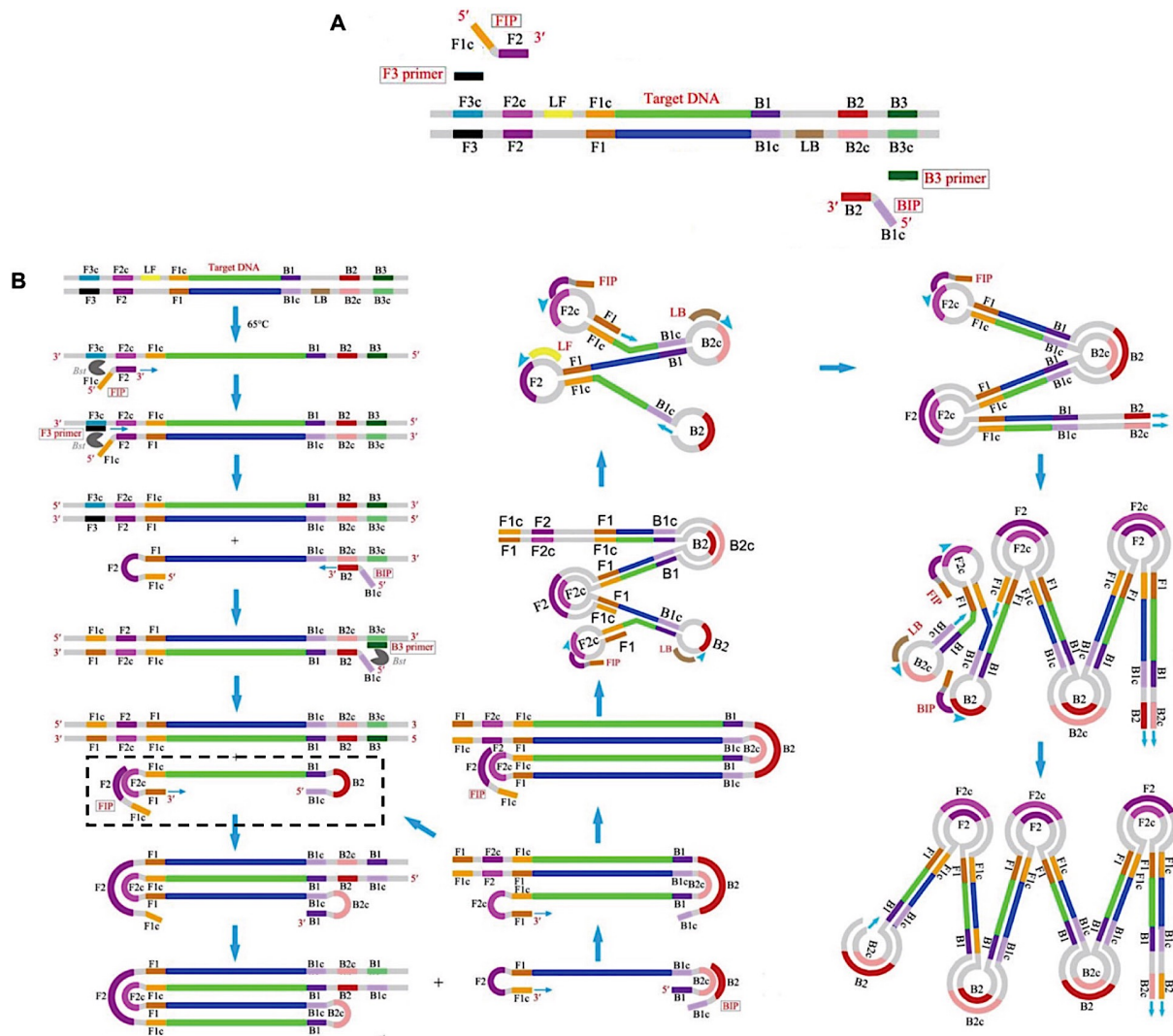


Figure 20 : Principe de la technique LAMP (Li et al., 2016)

A. La technique LAMP repose sur l'utilisation de six amorces. L'amorce FIP (*Forward Inner Primer*) contient à son extrémité 3' une séquence F2 complémentaire de séquence F2c et à son extrémité 5' une séquence identique à la séquence F1c. L'amorce F3 (*Forward Outer Primer*) correspond à la séquence F3c complémentaire de la séquence F3. L'amorce BIP (*Backward Inner Primer*) contient à son extrémité 3' une séquence B2 complémentaire de séquence F2c et à son extrémité 5' une séquence identique à la séquence B1c. L'amorce B3 (*Backward Outer Primer*) correspond à la séquence B3c complémentaire de la séquence B3. Deux amorces additionnelles (LF – *Loop Primer Forward* – et LB – *Loop Primer Backward* -) favorisent la formation de boucles.

B. L'hybridation des différentes amorces couplée à l'action d'une polymérase dotée d'une activité de déplacement de brin (« *strand displacement activity* ») aboutit à la formation d'une structure en épingle à cheveux (cadre en pointillés noirs), support de l'amplification exponentielle de la séquence d'intérêt.

Un produit secondaire apparaît lors de cette amplification, le pyrophosphate de magnésium. Il forme un précipité blanc troublant la solution de réaction. La présence du trouble indique une réaction positive, alors que son absence représente une réaction négative. Les résultats de ce test sont mesurés à l'aide de l'incubateur/lecteur Alethia™. Le résultat de l'échantillon de selle testé peut être « Non valide », « Positif » ou « Négatif » en fonction des changements observés dans l'absorbance.

Afin d'assurer la validité du résultat obtenu, un contrôle interne d'amplification est contenu dans chacun des tests unitaires Alethia™ *C. difficile*. Le système de préparation et de dilution de l'échantillon contient du tampon de phosphate salin et du *Staphylococcus aureus* traité à la formaline.

Le dispositif du test est formé de deux compartiments séparés contenant chacun une bille de réactif lyophilisé. Le compartiment TEST contient les amorces spécifiques pour *C. difficile* et le compartiment CONTRÔLE contient les amorces spécifiques pour *S. aureus*. L'échantillon du patient et la cible de contrôle de *S. aureus* sont traités en parallèle durant les étapes restantes de préparation de l'échantillon et de procédure de test. Le contrôle interne permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou du traitement des échantillons. Si l'amplification de la cible de contrôle de l'ADN du *S. aureus* n'est pas détectée dans la réaction finale, le test est considéré comme étant non valide et les résultats du patient ne sont pas reportés par l'automate Alethia™.

Le mode opératoire du test Alethia™ *C. difficile* est présenté en figure 21.

# alethia™

## C. difficile

### TEST PROCEDURE

How to perform the test

- 1a. **Liquid:**  
Insert brush into specimen.



- 1b. **Semi-solid:**  
Approximately one-half of the brush should be coated.



2. Insert brush into Sample Preparation Apparatus. Break at break point on stem. Recap and vortex 10 seconds.



3. Remove cap and squeeze 5-10 drops of sample into Heat Treatment Tube.



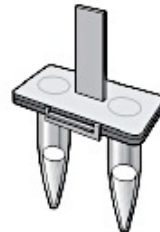
4. Incubate the Heat Treatment Tube at 95 C for 10 minutes. Vortex for 10 seconds.



5. Transfer 50 µL of the heat-treated sample to the Reaction Buffer Tube. Vortex for 10 seconds.



6. Using a micropipette, transfer 50 µL from the Reaction Buffer Tube to the (Left) TEST Chamber, then transfer 50 µL to the (Right) CONTROL Chamber of the Alethia™ Test Device.



7. Close and fasten the latch securely. Gently tap device to remove air bubbles trapped on the bottom of the chambers. Carefully examine reaction chambers to ensure there are no air bubbles left in the bottom of the chambers.



8. Insert the Alethia™ Test Device into the Alethia™ Instrument and initiate amplification reaction and detection.



This illustration is representative of the current Package Insert at the time of publication. Please refer to the most current version of the Package Insert for complete instructions.

#### USA/CORPORATE OFFICE

3471 River Hills Drive  
Cincinnati, Ohio 45244 USA  
Telephone: 513-271-5700

©2018 SNT1017 REV. 09/18

#### MERIDIAN BIOSCIENCE EUROPE

Belgium/Luxembourg Tel: +32 (0)16789 5959  
France Tel: +33 (0)1 4254 0440  
Germany Tel: +49 (0)3371 60 222 31  
Italy Tel: +39 0331 43 3636  
Netherlands Tel: +31 (0)411 62 11 66  
United Kingdom Tel: +44 (0)20 8453 7970

Orders/Customer Service: 1-800-543-1980  
Technical Support: 1-800-343-3858  
Information Fax: 513-272-5432  
Ordering Fax: 513-271-0124  
[meridianbioscience.com](http://meridianbioscience.com)

**meridian** BIOSCIENCE™

Figure 21 : Mode opératoire du test Alethia™ C. difficile

### 4.6.3 Performances analytiques de l'algorithme

Les performances analytiques de l'ImmunoCard<sup>®</sup> *C. difficile* GDH ont été décrites par plusieurs études. Staneck et al avaient retrouvé après étude de 927 échantillons de selles et comparaison des résultats avec ceux obtenus en CTA une sensibilité de 84 %, une spécificité de 92 %, une VPP de 63 % et une VPN de 97 % (Staneck et al., 1996). Turgeon et al avaient étudié sur le même modèle 1003 échantillons et avaient retrouvé une sensibilité de 80,2 %, une spécificité de 92,5 %, une VPP de 54,4 % et une VPN de 97,7 % (Turgeon et al., 2003). Ces résultats sont en accord avec l'utilisation en pratique des tests de détection de GDH comme tests de dépistage de la présence de *C. difficile*, avec une excellente VPN.

Le test Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* présente d'excellentes performances avec une sensibilité et une spécificité élevées. De nombreuses études ont été réalisées pour comparer les résultats du test avec ceux obtenus en CT. Les effectifs des études retenues allaient de 94 à 989 échantillons testés. D'après l'ensemble des résultats de ces études, la sensibilité du test s'élève de 86,7 à 98 % et sa spécificité de 91 à 100 %. Les VPP et VPN s'étendent de 67 à 100 % et de 97,1 à 99 % respectivement (Buchan et al., 2012; Hong et al., 2014; Lalande et al., 2011; Neuendorf et al., 2016; Norén et al., 2011, 2014; Viala et al., 2012; Ylisiurua et al., 2013).

L'algorithme diagnostique tel qu'il est proposé par Meridian a été étudié par Walkty et al en 2013 sur 428 échantillons dont les résultats étaient comparés à ceux obtenus en CT. La sensibilité diagnostique de l'algorithme était de 68,3 % (IC 95 % : 55,2-79,1), la spécificité de 100 % (IC 95 % : 98,7-100), la VPP de 100 % (IC 95 % : 89,8-100) et la VPN de 94,8 % (IC 95 % : 92-96,7) (Walkty et al., 2013). Eckert et al ont également étudié les performances de l'algorithme proposé par Meridian en 2014. Trois cent huit échantillons ont été inclus et les résultats comparés avec ceux obtenus en CT. La sensibilité diagnostique de l'algorithme était de 91,7 % (IC 95 % : 76,4-97,8), la spécificité de 100 % (IC 95 % : 98,3-100), la VPP de 100 % (IC 95 % : 87-100) et la VPN de 98,9 % (IC 95 % : 96,6-99,7) (Eckert et al., 2014b). Enfin, l'équipe de Goret et al a également testé les performances diagnostiques de l'algorithme sur 468 échantillons en les comparant aux résultats obtenus par CT. La sensibilité diagnostique était de 90 % (IC 95 % : 72,3-97,8), la spécificité de 98,9 % (IC 95 % : 97,4-99,5), la VPP de 84,4 % (IC 95 % : 66,5-94,1) et la VPN de 99,3 % (IC 95 % : 97,8-99,8) (Goret et al., 2015).

Ces études confirment des sensibilité et spécificité diagnostiques élevées et légitiment l'utilisation de cet algorithme pour le diagnostic des ICD.

### 4.6.4 Stratégie algorithmique Meridian

#### 4.6.4.1 Comparaison avec les recommandations des sociétés savantes

Cet algorithme diagnostique en deux temps répond partiellement aux recommandations françaises (Barbut et al., 2018b) et européennes (Crobach et al., 2016) puisqu'il ne comprend pas l'étape intermédiaire de recherche de toxines libres par EIA. Il répond cependant à une stratégie

diagnostique suboptimale selon Eckert et al (cf. tableau 5 paragraphe 3.5.6.1). En l'absence d'information décelable sur la présence de toxines libres ne permettant pas de différencier le porteur sain du patient infecté, il s'agit d'une stratégie sensible mais moins spécifique qu'une stratégie diagnostique optimale. Comme mentionné dans le paragraphe 4.5.3.1, nous considérons cette stratégie diagnostique comme performante si la sélection des selles testées et les indications de la recherche de *C. difficile* sont maîtrisées par le laboratoire.

Cet algorithme ne répond également pas totalement aux exigences des recommandations anglaises (Advisory Committee Associated Infection (ARHAI), 2012) puisqu'il ne comprend pas la recherche de toxines libres, ni à celles des recommandations américaines (McDonald et al., 2018) et australiennes (Ferguson et al., 2011) qui préconisent la réalisation de TAAN d'emblée sans détection de GDH préalable.

#### 4.6.4.2 Limites techniques

Le test de dépistage ImmunoCard® *C. difficile* GDH présente quelques limites. Les échantillons présentant des niveaux extrêmement élevés de GDH peuvent présenter un puits TEST positif et un résultat négatif au puits de réaction CONTROL. Une réaction croisée avec l'ImmunoCard® *C. difficile* GDH est observée en présence de *Staphylococcus aureus* (souche Cowan I), et les échantillons contenant du sang à des concentrations supérieures à 40 % produisent potentiellement des résultats faussement négatifs.

Le TAAN Alethia™ *C. difficile* peut présenter un résultat « Non valide » (jusqu'à 2,9% selon les données du fournisseur Meridian Bioscience), il n'est alors pas possible de statuer sur la présence de *C. difficile* toxigène ou non. Le fournisseur recommande de réaliser le test une nouvelle fois à partir de l'échantillon de selles primaire, afin de s'affranchir de toute éventuelle erreur de manipulation. En effet, cette technique nécessite une prise en main par les opérateurs. D'autres causes peuvent être à l'origine de ce résultat invalide comme un réactif non opérant, une erreur de l'incubateur/lecteur ou l'échec du contrôle interne. La non validité du test peut également être attribuée à la présence suspectée de substances interférentes dans les selles, impactant l'amplification isothermique. Les substances pouvant impacter l'amplification des acides nucléiques dans les selles sont les sels biliaires, l'hème, la bilirubine et les complexes polysaccharidiques (Lantz et al., 1997; Monteiro et al., 1997; Oikarinen et al., 2009).

#### 4.6.4.3 Analyse médico-économique

Concernant le coût engendré par cet algorithme, le test ImmunoCard® *C. difficile* GDH est 4 fois moins cher que le test Alethia™ *C. difficile*. C'est pourquoi il est économique de ne réaliser le test Alethia™ *C. difficile* qu'en cas de test ImmunoCard® *C. difficile* GDH positif. Rappelons que les recommandations américaines (McDonald et al., 2018) proposent la réalisation de test TAAN en première ligne, et que le coût engendré par de telles pratiques peut être un facteur limitant.



L'étude de Le Guern et al classait le test Alethia™ *C. difficile* parmi les TAAN les moins onéreux du marché, avec un coût approximatif de 33\$ par test contre 52\$ par test pour Xpert® *C. difficile* (Cepheid, Sunnyvale, Etats-Unis), ou 43\$ par test pour BD MAX™ Cdiff Assay (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Etats-Unis) (Le Guern et al., 2013). Ces prix sont indicatifs.

La comparaison du cout de cet algorithme avec celui d'autres algorithmes proposés n'est pas décrite dans la littérature. Lors de l'étude de marché pour sa mise en place au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, l'algorithme proposé par Meridian était le moins couteux en terme de coût/patient.

#### 4.7 Accréditation des algorithmes diagnostiques

Les laboratoires d'analyse médicales sont soumis à la démarche d'assurance qualité, d'après la norme NF EN ISO 15189. L'accréditation des laboratoires est accordée par le Comité Français d'Accréditation (COFRAC), et doit concerner 100% des analyses réalisées en 2020.

La validation d'une méthode est le procédé par lequel on confirme que la procédure analytique employée pour mener un test répond aux exigences de l'usage auquel elle est destinée. Les résultats de la validation de méthode sont utilisés pour juger la qualité, la fiabilité et la cohérence des résultats analytiques. Ce procédé fait partie intégrante de toute bonne pratique analytique, et dans le même temps de la démarche d'accréditation des laboratoires.

Le guide à suivre pour mener à bien cette validation de méthode est le SH GTA 04 (COFRAC, 2015), qui expose les différents points à aborder et conditions à remplir selon la portée d'accréditation. Les informations fournies par le SH GTA 04 peuvent être complétées par les recommandations des sociétés savantes telles que la la Société française de microbiologie (SFM) qui propose un référentiel spécifique de la microbiologie appelé QUAMIC (QUAMIC, 2016).

L'accréditation des algorithmes diagnostiques présente plusieurs difficultés. Le SH GTA 04 fournit les grands principes des conditions à remplir pour établir un dossier de validation/vérification de méthode, sans évoquer les particularités adaptées aux tests EIA ou aux TAAN. La validation de méthode des EIA et des TAAN mentionnées dans le QUAMIC (QUAMIC, 2016) ne sont traitées qu'au sein de l'examen microbiologique des selles (chapitre 10), sans évocation des particularités liées aux tests EIA et TAAN. La validation de méthode des TAAN peut être traitée au sein de la PCR en temps réel bactérienne (chapitre 8) bien que les méthodes ne soient pas similaires et nécessitent un ajustement des données collectées. La deuxième difficulté consiste en l'absence de publications, posters ou communications traitant de la validation de méthode de l'algorithme diagnostique proposé par Meridian Bioscience.

#### 4.8 Sensibilité aux antibiotiques

La réalisation de l'antibiogramme de *C. difficile* n'a pas d'intérêt en routine, car les souches sont habituellement sensibles aux antibiotiques utilisés en thérapeutique (métronidazole, vancomycine

ou fidaxomicine). Environ 3% des souches présentent une sensibilité intermédiaire au métronidazole mais aucun échec clinique n'a pu être relié à ces souches d'après Barbut et al (Barbut et al., 2018b). A titre d'exemple, l'ensemble des souches de *C. difficile* toxinogènes envoyées au CNR sont testées vis à vis du métronidazole. Aucune des 392 souches testées sur l'année 2012 n'était résistante (pour un disque chargé à 5 µg, diamètre inférieur à 21mm ou CMI pour concentration minimale inhibitrice >2 mg/L). Sur l'année 2013, 492 souches ont été testées et deux d'entre-elles présentaient une CMI à 3 et 4 mg/L ; 19 souches présentaient un diamètre d'inhibition inférieur à 35 mm avec disque de métronidazole chargé à 16 µg (sensibilité lorsque diamètre supérieur à 35 mm). Enfin, sur l'année 2014, 452 souches étaient testées vis à vis du métronidazole, deux d'entre-elles présentaient une CMI à 3 mg/L et neuf présentaient un diamètre d'inhibition inférieur à 35 mm avec disque chargé à 16 µg (Centre National de Référence Bactéries anaérobies et botulisme and Laboratoires associés *C. difficile*, 2013, 2014, 2015). Il est précisé que les recommandations actuelles du comité de l'antibiogramme de la SFM (CASFM, 2019) établissent une concentration critique de *C. difficile* vis à vis du métronidazole de 4 mg/L, et un diamètre critique à 21 mm pour une charge de 16 µg de métronidazole par disque. L'absence de données épidémiologiques récentes émanant du CNR ne permet pas de présenter les dernières tendances observées en matière de résistance vis à vis du métronidazole.

L'antibiogramme, en tant que marqueur phénotypique, peut avoir un intérêt dans le cadre d'études épidémiologiques ponctuelles. Par exemple, les souches épidémiques PR 027 sont caractérisées par une résistance à l'érythromycine et à la moxifloxacine (Loo et al., 2005; McDonald et al., 2005) documentées respectivement par la présence de mutations de l'ARN 23S (Schmidt et al., 2007) et de l'ADN gyrase (Spigaglia et al., 2008). Une résistance hétérogène au métronidazole a également été décrite chez ces souches (Gao and Huang, 2015; Peláez et al., 2008). Les souches PR 078 présentent quant à elles une moindre sensibilité à la tétracycline (Barbut et al., 2018b), par la présence de mutations de l'ARN 16S et par mécanisme d'efflux (Huang et al., 2009).

## 5 Traitement des ICD

L'ensemble des traitements médicamenteux traités dans ce paragraphe est résumé en figure 22.

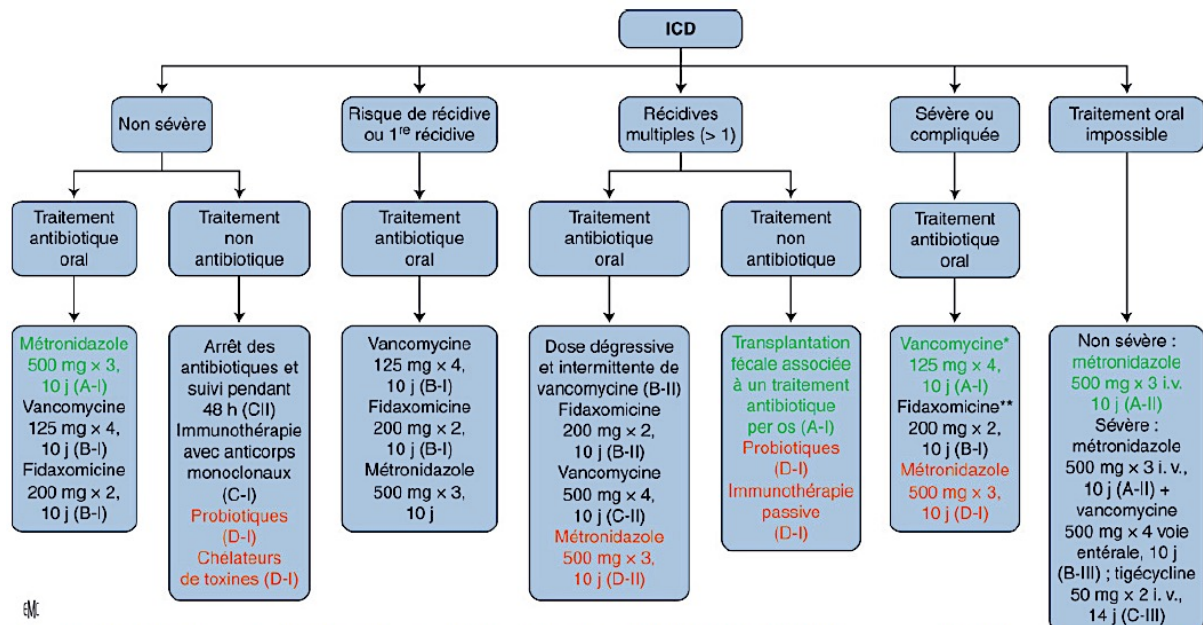


Figure 22 : Synthèse des recommandations thérapeutiques de l'ESCMID (Debast et al., 2014) d'après (Eckert et al., 2015b)

En Vert : recommandé (A-I)

En Rouge : non recommandé (D-I ou D-II)

\* : augmentation possible de l'augmentation des posologies de vancomycine à 500mgx4 pendant 10j (B-III), recommandée par l'IDSA (McDonald et al., 2018)

\*\* : Pas de preuve supportant l'utilisation de la fidaxomicine dans les formes d'ICD menaçant le pronostic vital (D-III)

## 5.1 Traitements médicamenteux recommandés

Le but d'un traitement curatif bien conduit dans le cadre d'ICD est, comme pour tout traitement, la guérison du patient. Les critères de guérison sont exclusivement cliniques, définis par un début de régression des symptômes (amélioration de la consistance des selles, absence d'apparition de signes de gravité) après le début du traitement antibiotique en 3 à 5 jours maximum, et un retour à l'état normal du transit en quelques semaines (Debast et al., 2014). Le traitement et la guérison d'une ICD reposent en grande partie sur la restauration du microbiote intestinal. Dans 25% des cas, le traitement symptomatique du patient (réhydratation) et l'arrêt du traitement antibiotique, ou son remplacement par un antibiotique à moindre risque, suffisent pour obtenir une amélioration clinique (Eckert et al., 2015a).

Les antibiotiques indiqués pour l'éradication de *C. difficile* sont le métronidazole, la vancomycine et la fidaxomicine. Ils sont tous trois administrables par voie orale (*Per os* : PO), bien que le conditionnement de la vancomycine soit prévu pour l'administration intraveineuse (IV). Le métronidazole est également disponible pour l'administration IV. La vancomycine et la fidaxomicine ne sont délivrés qu'en milieu hospitalier.

Les schémas thérapeutiques sont définis d'après les critères de sévérité, le niveau de récurrence de la maladie et la possibilité d'administration orale. Ils font l'objet de recommandations européennes (Debast et al., 2014) mais aussi américaines (McDonald et al., 2018). Les recommandations françaises du CMIT (Comité des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016) reprennent les recommandations européennes de l'ESCMID.

### 5.1.1 Cas non sévère

Dans le cadre de situation non-épidémique et face à une ICD ne présentant pas de critères de sévérité, il est recommandé d'arrêter toute antibiothérapie ayant potentiellement induit l'ICD et d'observer l'évolution clinique à 48 h. Dans le cas d'une détérioration clinique malgré l'arrêt de l'antibiothérapie, une antibiothérapie dirigée contre *C. difficile* doit être débutée par du métronidazole 500mg x 3/jour PO pendant 10j. La vancomycine (125mg x 4/jour PO, 10j) et la fidaxomicine (200mg x 2/jour PO, 10j) peuvent être utilisés en seconde intention. La stratégie thérapeutique est similaire chez l'enfant en adaptant les posologies et la femme enceinte : l'allaitement maternel est déconseillé lors de la prise de métronidazole.

Lorsque l'administration orale n'est pas possible, le métronidazole peut également être administré par voie IV (500mg x 3/jour IV, 10j).

Il n'y a pas de traitement recommandé en association de l'antibiothérapie dans le traitement des épisodes initiaux d'ICD sans signes de gravité. Les immunothérapies à base d'anticorps monoclonaux dirigés contre les toxines A et B (Lowy et al., 2010) et l'immunisation passive à base d'immunoglobulines IV fabriquées à partir de lait de vaches immunisées contre *C. difficile* et ses toxines (Numan et al., 2007) n'ont pas montré de niveau de preuve suffisant concernant leur efficacité (Crobach et al., 2009; Debast et al., 2014). Concernant les probiotiques, leur efficacité ne serait pas prouvée non plus au cours du traitement d'un premier épisode d'ICD (McFarland, 2009) et ne sont donc pas recommandés (Debast et al., 2014; McDonald et al., 2018).

### 5.1.2 Cas sévère

Il est recommandé en première intention de traiter un cas d'ICD sévère par vancomycine (125mg x 4/j PO pendant 10 jours) du fait de son efficacité supérieure au métronidazole (Al-Nassir et al., 2008; Debast et al., 2014; Zar et al., 2007). Le traitement par fidaxomicine (200mg x 2/j PO pendant 10 jours) peut aussi être indiqué en première intention. Son efficacité est équivalente à celle de la vancomycine sur un épisode sévère (Gentry et al., 2019). De plus, le traitement par fidaxomicine lors d'un premier épisode d'ICD diminue la survenue de récurrences (Al Momani et al., 2018). La fidaxomicine n'est pas indiquée chez les enfants et les femmes enceintes, et l'allaitement est déconseillé.

Les recommandations américaines préconisent une augmentation de la posologie de vancomycine à 500mg x 4/j PO pendant 10 jours (McDonald et al., 2018), mais il n'est pas prouvé que

ce dosage soit d'une efficacité supérieure en comparaison des 125mg x 4/j PO sur 10 jours à l'exception de la présence d'iléus (Fekety et al., 1989).

La voie veineuse ne doit être employée que si la voie orale est impossible. Pour les formes compliquées (iléus, mégacôlon toxique, choc) les recommandations américaines préconisent l'administration de métronidazole IV (500mg/8h), ainsi que de vancomycine par sonde naso-gastrique (500mg x 4/j) et/ou par lavements rectaux (500mg dans 100mL de solution saline toutes les 6h) (McDonald et al., 2018).

La réalisation d'une colectomie sans délai à partir de l'apparition de signes de gravité tels qu'un état de choc, une hyperlactatémie (>5mM), une défaillance d'organe dont la défaillance rénale, et la nécessité d'intubation/ventilation (Debast et al., 2014) est associée à un meilleur taux de survie (Koss et al., 2006; Stewart et al., 2013). Elle est de ce fait indiquée et recommandée en cas de perforation colique, d'inflammation systémique, de détérioration des signes cliniques malgré un traitement antibiotique optimal et bien conduit avec l'apparition de mégacôlon toxique, d'abdomen chirurgical et d'iléus sévère. La colectomie doit être envisagée et réalisée si possible avant l'apparition d'une lactatémie > 5mM (Debast et al., 2014). L'intervention chirurgicale consiste classiquement en une colectomie subtotale suivie d'une iléostomie (Koss et al., 2006). Une autre alternative à la colectomie est une iléostomie de décharge permettant de préserver le colon, associée à des lavages peropératoires, dont l'avantage est de diminuer le risque de morbidité en plus du risque de mortalité. Cette procédure est couplée à une administration IV de métronidazole (500mg x 3/jour IV, 10 jours) et à des lavages entéraux de vancomycine post-opératoires (500mg x 4/j voie entérale, 10 jours) (Neal et al., 2011).

### 5.1.3 Première récurrence ou risque de récurrence

Les recommandations européennes préconisent donc un traitement par fidaxomicine (200mg x 2/j PO pendant 10 jours) ou vancomycine (125mg x 4/j PO pendant 10 jours) en cas de première récurrence ou de premier épisode d'ICD avec facteurs de risques de récurrence (Debast et al., 2014). D'après les recommandations américaines, le métronidazole n'est pas préconisé dans le cadre de récurrence d'ICD (McDonald et al., 2018).

### 5.1.4 ICD récurrentes et multiples

Les recommandations européennes et américaines préconisent, un cas de deuxième récurrence ou plus, un traitement par vancomycine à dose dégressive (125mg x 4/j PO pendant 10 jours puis diminution progressive jusqu'à 125mg/j PO pour une durée totale de 21 jours minimum) ou intermittente (125mg x 4/j PO pendant 10 jours puis 125 à 500mg tous les 2 ou 3 jours pour une durée totale de 21 jours minimum) (Debast et al., 2014; McDonald et al., 2018).

L'utilisation de la fidaxomicine est également préconisée (200mg x 2/j PO pendant 10 jours), puisqu'elle est associée à un taux plus faible de deuxième récurrence lorsqu'elle est utilisée en traitement de la première (Beinortas et al., 2018; Cornely et al., 2012; Louie et al., 2012). Cependant,

l'efficacité de la fidaxomicine sur la survenue de récurrences multiples après une première récurrence n'est à l'heure actuelle pas établie (Biggs et al., 2019; Enoch et al., 2018).

La transplantation de microbiote fécale (TMF) est fortement recommandée en cas de récurrences multiples et d'échec de traitements antibiotiques bien conduits, en parallèle d'une antibiothérapie orale par vancomycine (500mg x 4/j PO) (Debast et al., 2014; McDonald et al., 2018). Pour le moment en France, la transplantation fécale est encadrée par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé, 2016). Les selles de donneur étant considérées comme des médicaments potentiels, elles doivent être préparées au sein des pharmacies des ES. La sélection des donneurs est standardisée et rigoureuse, répondant aux exigences de l'ANSM, avec questionnaire et entretien médical, suivis du dépistage d'infections potentielles dans le sang et les selles. Sa formulation et sa standardisation est actuellement en cours de développement en Europe.

## 5.2 Alternatives thérapeutiques

### 5.2.1 Vaccination

Le rôle des anticorps neutralisant les toxines de *C. difficile* a largement été démontré sur les modèles animaux en prouvant leur efficacité par diminution de la mortalité chez les hamsters et les souris (Anosova et al., 2013; Baliban et al., 2014).

La mise au point d'un vaccin contre *C. difficile* est à l'étude chez l'homme. La société Sanofi Pasteur a mis prématurément fin à l'étude de phase III portant sur un vaccin anatoxinique baptisé Cdiffense (Communication Sanofi, 2017). Une autre étude de phase III est en cours par la société Pfizer, sur un vaccin recombinant baptisé Clover (<https://clinicaltrials.gov/>). Ce vaccin pourrait, si son efficacité est démontrée, être utilisé en prévention de l'apparition d'ICD dans les populations à risques.

### 5.2.2 Biothérapies

Des biothérapies ont prouvé leur efficacité dans la diminution des récurrences après un épisode d'ICD : l'actoxumab et le bezlotoxumab sont des anticorps monoclonaux respectivement dirigés contre les toxines A et B de *C. difficile*, et leur utilisation en association d'un traitement antibiotique adapté permet de diminuer significativement l'incidence des récurrences. A noter que l'association des deux anticorps monoclonaux n'a pas montré d'efficacité supérieure à l'utilisation du bezlotoxumab seul, dirigé contre la toxine B (Wilcox et al., 2017). Des études complémentaires sont nécessaires afin de valider ou non leur utilisation en pratique.

### 5.2.3 Antibiotiques

#### 5.2.3.1 Ridinilazole

Membre de la famille des azolés, le ridinilazole est un antibiotique bactéricide en cours d'étude. Il constituerait une option intéressante dans le traitement des ICD. Son spectre étroit

permettrait de cibler presque exclusivement *C. difficile*. Une étude a permis de prouver sa non-infériorité vis à vis de la vancomycine (Vickers et al., 2017), et il a été démontré que son utilisation était moins délétère que la vancomycine sur le microbiote fécal (Thorpe et al., 2018). Des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'utilité potentielle de la prescription du ridinilazole en pratique clinique.

### 5.2.3.2 Teicoplanine

De la même famille que la vancomycine, la teicoplanine pourrait être une alternative intéressante dans le traitement des ICD. Une étude de Manthey et al retrouvait un taux de guérison clinique significativement plus élevé (90,7% contre 79,4%) et un taux de récurrence significativement plus faible (9,3% contre 34,3%) en comparaison avec la vancomycine (Manthey et al., 2017). Un plus grand nombre d'études est nécessaire pour statuer sur l'utilité de la teicoplanine dans le traitement des ICD sur plus long terme.

## 5.3 Mesures associées et prévention

### 5.3.1 Gestion des antibiotiques

Le bon usage des antibiotiques est primordial pour limiter la pression sélective sur *C. difficile* et l'émergence d'épidémies. Des politiques de bon usage de ces derniers, en minimisant la fréquence et la prescription des antibiotiques à haut risque d'engendrer une ICD, et la suspension dès que possible de toute antibiothérapie non dirigée contre *C. difficile* chez les patients atteints, sont essentielles pour la prévention des ICD (McDonald et al., 2018; Vonberg et al., 2008).

Les souches circulantes de *C. difficile* doivent être prises en compte dans le choix des antibiotiques prescrits pour d'autres pathologies infectieuses, et le choix des molécules à risque (exemple : fluoroquinolones vis à vis du PR 027 qui leur est résistant) à limiter au maximum, en appliquant une politique de substitution d'une classe d'antibiotiques par une autre, moins à risque (Ananthakrishnan, 2011; McDonald et al., 2018).

### 5.3.2 Gestion des patients et de l'environnement

La recherche d'ICD est préconisée chez tout patient hospitalisé présentant une diarrhée en vue d'un diagnostic précoce et d'une prévention de la transmission croisée de *C. difficile*, et les précautions de contact doivent être prises dès la suspicion clinique, sans attendre les résultats microbiologiques (Cohen et al., 2010). Il n'est en revanche pas conseillé de dépister et de prendre des précautions de contact avec les porteurs asymptomatiques (McDonald et al., 2018).

Le patient atteint d'ICD doit être isolé en chambre seule avec toilettes individuelles et du personnel dédié, l'isolement doit être maintenu jusqu'à 48 h après la fin des symptômes (diarrhées). Les patients doivent être informés de la contagiosité et du pouvoir de dissémination de la bactérie en cause dans leur maladie, et une éducation du personnel de soins et d'entretien doit être réalisée (Gerding et al., 2008; McDonald et al., 2018; Vonberg et al., 2008).

Le port de gants et de surblouses doit être effectué par le personnel soignant et les visiteurs, et un lavage des mains à l'eau et au savon (du fait de l'inefficacité des solutions hydro-alcooliques) doit être faite avant et après l'entrée dans chaque chambre d'hospitalisation (Cohen et al., 2010; Gerding et al., 2008; Vonberg et al., 2008).

Le matériel médical nécessaire à la prise en charge du patient infecté doit être dédié, ou à défaut désinfecté avec un produit sporicide avant et après chaque utilisation (McDonald et al., 2018; Vonberg et al., 2008). Les surfaces doivent être désinfectées avec des produits sporicides, et les chambres ayant accueilli un patient infecté doivent être désinfectées après chaque séjour, voire quotidiennement en contexte d'épidémie (Cohen et al., 2010; Gerding et al., 2008; McDonald et al., 2018).



**CHAPITRE 1 : VALIDATION DU TEST ALETHIA™ *C. DIFFICILE* SUR  
COLONIES DE *CLOSTRIDIODES DIFFICILE* ISOLEES EN CULTURE**

## Contexte

Les tests d'amplification d'acides nucléiques (TAAN) sont maintenant largement utilisés dans les laboratoires de microbiologie pour le diagnostic des infections à *C. difficile*. Leur utilisation est facile et la rapidité d'obtention du résultat est compatible avec une prise en charge clinique efficace. Ils sont intégrés dans les algorithmes en deux ou trois temps comme recommandé actuellement par les sociétés savantes françaises et européennes.

Le test Alethia™ *C. difficile* (Meridian Bioscience) est un TAAN fondé sur le principe d'amplification isothermique très sensible appelé LAMP pour *Loop mediated isothermal amplification*. Il a été mis en place en 2014 au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Ce TAAN est utilisé en seconde étape d'un algorithme en deux temps composé d'un test de dépistage initial par ImmunoCard® *C. difficile* GDH par méthode immuno-enzymatique (EIA).

Après la mise en place de la technique, le laboratoire a été confronté à des tests invalides en TAAN ne permettant pas de fournir de résultat. Ceci peut être lié à une préparation de l'échantillon incorrecte, un réactif non opérant, une erreur de l'incubateur/lecteur ou l'échec du contrôle interne. Selon les recommandations du fournisseur, il faut alors répéter l'entièreté du test en utilisant les selles originelles et en respectant scrupuleusement le mode opératoire. Le laboratoire a observé des patients pour lesquels les tests TAAN de contrôle étaient également invalides suggérant la présence d'inhibiteurs d'amplification. Bien que cela représente moins de 1% du nombre de tests réalisés, il a fallu trouver une alternative diagnostique chez ces patients pour lesquels le TAAN ne peut être interprété.

La culture toxigénique est la méthode de référence pour mettre en évidence les souches de *C. difficile* toxigènes. Celle-ci permet de s'affranchir des inhibiteurs d'amplification présents dans l'échantillon de selle. Cette méthode consiste à isoler *C. difficile* en culture à partir de milieux sélectifs, puis de déterminer le caractère toxigène des colonies isolées. Les méthodes de mise en évidence des toxines disponibles à partir des colonies sont : le test de cytotoxicité sur culture cellulaire (longs et difficiles à mettre en place), les tests EIA détectant les toxines libres A et B (ne sont plus utilisés au laboratoire) et les TAAN.

Le test Alethia™ *C. difficile* n'est pas validé par le fournisseur pour la recherche des gènes codant pour les toxines à partir de colonies de *C. difficile* isolées en culture. Nous avons donc décidé de valider cette technique sur les colonies en respectant les recommandations du guide technique d'accréditation de validation (portée B) des méthodes de biologie médicale, le SH GTA 04 (COFRAC, 2015). Nous avons ainsi pu proposer de compléter l'algorithme Meridian mis en place au laboratoire en cas de test Alethia™ *C. difficile* invalide.

## 1. Introduction

*C. difficile* est actuellement à l'origine de la majorité des diarrhées infectieuses associées aux soins chez l'adulte en Europe (Magill et al., 2014), et les infections communautaires qui lui sont incombées suivent une incidence croissante (Chitnis et al., 2013; Khanna et al., 2012). La survenue d'épidémies liées à des clones « hypervirulents » de ribotypes 027 ou 078 ainsi que la sévérité des tableaux cliniques causés par ces derniers (Goorhuis et al., 2008; Kuijper et al., 2007) ont contribué à en faire un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés.

Une infection à *C. difficile* (ICD) est définie par un tableau clinique compatible avec celui d'une ICD (diarrhée, iléus, mégacôlon toxique) et un test bactériologique positif pour la présence de toxines libres de *C. difficile* dans les selles ou la mise en évidence d'une souche toxino-gène, sans autre cause de diarrhées (Cohen et al., 2010; Debast et al., 2014). Les stratégies diagnostiques diffèrent selon les pays. Des algorithmes diagnostiques sont préconisés par les sociétés savantes telles que la Société Française de Microbiologie (Barbut et al., 2018) ou la Société Européenne de Microbiologie Clinique et de Maladies Infectieuses (Crobach et al., 2016). Elles préconisent toutes deux la réalisation d'algorithmes en deux ou trois étapes, avec la réalisation de TAAN afin de mettre en évidence les gènes codant pour les toxines complétée par la recherche de toxines libres, ou bien la réalisation de TAAN faisant suite à la détection de GDH et des toxines libres par tests EIA. De plus en plus de laboratoires optent pour ces algorithmes significativement plus sensibles que les tests immuno-enzymatiques seuls (Goret et al., 2015; Novak-Weekley et al., 2010).

La société Meridian (Meridian Bioscience™, Cincinnati, Etats-Unis) propose un test de détection ImmunoCard® *C. difficile* GDH-EIA et un test de détection des acides nucléiques Alethia™ *C. difficile* ayant pour cible l'îlot de pathogénicité *PaLoc* portant les gènes codant pour les toxines A et B. Il s'agit de deux méthodes qualitatives. Meridian fournit donc un algorithme en deux temps « prêt à l'emploi » utilisable sur les selles des patients suspectés d'ICD. C'est la seule société proposant actuellement à la fois un test de dépistage et un test de confirmation pour le diagnostic d'ICD. Cette technique a été choisie et mise en place au laboratoire du CHU de Bordeaux en 2014. Alethia™ *C. difficile* est fondé sur le principe d'amplification isothermique très sensible appelé LAMP pour *Loop mediated isothermal amplification*. Elle utilise des amorces spécifiques qui amplifient une région de 204 pb parmi la séquence conservée en 5' du gène *tcdA*. La technique LAMP utilise une ADN polymérase et un ensemble de quatre amorces spécialement conçues pour reconnaître un total de six séquences distinctes sur l'ADN cible. Un produit secondaire, le pyrophosphate de magnésium, apparaît lors de cette amplification en boucle. Il forme un précipité blanc entraînant un trouble de la solution de réaction qui est lu par spectrophotométrie. Cette réaction est évaluée par rapport à un blanc initial et un contrôle interne. Chaque dispositif contient un puits de contrôle interne qui permet de déceler un problème d'inhibition de l'amplification, d'efficacité des réactifs du test ou de traitement des échantillons. En effet, le système de préparation et de dilution de l'échantillon contient une souche de *Staphylococcus aureus* traité à la formaline dont un gène cible est amplifié lors de la réaction.

Bien que cette technique soit robuste (Buchan et al., 2012; Hong et al., 2014; Lalande et al., 2011; Neuendorf et al., 2016; Norén et al., 2011, 2014; Viala et al., 2012; Ylisiurua et al., 2013), les

TAAN peuvent être invalides en raison de la présence d'inhibiteurs ou de substances interférentes qu'il n'est pas possible d'identifier en pratique courante. Selon les données du fournisseur, jusqu'à 2,9% des tests peuvent donner un résultat invalide (Meridian, Fiche technique Alethia® *C. difficile*). Il n'a pas été retrouvé de données concernant le pourcentage de résultats invalides dans la littérature. L'algorithme et le diagnostic microbiologique ne peuvent être assurés dans ce cas. Une stratégie alternative pour pallier à ce problème pourrait reposer sur la mise en culture de la selle afin de tester le caractère toxigène des souches isolées par TAAN. Bien que longue, la culture est très sensible. Alethia™ *C. difficile* n'est pas validé par le fournisseur pour mettre en évidence le caractère toxigène de colonies de *C. difficile* isolées. Deux publications démontrent l'utilisation de Alethia™ *C. difficile* pour la culture toxigénique, mais la validation de la méthode est incomplète (Couturier et al., 2013; Hong et al., 2014). Afin de répondre à cette problématique nous avons adapté et validé la réalisation du test Alethia™ *C. difficile* à partir de suspensions de colonies de *C. difficile* obtenues par culture en respectant les recommandations du guide technique d'accréditation de validation (portée B) des méthodes de biologie médicale (SH GT 04) éditées par le Comité français d'accréditation (COFRAC). Nous avons ainsi pu développer une alternative aux tests invalides et compléter l'algorithme utilisé au laboratoire dans ce cas.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Souches de *C. difficile*

Les deux souches de *C. difficile* de référence CD 630 (souche de PR 012 isolée en Suisse en 1982) (Stabler et al., 2009; Wust, 1982) et F (souche PR 017) (Depitre et al., 1993) ont été fournies par le Laboratoire *C. difficile* associé au Centre national de référence des Bactéries anaérobies et botulisme (Pr F. Barbut et Dr C. Eckert, Hôpital Saint Antoine, Paris, France). La souche de référence 630 sécrète les deux toxines A et B (A+B+) et la souche F sécrète uniquement la toxine B (A-B+).

En routine, les souches isolées de patients atteints d'ICD sévères selon les critères de l'ESCMID (Crobach et al., 2016) (colite sévère, état de choc secondaire aux toxines, nécessité d'admission en soins intensifs, colectomie, signes biologiques ou décès imputable à l'ICD) étaient envoyées au laboratoire expert de Bactériologie-Hygiène du CHU de Toulouse associé au CNR (Dr L. Cavalié) pour typage. Un duplicata de ces souches conservé au laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux à -80°C a été utilisé rétrospectivement. Une extraction de données à partir du système informatique du laboratoire a permis de référencer 32 patients atteints d'ICD pour lesquels les souches ont été conservées entre octobre 2014 et novembre 2015. Ces souches cliniques sont caractérisées par PCR ribotypage. La présence des gènes *tcdA* (fragment A3), *tcdB* (fragment B1), *tcdC* (taille délétion) et *cdtB* (toxine binaire) était également analysée par ce laboratoire par une PCR « maison ».

### 2.2. Culture

Les souches ont été mises en culture sur gélose sélective CLO<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy l'étoile, France), en étuve anaérobie à 35°C durant 48 à 72 h. Les colonies de *C. difficile* ont été identifiées grâce à leur aspect caractéristique : colonies plates, circulaires à bord irrégulier (aspect en verre brisé), grises, mates et opaques, ainsi qu'à leur odeur de crésol ou de « crottin de cheval ». Une confirmation de l'identification a été réalisée par coloration de Gram et Maldi-Tof Microflex (Bruker, Billerica, États-Unis). Un réisolement des colonies isolées pures a été effectué sur gélose au sang de mouton COS<sup>®</sup> non sélective (bioMérieux), placées en étuve anaérobie à 35°C durant 48 à 72 h.

### 2.3. Test Alethia<sup>™</sup> *C. difficile*

Cinquante microlitres d'une suspension de colonies de *C. difficile* dans de l'eau physiologique stérile aux différentes concentrations testées étaient ajoutés au tube de préparation, à la place de l'échantillon primaire de selle décrit dans le mode opératoire du test Alethia<sup>™</sup> *C. difficile*. Le prétraitement thermique et la réalisation du test suivaient les recommandations du fournisseur.

#### 2.4. Etendue de mesure : limite de détection

La limite de détection a été déterminée à partir d'une gamme de dilutions d'une suspension de colonies de *C. difficile* dans de l'eau physiologique stérile à partir des souches de référence F et CD 630. La suspension initiale avait une concentration de  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL correspondant à une densité optique de 0,5 McF mesurée à l'aide d'un densitomètre (bioMérieux). Des dilutions de raison 10 ont été réalisées en cascade jusqu'à la concentration de  $1,5 \cdot 10^3$  UFC/mL. Puis elles ont été poursuivies avec un facteur de dilution égal à deux jusqu'à la concentration de  $4,7 \cdot 10^2$  UFC/mL.

#### 2.5. Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire

L'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. Il a été effectué à partir des deux souches de référence dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage sur une demi-journée. Il a été choisi d'établir cinq mesures pour chacune des souches, du fait de considérations économiques (prix du test unitaire élevé), pratique (dix tests par série sur le lecteur Alethia) et des recommandations du SH GTA 04 (racine carré du nombre d'échantillons analysés quotidiennement). Un témoin négatif a été réalisé.

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs. La reproductibilité a été évaluée grâce à l'étude de la variabilité inter-opérateur sur la souche de référence F. L'étude a été réalisée dans les conditions suivantes : quinze opérateurs, mêmes instrument et lot de réactifs, sur trois demi-journées en l'espace de dix jours. Le nombre d'opérateurs, et donc de tests réalisés, a été choisi en rapport avec l'effectif d'équipe technique pouvant être rencontré dans le laboratoire, quelle que soit l'importance de l'activité.

Les tests pour la répétabilité et la reproductibilité ont été effectués à partir de suspensions de *C. difficile* à 0,5 McF (équivalent à  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL). L'évaluation de la conformité des résultats a été réalisée par calcul du nombre de test positif obtenu rapporté au nombre de test positif attendu.

#### 2.6. Contamination

Le risque de contamination inter-réactif n'a pas été évalué puisque les dispositifs des tests sont unitaires. Le risque de contamination inter-échantillons a été évalué lors de l'étude de la limite de détection (*cf. supra*).

#### 2.7. Robustesse

La robustesse d'une procédure d'analyse est une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse a

été étudiée sur les deux souches de référence en faisant varier l'âge des colonies (2, 3 ou 5 jours de culture en étuve anaérobie à 35°C), les températures de conservation des géloses après culture (+4°C, +20-25°C, +35°C) et les conditions atmosphériques de conservation (anaérobiose ou aérobiose) des cultures. Les essais étaient réalisés en triple sur les deux souches pour chacun des paramètres étudiés. La suspension à 0,5 McF était utilisée. Les essais ont été réalisés par le même opérateur, sur plusieurs jours. Ces variations des paramètres ont été étudiées afin de mettre en pratique les variations pouvant être observées dans n'importe quel laboratoire de bactériologie (exemple : défaut de l'enceinte anaérobie, culture non repiquée, culture laissée sur la paillasse de lecture avant réalisation du test, etc...). L'évaluation de la conformité des résultats a été réalisée par calcul du nombre de test positif obtenu rapporté au nombre de test positif attendu.

La stabilité des réactifs n'a pas été évaluée puisque les conditions d'utilisation et de conservation de ces derniers ne différaient pas des recommandations du fournisseur.

## **2.8. Sensibilité analytique**

La sensibilité du test a été évaluée grâce aux souches cliniques provenant de vingt-deux patients atteints d'ICD sévère et caractérisées par PCR ribotypage. Les essais ont été effectués par le même opérateur, le même jour, au cours de différentes séries, à partir de suspensions des colonies à 0,5 McF. L'évaluation de la conformité des résultats a été réalisée par comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes.

### 3. Résultats

Nous avons commencé par établir la limite de détection de la méthode. Les résultats observés aux fortes concentrations validaient le principe de la méthode sur les colonies avec l'obtention de résultats positifs attendus (détection des gènes des toxines sur les colonies). Lors de la première série de dilution de série 10, la dernière dilution positive pour les deux souches de référence était de  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/mL (Tableau 1, en blanc). Nous avons donc décidé de réaliser des dilutions intermédiaires (Tableau 1, en gris). La limite de détection a été déterminée comme étant la concentration la plus basse pour laquelle les résultats positifs concordants étaient obtenus pour les deux souches de référence. Celle-ci est inchangée et est égale à  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/mL.

**Tableau 1 : Limite de détection du test Alethia™ C. difficile à partir de suspensions de colonies.**

Concentrations en UFC/ml	Turbidimétrie en McF	Résultat qualitatif	
		Souche F	Souche CD 630
$1,5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^{-1}$	Positif	Positif
$1,5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^{-2}$	Positif	Positif
$1,5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^{-3}$	Positif	Positif
$1,5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^{-4}$	Positif	Positif
$1,5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-5}$	Positif	Positif
$1,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^{-6}$	Négatif	Négatif
$7,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	Négatif	Négatif
$3,75 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	Positif	Négatif
$9,4 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^{-7}$	Positif	Négatif
$4,7 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	Négatif	Positif

Dans le cadre de la validation de la méthode, nous avons décidé de nous placer à une concentration de 0,5 McF dans de l'eau physiologique stérile (équivalent à  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL). La répétabilité et la reproductibilité (variabilité inter-opérateur) ont été réalisées avec cette dilution (Tableau 2 et 3, respectivement). Les résultats obtenus ont montré une conformité de 100%.

**Tableau 2 : Etude de la répétabilité du test Alethia™ C. difficile sur colonies**

Opérateur	Résultat du test	
	Souche F	Souche CD 630
Opérateur 1	Positif	Positif
Opérateur 1	Positif	Positif
Opérateur 1	Positif	Positif
Opérateur 1	Positif	Positif
Opérateur 1	Positif	Positif
<b>Concordance</b>	100%	100%



**Tableau 3 : Reproductibilité et variabilité inter-opérateur du test Alethia™ C. difficile sur colonies à partir de la souche de référence F.**

Opérateur	Résultat du test
Opérateur 1	Positif
Opérateur 2	Positif
Opérateur 3	Positif
Opérateur 4	Positif
Opérateur 5	Positif
Opérateur 6	Positif
Opérateur 7	Positif
Opérateur 8	Positif
Opérateur 9	Positif
Opérateur 10	Positif
Opérateur 11	Positif
Opérateur 12	Positif
Opérateur 13	Positif
Opérateur 14	Positif
Opérateur 15	Positif
<b>Concordance</b>	<b>100%</b>

Lors de l'analyse de la robustesse de la méthode, les paramètres analysés correspondent à ceux observés en routine au laboratoire. Les tests ont tous montré des résultats positifs. Le délai de culture en anaérobiose à +35°C (âge des colonies), la conservation des géloses en aérobie (après culture en anaérobiose) et la conservation des géloses en aérobie à température ambiante (TA) n'impactent pas la méthode.

**Tableau 4 : Etude de la robustesse du test Alethia™ C. difficile sur colonies.** Les tests ont été réalisés en triplicata. TA : température ambiante.

Paramètre de variation		Souche	
		F	CD 630
Délai de culture	48h	+/+/+	+/+/+
	72h	+/+/+	+/+/+
	5j	+/+/+	+/+/+
Conservation en aérobie 24h	+4°C	+/+/+	+/+/+
	TA	+/+/+	+/+/+
	+35°C	+/+/+	+/+/+
Conservation à TA	1h	+/+/+	+/+/+
	4h	+/+/+	+/+/+
	24h	+/+/+	+/+/+

Nous avons appliqué la méthode à des souches cliniques. Sur les 32 souches cliniques conservées au laboratoire, 30 ont été réisolées en culture. Six d'entre-elles ont été écartées suite à l'absence de détermination du ribotypage et de conclusion sur les gènes codant pour les toxines. Les souches en double issues d'un même patient ont été exclues. Au final, 22 souches cliniques distinctes ont été analysées en culture toxigénique avec le test Alethia™ *C. difficile*. Les résultats obtenus ont montré une concordance de 100% avec les résultats attendus. L'ensemble des résultats sont présentés dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Caractéristiques, PCR ribotype et résultats du test Alethia™ *C. difficile* pour les souches cliniques de *C. difficile*.**

Patient	PCR ribotype	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdC</i>	<i>cdtB</i>	Résultat TAAN Alethia™
Patient 1	106	Positif	Positif	18pb	Pseudogènes	Positif
Patient 2	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 3	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 4	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 5	autre	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 6	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 7	001	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 8	078/126	Positif	Positif	39pb	Présence	Positif
Patient 9	002	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 10	015	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 11	autre	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 12	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 13	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 14	autre	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 15	078/126	Positif	Positif	39pb	Présence	Positif
Patient 16	autre	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 17	autre	Positif	Positif	Absence	Absence	Positif
Patient 18	012	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 19	014/020/077	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 20	015	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 21	002	Positif	Positif	Absence	Pseudogènes	Positif
Patient 22	078/126	Positif	Positif	39pb	Présence	Positif
<b>Concordance</b>						100%

Aucun résultat invalide n'a été observé au cours de la réalisation des différentes étapes de validation.

## 4. Discussion

Nous avons validé le test Alethia™ *C. difficile* pour la recherche des gènes codant pour les toxines à partir de colonies de *C. difficile* isolées en culture. Nous avons respecté les recommandations du guide technique d'accréditation de validation des méthodes de biologie médicale (SH GT 04). Cette évaluation des performances nous permet ainsi de répondre aux exigences de l'accréditation selon le COFRAC. Nous pouvons ainsi proposer de compléter l'algorithme Meridian mis en place au laboratoire en cas de test Alethia™ *C. difficile* invalide. Celui-ci repose tout d'abord sur un test de détection ImmunoCard® *C. difficile* GDH-EIA puis sur le test de confirmation Alethia™ *C. difficile*. En cas de TAAN invalide, la répétition du test peut être effectuée mais si celui-ci s'avère à nouveau invalide, il faut alors réaliser la culture toxigénique en utilisant ce même TAAN. Si la culture toxigénique avec le test Alethia™ *C. difficile* est décrit par quelques auteurs, le complément d'algorithme que nous proposons n'est pas publié à ce jour dans la littérature. Il est facile à mettre en place au laboratoire et n'exige pas de matériel ou de technique supplémentaire. Sa seule contrainte repose sur l'allongement significatif du délai de rendu du résultat. En effet, alors que les résultats des algorithmes classiques de diagnostic des ICD fournissent une réponse le jour même (à J0), la culture nécessite 48 à 72h (J+2 à J+3). Le clinicien doit donc être alerté de cet allongement de délai et prendre les mesures nécessaires en cas de forte suspicion d'ICD.

L'étude de la limite de détection n'a pas permis de retrouver les seuils décrits par d'autres auteurs dans la littérature. En effet, Hong et al retrouvaient une limite de détection de 250 UFC/mL avec la souche de *C. difficile* ATCC 9688 (tcdA+, tcdB+, cdtB-) et de  $1,1 \cdot 10^4$  UFC/mL avec la souche ATCC 43598 (tcdA-, tcdB+, cdtB-) en utilisant le test Alethia™ *C. difficile*. Nos analyses ne nous permettent pas d'écarter des résultats faussement négatifs avec des concentrations de suspensions de colonies strictement inférieures à  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/mL. La différence observée par Hong et al entre les limites de détection de souches ayant les phénotypes toxines A+B+ et A-B+ n'a en revanche pas été observée dans notre étude, puisque nos deux souches de références (aussi A+B+ et A-B+) retrouvaient la même limite de détection. Il doit être précisé que l'absence de données concernant le volume de la suspension de colonies utilisée lors de chaque test dans l'étude de Hong et al ne nous permet qu'une comparaison relative avec nos résultats (Hong et al., 2014).

L'analyse de 22 souches provenant de patients a montré une excellente corrélation (100%) avec les résultats obtenus au centre expert considérés comme référence. Le choix de la dilution de 0,5 McF a été réalisé par souci de simplification lors de la manipulation technique et pour s'affranchir des risques liés aux faux négatifs. Cette dilution rejoint les consignes d'autres manipulations techniques rencontrées en laboratoire de bactériologie, telles que la réalisation des concentrations minimales inhibitrices et/ou d'antibiogrammes qui repose sur des suspensions bactériennes de 0,5 McF également.

Plusieurs éléments n'ont pas été abordés dans cette validation de méthode en raison du développement du test initial sur les selles et desquelles nous nous affranchissons dans notre méthode. En effet, la réalisation de la PCR sur suspension de colonies isolées pures en eau stérile permet de s'affranchir de l'analyse de la spécificité déjà réalisée par le fournisseur. Des données

indépendantes ont également été publiées dans la littérature. Il n'a pas été décrit de réactivité croisée du test Alethia™ *C. difficile* avec 40 souches distinctes de bactéries phylogénétiquement proches de *C. difficile*, dont trois souches de *C. sordellii* (Couturier et al., 2013; Hong et al., 2014). Les interférences n'ont pas été étudiées : le test possède un contrôle d'amplification interne permettant de valider chaque test. La contamination est déjà maîtrisée en routine par une formation du personnel, le nettoyage et la décontamination de la paillasse et la présence de patients testés négatifs. La stabilité des réactifs n'a pas été évaluée. Ils sont stables 18 mois à température ambiante et le laboratoire respecte les conditions fournisseurs (métrologie et gestion des stocks). L'exactitude de la méthode doit être contrôlée en continu. La participation à un programme d'EEQ pour des souches de *C. difficile* doit être étendue à la culture toxigénique que nous proposons.

Enfin, il ne faut pas oublier que le test Alethia™ *C. difficile* ne met en évidence que le caractère toxigène des souches de *C. difficile*, sans en évaluer l'excrétion des toxines libres. Il ne permet pas à lui seul, de différencier les porteurs asymptomatiques des patients réellement infectés. La culture toxigénique utilisant le TAAN présente les mêmes défauts. La culture provoque la germination de spores portées par le patient. Bien que l'utilisation de TAAN (quel qu'il soit) est préconisée aux Etats Unis sans recherche complémentaire (McDonald et al., 2018), elle est en France (Barbut et al., 2018) et en Europe (Crobach et al., 2016) préconisée au sein d'algorithmes proposant la détection conjointe des toxines libres A et B par tests immuno-enzymatiques. Le résultat de l'algorithme complété doit être corrélé à un contexte évocateur d'ICD et confronté à la clinique.

## 5. Conclusion

La réalisation du test Alethia™ *C. difficile* appliquée aux colonies de *C. difficile* isolées en culture permet de répondre aux cas où la présence de *C. difficile* toxigène n'a pu être déterminée sur l'échantillon de selles en raison d'un inhibiteur d'amplification. Cette culture toxigénique est applicable facilement en routine sans acquisition de matériel supplémentaire. Son inconvénient réside en sa durée de réalisation et l'allongement du délai de résultat. Nous avons montré que nous répondions aux exigences de l'accréditation du COFRAC en respectant les recommandations du guide technique d'accréditation de validation en portée B des méthodes de biologie médicale (SH GTA 04).

## Bibliographie

Barbut, F., Eckert, C., and Le Monnier, A. (2018). *Clostridium difficile*. In REMIC, pp. 533–539.

Buchan, B.W., Mackey, T.-L.A., Daly, J.A., Alger, G., Denys, G.A., Peterson, L.R., Kehl, S.C., and Ledebor, N.A. (2012). Multicenter Clinical Evaluation of the Portrait Toxigenic *C. difficile* Assay for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* Strains in Clinical Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 50, 3932–3936.

Chitnis, A.S., Holzbauer, S.M., Belflower, R.M., Winston, L.G., Bamberg, W.M., Lyons, C., Farley, M.M., Dumyati, G.K., Wilson, L.E., Beldavs, Z.G., et al. (2013). Epidemiology of Community-Associated *Clostridium difficile* Infection, 2009 Through 2011. *JAMA Intern Med* 173, 1359–1367.

COFRAC (2015). SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale.

Cohen, S.H., Gerding, D.N., Johnson, S., Kelly, C.P., Loo, V.G., McDonald, L.C., Pepin, J., Wilcox, M.H., Society for Healthcare Epidemiology of America, and Infectious Diseases Society of America (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.

Couturier, B., Schlaberg, R., Konzak, C., Nicholes, J., Law, C., and She, R.C. (2013). tcdA As a Diagnostic Target in a Loop-Mediated Amplification Assay for Detecting Toxigenic *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 27, 171–176.

Crobach, M.J.T., Planche, T., Eckert, C., Barbut, F., Terveer, E.M., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H., and Kuijper, E.J. (2016). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 22, S63–S81.

Debast, S.B., Bauer, M.P., and Kuijper, E.J. (2014). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 20, 1–26.

Depitre, C., Delmee, M., Avesani, V., Roels, A., L'haridon, R., Popoff, M., and Corthier, G. (1993). Serogroup F strains of *Clostridium difficile* produce toxin B but not toxin A. *Journal of Medical Microbiology*, 38, 434–441.

Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S.B., Harmanus, C., Notermans, D.W., Bergwerff, A.A., Dekker, F.W., and Kuijper, E.J. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new

hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin. Infect. Dis.* 47, 1162–1170.

Goret, J., Blanchi, J., Eckert, C., Lacombe, S., Petit, A., Barbut, F., Bébéar, C., and Mégraud, F. (2015). Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Gut Pathog* 7.

Hong, G., Park, K.S., Ki, C.-S., and Lee, N.Y. (2014). Evaluation of the illumigene *C. difficile* assay for toxigenic *Clostridium difficile* detection: a prospective study of 302 consecutive clinical fecal samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 80, 177–180.

Khanna, S., Pardi, D.S., Aronson, S.L., Kammer, P.P., Orenstein, R., St. Sauver, J.L., Harmsen, W.S., and Zinsmeister, A.R. (2012). The Epidemiology of Community-acquired *Clostridium difficile* infection: A population-based study. *Am J Gastroenterol* 107, 89–95.

Kuijper, E.J., Coignard, B., Brazier, J.S., Suetens, C., Drudy, D., Wiuff, C., Pituch, H., Reichert, P., Schneider, F., Widmer, A.F., et al. (2007). Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to PCR ribotype 027 in Europe. *Eurosurveillance* 12, 1–2.

Lalande, V., Barrault, L., Wadel, S., Eckert, C., Petit, J.-C., and Barbut, F. (2011). Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. *J Clin Microbiol* 49, 2714–2716.

Magill, S.S., Edwards, J.R., Bamberg, W., Beldavs, Z.G., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., et al. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care–associated Infections. *New England Journal of Medicine* 370, 1198–1208.

McDonald, L.C., Gerding, D.N., Johnson, S., Bakken, J.S., Carroll, K.C., Coffin, S.E., Dubberke, E.R., Garey, K.W., Gould, C.V., Kelly, C., et al. (2018). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 66, e1–e48.

Meridian, Fiche technique Alethia® *C. difficile*.

Neuendorf, M., Guadarrama-Gonzalez, R., Lamik, B., and MacKenzie, C.R. (2016). A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *BMC Microbiol.* 16, 19.

Norén, T., Alriksson, I., Andersson, J., Åkerlund, T., and Unemo, M. (2011). Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for *Clostridium difficile* Detection Challenges Cytotoxin B Cell Test and Culture as Gold Standard. *J Clin Microbiol* 49, 710–711.

Norén, T., Unemo, M., Magnusson, C., Eiserman, M., and Matussek, A. (2014). Evaluation of the rapid loop-mediated isothermal amplification assay Illumigene for diagnosis of *Clostridium difficile* in an outbreak situation. *APMIS* 122, 155–160.

Novak-Weekley, S.M., Marlowe, E.M., Miller, J.M., Cumpio, J., Nomura, J.H., Vance, P.H., and Weissfeld, A. (2010). *Clostridium difficile* Testing in the Clinical Laboratory by Use of Multiple Testing Algorithms. *J Clin Microbiol* 48, 889–893.

Stabler, R.A., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T.D., Sebahia, M., Quail, M.A., Rose, G., et al. (2009). Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium. *Genome Biol* 10, R102.

Viala, C., Le Monnier, A., Maataoui, N., Rousseau, C., Collignon, A., and Poilane, I. (2012). Comparison of commercial molecular assays for toxigenic *Clostridium difficile* detection in stools: BD GeneOhm Cdiff, XPert C. *difficile* and illumigene C. *difficile*. *J. Microbiol. Methods* 90, 83–85.

Wust, J. (1982). Investigation of an Outbreak of Antibiotic-Associated Colitis by Various Typing Methods. *J. CLIN. MICROBIOL.* 16, 6.

Ylisiurua, P., Koskela, M., Vainio, O., and Tuokko, H. (2013). Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Scand. J. Infect. Dis.* 45, 19–25.



## **CHAPITRE 2 : ACCREDITATION DE L'ALGORITHME MERIDIAN**

### **BIOSCIENCE POUR LE DIAGNOSTIC DES ICD**

## Contexte

L'article L.6221-1 du Code de la santé publique rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) sur l'ensemble de l'activité qu'ils réalisent. Cette accréditation est délivrée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) et repose notamment sur la norme NF EN ISO 15189. L'accréditation de l'ensemble des examens (100% des analyses) doit être réalisée en 2020.

Pour répondre à ces exigences, les examens soumis à l'accréditation doivent être validés. Cette validation de méthode s'effectue en fonction de la portée d'accréditation de l'examen concerné. L'ensemble des points à aborder lors d'une validation de méthode sont présentés au sein du SH GTA 04 (COFRAC, 2015a), et listés au sein d'un formulaire SH FORM 43 (COFRAC, 2015b). Ces éléments peuvent être complétés par les recommandations de la Société Française de Microbiologie (SFM) qui propose un référentiel spécifique pour la microbiologie appelé QUAMIC (QUAMIC, 2016). Ces derniers ne proposent pas d'exemples de validations de méthodes.

Nous proposons donc de définir l'ensemble des points nécessaires à la validation de l'algorithme Meridian Bioscience (Cincinnati, Ohio, États-Unis) utilisé au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux. Nous proposons un formulaire SH FORM 43 pré-rempli, utilisable pour les LBM souhaitant valider cette méthode. L'algorithme diagnostique proposé par Meridian Bioscience est un processus qualitatif complexe composé de 2 sous processus (ImmunoCard<sup>®</sup> *C. difficile* GDH-EIA et Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* dans les selles), et complété par un troisième sous processus (Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* sur colonies isolées en culture – culture toxigénique) développé dans le premier chapitre de cette thèse. Les deux premiers sous-processus font l'objet d'une validation en portée A, puisque le laboratoire suit les recommandations techniques du fournisseur. Le troisième fait l'objet d'une validation en portée B, du fait de l'adaptation de la méthode Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* à la culture toxigénique.

## 1. Introduction

*Clostridioles difficile* est un acteur majeur des diarrhées infectieuses associées aux soins (Magill et al., 2014). Le diagnostic des infections à *C. difficile* (ICD) repose sur un tableau évocateur et la mise en évidence microbiologique de *C. difficile* toxigène par des algorithmes diagnostiques. L'algorithme proposé par la société Meridian Bioscience (Cincinnati, Ohio, États-Unis) est constitué d'un test de dépistage initial dans les selles par la détection de la glutamate déshydrogénase (GDH) par méthode immuno-enzymatique (EIA) ImmunoCard® *C. difficile* GDH, suivi dans un second temps du test d'amplification des acides nucléiques (TAAN) Alethia™ *C. difficile*. Ce dernier permet de détecter le locus de pathogénicité *PaLoc* portant les gènes codant pour les toxines A et B dans les selles. Meridian fournit un algorithme en deux temps « prêt à l'emploi ».

Selon les recommandations du fournisseur, lorsque le test de détection de GDH est négatif, les investigations concernant une éventuelle ICD s'arrêtent et il est conclu à une absence de *C. difficile* dans les selles. En revanche, lorsque la GDH est positive, la présence de *C. difficile* dans les selles est établie. L'investigation est poursuivie en réalisant un test de détection des acides nucléiques Alethia™ *C. difficile* afin de déterminer le caractère toxigène ou non. Si son résultat est « Négatif », il est conclu à la présence de *C. difficile* non toxigène. S'il est rendu « Positif », il est conclu à la présence de *C. difficile* producteur de toxines et le diagnostic microbiologique d'ICD est établi. Cet algorithme diagnostique des ICD a été mis en place au laboratoire de Bactériologie du CHU de Bordeaux en juin 2014. Il a été complété depuis. Lorsque le TAAN est invalide à deux reprises, le TAAN Alethia™ *C. difficile* est réalisé sur les colonies de *C. difficile* isolées en culture. Cette culture toxigénique (CT) complémentaire est utilisée dans un troisième temps. Bien que plus longue (48h de culture minimum), elle permet de s'affranchir de l'effet d'inhibiteurs d'amplification génique contenus dans les selles. La CT utilisant le test Alethia™ *C. difficile* n'est pas validée par le fournisseur.

L'article L.6221-1 du Code de la santé publique rend obligatoire l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (LBM) sur l'ensemble de l'activité qu'ils réalisent. Cette accréditation est délivrée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) et repose sur des normes européennes harmonisées et notamment la norme NF EN ISO 15189. L'objectif de l'accréditation est de garantir la fiabilité des examens de biologie médicale réalisés et la qualité de la prestation médicale offerte par un LBM. L'accréditation de l'ensemble des examens (100% des analyses) doit être réalisée pour 2020. Pour répondre à ces exigences les examens soumis à l'accréditation doivent être validés. Cette validation de méthode s'effectue en fonction de la portée d'accréditation de l'examen concerné, établie par le SH REF 08 (COFRAC, 2017). L'ensemble des points à aborder lors d'une validation de méthode sont présentés au sein du SH GTA 04 (COFRAC, 2015a), et listés au sein d'un formulaire SH FORM 43 (COFRAC, 2015b). Les informations fournies par le SH GTA 04 peuvent être complétées par les recommandations des sociétés savantes telles que la Société Française de Microbiologie (SFM) qui propose un référentiel spécifique pour la microbiologie appelé QUAMIC (QUAMIC, 2016).

L'accréditation des algorithmes diagnostiques présente plusieurs difficultés. Le SH GTA 04 fournit les grands principes des conditions à remplir pour établir un dossier de validation/vérification de méthode, sans évoquer les particularités adaptées aux tests EIA et TAAN. La validation de méthode des algorithmes diagnostiques des ICD est mentionnée dans le QUAMIC (QUAMIC, 2016) au sein de l'examen microbiologique des selles (chapitre 10), sans évocation des particularités liées aux tests EIA et TAAN. La validation de méthode des TAAN pourrait être traitée au sein du chapitre abordant la PCR en temps réel bactérienne (chapitre 8) mais les méthodes ne sont pas similaires et nécessitent un ajustement des données collectées. La deuxième difficulté consiste en l'absence de publications, posters ou communications traitant de la validation de méthode de l'algorithme diagnostique des ICD proposé par Meridian Bioscience.

Nous proposons donc de définir l'ensemble des points nécessaires à la validation de l'algorithme diagnostique des ICD proposé par la société Meridian Bioscience. Au travers de notre expérience, nous proposons un formulaire SH FORM 43 pré-rempli pour les LBM souhaitant valider et accréditer la technique. L'algorithme diagnostique proposé par Meridian Bioscience est un processus complexe. Dans notre étude, le champ d'application de la vérification correspond donc à trois examens de biologie médicale : le test ImmunoCard<sup>®</sup> *C. difficile* GDH dans les selles, le test Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* dans les selles et le test Alethia<sup>™</sup> *C. difficile* sur les colonies recueillies après mise en culture (culture toxigénique).

## 2. Matériel et méthode

Nous avons suivi la méthodologie décrite par le SH GTA 04 (Révision 0 – avril 2015) (COFRAC, 2015a) pour le design du plan expérimental nécessaire à la validation de méthode.

L'algorithme diagnostique proposé par Meridian Bioscience est un processus complexe composé de trois examens de biologie médicale : le test ImmunoCard® *C. difficile* GDH dans les selles, le test Alethia™ *C. difficile* dans les selles et le test Alethia™ *C. difficile* sur les colonies recueillies après mise en culture (culture toxigénique). Ils relèvent pour les deux premiers de la portée flexible standard (A) et pour le troisième de la portée flexible étendue (B) car l'utilisation du TAAN dans la culture toxigénique n'est pas validée par le fournisseur. Les tests ImmunoCard® *C. difficile* GDH-EIA et Alethia™ *C. difficile* appartiennent à deux lignes de portée différentes : respectivement, il s'agit de la ligne BM MG03 en microbiologie générale (MICROBIOBM) et de la ligne BM BA02 en microbiologie spécialisée (BACTH) selon le SH REF 50. La culture des souches de *C. difficile* n'a pas été traitée en tant que quatrième sous processus. En effet, la culture bactérienne a un rôle central en bactériologie et il est plus simple d'en faire l'objet d'une validation de méthode à part entière, afin de pouvoir s'y référer lors de la validation des autres examens standard de microbiologie.

L'analyse des modes de défaillances, de leurs effets et de leur criticité (analyse de risque) et le diagramme d'Ishikawa ont été réalisés grâce à la méthode des « 5 M » pour « Matière, Milieu, Matériel, Méthode, Main d'œuvre ». Pour chaque risque identifié, un indice de criticité a été calculé selon la formule suivante : fréquence x gravité x détectabilité. Les cotations de la fréquence, de la gravité et de la détectabilité sont issues des grilles du SH GTA 06 (COFRAC, 2012). Nous avons choisi de retenir en particulier les points dont l'indice de criticité était supérieur ou égal à 9, car cela correspond à une cotation maximale du risque pour au moins 2 des 3 composantes parmi la fréquence, la gravité et la détectabilité.

Le test ImmunoCard® *C. difficile* GDH dans les selles et le test Alethia™ *C. difficile* dans les selles étant de portée A, la répétabilité, la reproductibilité ou fidélité intermédiaire et la variabilité inter-opérateurs ont nécessité des essais sur site à partir de selles provenant de patients. Les méthodes appliquées sont détaillées dans le SH FORM 43 pré-rempli ci-dessous. La spécificité analytique, la sensibilité diagnostique, la comparaison avec d'autres méthodes et l'étude des interférences ont été argumentées grâce aux données provenant de la littérature. La justesse, l'exactitude, la contamination, la stabilité des réactifs, la robustesse, l'étendue de mesure et l'intervalle de référence n'ont pas été évalués car les essais ne sont pas applicables ou ces éléments maîtrisés.

Le test Alethia™ *C. difficile* sur les colonies recueillies après mise en culture étant de portée B, la répétabilité, la reproductibilité ou fidélité intermédiaire, la variabilité inter-opérateurs, la sensibilité diagnostique, la contamination, la stabilité des réactifs, la robustesse et la comparaison de méthode ont nécessité des essais sur site. Les méthodes appliquées sont détaillées dans le SH FORM 43 pré-rempli ci-dessous. La spécificité analytique, la justesse, l'exactitude, l'étendue de mesure et l'intervalle de référence n'ont pas été évalués, du fait de la non applicabilité des essais, ou de la maîtrise de ces éléments. Deux souches de référence CD 630 et F ont été utilisées pour les essais de répétabilité, reproductibilité, variabilité inter-opérateurs, contamination, limite de détection, robustesse et stabilité

des réactifs. La souche CD 630 sécrète les toxines A et B (A+B+) tandis que la souche F ne sécrète que la toxine B (A-B+). Elles ont été fournies par le Laboratoire *C. difficile* associé au Centre national de référence des Bactéries anaérobies et botulisme (Pr F. Barbut et Dr C. Eckert, Hôpital Saint Antoine, Paris, France). Des souches issues de patients atteints d'ICD sévères ont été utilisées pour les essais de sensibilité diagnostique et de comparaison des méthodes.

Les résultats obtenus lors de la validation des différents paramètres testés ont ensuite été reportés dans un formulaire SH FORM 43 (COFRAC, 2015b). Le formulaire SH FORM 43 vierge est accessible via leur site internet ([www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)), de manière gratuite. Dans le SH FORM proposé dans ce chapitre apparaissent en bleu les conseils de réalisation et explications permettant aux LBM d'appliquer la validation de méthode sur leur site. Pour faciliter la lecture, ces conseils ont été inscrits sur le premier sous-processus concerné et non répétés par la suite.

### 3. Proposition de SH FORM 43 pour l'algorithme diagnostique des ICD par Meridian Bioscience

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE
<b>Identification du paramètre : Recherche de <i>C. difficile</i> toxinogène dans les selles (méthode qualitative)</b>
<b>Processus simple <input type="checkbox"/> ; Processus complexe <input checked="" type="checkbox"/> Nombre de sous-processus : 3</b>

<p><b>Sous processus 1 :</b> Détection qualitative de l'antigène spécifique de <i>C. difficile</i> (glutamate déshydrogénase, GDH) dans les selles par test unitaire (méthode immuno-enzymatique, EIA)</p>	<p>Modalités de vérification/validation<sup>1</sup> :</p> <table> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>1. Répétabilité</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>2. Fidélité intermédiaire</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>3. Variabilité inter-opérateurs</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>4. Justesse</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>5. Exactitude</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> B</td><td>6. Sensibilité et spécificité analytique</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> ADR</td><td>7. Incertitudes</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>8. Etendue de mesure</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> B</td><td>9. Comparaison de méthodes</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> B</td><td>10. Interférences</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>11. Contamination</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>12. Robustesse et fiabilité des réactifs</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>13. Intervalle de référence</td></tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> E	1. Répétabilité	<input checked="" type="checkbox"/> E	2. Fidélité intermédiaire	<input checked="" type="checkbox"/> E	3. Variabilité inter-opérateurs	<input type="checkbox"/> NA	4. Justesse	<input type="checkbox"/> NA	5. Exactitude	<input checked="" type="checkbox"/> B	6. Sensibilité et spécificité analytique	<input checked="" type="checkbox"/> ADR	7. Incertitudes	<input type="checkbox"/> NA	8. Etendue de mesure	<input checked="" type="checkbox"/> B	9. Comparaison de méthodes	<input checked="" type="checkbox"/> B	10. Interférences	<input type="checkbox"/> NA	11. Contamination	<input type="checkbox"/> NA	12. Robustesse et fiabilité des réactifs	<input type="checkbox"/> NA	13. Intervalle de référence
<input checked="" type="checkbox"/> E	1. Répétabilité																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	2. Fidélité intermédiaire																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	3. Variabilité inter-opérateurs																										
<input type="checkbox"/> NA	4. Justesse																										
<input type="checkbox"/> NA	5. Exactitude																										
<input checked="" type="checkbox"/> B	6. Sensibilité et spécificité analytique																										
<input checked="" type="checkbox"/> ADR	7. Incertitudes																										
<input type="checkbox"/> NA	8. Etendue de mesure																										
<input checked="" type="checkbox"/> B	9. Comparaison de méthodes																										
<input checked="" type="checkbox"/> B	10. Interférences																										
<input type="checkbox"/> NA	11. Contamination																										
<input type="checkbox"/> NA	12. Robustesse et fiabilité des réactifs																										
<input type="checkbox"/> NA	13. Intervalle de référence																										
<p><b>Sous processus 2 :</b> Détection qualitative des acides nucléiques bactériens codant pour les toxines de <i>C. difficile</i> dans les selles par extraction et amplification isothermique</p>	<p>Modalités de vérification/validation :</p> <table> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>1. Répétabilité</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>2. Fidélité intermédiaire</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>3. Variabilité inter-opérateurs</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>4. Justesse</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>5. Exactitude</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> B</td><td>6. Sensibilité et spécificité analytique</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> ADR</td><td>7. Incertitudes</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>8. Etendue de mesure</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> B</td><td>9. Comparaison de méthodes</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> B</td><td>10. Interférences</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>11. Contamination</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>12. Robustesse et fiabilité des réactifs</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>13. Intervalle de référence</td></tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> E	1. Répétabilité	<input checked="" type="checkbox"/> E	2. Fidélité intermédiaire	<input checked="" type="checkbox"/> E	3. Variabilité inter-opérateurs	<input type="checkbox"/> NA	4. Justesse	<input type="checkbox"/> NA	5. Exactitude	<input checked="" type="checkbox"/> B	6. Sensibilité et spécificité analytique	<input checked="" type="checkbox"/> ADR	7. Incertitudes	<input type="checkbox"/> NA	8. Etendue de mesure	<input checked="" type="checkbox"/> B	9. Comparaison de méthodes	<input checked="" type="checkbox"/> B	10. Interférences	<input type="checkbox"/> NA	11. Contamination	<input type="checkbox"/> NA	12. Robustesse et fiabilité des réactifs	<input type="checkbox"/> NA	13. Intervalle de référence
<input checked="" type="checkbox"/> E	1. Répétabilité																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	2. Fidélité intermédiaire																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	3. Variabilité inter-opérateurs																										
<input type="checkbox"/> NA	4. Justesse																										
<input type="checkbox"/> NA	5. Exactitude																										
<input checked="" type="checkbox"/> B	6. Sensibilité et spécificité analytique																										
<input checked="" type="checkbox"/> ADR	7. Incertitudes																										
<input type="checkbox"/> NA	8. Etendue de mesure																										
<input checked="" type="checkbox"/> B	9. Comparaison de méthodes																										
<input checked="" type="checkbox"/> B	10. Interférences																										
<input type="checkbox"/> NA	11. Contamination																										
<input type="checkbox"/> NA	12. Robustesse et fiabilité des réactifs																										
<input type="checkbox"/> NA	13. Intervalle de référence																										
<p><b>Sous processus 3 :</b> Détection qualitative des acides nucléiques bactériens codant pour les toxines de <i>C. difficile</i> sur les colonies isolées en culture à partir de selles par extraction et amplification isothermique</p>	<p>Modalités de vérification/validation :</p> <table> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>1. Répétabilité</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>2. Fidélité intermédiaire</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>3. Variabilité inter-opérateurs</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>4. Justesse</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>5. Exactitude</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E + B</td><td>6. Sensibilité et spécificité analytique</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> ADR</td><td>7. Incertitudes</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>8. Etendue de mesure (limite détection)</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>9. Comparaison de méthodes</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>10. Interférences</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E + ADR</td><td>11. Contamination</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> E</td><td>12. Robustesse et fiabilité des réactifs</td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/> NA</td><td>13. Intervalle de référence</td></tr> </table>	<input checked="" type="checkbox"/> E	1. Répétabilité	<input checked="" type="checkbox"/> E	2. Fidélité intermédiaire	<input checked="" type="checkbox"/> E	3. Variabilité inter-opérateurs	<input type="checkbox"/> NA	4. Justesse	<input type="checkbox"/> NA	5. Exactitude	<input checked="" type="checkbox"/> E + B	6. Sensibilité et spécificité analytique	<input checked="" type="checkbox"/> ADR	7. Incertitudes	<input checked="" type="checkbox"/> E	8. Etendue de mesure (limite détection)	<input checked="" type="checkbox"/> E	9. Comparaison de méthodes	<input type="checkbox"/> NA	10. Interférences	<input checked="" type="checkbox"/> E + ADR	11. Contamination	<input checked="" type="checkbox"/> E	12. Robustesse et fiabilité des réactifs	<input type="checkbox"/> NA	13. Intervalle de référence
<input checked="" type="checkbox"/> E	1. Répétabilité																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	2. Fidélité intermédiaire																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	3. Variabilité inter-opérateurs																										
<input type="checkbox"/> NA	4. Justesse																										
<input type="checkbox"/> NA	5. Exactitude																										
<input checked="" type="checkbox"/> E + B	6. Sensibilité et spécificité analytique																										
<input checked="" type="checkbox"/> ADR	7. Incertitudes																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	8. Etendue de mesure (limite détection)																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	9. Comparaison de méthodes																										
<input type="checkbox"/> NA	10. Interférences																										
<input checked="" type="checkbox"/> E + ADR	11. Contamination																										
<input checked="" type="checkbox"/> E	12. Robustesse et fiabilité des réactifs																										
<input type="checkbox"/> NA	13. Intervalle de référence																										

<sup>1</sup> Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, a minima.

Le types de vérification est indiqué : B, bibliographique ; E, essais ; ADR, analyse de risque.  
L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

TABLEAU DES EVOLUTIONS		
Date	Motif de mise à jour	Paragraphes mis à jour
01/08/17	Mise en œuvre	Tous

*Dupliquer les paragraphes à modifier et préciser dans le titre de chaque tableau « MAJ-date de mise à jour »*

MISE EN ŒUVRE	
<b>Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :</b>	Cécile Juillard, Interne Julien Goret, AHU
<b>Procédure de validation/mode opératoire :</b>	SH GTA 04
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	PR_QUA_8536
<b>Période d'étude :</b>	Du 02/11/15 au 06/05/16
<b>Date de 1<sup>ère</sup> utilisation :</b>	02/06/14
<b>Localisation des documents de preuve (données brutes...) :</b>	Les données sont conservées sur un disque partagé N Les éléments de preuve comprennent le numéro de lot des réactifs utilisés et les noms des opérateurs

*Le laboratoire veillera à citer les procédures propres au LBM.*



**SOUS-PROCESSUS 1 : Détection qualitative de l'antigène spécifique de *C. difficile* (glutamate déshydrogénase, GDH) dans les selles par test unitaire (méthode immuno-enzymatique, EIA)**

Portée A  ; Portée B

**DESCRIPTION DE LA METHODE**

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Détection qualitative de l'antigène spécifique de <i>C. difficile</i> (glutamate déshydrogénase, GDH) dans les selles par test unitaire sur support solide
<b>Principe de la Méthode :</b>	Test unitaire immuno-enzymatique (EIA)
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Selle
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Pot stérile sans additifs Les milieux de transports peuvent être utilisés, à condition qu'ils soient validés par le fournisseur ou que des études aient prouvé leur performance pour le test étudié.
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Homogénéisation puis dilution dans mélange de diluant échantillon
<b>Unités :</b>	Pas d'unité, résultat qualitatif
<b>Critères d'interprétation<sup>2</sup> :</b>	Positif/Négatif
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	NA
<b>Référence du réactif :</b>	ImmunoCard® <i>C. difficile</i> GDH référence 716050
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	NA
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	Contrôle interne de qualité (CIQ) positif/négatif lors de l'ouverture de chaque nouveau coffret de réactifs. Témoin interne à chaque test

<sup>2</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

**MAITRISE DES RISQUES**  
**(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)**

Pour chaque risque identifié, une analyse AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité) a permis d'attribuer un indice de criticité (IC) calculé selon la formule suivante : Indice de criticité = Fréquence x Gravité x Détectabilité.

Les paramètres de la formule sont définis selon les grilles suivantes dans le SH GTA 06 (COFRAC, 2012) :

- Fréquence (F) d'apparition des anomalies constatées :

- 1 = 0 à 1 fois par an
- 2 = 2 à 3 fois par an
- 3 = supérieure à 3 fois par an

- Gravité (G) de l'anomalie sur le processus analytique et ses incidences sur le diagnostic, le traitement ou l'épidémiologie :

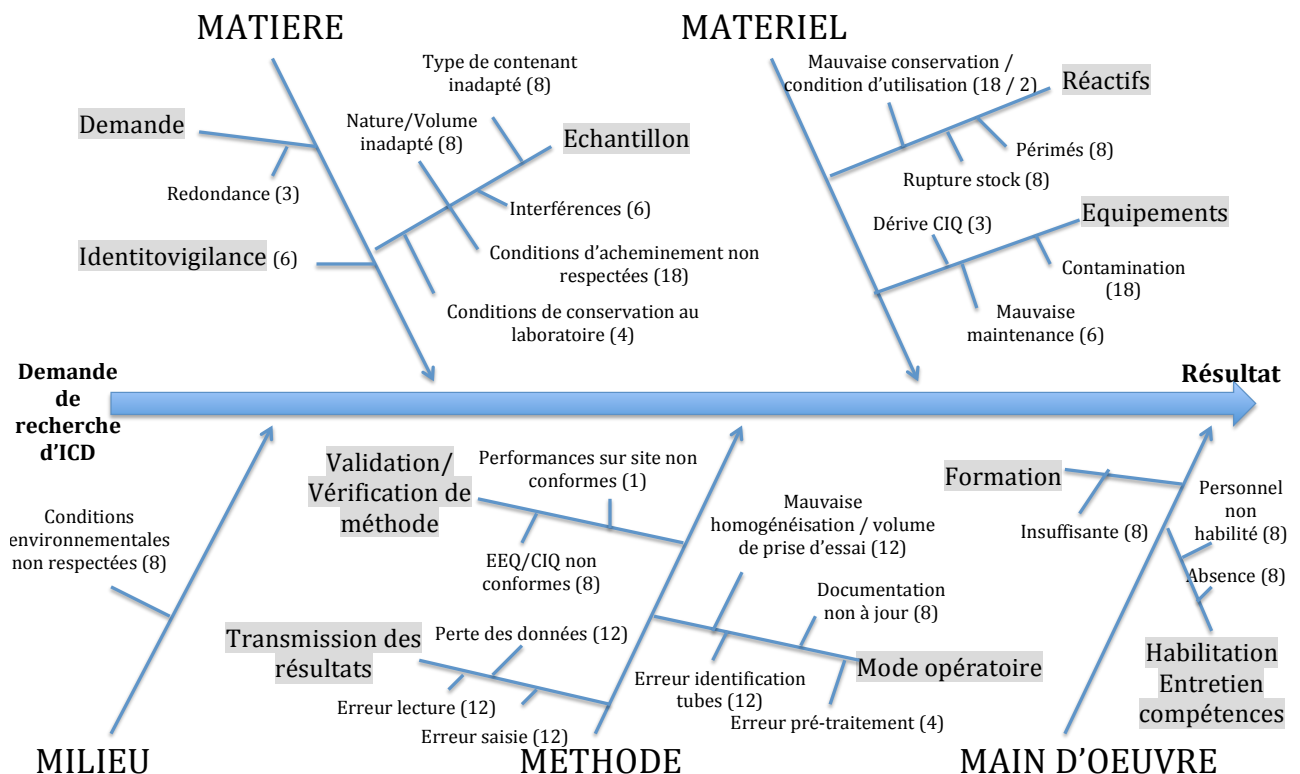
- 1 = Aucune incidence
- 2 = Incidence probable
- 3 = Incidence certaine

- Détectabilité (D) de l'anomalie au cours du processus analytique incluant la phase pré et post-analytique :

- 1 = Anomalie détectable au cours du processus analytique
- 2 = Détection possible de l'anomalie au cours du processus analytique
- 3 = Anomalie non détectable au cours du processus analytique

Ces risques sont représentés au sein d'un diagramme d'Ishikawa ci-dessous. Ce dernier porte sur l'ensemble des trois sous processus.

Diagramme d'Ishikawa appliqué aux trois sous processus composant l'algorithme diagnostique d'ICD :



<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>3</sup></b>	<b>Éléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire</b>
<b>Matière (échantillons)</b>	Identité	6 (2*3*1)	Formation et information du personnel	Maintien des compétences IN LAB 16 2010 Critères de conformité des échantillons et des demandes d'exams vérifiés à l'enregistrement IN LAB 16 1481 Enregistrement étiquetage et acheminement des échantillons de bactériologie
	Préparation du patient		Information des patients et préleveurs	Catalogue des actes Instructions de prélèvement
	Type de contenants	2 (1*2*1)	Formation des préleveurs	Instructions de prélèvement
	Nature, volume de l'échantillon	6 (3*2*1)	Contrôle à réception : consistance, volume de selles	Document Critères d'acceptation/de refus Instructions de prélèvement
	Redondance de la demande	3 (3*1*1)	Recherche négative de moins de 7 jours Recherche positive de moins de 14 jours	Mode opératoire IN LAB 557 Paramétrage informatique : génération du code « analyse redondante » automatique à l'enregistrement
	Délai et température avant traitement analytique (date d'émission/délai d'acheminement)	18 (3*2*3)	+4°C jusqu'à 5 jours, -20°C jusqu'à 30 jours	Recommandations fournisseur Vérification des prescriptions à l'enregistrement Gestion des non-conformités Paramétrage informatique
	Conditions de conservation des échantillons au laboratoire	4 (1*2*2)		Instructions de conservation des selles « Température de stockage des échantillons » (EN LAB 079)
Interférences	6 (2*3*1)	Risque de faux négatif si présence de sang >40% Contrôle à la réception Formation des préleveurs Renseignements cliniques	Formation et habilitation du personnel Notice fournisseur Catalogue des actes Instructions de prélèvement Diffusion sur le compte rendu : commentaire au moment de la validation biologique si selle sanglante testée rendue négative Appel du clinicien en cas de test invalide	

<sup>3</sup> A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>3</sup></b>	<b>Eléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...) avec les références du SMQ du laboratoire</b>
<b>Milieu</b>	Exigences environnementales pour le matériel	8 (2*2*2)	Température ambiante (+20 à +26°C)	Notice fournisseur Suivi métrologique (sonde Sirius)
<b>Matériel (réactifs)</b>	Conditions d'utilisation et de conservation des réactifs	18 (3*2*3)	Conservation à +2 à +4°C	Procédure de gestion des stocks – gestion des approvisionnements (PR_EQU_9139) Suivi métrologique, notice fournisseur Formation et habilitation du personnel
		2 (1*2*1)	A ramener à température ambiante (+20 à +26°C) lors de chaque test	
	Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks	8 (2*2*2)	Suivi des péremptions Suivi des stocks	Procédure de gestion des stocks – gestion des approvisionnements (PR_EQU_9139)
<b>Méthode</b>	Acquittement et préparation des échantillons	12 (2*3*2)	Identification/acquittement lors du début de réalisation Homogénéisation, volume d'échantillon utilisé, dilution	Echantillons à acquitter/identifier un par un (en cas de série) Formation du personnel, respect du mode opératoire (IN-LAB 557) Fiche technique fournisseur Formation et habilitation du personnel
	Saisie manuelle des résultats	12 (2*3*2)	Erreur de saisie, lecture, perte des données	« TD Micro - Saisie de résultats (WIP) » (MO_INF_9626) Cahier de traçabilité de la paillasse (EN-LAB 106) Formation et habilitation du personnel
	Performances des techniques	1 (1*1*1)	Vérification de méthode de l'algorithme : résultats conformes	Procédure de validation de méthode (SH-GTA-04 SH-FORM-43)
	Surveillance des dérives	3 (1*3*1)	CIQ et EEQ Suivi des CIQ à chaque ouverture de coffret	Procédure de gestion des contrôles qualité Formation et habilitation du personnel
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Compétence et maintien de compétence du personnel	8 (2*2*2)	Formation Habilitation Entretien des compétences	Enregistrements des compétences du personnel : fiche d'habilitation Traçabilité de l'occupation des postes de travail

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### REPETABILITE

Applicable  ; non applicable (à justifier)

Echantillons	Nombre de valeurs (N)	1 <sup>er</sup> passage	2 <sup>ème</sup> passage	3 <sup>ème</sup> passage	4 <sup>ème</sup> passage	5 <sup>ème</sup> passage	Conclusion <sup>4</sup>
Selle patient connue positive	5	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Conforme
Selle patient connue négative	5	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme

Méthode : Les essais ont été réalisés sur des selles provenant de patients, l'une positive et l'autre négative. Cinq mesures ont été réalisées pour chacune, au sein de la même série, par le même opérateur, le même jour

Objectif : 100% de concordance pour l'échantillon positif et négatif.

Argumentaire de la conclusion : En l'absence de recommandations, le nombre de mesures a été établi à 5 par le laboratoire.

Conclusion : La répétabilité du test ImmunoCard® C. difficile GDH est conforme aux objectifs du laboratoire.

### FIDELITE INTERMEDIAIRE

Applicable  ; non applicable (à justifier)

Opérateurs évalués	Essai sur site – résultats de la variabilité
1	Positif
2	Positif
3	Positif
4	Positif
5	Positif
6	Positif
7	Positif
8	Positif
9	Positif
10	Positif
11	Positif
12	Positif
13	Positif
14	Positif
15	Positif
<b>Pourcentage de concordance</b>	<b>100%</b>

Méthode : 15 essais ont été réalisés sur la selle congelée d'un patient positif. Quinze mesures ont été réalisées par quinze opérateurs différents. Les essais ont été réalisés sur trois demi-journées en l'espace de dix jours (25, 27/04 et 04/05/16). La reproductibilité sur patients négatifs n'a pas été réalisée pour limiter le cout des réactifs. Des résultats négatifs obtenus sur d'autres selles le même jour, avec même lot de réactifs par des opérateurs différents ont été obtenus en parallèle. De plus, la contamination inter échantillon est maîtrisée par le laboratoire (cf. ADR)

Objectif : 100% de concordance de résultat positif.

<sup>4</sup> Conforme/non conforme

Argumentaire de la conclusion : Le nombre de mesures établi à 15 a été justifié en rapport avec l'effectif de personnel technique pouvant être rencontré dans le laboratoire.

Conclusion : La reproductibilité du test ImmunoCard® C. *difficile* GDH est maîtrisée et conforme aux attentes du laboratoire.

La fidélité intermédiaire peut également être évaluée grâce au suivi des CIQ sur une période donnée.

Il n'y a pas d'information disponible concernant le nombre d'essais minimum à réaliser, que ce soit dans le SH GTA 04 ou dans le QUAMIC. Le nombre de quinze a été établi du fait de l'étude conjointe de la variabilité inter-opérateurs, en l'absence d'exploitation des CIQ. Le nombre de mesures peut être étendu lorsque les résultats des CIQ sur une période donnée sont analysés de manière rétrospective.

Le choix d'étudier la fidélité intermédiaire via l'étude de la variabilité inter-opérateurs permet de limiter les manipulations techniques et la consommation de réactifs, tout en répondant aux exigences du SH GTA 04.

**VARIABILITE INTER-OPERATEURS**  
Applicable  ; non applicable

Méthode : Les essais ont été réalisés sur 1 selle d'un même patient. Quinze mesures ont été réalisées par quinze opérateurs différents. Les essais ont été réalisés sur trois demi-journées en l'espace de dix jours (25, 27/04 et 04/05/16). Les résultats sont présentés dans le paragraphe « fidélité intermédiaire ».

Les essais sur selles de patients négatifs n'ont pas été réalisés pour limiter l'utilisation des réactifs. Des résultats négatifs obtenus sur d'autres selles le même jour, avec même lot de réactifs par des opérateurs différents ont été obtenus en parallèle. De plus, la contamination inter échantillon est maîtrisée par le laboratoire (cf ADR)

Objectif : 100% de concordance de résultat positif.

Argumentaire de la conclusion : Le nombre de mesures établi à 15 a été justifié en rapport avec l'effectif de personnel technique pouvant être rencontré dans le LBM.

Conclusion : La variabilité inter-opérateurs du test ImmunoCard® C. *difficile* est maîtrisée et conforme aux attentes du laboratoire.

La variabilité inter-opérateur peut être étudiée avec un nombre d'opérateur moins élevé (n=5 par exemple) et comporter une selle positive et une selle négative. Elle pourra également servir pour l'étude de la reproductibilité décrite plus haut.

**JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

Argumentaire de la conclusion : L'absence de programme de CIQ externalisés ne permet pas l'étude de l'exactitude.

La justesse peut être évaluée grâce à la mise en place de CIQ externalisés. Il n'existe pas de programmes ou campagnes de CIQ externalisés disponibles à l'heure actuelle. La société Meridian Bioscience ne propose pas de programmes de CIQ externalisés.

**EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)**  
Contrôles quantitatifs  ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : Au moment de la réalisation de la validation de méthode, le laboratoire ne disposait pas de programme d'EEQ. L'étude de l'exactitude n' pas pu être réalisée.

L'exactitude peut être évaluée grâce à l'adhésion du laboratoire à un programme d'EEQ et à l'étude des résultats de ces derniers.

Les évaluations externes de la qualité des examens à résultats qualitatifs sont moins fréquentes que pour les examens à résultats quantitatifs, mais il est possible d'en trouver en France ainsi que dans des réseaux ou structures européennes et/ou internationales afin de participer à de telles comparaisons de résultats. Par exemple, le programme LABQUALITY (distribué par la société R-Biopharm) est disponible pour le diagnostic microbiologique des ICD.

<b>SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
Références bibliographiques (Staneck et al., 1996) (Turgeon et al., 2003) (Meridian, Fiche technique Immunocard® <i>C. difficile</i> GDH)	
Sensibilité	97,6%
Spécificité	87%
VPP	NA
VPN	99,6%

Méthode : Analyse des données de la littérature et des données fournisseur.

Objectif : Sensibilité >95% et spécificité > 85%.

Argumentaire de la conclusion : La technique choisie par le laboratoire doit présenter une excellente sensibilité analytique et valeur prédictive négative puisqu'il s'agit d'un test de dépistage. La spécificité exigée est acceptable du fait de la présence du test Alethia™ *C. difficile* en confirmation du test Immunocard® *C. difficile* GDH positif. La VPP n'est pas applicable (NA) pour ces mêmes raisons.

Conclusion : Les sensibilité et spécificité décrites par le fournisseur et la littérature sont conformes aux attentes du laboratoire.

<b>LIMITE DE DETECTION</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
<b>Limite de détection :</b>	10 ng/mL de selles ou 1,0 ng/mL lorsque la selle est diluée dans un système non-matrice.

Méthode : Analyse des données fournisseur, fiche technique (Meridian, Fiche technique Immunocard® *C. difficile* GDH).

Objectif : Détection de toute selle qui présente *C. difficile* en quantité significative.

Argumentaire de la conclusion : D'après les données du fournisseur, la sensibilité analytique décrite plus haut (97,6%) permet d'interpréter la conformité de la limite de détection décrite.

Conclusion : La limite de détection décrite par le fournisseur est conforme aux attentes du laboratoire et correspond aux performances décrites dans le paragraphe sensibilité et spécificité analytique.

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Goret et al. Gut Pathog (2015) 7:33 DOI 10.1186/s13099-015-0079-8
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :</b>	GDH Diasorin® par CLIA sur Liaison random access
<b>Nombre de mesures :</b>	468 échantillons testés
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	Echantillons positifs et négatifs
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	Analyse des résultats discordants (CT)
<b>Diagramme des différences et/ou des rapports :</b>	95,7% de concordance, avec 15% de positifs

Méthode : Le laboratoire a réalisé une analyse comparative des stratégies algorithmiques portant sur 468 selles, Goret et al. Gut Pathog (2015)

Objectif : Concordance > 90%.

Argumentaire de la conclusion : Il n'existe pas de différence significative entre les tests GDH-EIA des sociétés Alere et Meridian lors de l'essai sur site.

Conclusion : La comparaison des méthodes est conforme aux attentes du laboratoire.

Le SH GTA 04 évoque 30 échantillons au minimum pour étudier la comparaison des méthodes, tandis que le QUAMIC n'évoque pas de nombre minimum d'échantillons concernant la comparaison de méthodes des tests EIA. Il conviendra donc au LBM de justifier de son choix.

En cas d'absence de comparaison de méthode pour cause d'examen « en miroir » non disponible, la différence entre la nouvelle et l'ancienne technique diagnostique doivent être notifiés sur le compte-rendu d'examen par une phrase informant du changement de technique, de sa date d'application et de l'absence de comparabilité entre les deux méthodes. Cette phrase informative peut apparaître sur les comptes-rendus pour un délai d'un an à compter du changement de la technique, et être supprimée ensuite (partant du principe que les prescripteurs auront été informés sur cette période).

Enfin, les résultats antérieurs des examens effectués avec l'ancienne technique ne doivent pas apparaître en antériorité des résultats obtenus avec la nouvelle technique, cela nécessite le paramétrage d'un nouvel examen sur le SIL.

<b>INTERFERENCES</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>
--

Méthode : Analyse des données fournisseur., fiche technique (Meridian, Fiche technique Immunocard® C. *difficile* GDH).

Objectif : Les substances pouvant interférer lors de la réalisation du test Immunocard® C. *difficile* GDH doivent être connues du laboratoire en cas de test invalide.

Argumentaire de la conclusion : D'après les données fournisseur, les substances suivantes, aux concentrations solvant / diluant spécifiées, n'interfèrent pas avec les résultats du test dans les concentrations finales présentées: Le sulfate de baryum (5 mg/mL), la graisse fécale (2,65 mg d'acide stéarique et 1,3 mg d'acide palmitique/mL), l'hémoglobine (3,2 mg/mL), Imodium AD® (chlorhydrate de loperamide) (6,67.10<sup>3</sup> mg/mL), Kaopectate® (salicylate de bismuth) (0,87 mg/mL), métronidazole (12,5 mg/mL), mucine (3,33 mg/mL), Mylanta® (hydroxyde d'aluminium sans hydroxyde de magnésium) (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (salicylate de bismuth) (0,87 mg/mL), polyéthylène glycol (79,05 mg/mL), Prilosec® (oméprazole) (0,5 mg/mL), siméthicone (0,625 mg/mL), Tagamet® (cimétidine) (0,5 mg/mL), Tums® (carbonate de calcium) (5,0 mg/mL), la vancomycine HCl (2,5 mg/mL), le sang total (40%) et les globules blancs (5%).



Les échantillons contenant du sang total à des concentrations supérieures à 40 % peuvent produire des résultats faussement négatifs.

Conclusion : Le laboratoire connaît les substances pouvant interférer lors du test Immunocard® *C. difficile* GDH grâce à l'étude réalisée par le fournisseur. Comme mentionné dans l'ADR, un appel du clinicien pour analyser les cause d'invalidité du test doit être réalisé. Les interférences sont maîtrisées.

**CONTAMINATION**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

Le risque de contamination inter-réactif n'a pas été évalué puisque les dispositifs des tests sont unitaires (pipettes à usage unique, tubes à hémolyse usage unique, etc). L'analyse de risques, la formation et l'habilitation du personnel technique permettent la maîtrise du risque de contamination inter-échantillon

**ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

**Données bibliographiques**

Meridian, Fiche technique Immunocard® *C. difficile* GDH

Argumentaire de la conclusion : La fiche technique des réactifs indique les conditions de conservation (Conserver le coffret entre +2 et +8°C et le remettre rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation), les réactifs doivent être utilisés selon les recommandations du fournisseur (amener tout le coffret, y compris la pochette de cartes de test, entre +20 et +26°C avant utilisation). Ces paramètres n'ont pas été testés mais sont maîtrisés par le laboratoire (Cf. ADR).

**SOUS-PROCESSUS 2 : Détection qualitative des acides nucléiques bactériens codant pour les toxines de *C. difficile* dans les selles par extraction et amplification isothermique**

Portée A  ; Portée B  (à justifier)

**DESCRIPTION DE LA METHODE**

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Détection qualitative des acides nucléiques bactériens codant pour les toxines de <i>C. difficile</i> dans les selles par extraction et amplification isothermique
<b>Principe de la Méthode :</b>	Détection d'acides nucléiques – Biologie moléculaire – PCR isothermique commercialisée
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Selle
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Pot stérile à coproculture Les milieux de transports peuvent être utilisés, à condition qu'ils soient validés par le fournisseur ou que des études aient prouvé leur performance pour le test étudié.
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Homogénéisation du prélèvement et préparation + traitement thermique selon le mode opératoire du fournisseur
<b>Unités :</b>	Absence d'unité, résultat qualitatif
<b>Critères d'interprétation<sup>5</sup> :</b>	Positif // Invalide // Négatif
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	llumipro-10 ref 610172 SN IP2432
<b>Référence du réactif :</b>	llumigene® <i>C. difficile</i> DNA amplification assay - Réf 280050, version notice rev 04/15
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	Réactif de contrôle externe Illumigene® réf 279920
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	Contrôle interne de qualité (CIQ) positif/négatif lors de l'ouverture de chaque nouveau coffret de réactifs. Puits de contrôle interne d'extraction et d'amplification pour chaque test.

<sup>5</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>6</sup></b>	<b>Éléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
<b>Matière (échantillons)</b>	Points critiques déjà évoqués et maîtrisés au moment de la détection de la GDH (sous processus n°1)			
<b>Milieu</b>	Exigences environnementales pour le matériel	8 (2*2*2)	Température ambiante (+21 à +27°C)	Fiche technique du fournisseur Enregistrements et suivi de la température ambiante à la paillasse
<b>Matériel (équipements)</b>	Surveillance des dérives	8 (2*2*2)	Suivi des CIQ à chaque ouverture de coffret Programme d'EEQ	Procédure de gestion des contrôles qualité
	Maîtrise des équipements	6 (1*3*2)	Maintenance/métrologie automate – plaque chauffante – pipettes – bain marie	Enregistrements maintenances et interventions SAV – Calibration thermomètre/cartographie plaque chauffante – Calibration pipettes Maîtrise des performances métrologiques des équipements » (Suivi métrologique
	Contamination	18 (2*3*3)	Respect conditions opératoires fournisseurs + règles d'hygiène du laboratoire	Manipulation sous hotte Fiche technique fournisseur Mode opératoire Nettoyage et désinfection d'une surface de travail
<b>Matériel (réactifs)</b>	Conservation et conditions d'utilisation	4 (1*2*2)	+2 à +27°C, à ramener entre +21 et +27°C lors de chaque test	Suivi métrologique de la chambre froide et de l'environnement à la paillasse Fiche technique fournisseur Formation et habilitation du personnel
	Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks	8 (2*2*2)	Suivi des péremptions Suivi des stocks	Procédure de gestion des stocks – gestion des approvisionnements
<b>Méthode</b>	Traitement manuel des échantillons	12 (2*3*2)	Identification/acquittement lors du début de réalisation Homogénéisation, volume d'échantillon utilisé	Echantillons à identifier/acquitter un par un (en cas de série) Formation du personnel, respect du mode opératoire (IN-LAB 557) Fiche technique fournisseur Formation et habilitation du personnel
	Prétraitement : traitement thermique	4 (1*2*2)	Respect de la température et du temps de chauffage	Notice fournisseur Mode opératoire Formation et habilitation du personnel
	Saisie manuelle des résultats	12 (2*3*2)	Erreur de saisie, lecture, perte des données	Mode opératoire Formation et habilitation du personnel Cahier de traçabilité de la paillasse

<sup>6</sup> A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>6</sup></b>	<b>Eléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
	Performances des techniques	1 (1*1*1)	Vérification de méthode de l'algorithme : résultats conformes Suivi du bain marie à sec	Procédure de validation de méthode Suivi métrologique Mode opératoire
	Surveillance des dérives	8 (2*2*2)	Suivi des CIQ à chaque ouverture de coffret Programme d'EEQ	Procédure de gestion des contrôles qualité
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Compétence et maintien de compétence du personnel	8 (2*2*2)	Formation Habilitation Entretien des compétences	Enregistrements des compétences du personnel : fiche d'habilitation Traçabilité de l'occupation des postes de travail

Le diagramme d'Ishikawa reprenant l'ensemble des risques et leur index de criticité est développé en sous processus 1 et porte sur l'ensemble des trois sous-processus.

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

<b>REPETABILITE</b>							
Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	1 <sup>er</sup> passage	2 <sup>ème</sup> passage	3 <sup>ème</sup> passage	4 <sup>ème</sup> passage	5 <sup>ème</sup> passage	Conclusion
Selle connue positive	5	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Conforme
Selle connue négative	5	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Conforme

Méthode : Les essais ont été réalisés sur des selles provenant de patients, l'une positive et l'autre négative. Cinq mesures ont été réalisées pour chacune, au sein de la même série, par le même opérateur, le même jour

Objectif : 100% de concordance pour l'échantillon positif et négatif.

Argumentaire de la conclusion : En l'absence de recommandations, le nombre de mesures a été établi à 5 par le laboratoire.

Conclusion : La répétabilité du test Alethia™ C. difficile est maîtrisée et conforme aux objectifs du laboratoire.

## FIDELITE INTERMEDIAIRE

Applicable  ; non applicable (à justifier)

Opérateurs évalués	Essai sur site – résultats de la variabilité
1	Positif
2	Positif
3	Positif
4	Positif
5	Positif
6	Positif
7	Positif
8	Positif
9	Positif
10	Positif
11	Positif
12	Positif
13	Positif
14	Positif
15	Positif
<b>Pourcentage de concordance</b>	100%

Méthode : 15 essais ont été réalisés sur la selle d'un patient positif. Quinze mesures ont été réalisées par quinze opérateurs différents. Les essais ont été réalisés sur trois demi-journées en l'espace de dix jours (25, 27/04 et 04/05/16). La reproductibilité sur patients négatifs n'a pas été réalisée pour limiter le cout des réactifs. Des résultats négatifs obtenus sur d'autres selles le même jour, avec même lot de réactifs par des opérateurs différents ont été obtenus en parallèle. De plus, la contamination inter échantillon est maitrisée par le laboratoire (cf. ADR)

Objectif : 100% de concordance de résultat positif.

<sup>7</sup> Conforme/non conforme

Argumentaire de la conclusion : Le nombre de mesures établi à 15 a été justifié en rapport avec l'effectif de personnel technique pouvant être rencontré dans le laboratoire.

Conclusion : La reproductibilité du test Alethia™ C. difficile est maîtrisée et conforme aux attentes du laboratoire.

#### **VARIABILITE INTER-OPERATEURS**

Applicable  ; non applicable

Méthode : Les essais ont été réalisés sur 1 selle congelée d'un même patient. Quinze mesures ont été réalisées par quinze opérateurs différents. Les essais ont été réalisés sur trois demi-journées en l'espace de dix jours (25, 27/04 et 04/05/16). Les résultats sont présentés dans le paragraphe « fidélité intermédiaire ».

Les essais sur selles de patients négatifs n'ont pas été réalisés pour limiter l'utilisation des réactifs. Des résultats négatifs obtenus sur d'autres selles le même jour, avec même lot de réactifs par des opérateurs différents ont été obtenus en parallèle. De plus, la contamination inter échantillon est maîtrisée par le laboratoire (cf ADR)

Objectif : 100% de concordance de résultat positif.

Argumentaire de la conclusion : Le nombre de mesures établi à 15 a été justifié en rapport avec l'effectif de personnel technique pouvant être rencontré dans le LBM.

Conclusion : La variabilité inter-opérateurs du test Alethia™ C. difficile sur selles est maîtrisée et conforme aux attentes du laboratoire.

#### **JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)**

Applicable  ; non applicable (à justifier)

L'absence de programme de CIQ externalisés ne permet pas l'étude de l'exactitude.

La justesse peut être évaluée grâce à la mise en place de CIQ externalisés. Il n'existe pas de programmes ou campagnes de CIQ externalisés disponibles à l'heure actuelle. La société Meridian Bioscience ne propose pas de programmes de CIQ externalisés.

#### **EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)**

Contrôles quantitatifs  ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : Au moment de la réalisation de la validation de méthode, le laboratoire ne disposait pas de programme d'EEQ. L'étude de l'exactitude n' pas pu être réalisée.

L'exactitude peut être évaluée grâce à l'adhésion du laboratoire à un programme d'EEQ et à l'étude des résultats de ces derniers.

Les évaluations externes de la qualité des examens à résultats qualitatifs sont moins fréquentes que pour les examens à résultats quantitatifs, mais il est possible d'en trouver en France ainsi que dans des réseaux ou structures européennes et/ou internationales afin de participer à de telles comparaisons de résultats Par exemple, les programmes tels que NEQAQ, LABQUALITY (distribué par la société R-Biopharm) et QCMD (distribué par la société CSQD Switzerland) sont disponibles.

**SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE**  
**Applicable  ; non applicable (à justifier)**

(Buchan et al., 2012)  
 (Hong et al., 2014)  
 (Lalande et al., 2011)  
 (Neuendorf et al., 2016)  
 (Norén et al., 2011)  
 (Viala et al., 2012)  
 (Ylisiurua et al., 2013)

(Meridian, Fiche technique Alethia® *C. difficile*)

Sensibilité	95,2%
Spécificité	95,3%

Méthode : Analyse des données de la littérature et des données fournisseur.

Objectif : Sensibilité et spécificité acceptables (>95%).

Argumentaire de la conclusion : Selon le Quamic et les données de la littérature, les techniques de biologie moléculaire sont considérées comme acceptables quand elles présentent des valeurs de sensibilité et de spécificité supérieures à 95%.

Conclusion : Les sensibilité et spécificité décrites par le fournisseur et la littérature sont conformes aux attentes du laboratoire.

**LIMITE DE DETECTION**  
**Applicable  ; non applicable**

<b>Limite de détection :</b>	250 UFC/mL (Hong et al., 2014)
------------------------------	--------------------------------

Méthode : Analyse des données de la littérature.

Objectif : Détection des gènes codant pour les toxines dans toutes selles avec présence de *C. difficile* toxinogène.

Argumentaire de la conclusion : D'après les données du fournisseur, la sensibilité analytique décrite plus haut (95,2%) permet d'interpréter la conformité de la limite de détection décrite.

Conclusion : La limite de détection décrite par le fournisseur est conforme aux attentes du laboratoire.

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Goret et al. Gut Pathog (2015) 7:33 DOI 10.1186/s13099-015-0079-8
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :</b>	GDH Diasorin® par CLIA sur Liaison random access
<b>Nombre de mesures :</b>	468 échantillons testés
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	Echantillons positifs et négatifs
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	Analyse des résultats discordants (CT)

Tableau : Performances de tests diagnostiques en comparaison de la CT pour *C. difficile* (Goret et al., 2015)

	(%) Sensitivity (95% CI)	(%) Specificity (95% CI)	Positive predictive value (%) (95% CI)	Negative predictive value (%) (95% CI)
DiaSorin algorithm = CLIA GDH + CLIA toxins A/B	86.7 (68.4–95.6)	99.1 (97.7–99.8)	86.7 (68.3–95.6)	98.1 (97.5–99.7)
Meridian algorithm = EIA GDH + NAAT for toxin gene	90.0 (72.3–97.8)	98.9 (97.4–99.5)	84.4 (66.5–94.1)	99.3 (97.8–99.8)
2-Step Alere algorithm = EIA GDH + EIA toxins A/B	50.0 (31.7–68.3)	99.5 (98.1–99.9)	88.2 (62.2–97.9)	96.7 (94.5–98.1)
3-Step Alere algorithm = EIA GDH + EIA toxins A/B + toxigenic culture	60.0 (40.7–76.7)	99.5 (98.1–99.9)	90.0 (66.8–98.2)	97.3 (95.2–98.5)

CLIA chemiluminescence, GDH glutamate dehydrogenase, EIA enzyme immunoassay, NAAT nucleic acid amplification test, CI 95 % confidence interval

**Méthode :** Le laboratoire a réalisé une analyse comparative des stratégies algorithmiques portant sur 468 selles avant la mise en place de l'algorithme Meridian au laboratoire, Goret et al. Gut Pathog (2015). La recherche de toxine par TAAN n'était pas utilisée auparavant au laboratoire et n'a pas pu être comparée. Toutefois, les résultats de l'algorithme GDH-TAAN et GDH/Toxines-EIA précédemment utilisés ont été obtenus.

**Objectif :** Augmentation significative du nombre de résultats positifs en raison des meilleures performances diagnostiques de l'algorithme Meridian.

**Argumentaire de la conclusion :** D'après les résultats obtenus, le nombre de patients positifs a été doublé (augmentation significative) en utilisant l'algorithme Meridian. La sensibilité diagnostique était de 86,7% pour cet algorithme alors qu'elle était de 50% pour l'algorithme EIA utilisé précédemment.

**Conclusion :** Selon les données de la littérature, le test Alethia™ *C. difficile* est comparable à la culture toxigénique, méthode de référence (91%, cf. paragraphe sensibilité et spécificité analytique). La comparaison des méthodes algorithmiques est conforme aux attentes du laboratoire.

<b>INTERFERENCES</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>
--

**Méthode :** Analyse des données fournisseur, fiche technique (Meridian, Fiche technique Alethia™ *C. difficile*).

**Objectif :** Les substances pouvant interférer lors de la réalisation du test Alethia™ *C. difficile* doivent être connues du laboratoire exécutant en cas de test invalide.

**Argumentaire de la conclusion :** D'après les données du fournisseur, les substances suivantes, présentes dans les selles humaines aux concentrations indiquées, n'ont provoqué aucune interférence sur les résultats du test: sulfate de baryum (5 mg/mL), graisses fécales (équivalentes à 2,65 mg d'acide stéarique plus 1,3 mg d'acide palmitique par mL), hémoglobine (en tant que méthémoglobine) (3,2 mg/mL), IgA (5 mg/mL), Imodium AD® (0,00667 mg/mL), Kaopectate® (0,87 mg/mL), Metronidazole (12,5 mg/mL), mucine (3,33 mg/mL) Mylanta® (4,2 mg/mL), Pepto-Bismol® (0,87 mg/mL), Prilosec® (0,5 mg/mL), Tagamet® (0,5 mg/mL), TUMS® (0,5 mg/mL), Vancomycin (12,5 mg/mL), globules blancs (5 % V/V), sang total (5% V/V).



Conclusion : Le laboratoire connaît les substances pouvant interférer lors du test Alethia™ C. difficile grâce à l'étude réalisée par le fournisseur.

Conclusion : Le laboratoire connaît les substances pouvant interférer lors du test Alethia™ C. difficile grâce à l'étude réalisée par le fournisseur. En cas de test invalide, le test est répété. S'il est à nouveau invalide, la CT (sous-processus 3) permet de s'affranchir des inhibiteurs d'amplification. Les interférences sont maîtrisées.

**CONTAMINATION (**  
**Applicable  ; non applicable (à justifier)**

Le risque de contamination inter-réactif n'a pas été évalué puisque les dispositifs des tests sont unitaires. L'analyse de risques, la formation et l'habilitation du personnel technique permettent la maîtrise du risque de contamination inter-échantillon.

**ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS**  
**(étude expérimentale indispensable en portée B)**  
**(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)**  
**Applicable  ; non applicable (à justifier)**

**Données bibliographiques**

Meridian, Fiche technique Alethia™ C. difficile

Argumentaire de la conclusion : La fiche technique des réactifs indique les conditions de conservation (Conserver la trousse entre +2 et +27°C), les réactifs sont utilisés selon les recommandations du fournisseur (s'assurer que les réactifs de la trousse sont bien à température ambiante, +21 à +27°C, avant de les utiliser. En cas de non respect, des résultats incorrects peuvent être observés). Ces paramètres n'ont pas été testés car ils sont maîtrisés par le laboratoire (Cf. ADR). L'analyse des puits du bain-marie à sec n'a pas été réalisée car celui-ci bénéficie d'un contrôle métrologique (Cf. ADR).

**SOUS-PROCESSUS n°3 : Détection qualitative des acides nucléiques bactériens codant pour les toxines de *C. difficile* sur les colonies isolées en culture à partir de selles par extraction et amplification isothermique**

Portée A  ; Portée B  (à justifier)

**DESCRIPTION DE LA METHODE**

<b>Analyte / Mesurande :</b>	Détection qualitative des acides nucléiques bactériens codant pour les toxines de <i>C. difficile</i> sur les colonies isolées en culture à partir de selles par extraction et amplification isothermique
<b>Principe de la Méthode :</b>	Détection d'acides nucléiques – Biologie moléculaire – PCR isothermique commercialisée
<b>Type d'échantillon primaire :</b>	Culture de <i>C. difficile</i> (colonies)
<b>Type de récipient, additifs :</b>	Milieu de culture CLO® et COS® (bio Mérieux)
<b>Prétraitement de l'échantillon :</b>	Dilution des colonies de <i>C. difficile</i> dans eau physiologique stérile : suspension à 0,5 McF (équivalent à $1,5 \cdot 10^8$ UFC/mL) 50 microlitres de la suspension sont transférés dans la solution d'extraction (solution tampon) Puis pré-traitement thermique selon mode opératoire fournisseur
<b>Unités :</b>	NA, résultat qualitatif
<b>Critères d'interprétation<sup>8</sup> :</b>	Positif // Invalide // Négatif
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Equipement (instrument, analyseur, etc.) :</b>	Illumipro-10 ref 610172 SN IP2432
<b>Référence du réactif :</b>	Illumigene® <i>C. difficile</i> DNA amplification assay - Réf 280050, version notice rev 04/15
<b>Matériau d'étalonnage (références) :</b>	Réactif de contrôle externe Illumigene® réf 279920
<b>Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :</b>	Contrôle interne de qualité positif/négatif lors de l'ouverture de chaque nouveau coffret de réactifs. Témoin interne = contrôle d'extraction et d'amplification pour chaque test.

<sup>8</sup> Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

<b>MAITRISE DES RISQUES</b> (le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>9</sup></b>	<b>Eléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
<b>Matière (échantillons)</b>	Identité	6 (2*3*1)	Identification des cultures Etiquetage	Formation et information du personnel Maintien des compétences Procédure d'identitovigilance Paramétrage informatique
	Type de gélose sur laquelle le <i>C. difficile</i> est ensemencé Atmosphère	8 (2*2*2)	Gélose sélective CLO® pour mise en évidence optimale de <i>C. difficile</i> , réisolement des colonies pures sur gélose COS®. Culture en anaérobiose	Mode opératoire Formation et habilitation du personnel Maintien des compétences Métrologie Indicateurs de suivi de l'enceinte anaérobiose
	Nature, volume et choix des colonies	8 (2*2*2)	Identification correcte du <i>C. difficile</i> (caractéristiques, identification MALDI-TOF®) Repiquage si nécessaire pour quantité de colonies suffisantes (>3UFC/boite) Echantillon de plusieurs colonies (palier à la coexistence de souches toxigènes et non toxigènes)	Mode opératoire Formation du personnel et maintien des compétences
	Délai et température de conservation avant traitement analytique	2 (1*1*2)	Conservation de la souche avant analyse (après culture 48H en anaérobiose à +35°C).	Essai sur site : non critique pour âge de la culture (jusqu'à 5j) et conditions de conservation (+4,+20 à 26, +35°C, en air ambiant ou anaérobiose) Cf Robustesse Mode opératoire Formation et habilitation du personnel
<b>Milieu</b>	Exigences environnementales pour le matériel	8 (2*2*2)	Température ambiante (+21 à +27°C)	Exigences / fiche technique du fournisseur Enregistrements et suivi de la température ambiante à la paillasse Formation et habilitation du personnel
<b>Matériel (équipements)</b>	Surveillance des dérives	3 (1*3*1)	CIQ à chaque ouverture de coffret	Procédure de gestion des contrôles qualité
	Maîtrise des équipements	6 (1*3*2)	Maintenance/métrologie automate – plaque chauffante – pipettes – densitomètre	Enregistrements maintenances et interventions SAV - Calibration thermomètre/cartographie plaque chauffante – Calibration pipettes Maîtrise des performances métrologiques des équipements Suivi par le biomédical

<sup>9</sup> A préciser par le laboratoire, par exemple 1 non critique – 5 très critique ;

**MAITRISE DES RISQUES**  
(le laboratoire adaptera les points critiques à maîtriser à partir du tableau ci-dessous pour chaque paramètre vérifié/validé)

<b>EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE</b>				
<b>5M</b>	<b>Points critiques</b>	<b>Echelle de criticité<sup>9</sup></b>	<b>Eléments à maîtriser</b>	<b>Moyens de maîtrise (formation du personnel, vérification expérimentale, jeux d'essai, ...) / Documents (procédure, instruction, enregistrement, ...)</b>
	Contamination	18 (2*3*3)	Respect conditions opératoires fournisseurs + règles d'hygiène du laboratoire	Manipulation des colonies sous hotte Fiche technique Mode opératoire de nettoyage et désinfection d'une surface de travail Formation et habilitation du personnel
<b>Matériel (réactifs)</b>	Conservation et conditions d'utilisation	4 (1*2*2)	+2 à +27°C, à ramener entre +21 et +27°C lors de chaque test	Formation et habilitation du personnel Fiche technique Mode opératoire Suivi métrologique de la chambre froide et de l'environnement à la pailasse
	Acceptation à réception des réactifs, gestion des stocks	8 (2*2*2)	Suivi des péremptions Suivi des stocks	Procédure de gestion des stocks – gestion des approvisionnements
<b>Méthode</b>	Traitement manuel des échantillons	12 (2*3*2)	Identification lors du début de réalisation Nombre et type de colonies à prélever Homogénéisation, volume de prise d'essai	Echantillons à identifier un par un (en cas de série) Formation et habilitation du personnel Mode opératoire Fiche technique fournisseur
	Prétraitement : -préparation de la solution à 0,5 McF	2 (1*2*1)	Concentration suffisante de la solution, à partir de plusieurs colonies (>=3)	Formation et habilitation du personnel Mode opératoire Notice technique
	-traitement thermique	4 (1*2*2)	Respect de la température et du temps de chauffage	
	Rendu manuel des résultats	18 (2*3*3)	Erreur de lecture, saisie, perte des données	Cahier de traçabilité de la pailasse Formation et habilitation du personnel Mode opératoire
<b>Main d'œuvre (Personnel)</b>	Compétence et maintien de compétence du personnel	8 (2*2*2)	Formation Habilitation Entretien des compétences	Enregistrements des compétences du personnel : fiche d'habilitation Habilitation réalisation sur culture Traçabilité de l'occupation des postes de travail

Le diagramme d'Ishikawa reprenant l'ensemble des risques et leur index de criticité est développé en sous processus 1 et porte sur l'ensemble des trois sous processus.

REPETABILITE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>							
Echantillons	Nombre de valeurs (N)	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5	Conclusion <sup>10</sup>
Souche F	5	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Conforme
Souche CD 630	5	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif	Conforme
Blanc	4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	-	Conforme

Méthode : Les essais ont été réalisés sur deux souches de référence toxigènes F et CD 630. Cinquante microlitres d'une suspension de *C. difficile* à 0,5 McF (équivalent à  $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL) étaient utilisés pour chaque test. Cinq mesures ont été réalisées pour chacune des souches, au sein de la même série, par le même opérateur, le même jour. Les témoins négatifs ont été évalués lors des essais concernant la limite de détection, réalisés le même jour par le même opérateur (04/05/16).

Objectif : 100% de concordance pour l'échantillon positif et négatif.

Argumentaire de la conclusion : En l'absence de recommandations, le nombre de mesures a été établi à 5 par le laboratoire.

Conclusion : La répétabilité du test Alethia™ *C. difficile* sur colonies est maîtrisée et conforme aux objectifs du laboratoire.

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>
--

Opérateurs évalués	Essai sur site – résultats de la variabilité
1	Positif
2	Positif
3	Positif
4	Positif
5	Positif
6	Positif
7	Positif
8	Positif
9	Positif
10	Positif
11	Positif
12	Positif
13	Positif
14	Positif
15	Positif
<b>Pourcentage de concordance</b>	100%

Méthode : Quinze essais ont été réalisés à partir de la souche de référence F. Quinze analyses à partir d'une culture différente ont été réalisées par quinze opérateurs différents. Les essais ont été réalisés sur trois demi-journées en l'espace de dix jours (25, 27/04 et 04/05/16).

La reproductibilité sur échantillons négatifs (colonies non *C. difficile* ou eau stérile) n'a pas été réalisée pour limiter l'utilisation des réactifs. La technique est spécifique. La contamination inter échantillon est maîtrisée par le laboratoire (cf ADR).

Objectif : 100% de concordance de résultat positif.

Argumentaire de la conclusion : Le nombre de mesures établi à 15 a été justifié en rapport avec l'effectif de personnel technique pouvant être rencontré dans n'importe quel LBM.

Conclusion : La reproductibilité du test Alethia™ *C. difficile* est maîtrisée et conforme aux attentes du laboratoire.

**VARIABILITE INTER-OPERATEURS**  
Applicable  ; non applicable

Méthode : Quinze essais ont été réalisés à partir de la souche de référence F. Quinze analyses à partir d'une culture différente ont été réalisées par quinze opérateurs différents. Les essais ont été réalisés sur trois demi-journées en l'espace de dix jours (25, 27/04 et 04/05/16).

La reproductibilité sur échantillons négatifs (colonies non *C. difficile* ou eau stérile) n'a pas été réalisée pour limiter l'utilisation des réactifs. La technique est spécifique. La contamination inter échantillon est maîtrisée par le laboratoire (cf ADR). Les résultats sont présentés dans le paragraphe « fidélité intermédiaire ».

Objectif : 100% de concordance de résultat positif.

Argumentaire de la conclusion : Le nombre de mesures établi à 15 a été justifié en rapport avec l'effectif de personnel technique pouvant être rencontré dans n'importe quel LBM.

Conclusion : La variabilité inter-opérateurs du test Alethia™ *C. difficile* sur colonies est maîtrisée et conforme aux attentes du laboratoire.

**JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés)**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

L'absence de programme de CIQ externalisés ne permet pas l'étude de l'exactitude.

La justesse peut être évaluée grâce à la mise en place de CIQ externalisés. Il n'existe pas de programmes ou campagnes de CIQ externalisés disponibles à l'heure actuelle. La société Meridian Bioscience ne propose pas de programmes de CIQ externalisés.

**EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ)**  
Contrôles quantitatifs  ; Contrôles qualitatifs

Argumentaire de la conclusion : Au moment de la réalisation de la validation de méthode, le laboratoire ne disposait pas de programme d'EEQ. L'étude de l'exactitude n'a pas pu être réalisée.

L'exactitude peut être évaluée grâce à l'adhésion du laboratoire à un programme d'EEQ et à l'étude des résultats de ces derniers.

Les évaluations externes de la qualité des examens à résultats qualitatifs sont moins fréquentes que pour les examens à résultats quantitatifs, mais il est possible d'en trouver en France ainsi que dans des réseaux ou structures européennes et/ou internationales afin de participer à de telles comparaisons de résultats. Par exemple, telles que le CTCB (Centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie) et l'association Biologie prospective proposent des programmes permettant la réception de souches de références mais la présence d'une souche de *C. difficile* n'est pas systématique.

**SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE**  
**(étude expérimentale indispensable en portée B)**  
**Applicable  ; non applicable (à justifier)**

Souche testée	Résultat
Souche 1	Positif
Souche 2	Positif
Souche 3	Positif
Souche 4	Positif
Souche 5	Positif
Souche 6	Positif
Souche7	Positif
Souche 8	Positif
Souche 9	Positif
Souche 10	Positif
Souche 11	Positif
Souche 12	Positif
Souche 13	Positif
Souche 14	Positif
Souche 15	Positif
Souche 16	Positif
Souche 17	Positif
Souche 18	Positif
Souche 19	Positif
Souche 20	Positif
Souche 21	Positif
Souche 22	Positif
<b>Pourcentage de concordance</b>	<b>100%</b>

Méthode : La spécificité du test a été évaluée grâce aux souches cliniques provenant de vingt-deux patients atteints d'ICD sévère et caractérisées par PCR de référence au laboratoire expert partenaire du CNR *C. difficile*. Les essais ont été effectués par le même opérateur, le même jour (05/05/16), au cours de différentes séries, à partir de suspensions des colonies à 0,5 McF. L'évaluation de la conformité des résultats a été réalisée par comparaison des résultats obtenus avec la méthode de référence.

Objectif : 100% de concordance

Argumentaire de la conclusion : Seule la spécificité a été évaluée par essais sur site. Il n' pas été choisi de tester des échantillons négatifs devant le risque négligeable de faux positifs par une méthode de biologie moléculaire. De plus, le test Alethia™ *C. difficile* est déjà validé sur les selles par le fournisseur avec analyse de la spécificité vis à vis de souches bactériennes. La sensibilité diagnostique n'a pas été démontrée sur site car elle est déjà bien décrite dans la littérature. en effet, Neuendorf et al (Neuendorf et al. BMC Microbiology, 2016) ont montré que le test Alethia™ *C. difficile* est comparable à la culture toxigénique, méthode de référence, avec une concordance de 91%.

Conclusion : L'étude des performances de la technique est conforme aux attentes du laboratoire.

**LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
**Applicable  ; non applicable**

Concentrations en UFC/ml	Turbidimétrie en McF	Résultat qualitatif	
		Souche F	Souche CD 630
1,5.10 <sup>8</sup>	5.10 <sup>-1</sup>	Positif	Positif
1,5.10 <sup>7</sup>	5.10 <sup>-2</sup>	Positif	Positif
1,5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>-3</sup>	Positif	Positif
1,5.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>-4</sup>	Positif	Positif
1,5.10 <sup>4</sup>	5.10 <sup>-5</sup>	Positif	Positif
1,5.10 <sup>3</sup>	5.10 <sup>-6</sup>	Négatif	Négatif
7,5.10 <sup>3</sup>	2,5.10 <sup>-6</sup>	Négatif	Négatif
3,75.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>-6</sup>	Positif	Négatif
9,4.10 <sup>2</sup>	7,5.10 <sup>-7</sup>	Positif	Négatif
4,7.10 <sup>2</sup>	1,5.10 <sup>-7</sup>	Négatif	Positif

**Méthode :** La limite de détection a été déterminée à partir d'une gamme de dilutions d'une suspension de colonies de *C. difficile* dans de l'eau physiologique stérile à partir des souches de référence F et CD 630. La suspension initiale avait une concentration de 1,5.10<sup>8</sup> UFC/mL correspondant à une densité optique de 0,5McF mesurée à l'aide d'un densitomètre (bioMérieux). Des dilutions de raison 10 ont été réalisées en cascade jusqu'à la concentration de 1,5.10<sup>3</sup> UFC/mL. Puis elles ont été poursuivies avec un facteur de dilution égal à deux jusqu'à la concentration de 4,7.10<sup>2</sup> UFC/mL.

**Objectif :** Déterminer la limite de détection de la méthode, en vue de la standardisation de la technique (choix d'une concentration de colonies bien plus élevée que la limite de détection pour éviter tout risque de faux-négatifs).

**Argumentaire de la conclusion :** La limite de détection a été déterminée comme étant la concentration la plus basse pour laquelle les résultats positifs concordants étaient obtenus pour les deux souches de référence F et CD 630. La limite de détection a été arrêtée à 1,5.10<sup>4</sup> UFC/mL.

**Conclusion :** La détermination de la limite de détection est conformes aux attentes du laboratoire. La concentration retenue de la suspension pour réaliser le test Alethia™ *C. difficile* sur colonies est de 1,5.10<sup>8</sup> UFC/mL, soit 0,5 McF. Il s'agit d'une dilution facile à mettre en œuvre au laboratoire par le personnel technique.

**COMPARAISON DE METHODES :**  
**Applicable  ; non applicable (à justifier)**

<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Exploitation des données d'ICD graves : envoi et caractérisation des souches en cause au centre expert du CHU de Toulouse
<b>Méthodes comparées : méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareils en miroir ou back-up, EBMD, ...</b>	PCR multiplex maison de référence et analyse des produits d'amplification par migration sur gel
<b>Nombre de mesures :</b>	22
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	Echantillons positifs
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	Analyse de concordance
<b>Exploitation des résultats de comparaison (diagramme de différences, concordance catégorielle) :</b>	Aucun résultat discordant 100% de concordance

**Méthode :** 22 souches cliniques distinctes ont été analysées en culture toxigénique avec le test Alethia™ *C. difficile*. Elles avaient été envoyées en parallèle au centre expert du CHU de Toulouse (laboratoire expert, associé au CNR *C. difficile*) pour PCR ribotypage en raison de leur implication dans des tableaux d'ICD graves. Les résultats des 22 souches sont revenus positifs en PCR multiplex et en Alethia™ *C. difficile*.



Objectif : Le laboratoire veut s'assurer de la comparabilité de sa méthode avec la technique proposée par le laboratoire partenaire du CNR. Le but est d'obtenir plus de 99% de comparabilité entre les deux méthodes.

Argumentaire de la conclusion : Les résultats obtenus ont montré une concordance de 100% avec les résultats attendus.

Conclusion : D'après les résultats obtenus, le test Alethia™ C. difficile sur culture est comparable à la PCR multiplex du laboratoire de référence (100%). La comparaison de méthodes est conforme aux attentes du laboratoire.

Le nombre minimum d'échantillons requis pour la comparaison des méthodes est établi à 30 selon le SH GTA 04. Cependant, le QUAMIC préconise un nombre de 10 échantillons lors de la comparaison de la méthode avec la culture, et de 20 échantillons lorsque la méthode est comparée à une méthode autre que la culture. Nous ne disposons pas de souches supplémentaires au laboratoire.

**INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

L'impact des interférences potentielles est évalué par le contrôle interne à chaque dispositif de test.

De plus, le test Alethia™ C. difficile est validé sur les selles pour lesquelles les substances interférentes sont nombreuses alors que nous travaillons sur des colonies isolées mises en suspension dans de l'eau stérile. Nous considérons ainsi que le risque d'interférence est négligeable.

**CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B)**  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

Le risque de contamination inter-réactif n'a pas été évalué puisque les dispositifs des tests sont unitaires.

L'analyse de risques, la formation et l'habilitation du personnel technique permettent la maîtrise du risque de contamination inter-échantillon.

**ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS**  
(étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)

Paramètre de variation	Souche		
		F	CD 630
Délai de culture	48h	+/+/+	+/+/+
	72h	+/+/+	+/+/+
	5j	+/+/+	+/+/+
Conservation en aérobic	+4°C	+/+/+	+/+/+
	TA	+/+/+	+/+/+
	+35°C	+/+/+	+/+/+
Conservation à TA	1h	+/+/+	+/+/+
	4h	+/+/+	+/+/+
	24h	+/+/+	+/+/+

Méthode : La robustesse a été étudiée sur les deux souches de référence en faisant varier l'âge des colonies (2, 3 ou 5 jours de culture en étuve anaérobie à 35°C), les températures de conservation des géloses après culture (+4°C, +20-25°C, +35°C) et les conditions atmosphériques de conservation (anaérobie ou aérobie) des cultures. Les essais étaient réalisés en triplicate sur les deux souches pour chacun des paramètres étudiés. La suspension à 0,5 McF était utilisée. Les essais ont été réalisés par le même opérateur, sur plusieurs jours.

Objectif : Le laboratoire souhaite prouver que la confirmation du caractère toxigène des colonies de *C. difficile* peut se révéler possible jusqu'à 5 jours après le début de mise en culture, quelle que soit la température et l'atmosphère de conservation.

Argumentaire de la conclusion : La confirmation du caractère toxigène des colonies de *C. difficile* peut se révéler possible jusqu'à 5 jours après le début de mise en culture, quelle que soit la température et l'atmosphère de conservation.

Conclusion : L'étude de la robustesse est conforme aux attentes du laboratoire.

Lors de l'analyse de la robustesse de la méthode, les paramètres analysés correspondent à ceux observés en routine au laboratoire. Il appartient à chaque LBM d'identifier et analyser les paramètres entrant en compte dans l'évaluation de la robustesse.

## 4. Discussion

Nous avons proposé une validation et un formulaire SH FORM 43 pour l'algorithme diagnostique des ICD de la société Meridian Bioscience, à partir de selles et de colonies de *C. difficile* isolées en culture. Nous avons respecté les recommandations du guide technique d'accréditation en portée A et B des méthodes de biologie médicale (SH GTA 04), nous permettant ainsi de répondre aux exigences d'accréditation selon le COFRAC. Nous n'avons présenté que la validation du processus analytique mais les processus pré-analytique et post-analytiques doivent être maîtrisés. Cette maîtrise s'effectue, entre-autres, par la formation, l'habilitation et le maintien de compétences du personnel ; par la gestion du paramétrage informatique ; par la mise à jour du catalogue des examens ; par le suivi des avancées concernant la méthode dans la littérature (mise à jour des références bibliographiques), etc.

Les points de l'analyse de risque retenus comme « critiques » sont ceux pour lesquels l'indice de criticité calculé était le plus élevé. Parmi les points les plus critiques, sont retrouvés les conditions d'acheminements des échantillons pour les tests Immunocard® *C. difficile* GDH et Alethia™ *C. difficile* sur selles, les conditions d'utilisation des réactifs (Immunocard® *C. difficile* GDH), la manipulation technique et la lecture couplée à la saisie manuelle du résultat pour les trois tests, et la contamination via du matériel souillé pour le test Alethia™ *C. difficile* sur selle et sur culture. Concernant les conditions d'acheminement des échantillons, ces derniers étaient, au moment de l'étude, acheminés à température ambiante au laboratoire de bactériologie. Or les recommandations du fournisseur des tests ImmunoCard® GDH et Alethia™ *C. difficile* stipulent bien la nécessité de conserver les échantillons de selle à +4°C jusqu'à 5 jours. La durée tolérée de conservation de l'échantillon à température ambiante après l'émission n'est pas précisée. Ceci peut faire l'objet d'une étude d'impact en évaluant l'influence de la conservation à température ambiante des selles avant réalisation des tests ImmunoCard® GDH et Alethia™ *C. difficile*. Cette étude d'impact porte sur le processus pré-analytique tandis que notre travail porte sur le processus analytique seul, et n'a donc pas été réalisée dans cette thèse. La maîtrise des processus pré-analytique, analytique et post-analytique est nécessaire. Les conditions d'utilisation des réactifs du test ImmunoCard® GDH posent également problème. Ils doivent être conservés entre +2 et +4°C, et ramenés à température ambiante avant chaque test. Du fait de la fréquence des demandes et de l'éloignement entre la pailleuse et le lieu de conservation à +4°C, les réactifs peuvent être laissés à température ambiante plusieurs heures. L'effet de cet usage sur la conservation des réactifs n'est pas connu. Une étude d'impact peut également être réalisée afin de prouver l'absence d'influence sur les résultats des tests ImmunoCard® GDH, et la formation du personnel technique approfondie en ce sens. Le traitement manuel des échantillons, l'acquittement du prélèvement à l'identification du test, ainsi que l'homogénéisation et le volume de prise d'essai sont également des points critiques. L'ensemble de ces manipulations nécessite un opérateur alerte, sensibilisé à l'identification, et formé à la technique réalisée (respect des recommandations fournisseur pour le traitement de l'échantillon). La lecture du résultat, sa saisie manuelle sur le SIL et la perte de données potentielle sont également critiques. En cas de demandes concomitantes, l'erreur de lecture du résultat et de retranscription manuelle dans le SIL est possible. Enfin, si l'échantillon n'est pas identifié correctement au sein d'une série réalisée sur le

lecteur Alethia, que la position du test n'est pas retenue et que le résultat n'est pas récupéré immédiatement après la fin du test, il peut être perdu. Ces derniers points nécessitent une formation rigoureuse et une sensibilisation du personnel technique. La contamination du test via le matériel souillé est possible lors de la réalisation du test Alethia™ *C. difficile*, par défaut de respect des conditions opératoires (manipulation sous hotte, sens de circulation lors de tests de biologie moléculaire), des conditions d'entretien et d'hygiène. Les règles de désinfection du matériel et de la paillasse doivent être impérativement respectées et font partie de la formation du personnel technique. Tous ces points sont à maîtriser pour l'accréditation de l'algorithme.

La validation de méthode de l'algorithme diagnostique d'ICD proposé par Meridian Bioscience est accessible à n'importe quel LBM souhaitant accréditer cette technique. Les essais sur site préconisés par le SH GTA 04 sont simples à réaliser.

Ce formulaire SH FORM 43 constitue une proposition de validation de méthode et est soumis à amélioration continue. Il illustre les informations des référentiels. Des informations plus précises concernant la validation des méthodes EIA et TAAN au sein du référentiel QUAMIC proposé par la SFM et du guide technique SH GTA 04 proposé par le COFRAC, ainsi que la publication d'articles, de posters ou de communications dans la littérature à ce sujet seraient d'une aide précieuse pour les LBM souhaitant soumettre à accréditation cet algorithme diagnostique.

## 5. Conclusion

La validation de méthode de l'algorithme diagnostique d'ICD proposé par la société Meridian Bioscience peut être réalisée facilement dans les LBM. Les référentiels et guides techniques, ainsi que les formulaires proposés par le COFRAC sont des outils nécessaires et indispensables à la réalisation des dossiers de validation de méthode. Toutefois, l'absence de standardisation des référentiels de microbiologie quant à la validation de méthode des algorithmes diagnostiques des ICD constitue un frein à la démarche qualité.

Comme dans toute démarche qualité, la proposition de ce dossier de validation de méthode est soumise à remarques, modifications et amélioration continue, dans le but de satisfaire pleinement aux exigences de l'accréditation et aux spécificités de chaque LBM. Ce travail a pour finalité de faciliter les démarches qualité de tous les LBM.

## Bibliographie

Buchan, B.W., Mackey, T.-L.A., Daly, J.A., Alger, G., Denys, G.A., Peterson, L.R., Kehl, S.C., and Ledebor, N.A. (2012). Multicenter Clinical Evaluation of the Portrait Toxigenic *C. difficile* Assay for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* Strains in Clinical Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 50, 3932–3936.

COFRAC (2012). SH GTA 06 : Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale.

COFRAC (2015a). SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale.

COFRAC (2015b). SH FORM 43 : Fiche type de vérification (portée A) / validation (portée B) d'une méthode de biologie médicale.

COFRAC (2017). SH REF 08 : Expression et évaluation des portées d'accréditation.

Goret, J., Blanchi, J., Eckert, C., Lacombe, S., Petit, A., Barbut, F., Bébéar, C., and Mégraud, F. (2015). Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Gut Pathog* 7.

Hong, G., Park, K.S., Ki, C.-S., and Lee, N.Y. (2014). Evaluation of the illumigene *C. difficile* assay for toxigenic *Clostridium difficile* detection: a prospective study of 302 consecutive clinical fecal samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 80, 177–180.

Lalande, V., Barrault, L., Wadel, S., Eckert, C., Petit, J.-C., and Barbut, F. (2011). Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. *J Clin Microbiol* 49, 2714–2716.

Magill, S.S., Edwards, J.R., Bamberg, W., Beldavs, Z.G., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., et al. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated Infections. *New England Journal of Medicine* 370, 1198–1208.

Meridian, Fiche technique Alethia® *C. difficile*.

Meridian, Fiche technique Immunocard® *C. difficile* GDH.

Neuendorf, M., Guadarrama-Gonzalez, R., Lamik, B., and MacKenzie, C.R. (2016). A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic

culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. BMC Microbiol. 16, 19.

Norén, T., Ariksson, I., Andersson, J., Åkerlund, T., and Unemo, M. (2011). Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for *Clostridium difficile* Detection Challenges Cytotoxin B Cell Test and Culture as Gold Standard. J Clin Microbiol 49, 710–711.

Staneck, J.L., Weckbach, L.S., Allen, S.D., Siders, J.A., Gilligan, P.H., Coppitt, G., Kraft, J.A., and Willis, D.H. (1996). Multicenter Evaluation of Four Methods for *Clostridium difficile* Detection: ImmunoCard C. difficile, Cytotoxin Assay, Culture, and Latex Agglutination. 34, 4.

Turgeon, D.K., Novicki, T.J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Ulness, B., Cent, A., Ashley, R., Larson, A., Coyle, M., et al. (2003). Six Rapid Tests for Direct Detection of *Clostridium difficile* and Its Toxins in Fecal Samples Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. J Clin Microbiol 41, 667–670.

Viala, C., Le Monnier, A., Maataoui, N., Rousseau, C., Collignon, A., and Poilane, I. (2012). Comparison of commercial molecular assays for toxigenic *Clostridium difficile* detection in stools: BD GeneOhm Cdiff, XPert C. difficile and illumigene C. difficile. J. Microbiol. Methods 90, 83–85.

[www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).

Ylisiurua, P., Koskela, M., Vainio, O., and Tuokko, H. (2013). Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins. Scand. J. Infect. Dis. 45, 19–25.

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Depuis vingt ans, il est établi que *C. difficile* est devenu un acteur incontournable des diarrhées associées aux soins dans les pays industrialisés. A partir du milieu des années 2000 aux Etats-Unis et en Europe, l'apparition d'épidémies liée aux clones hypervirulents ainsi que l'émergence d'infections communautaires sont des éléments confirmant le rôle de *C. difficile* en tant que problème majeur de santé publique.

Dans cette étude, nous avons proposé une solution à la survenue de résultats invalides lors de la réalisation du test Alethia™ *C. difficile* dans les selles, ne permettant pas de statuer sur l'absence ou la présence de *C. difficile* toxigène. La culture toxigénique, méthode de référence du diagnostic des ICD, est une méthode longue (48 à 72h) mais très sensible. L'application du TAAN Alethia™ aux colonies de *C. difficile* obtenues en culture a été réalisée dans le but de s'affranchir des résultats invalides de ce même TAAN dans les selles, lors de la présence d'inhibiteurs de l'amplification génique. Le test Alethia™ *C. difficile* n'étant pas validé par le fournisseur pour la recherche des gènes codant pour les toxines à partir de la culture de *C. difficile*, nous avons décidé de valider cette technique en respectant les recommandations du guide technique d'accréditation de validation des méthodes de biologie médicale, le SH GTA 04 (COFRAC, 2015). Nous avons ainsi pu proposer de compléter l'algorithme mis en place au laboratoire en cas de test Alethia™ *C. difficile* invalide. Cette alternative permet, pour n'importe quel LBM utilisant cet algorithme diagnostique, de pouvoir répondre, malgré un test invalide sur selles, à la question posée par les cliniciens prescripteurs, et ce sans équipement supplémentaire. De plus, la réalisation du test Alethia™ *C. difficile* sur culture est simple à mettre en place. La limite principale de cette technique est l'allongement du délai d'obtention du résultat, puisque la culture de *C. difficile* nécessite 48 à 72h de délai, *versus* quelques heures lorsque le résultat peut directement être obtenu à partir des selles.

Cette validation permettait également de répondre aux exigences d'accréditation du COFRAC et de la norme NF EN ISO 15189. Elles nous ont permis de remplir les conditions à une validation en portée B. En effet, l'accréditation des LBM par le COFRAC doit être réalisée pour la totalité des analyses en 2020. Nous avons également réalisé les vérifications nécessaires à la validation de méthode de l'algorithme diagnostique. L'algorithme diagnostique complet constituant un processus complexe, trois sous-processus ont été étudiés. Les sous-processus de la détection de GDH et de la réalisation du TAAN dans les selles ont fait l'objet d'une étude en portée A, tandis que le sous-processus de la réalisation de TAAN à partir de cultures de *C. difficile* a fait l'objet d'une étude en portée B. L'ensemble des paramètres vérifiés selon les directives du SH GTA 04 sont présentés au sein d'un formulaire SH FORM 43. En l'absence de publications indépendantes et d'exemples proposés par les sociétés savantes, nous avons proposé un SH FORM 43 pré-rempli diffusable à l'ensemble des LBM afin de les aider à accréditer cette méthode diagnostique. La culture de *C. difficile* en tant que sous-processus complémentaire n'a pas été traitée. Cette dernière peut faire l'objet d'une validation de méthode à part entière, dont la référence peut être utilisée au sein de l'ensemble des dossiers de validation de méthode utilisant la culture. De plus, notre travail ne porte



que sur le processus analytique. Les processus pré et post-analytiques n'ont pas été étudiés à l'occasion de cette thèse mais doivent être maîtrisés.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a permis de compléter l'algorithme Meridian utilisé pour le diagnostic des ICD au CHU de Bordeaux, d'en vérifier et référencer les différentes étapes au sein d'un formulaire SH FORM 43, en vue d'une accréditation de la technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- Advisory Committee Associated Infection (ARHAI) (2012). Updated guidance on the diagnosis and reporting of *Clostridium difficile*.
- Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (2016). La transplantation de microbiote fécal et son encadrement dans les essais cliniques.
- Aichinger, E., Schleck, C.D., Harmsen, W.S., Nyre, L.M., and Patel, R. (2008). Nonutility of Repeat Laboratory Testing for Detection of *Clostridium difficile* by Use of PCR or Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol* 46, 3795–3797.
- Al Momani, L.A., Abughanimeh, O., Boonpherg, B., Gabriel, J.G., and Young, M. (2018). Fidaxomicin vs Vancomycin for the Treatment of a First Episode of *Clostridium difficile* Infection: A Meta-analysis and Systematic Review. *Cureus*.
- Al Saif, N., and Brazier, J.S. (1996). The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *Journal of Medical Microbiology* 45, 133–137.
- Alam, M.J., Anu, A., Walk, S.T., and Garey, K.W. (2014). Investigation of potentially pathogenic *Clostridium difficile* contamination in household environs. *Anaerobe* 27, 31–33.
- Ali, S., Moore, G., and Wilson, A.P.R. (2011). Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants. *Journal of Hospital Infection* 79, 97–98.
- Al-Jumaili, I.J., Shibley, M., Lishman, A.H., and Record, C.O. (1984). Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *J. Clin. Microbiol.* 19, 77–78.
- Al-Nassir, W.N., Sethi, A.K., Nerandzic, M.M., Bobulsky, G.S., Jump, R.L.P., and Donskey, C.J. (2008). Comparison of Clinical and Microbiological Response to Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Disease with Metronidazole and Vancomycin. *Clin Infect Dis* 47, 56–62.
- Alvarado, A.S., Brodsky, S.V., Nadasdy, T., and Singh, N. (2014). Hemolytic uremic syndrome associated with *Clostridium difficile* infection. *Clin. Nephrol.* 81, 302–306.
- Ananthkrishnan, A.N. (2011). *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 8, 17–26.
- Androga, G.O., Hart, J., Foster, N.F., Charles, A., Forbes, D., and Riley, T.V. (2015). Infection with Toxin A-Negative, Toxin B-Negative, Binary Toxin-Positive *Clostridium difficile* in a Young Patient with Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol* 53, 3702–3704.
- Anosova, N.G., Brown, A.M., Li, L., Liu, N., Cole, L.E., Zhang, J., Mehta, H., and Kleanthous, H. (2013). Systemic antibody responses induced by a two-component *Clostridium difficile* toxoid vaccine protect against *Clostridium difficile*-associated disease in hamsters. *J. Med. Microbiol.* 62, 1394–1404.
- Arimoto, J., Horita, N., Kato, S., Fuyuki, A., Higurashi, T., Ohkubo, H., Endo, H., Takashi, N., Kaneko, T., and Nakajima, A. (2016). Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 6.
- Aslam, S., Hamill, R.J., and Musher, D.M. (2005). Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *The Lancet Infectious Diseases* 5, 549–557.
- Awad, M.M., Johanesen, P.A., Carter, G.P., Rose, E., and Lyras, D. (2014). *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes* 5, 579–593.
- Bakri, M., and al. (2009). *Clostridium difficile* in Ready-to-Eat Salads, Scotland. *Emerging Infectious Diseases Journal - CDC* 15.
- Baliban, S.M., Michael, A., Shammassian, B., Mudakha, S., Khan, A.S., Cocklin, S., Zentner, I.,

- Latimer, B.P., Bouillaut, L., Hunter, M., et al. (2014). An optimized, synthetic DNA vaccine encoding the toxin A and toxin B receptor binding domains of *Clostridium difficile* induces protective antibody responses in vivo. *Infect. Immun.* *82*, 4080–4091.
- Banz, A., Lantz, A., Riou, B., Foussadier, A., Miller, M., Davies, K., and Wilcox, M. (2018). Sensitivity of Single-Molecule Array Assays for Detection of *Clostridium difficile* Toxins in Comparison to Conventional Laboratory Testing Algorithms. *J. Clin. Microbiol.* *56*.
- Barbut, F. (2015). How to eradicate *Clostridium difficile* from the environment. *Journal of Hospital Infection* *89*, 287–295.
- Barbut, F., Richard, A., Hamadi, K., Chomette, V., Burghoffer, B., and Petit, J.-C. (2000). Epidemiology of Recurrences or Reinfections of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* *38*, 2386–2388.
- Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B., Thien, H.V., Grimprel, E., and Petit, J.-C. (2002). Prevalence and Genetic Characterization of Toxin A Variant Strains of *Clostridium difficile* among Adults and Children with Diarrhea in France. *Journal of Clinical Microbiology* *40*, 2079–2083.
- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmée, M., Brazier, J., Kuijper, E., and Poxton, I. (2007). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clinical Microbiology and Infection* *13*, 1048–1057.
- Barbut, F., Beaugerie, L., and Petit, J.-C. (2008). *Clostridium difficile* et pathologie digestive. *Maladies infectieuses*.
- Barbut, F., Ramé, L., Petit, A., Suzon, L., de Chevigny, A., and Eckert, C. (2015). Prévalence des infections à *Clostridium difficile* chez les patients hospitalisés avec une diarrhée : résultats d'une étude française prospective multicentrique. *La Presse Médicale* *44*, e75–e83.
- Barbut, F., Bouée, S., Longepierre, L., Goldberg, M., Bensoussan, C., and Levy-Bachelot, L. (2018a). Excess mortality between 2007 and 2014 among patients with *Clostridium difficile* infection: a French health insurance database analysis. *Journal of Hospital Infection* *98*, 21–28.
- Barbut, F., Eckert, C., and Le Monnier, A. (2018b). *Clostridium difficile*. In REMIC, pp. 533–539.
- Barra-Carrasco, J., Hernández-Rocha, C., Ibáñez, P., Guzmán-Durán, A.M., Álvarez-Lobos, M., and Paredes-Sabja, D. (2014). *Clostridium difficile* spores and its relevance in the persistence and transmission of the infection. *Rev Chilena Infectol* *31*, 694–703.
- Barth, H., Aktories, K., Popoff, M.R., and Stiles, B.G. (2004). Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* *68*, 373–402.
- Bartlett, J.G. (1994). *Clostridium difficile*: History of Its Role as an Enteric Pathogen and the Current State of Knowledge About the Organism. *Clin Infect Dis* *18*, S265–S272.
- Bartlett, J.G. (2006). Narrative Review: The New Epidemic of *Clostridium difficile*-Associated Enteric Disease. *Annals of Internal Medicine* *145*, 758.
- Bartlett, J.G., and Gerding, D.N. (2008). Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* *46*, S12–S18.
- Bartlett, J.G., and Gorbach, S.L. (1977). Pseudomembranous enterocolitis (antibiotic-related colitis). *Adv Intern Med* *22*, 455–476.
- Bartlett, J.G., Onderdonk, A.B., Cisneros, R.L., and Kasper, D.L. (1977). Clindamycin-Associated Colitis Due to a Toxin-Producing Species of *Clostridium* in Hamsters. *J Infect Dis* *136*, 701–705.

- Bartlett, J.G., Chang, T.W., Gurwith, M., Gorbach, S.L., and Onderdonk, A.B. (1978a). Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis Due to Toxin-Producing Clostridia. *New England Journal of Medicine* 298, 531–534.
- Bartlett, J.G., Moon, N., Chang, T.W., Taylor, N., and Onderdonk, A.B. (1978b). Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 75, 778–782.
- Bartsch, S.M., Umscheid, C.A., Nachamkin, I., Hamilton, K., and Lee, B.Y. (2015). Comparing the economic and health benefits of different approaches to diagnosing *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 21, 77.e1-77.e9.
- Bauer, M.P., Notermans, D.W., van Benthem, B.H., Brazier, J.S., Wilcox, M.H., Rupnik, M., Monnet, D.L., van Dissel, J.T., and Kuijper, E.J. (2011). *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. *The Lancet* 377, 63–73.
- Beinortas, T., Burr, N.E., Wilcox, M.H., and Subramanian, V. (2018). Comparative efficacy of treatments for *Clostridium difficile* infection: a systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 1035–1044.
- Best, E.L., Fawley, W.N., Parnell, P., and Wilcox, M.H. (2010). The Potential for Airborne Dispersal of *Clostridium difficile* from Symptomatic Patients. *Clin Infect Dis* 50, 1450–1457.
- Bibbò, S., Lopetuso, L.R., Ianiro, G., Di Rienzo, T., Gasbarrini, A., and Cammarota, G. (2014). Role of microbiota and innate immunity in recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Immunol Res* 2014, 462740.
- Bidet, P., Barbut, F., Lalande, V., Burghoffer, B., and Petit, J.-C. (1999). Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS Microbiology Letters* 175, 261–266.
- Biggs, M., Iqbal, T., Holden, E., Clewer, V., and Garvey, M.I. (2019). Effect of using fidaxomicin on recurrent *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection* 102, 165–167.
- Birgand, G., Blanckaert, K., Carbonne, A., Coignard, B., Barbut, F., Eckert, C., Grandbastien, B., Kadi, Z., and Astagneau, P. (2010). Investigation of a large outbreak of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006-2007 and associated clusters in 2008-2009. *Eurosurveillance* 15, 19597.
- Blaich, A., Frei, R., Castellano, C., Kiessling, C., Geschke, A., Rentsch, K.M., and Egli, A. (2017). Evaluation of two novel chemiluminescence immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase and toxin A&B. *Journal of Microbiological Methods* 135, 63–65.
- Blanchi, J., Goret, J., and Mégraud, F. (2016). *Clostridium difficile* Infection: A Model for Disruption of the Gut Microbiota Equilibrium. *Digestive Diseases* 34, 217–220.
- Bomers, M.K., van Agtmael, M.A., Luik, H., van Veen, M.C., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., and Smulders, Y.M. (2012). Using a dog's superior olfactory sensitivity to identify *Clostridium difficile* in stools and patients: proof of principle study. *BMJ* 345, e7396.
- Borriello, S.P. (1990). 12th C. L. Oakley lecture. Pathogenesis of *Clostridium difficile* infection of the gut. *J. Med. Microbiol.* 33, 207–215.
- Brown, N.A., Lebar, W.D., Young, C.L., Hankerd, R.E., and Newton, D.W. (2011). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: comparison of four methods on specimens collected in Cary-Blair transport medium and tcdB PCR on fresh versus frozen samples. *Infect Dis Rep* 3, e5.
- Buchan, B.W., Mackey, T.-L.A., Daly, J.A., Alger, G., Denys, G.A., Peterson, L.R., Kehl, S.C., and Ledebuer, N.A. (2012). Multicenter Clinical Evaluation of the Portrait Toxigenic *C. difficile* Assay for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* Strains in Clinical Stool Specimens. *J Clin Microbiol* 50, 3932–3936.

- Burke, K.E., and Lamont, J.T. (2014). *Clostridium difficile* Infection: A Worldwide Disease. *Gut Liver* 8, 1–6.
- Buyse, S., Azoulay, E., Barbut, F., and Schlemmer, B. (2005). Infection à *Clostridium difficile* : physiopathologie, diagnostic et traitement. *Réanimation* 14, 255–263.
- Calabi, E., Ward, S., Wren, B., Paxton, T., Panico, M., Morris, H., Dell, A., Dougan, G., and Fairweather, N. (2001). Molecular characterization of the surface layer proteins from *Clostridium difficile*. *Molecular Microbiology* 40, 1187–1199.
- Carpenter, B.P., Hennessey, E.K., Bryant, A.M., Khoury, J.A., and Crannage, A.J. (2016). Identification of Factors Impacting Recurrent *Clostridium difficile* Infection and Development of a Risk Evaluation Tool. *J Pharm Pharm Sci* 19, 349–356.
- Carson, K.C., Boseiwaqa, L.V., Thean, S.K., Foster, N.F., and Riley, T.V. (2013). Isolation of *Clostridium difficile* from faecal specimens - A comparison of chromID *C. difficile* agar and cycloserine-cefoxitin-fructose agar. *J. Med. Microbiol.* 62, 1423–1427.
- Carter, G.P., Lyras, D., Allen, D.L., Mackin, K.E., Howarth, P.M., O'Connor, J.R., and Rood, J.I. (2007). Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. *J. Bacteriol.* 189, 7290–7301.
- Carter, G.P., Chakravorty, A., Pham Nguyen, T.A., Mileto, S., Schreiber, F., Li, L., Howarth, P., Clare, S., Cunningham, B., Sambol, S.P., et al. (2015). Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *MBio* 6, e00551.
- CASFM (2019). Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - Recommandations 2019 V1.
- Cassir, N., Delarozière, J.-C., Dubourg, G., Delord, M., Lagier, J.-C., Brouqui, P., Fenollar, F., Raoult, D., and Fournier, P.E. (2016). A Regional Outbreak of *Clostridium difficile* PCR-Ribotype 027 Infections in Southeastern France from a Single Long-Term Care Facility. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 37, 1337–1341.
- Centre National de Référence Bactéries anaérobies et botulisme, and Laboratoires associés *C. difficile* (2013). Rapport annuel d'activité 2012.
- Centre National de Référence Bactéries anaérobies et botulisme, and Laboratoires associés *C. difficile* (2014). Rapport annuel d'activité 2013.
- Centre National de Référence Bactéries anaérobies et botulisme, and Laboratoires associés *C. difficile* (2015). Rapport annuel d'activité 2014.
- Chang, T.W., Gorbach, S.L., and Bartlett, J.B. (1978). Neutralization of *Clostridium difficile* toxin by *Clostridium sordellii* antitoxins. *Infect. Immun.* 22, 418–422.
- Chitnis, A.S., Holzbauer, S.M., Belflower, R.M., Winston, L.G., Bamberg, W.M., Lyons, C., Farley, M.M., Dumyati, G.K., Wilson, L.E., Beldavs, Z.G., et al. (2013). Epidemiology of Community-Associated *Clostridium difficile* Infection, 2009 Through 2011. *JAMA Intern Med* 173, 1359–1367.
- CMIT (2018). ECN PILLY: maladies infectieuses et et tropicales. (MED-LINE EDITIONS - EDUC).
- Code de la santé publique - Article L6221-1.
- COFRAC (2015). SH GTA 04 : Guide technique d'accréditation de vérification (portée A) / validation (portée B) des méthodes en biologie médicale.
- Cohen, S.H., Gerding, D.N., Johnson, S., Kelly, C.P., Loo, V.G., McDonald, L.C., Pepin, J., Wilcox,

- M.H., Society for Healthcare Epidemiology of America, and Infectious Diseases Society of America (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.
- Coignard, B., Barbut, F., Blanckaert, K., Thiolet, J.M., Pujol, I., Carbonne, A., Petit, J.C., and Desenclos, J.C. (2006). Emergence of *Clostridium difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027-associated disease, France, 2006. *Weekly Releases (1997–2007)* 11, 3044.
- Comité des Universitaires des Maladies Infectieuses et Tropicales (2016). Recommandations thérapeutiques infections à *Clostridium difficile*.
- Committee on Infectious Diseases (2013). *Clostridium difficile* Infection in Infants and Children. *Pediatrics* 131, 196–200.
- Communication Sanofi (2017). Sanofi met fin au développement du vaccin contre *Clostridium difficile*.
- Cornely, O.A., Miller, M.A., Louie, T.J., Crook, D.W., and Gorbach, S.L. (2012). Treatment of First Recurrence of *Clostridium difficile* Infection: Fidaxomicin Versus Vancomycin. *Clin Infect Dis* 55, S154–S161.
- Cowardin, C.A., Buonomo, E.L., Saleh, M.M., Wilson, M.G., Burgess, S.L., Kuehne, S.A., Schwan, C., Eichhoff, A.M., Koch-Nolte, F., Lyras, D., et al. (2016). The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. *Nat Microbiol* 1, 16108.
- Crobach, M.J.T., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H., and Kuijper, E.J. (2009). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): Data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clinical Microbiology and Infection* 15, 1053–1066.
- Crobach, M.J.T., Planche, T., Eckert, C., Barbut, F., Terveer, E.M., Dekkers, O.M., Wilcox, M.H., and Kuijper, E.J. (2016). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 22, S63–S81.
- Curry, S.R., Marsh, J.W., Schlackman, J.L., and Harrison, L.H. (2012). Prevalence of *Clostridium difficile* in Uncooked Ground Meat Products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4183–4186.
- Davies, K.A., Longshaw, C.M., Davis, G.L., Bouza, E., Barbut, F., Barna, Z., Delmée, M., Fitzpatrick, F., Ivanova, K., Kuijper, E., et al. (2014). Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). *The Lancet Infectious Diseases* 14, 1208–1219.
- Davies, K.A., Ashwin, H., Longshaw, C.M., Burns, D.A., Davis, G.L., Wilcox, M.H., and Group, on behalf of the E. study (2016). Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. *Eurosurveillance* 21, 30294.
- Debast, S.B., Bauer, M.P., and Kuijper, E.J. (2014). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clinical Microbiology and Infection* 20, 1–26.
- Deshpande, A., Pasupuleti, V., Rolston, D.D.K., Jain, A., Deshpande, N., Pant, C., and Hernandez, A.V. (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–e90.
- Deshpande, A., Pasupuleti, V., Thota, P., Pant, C., Rolston, D.D.K., Sferra, T.J., Hernandez, A.V., and Donskey, C.J. (2013). Community-associated *Clostridium difficile* infection and antibiotics: a meta-

analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1951–1961.

Dingle, K.E., Didelot, X., Quan, T.P., Eyre, D.W., Stoesser, N., Marwick, C.A., Coia, J., Brown, D., Buchanan, S., Ijaz, U.Z., et al. (2019). A Role for Tetracycline Selection in Recent Evolution of Agriculture-Associated *Clostridium difficile* PCR Ribotype 078. *MBio* **10**.

Dorp, S.M. van, Kinross, P., Gastmeier, P., Behnke, M., Kola, A., Delmée, M., Pavelkovich, A., Mentula, S., Barbut, F., Hajdu, A., et al. (2016). Standardised surveillance of *Clostridium difficile* infection in European acute care hospitals: a pilot study, 2013. *Eurosurveillance* **21**, 30293.

Dubberke, E.R., Reske, K.A., Noble-Wang, J., Thompson, A., Killgore, G., Mayfield, J., Camins, B., Woeltje, K., McDonald, J.R., McDonald, L.C., et al. (2007). Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *American Journal of Infection Control* **35**, 315–318.

Dupont, H.L. (2013). Diagnosis and management of *Clostridium difficile* infection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 1216–1223; quiz e73.

Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., and Matamouros, S. (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *Journal of Medical Microbiology* **57**, 685–689.

Eckert, C., and Barbut, F. (2010). Infections à *Clostridium difficile*. *Med Sci (Paris)* **26**, 153–158.

Eckert, C., Lalande, V., and Barbut, F. (2011). Diagnostic des infections à *Clostridium difficile*. [/data/revues/22106545/v13i2/S2210654511000287/](#).

Eckert, C., Burghoffer, B., and Barbut, F. (2013a). Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. *Journal of Medical Microbiology* **62**, 1435–1438.

Eckert, C., Coignard, B., Hebert, M., Tarnaud, C., Tessier, C., Lemire, A., Burghoffer, B., Noel, D., and Barbut, F. (2013b). Clinical and microbiological features of *Clostridium difficile* infections in France: The ICD-RAISIN 2009 national survey. *Médecine et Maladies Infectieuses* **43**, 67–74.

Eckert, C., Jones, G., and Barbut, F. (2013c). Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: the molecular approach. *Future Microbiology* **8**, 1587–1598.

Eckert, C., Emirian, A., Le Monnier, A., Cathala, L., De Montclos, H., Goret, J., Berger, P., Petit, A., De Chevigny, A., Jean-Pierre, H., et al. (2014a). Prevalence and pathogenicity of binary toxin–positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. *New Microbes New Infect* **3**, 12–17.

Eckert, C., Holscher, E., Petit, A., Lalande, V., and Barbut, F. (2014b). Molecular Test Based on Isothermal Helicase-Dependent Amplification for Detection of the *Clostridium difficile* Toxin A Gene. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2386–2389.

Eckert, C., Lalande, V., and Barbut, F. (2015a). Colites à *Clostridium difficile*. *La revue du praticien* **65**, 5.

Eckert, C., Marchandin, H., and Barbut, F. (2015b). *Clostridium difficile*. *EMC - Biologie Médicale* **90-05-0115-A**.

Eckert, C., Marchandin, H., Lemée, L., Bouvet, P., Cavalié, L., Jean-Pierre, H., and Barbut, F. (2015c). Quelles méthodes utiliser pour le diagnostic des infections à *Clostridium difficile*? *La lettre de l'infectiologie* **6**.

Eglow, R., Pothoulakis, C., Itzkowitz, S., Israel, E.J., O'Keane, C.J., Gong, D., Gao, N., Xu, Y.L., Walker, W.A., and LaMont, J.T. (1992). Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J. Clin. Invest.* **90**, 822–829.

Elkafrawy, A.A., Saeed, L., Tomaw, A., Numan, L., and Boyd, S. (2019). Adherence to the testing guidelines for *Clostridium difficile* toxin in stool improved the rates of hospital acquired *Clostridium*

*difficile* infection. *Gastroenterology* 156, S-894.

Enoch, D.A., Santos, R., Phillips, C.J., Micallef, C., Murphy, M.E., Aliyu, S.H., Massey, D., and Brown, N.M. (2018). Real-world use of fidaxomicin in a large UK tertiary hospital: how effective is it for treating recurrent disease? *Journal of Hospital Infection* 100, 142–146.

Esfandiari, Z., Jalali, M., Ezzatpanah, H., Weese, J.S., and Chamani, M. (2014). Prevalence and Characterization of *Clostridium difficile* in Beef and Mutton Meats of Isfahan Region, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 7, e16771.

European Centre for Disease Prevention and Control (2013). Point prevalence survey of healthcare associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm.

European Centre for Disease Prevention and Control (2018). Annual Epidemiological Report for 2016 - *Clostridium difficile* infections.

Fagan, R.P., Janoir, C., Collignon, A., Mastrantonio, P., Poxton, I.R., and Fairweather, N.F. (2011). A proposed nomenclature for cell wall proteins of *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology* 60, 1225–1228.

Fekety, R., Silva, J., Kauffman, C., Buggy, B., and Gunner Deery, H. (1989). Treatment of antibiotic-associated *Clostridium difficile* colitis with oral vancomycin: Comparison of two dosage regimens. *The American Journal of Medicine* 86, 15–19.

Fekety, R., McFarland, L.V., Surawicz, C.M., Greenberg, R.N., Elmer, G.W., and Mulligan, M.E. (1997). Recurrent *Clostridium difficile* Diarrhea: Characteristics of and Risk Factors for Patients Enrolled in a Prospective, Randomized, Double-Blinded Trial. *Clin Infect Dis* 24, 324–333.

Ferguson, J.K., Cheng, A.C., Gilbert, G.L., Gottlieb, T., Korman, T., McGregor, A., Richards, M., Roberts, S., Robson, J., Gessel, H.V., et al. (2011). *Clostridium difficile* laboratory testing in Australia and New Zealand: national survey results and Australasian Society for Infectious Diseases recommendations for best practice. *Pathology* 43, 482–487.

Finney, J.M. (1893). Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull Johns Hopkins Hospital Journal* 53–55.

Gao, Q., and Huang, H. (2015). Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Yi Chuan* 37, 458–464.

García-Lechuz, J.M., Hernangómez, S., Juan, R.S., Peláez, T., Alcalá, L., and Bouza, E. (2001). Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection* 7, 453–457.

Garey, K.W., Sethi, S., Yadav, Y., and DuPont, H.L. (2008). Meta-analysis to assess risk factors for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Journal of Hospital Infection* 70, 298–304.

Garrigues, P., Roux, T.D., Wanono, E., and Mathieu, A. (2016). Arthrite réactionnelle à *Clostridium difficile*: à propos de 2 observations et revue de la littérature. [/data/revues/02488663/v37sS1/S0248866316302247/](#).

Gentry, C.A., Nguyen, P.K., Thind, S., Kurdgelashvili, G., Skrepnek, G.H., and Williams, R.J. (2019). Fidaxomicin versus oral vancomycin for severe *Clostridium difficile* infection: a retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 987–993.

George, W.L., Rolfe, R.D., Harding, G.K., Klein, R., Putnam, C.W., and Finegold, S.M. (1982). *Clostridium difficile* and cytotoxin in feces of patients with antimicrobial agent-associated pseudomembranous colitis. *Infection* 10, 205–208.

Gerding, D.N., Muto, C.A., and Owens, R.C. (2008). Measures to control and prevent *Clostridium difficile* infection. *Clin. Infect. Dis.* 46 *Suppl* 1, S43-49.



Gerding, D.N., Sambol, S.P., and Johnson, S. (2018). Non-toxicogenic Clostridioides (Formerly Clostridium) difficile for Prevention of C. difficile Infection: From Bench to Bedside Back to Bench and Back to Bedside. *Front Microbiol* 9.

Gerhard, R., Nottrott, S., Schoentaube, J., Tatge, H., Olling, A., and Just, I. (2008). Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Med. Microbiol.* 57, 765–770.

Geric, B., Carman, R.J., Rupnik, M., Genheimer, C.W., Sambol, S.P., Lyerly, D.M., Gerding, D.N., and Johnson, S. (2006). Binary Toxin–Producing, Large Clostridial Toxin–Negative *Clostridium difficile* Strains Are Enterotoxic but Do Not Cause Disease in Hamsters. *J Infect Dis* 193, 1143–1150.

Goldenberg, S.D., and French, G.L. (2011). Lack of association of tcdC type and binary toxin status with disease severity and outcome in toxigenic *Clostridium difficile*. *J. Infect.* 62, 355–362.

Goret, J., Blanchi, J., Eckert, C., Lacombe, S., Petit, A., Barbut, F., Bébéar, C., and Mégraud, F. (2015). Comparison of a novel chemiluminescent based algorithm to three algorithmic approaches for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Gut Pathog* 7.

Goret, J., Blanchi, J., Floch, P., Peuchant, O., Chrisment, D., Sanchez, R., Biessy, H., Lemarié, R., Leysse, D., Loutfi, B., et al. (2018). Impact of the introduction of a nucleic acid amplification test for *Clostridium difficile* diagnosis on stool rejection policies. *Gut Pathog* 10.

Govind, R., and Dupuy, B. (2012). Secretion of *Clostridium difficile* Toxins A and B Requires the Holin-like Protein TcdE. *PLOS Pathogens* 8, e1002727.

Hall IC, and O'Toole E. (1935). Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child* 1935;49:390-402.

Hennequin, C., Porcheray, F., Waligora-Dupriet, A., Collignon, A., Barc, M., Bourlioux, P., and Karjalainen, T. (2001). GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 87–96.

Hennequin, C., Janoir, C., Barc, M.-C., Collignon, A., and Karjalainen, T. (2003). Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2779–2787.

Hensgens, M.P.M., Keessen, E.C., Squire, M.M., Riley, T.V., Koene, M.G.J., de Boer, E., Lipman, L.J.A., and Kuijper, E.J. (2012). *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? *Clinical Microbiology and Infection* 18, 635–645.

Hirvonen, J.J., and Kaukoranta, S.-S. (2015). Comparison of BD Max Cdiff and GenomEra C. difficile molecular assays for detection of toxigenic *Clostridium difficile* from stools in conventional sample containers and in FecalSwabs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34, 1005–1009.

Hong, G., Park, K.S., Ki, C.-S., and Lee, N.Y. (2014). Evaluation of the illumigene *C. difficile* assay for toxigenic *Clostridium difficile* detection: a prospective study of 302 consecutive clinical fecal samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 80, 177–180.

Hoover, D.G., and Rodriguez-Palacios, A. (2013). Transmission of *Clostridium difficile* in Foods. *Infectious Disease Clinics of North America* 27, 675–685.

<https://clinicaltrials.gov/>.

Hu, M.Y., Katchar, K., Kyne, L., Maroo, S., Tummala, S., Dreisbach, V., Xu, H., Leffler, D.A., and Kelly, C.P. (2009). Prospective Derivation and Validation of a Clinical Prediction Rule for Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Gastroenterology* 136, 1206–1214.

Huang, H., Weintraub, A., Fang, H., and Nord, C.E. (2009). Antimicrobial resistance in *Clostridium*

*difficile*. International Journal of Antimicrobial Agents 34, 516–522.

Humphries, R.M., Uslan, D.Z., and Rubin, Z. (2013). Performance of *Clostridium difficile* Toxin Enzyme Immunoassay and Nucleic Acid Amplification Tests Stratified by Patient Disease Severity. Journal of Clinical Microbiology 51, 869–873.

Institut de Veille Sanitaire (2010). Infections à *Clostridium difficile* : situation épidémiologique, France, juillet 2009-juin 2010.

Institut de Veille Sanitaire - Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (2006). Conduite à tenir : diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *Clostridium difficile*. [Http://www.invs.sante.fr/raisin/](http://www.invs.sante.fr/raisin/).

Janezic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., and Rupnik, M. (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. PLOS ONE 11, e0167101.

Jangi, S., and Lamont, J.T. (2010). Asymptomatic Colonization by *Clostridium difficile* in Infants: Implications for Disease in Later Life: Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 51, 2–7.

Jank, T., and Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends in Microbiology 16, 222–229.

Jardine, C.M., Reid-Smith, R.J., Rousseau, J., and Weese, J.S. (2013). Detection of *Clostridium difficile* in Small and Medium-sized Wild Mammals in Southern Ontario, Canada. Jwdi 49, 418–421.

Joseph, R., Demeyer, D., Vanrenterghem, D., van den Berg, R., Kuijper, E., and Delmée, M. (2005). First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium. Euro Surveill. 10, E051020.4.

Jullian-Desayes, I., Landelle, C., Mallaret, M.-R., Brun-Buisson, C., and Barbut, F. (2017). *Clostridium difficile* contamination of health care workers' hands and its potential contribution to the spread of infection: Review of the literature. American Journal of Infection Control 45, 51–58.

Jump, R.L.P., Pultz, M.J., and Donskey, C.J. (2007). Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *Clostridium difficile*-associated diarrhea? Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51, 2883–2887.

Just, I., and Gerhard, R. (2004). Large clostridial cytotoxins. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 152, 23–47.

Keessen, E., Harmanus, C., Dohmen, W., and Lipman, L. (2013). *Clostridium difficile* Infection Associated with Pig Farms - Volume 19, Number 6—June 2013 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emergous Infectious Disease.

Khan, M.Y., and Hall, W.H. (1966). Staphylococcal Enterocolitis—Treatment with Oral Vancomycin. Annals of Internal Medicine 65, 1.

Khanna, S., Pardi, D.S., Aronson, S.L., Kammer, P.P., Orenstein, R., St. Sauver, J.L., Harmsen, W.S., and Zinsmeister, A.R. (2012). The Epidemiology of Community-acquired *Clostridium difficile* infection: A population-based study. Am J Gastroenterol 107, 89–95.

Kim, J., Seo, M.-R., Kang, J.O., Kim, Y., Hong, S.-P., and Pai, H. (2014). Clinical characteristics of relapses and re-infections in *Clostridium difficile* infection. Clinical Microbiology and Infection 20, 1198–1204.

Knight, D.R., Elliott, B., Chang, B.J., Perkins, T.T., and Riley, T.V. (2015). Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Rev 28, 721–741.

Knoop, F.C., Owens, M., and Crocker, I.C. (1993). *Clostridium difficile*: clinical disease and diagnosis.

Clin Microbiol Rev 6, 251–265.

Kola, A., Behnke, M., Gastmeier, P., Dorp, S.M. van, Kuijper, E.J., Kinross, P., Sutens, C., and European Centre for Disease Prevention and Control (2015). European surveillance of *Clostridium difficile* infections: surveillance protocol version 2.1. (Stockholm: ECDC).

Koss, K., Clark, M.A., Sanders, D.S.A., Morton, D., Keighley, M.R.B., and Goh, J. (2006). The outcome of surgery in fulminant *Clostridium difficile* colitis. *Colorectal Disease* 8, 149–154.

Kovacs-Simon, A., Leuzzi, R., Kasendra, M., Minton, N., Titball, R.W., and Michell, S.L. (2014). Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 210, 274–284.

Kuehne, S.A., Cartman, S.T., Heap, J.T., Kelly, M.L., Cockayne, A., and Minton, N.P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 467, 711–713.

Kuehne, S.A., Collery, M.M., Kelly, M.L., Cartman, S.T., Cockayne, A., and Minton, N.P. (2014). Importance of Toxin A, Toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *The Journal of Infectious Diseases* 209, 83–86.

Kuijper, E.J., Coignard, B., and Tüll, P. (2006a). Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 2–18.

Kuijper, E.J., van den Berg, R.J., and Debast, S. (2006b). *Clostridium difficile* Ribotype 027, Toxinotype III, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases Journal - CDC* 12.

Kwon, J.H., Lanzas, C., Reske, K.A., Hink, T., Seiler, S.M., Bommarito, K.M., Burnham, C.-A.D., and Dubberke, E.R. (2016). An Evaluation of Food as a Potential Source for *Clostridium difficile* Acquisition in Hospitalized Patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 37, 1401–1407.

Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., and Kelly, C.P. (2000). Asymptomatic Carriage of *Clostridium difficile* and Serum Levels of IgG Antibody against Toxin A. *New England Journal of Medicine* 342, 390–397.

Kyne, L., Warny, M., Qamar, A., and Kelly, C.P. (2001). Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *The Lancet* 357, 189–193.

Lalande, V., Barbut, F., and Petit, J.-C. (2004). Diagnostic bactériologique des infections liées à *Clostridium difficile*. *data/revues/03389898/20040368/0480026X/ 2004*, 57–63.

Lalande, V., Barrault, L., Wadel, S., Eckert, C., Petit, J.-C., and Barbut, F. (2011). Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections. *J Clin Microbiol* 49, 2714–2716.

Lamont, J.T. (2002). Theodore E. Woodward Award. How bacterial enterotoxins work: insights from in vivo studies. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 113, 167–180; discussion 180-181.

Lantz, P.-G., Matsson, M., Wadström, T., and Rådström, P. (1997). Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *Journal of Microbiological Methods* 28, 159–167.

Lawley, T.D., Croucher, N.J., Yu, L., Clare, S., Sebahia, M., Goulding, D., Pickard, D.J., Parkhill, J., Choudhary, J., and Dougan, G. (2009). Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. *J. Bacteriol.* 191, 5377–5386.

Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L., and Finegold, S.M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40, 95–99.

Le Guern, R., Herwegh, S., Courcol, R., and Wallet, F. (2013). Molecular methods in the diagnosis of *Clostridium difficile* infections: an update. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 13, 681–692.

Leffler, D.A., and Lamont, J.T. (2009). Treatment of *Clostridium difficile*-Associated Disease.

Gastroenterology 136, 1899–1912.

Leffler, D.A., and Lamont, J.T. (2015). *Clostridium difficile* infection. N. Engl. J. Med. 372, 1539–1548.

Lemée, L., and Pons, J.-L. (2004). Les méthodes de typage appliquées à *Clostridium difficile*: principes et intérêts. Revue française des laboratoires 7.

Lessa, F.C., Gould, C.V., and McDonald, L.C. (2012). Current Status of *Clostridium difficile* Infection Epidemiology. Clin Infect Dis 55, S65–S70.

Li, J.-J., Xiong, C., Liu, Y., Liang, J.-S., and Zhou, X.-W. (2016). Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Emergence As an Alternative Technology for Herbal Medicine Identification. Front Plant Sci 7, 1956.

Loo, V.G., Oughton, M., Bourgault, A.-M., Kelly, M., Dewar, K., and Monczak, Y. (2005). A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*–associated diarrhea with high morbidity and mortality. The New England Journal of Medicine 353, 1273–1281.

Loo, V.G., Bourgault, A.-M., Poirier, L., Lamothe, F., Michaud, S., Turgeon, N., Toye, B., Beaudoin, A., Frost, E.H., Gilca, R., et al. (2011). Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. New England Journal of Medicine 365, 1693–1703.

Louie, T.J., Cannon, K., Byrne, B., Emery, J., Ward, L., Eyben, M., and Krulicki, W. (2012). Fidaxomicin Preserves the Intestinal Microbiome During and After Treatment of *Clostridium difficile* Infection (CDI) and Reduces Both Toxin Reexpression and Recurrence of CDI. Clin Infect Dis 55, S132–S142.

Lowy, I., Molrine, D.C., Leav, B.A., Blair, B.M., Baxter, R., Gerding, D.N., Nichol, G., Thomas, W.D., Leney, M., Sloan, S., et al. (2010). Treatment with Monoclonal Antibodies against *Clostridium difficile* Toxins. New England Journal of Medicine 362, 197–205.

Lyras, D., O'Connor, J.R., Howarth, P.M., Sambol, S.P., Carter, G.P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., et al. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. Nature 458, 1176–1179.

Magill, S.S., Edwards, J.R., Bamberg, W., Beldavs, Z.G., Dumyati, G., Kainer, M.A., Lynfield, R., Maloney, M., McAllister-Hollod, L., Nadle, J., et al. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care–associated Infections. New England Journal of Medicine 370, 1198–1208.

Manabe, Y.C., Vinetz, J.M., Moore, R.D., Merz, C., Charache, P., and Bartlett, J.G. (1995). *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis. Ann. Intern. Med. 123, 835–840.

Manthey, C.F., Eckmann, L., and Fuhrmann, V. (2017). Therapy for *Clostridium difficile* infection – any news beyond Metronidazole and Vancomycin? Expert Review of Clinical Pharmacology 10, 1239–1250.

Marler, L.M., Siders, J.A., Wolters, L.C., Pettigrew, Y., Skitt, B.L., and Allen, S.D. (1992). Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. J. Clin. Microbiol. 30, 514–516.

Martínez-Meléndez, A., Camacho-Ortiz, A., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H.J., Villarreal-Treviño, L., and Garza-González, E. (2017). Current knowledge on the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. World Journal of Gastroenterology 23, 1552.

Mashock, M.J., Faron, M.L., Buchan, B.W., and Ledebor, N.A. (2017). Evaluation of Copan FecalSwab as Specimen Type for Use in Xpert C. difficile Assay. Journal of Clinical Microbiology 55, 3123–3129.

Matamouros, S., England, P., and Dupuy, B. (2007). *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. Molecular Microbiology 64, 1274–1288.

- Mattila, E., Arkkila, P., Mattila, P.S., Tarkka, E., Tissari, P., and Anttila, V.-J. (2013). Extraintestinal *Clostridium difficile* Infections. *Clin Infect Dis* 57, e148–e153.
- Maugat, S., Ponties, V., and Colomb-Cotinat, M. (2018). Bilan 2001-2017 des signalements externes d'infections nosocomiales. Part des signalements impliquant une bactérie multirésistante, hautement résistante-émergente ou un *Clostridium difficile*. 8.
- McCarthy, J., and Stingemore, N. (1999). *Clostridium difficile* infection of a prosthetic joint presenting 12 months after antibiotic-associated diarrhoea. *Journal of Infection* 39, 94–96.
- McDonald, L.C., Owens, R.C., and Johnson, S. (2005). An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine* 9.
- McDonald, L.C., Gerding, D.N., Johnson, S., Bakken, J.S., Carroll, K.C., Coffin, S.E., Dubberke, E.R., Garey, K.W., Gould, C.V., Kelly, C., et al. (2018). Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clin Infect Dis* 66, e1–e48.
- McFarland, L.V. (2008). Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiology* 3, 563–578.
- McFarland, L.V. (2009). Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe* 15, 274–280.
- McFarland, L.V., Mulligan, M.E., Kwok, R.Y.Y., and Stamm, W.E. (1989). Nosocomial Acquisition of *Clostridium difficile* Infection. *New England Journal of Medicine* 320, 204–210.
- Metcalfe, D., Avery, B.P., Janecko, N., Matic, N., Reid-Smith, R., and Weese, J.S. (2011). *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe* 17, 85–86.
- Monot, M., Eckert, C., Lemire, A., Hamiot, A., Dubois, T., Tessier, C., Dumoulard, B., Hamel, B., Petit, A., Lalande, V., et al. (2015). *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. *Sci Rep* 5.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., and Mégraud, F. (1997). Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35, 995–998.
- Neal, M.D., Alverdy, J.C., Hall, D.E., Simmons, R.L., and Zuckerbraun, B.S. (2011). Diverting loop ileostomy and colonic lavage: an alternative to total abdominal colectomy for the treatment of severe, complicated *Clostridium difficile* associated disease. *Annals of Surgery* 254, 423.
- Neuendorf, M., Guadarrama-Gonzalez, R., Lamik, B., and MacKenzie, C.R. (2016). A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *BMC Microbiol.* 16, 19.
- Norén, T., Alriksson, I., Andersson, J., Åkerlund, T., and Unemo, M. (2011). Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for *Clostridium difficile* Detection Challenges Cytotoxin B Cell Test and Culture as Gold Standard. *J Clin Microbiol* 49, 710–711.
- Norén, T., Unemo, M., Magnusson, C., Eiserman, M., and Matussek, A. (2014). Evaluation of the rapid loop-mediated isothermal amplification assay Illumigene for diagnosis of *Clostridium difficile* in an outbreak situation. *APMIS* 122, 155–160.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28, e63–e63.
- Numan, S.C., Veldkamp, P., Kuijper, E.J., Berg, R.J. van den, and Dissel, J.T. van (2007). *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: bovine anti-*Clostridium difficile* whey protein to help aid the prevention of

relapses. *Gut* 56, 888–889.

Oikarinen, S., Tauriainen, S., Viskari, H., Simell, O., Knip, M., Virtanen, S., and Hyöty, H. (2009). PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J. Clin. Virol.* 44, 211–214.

Oren, A., and Rupnik, M. (2018). *Clostridium difficile* and *Clostridioides difficile*: Two validly published and correct names. *Anaerobe* 52, 125–126.

Otter, J.A., Yezli, S., Salkeld, J.A.G., and French, G.L. (2013). Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. *American Journal of Infection Control* 41, S6–S11.

Paredes-Sabja, D., Shen, A., and Sorg, J.A. (2014). *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology* 22, 406–416.

Peláez, T., Cercenado, E., Alcalá, L., Marín, M., Martín-López, A., Martínez-Alarcón, J., Catalán, P., Sánchez-Somolinos, M., and Bouza, E. (2008). Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3028–3032.

Pépin, J., Valiquette, L., and Cossette, B. (2005a). Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*–associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ* 173, 1037–1042.

Pépin, J., Saheb, N., Coulombe, M.-A., Alary, M.-E., Corriveau, M.-P., Authier, S., Leblanc, M., Rivard, G., Bettez, M., Primeau, V., et al. (2005b). Emergence of Fluoroquinolones as the Predominant Risk Factor for *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea: A Cohort Study during an Epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 41, 1254–1260.

Permpoonpattana, P., Tolls, E.H., Nadem, R., Tan, S., Brisson, A., and Cutting, S.M. (2011). Surface layers of *Clostridium difficile* endospores. *J. Bacteriol.* 193, 6461–6470.

Planche, T.D., Davies, K.A., Coen, P.G., Finney, J.M., Monahan, I.M., Morris, K.A., O'Connor, L., Oakley, S.J., Pope, C.F., Wren, M.W., et al. (2013). Differences in outcome according to *Clostridium difficile* testing method: a prospective multicentre diagnostic validation study of *C. difficile* infection. *The Lancet Infectious Diseases* 13, 936–945.

Polage, C.R., Gyorke, C.E., Kennedy, M.A., Leslie, J.L., Chin, D.L., Wang, S., Nguyen, H.H., Huang, B., Tang, Y.-W., Lee, L.W., et al. (2015). Overdiagnosis of *Clostridium difficile* Infection in the Molecular Test Era. *JAMA Intern Med* 175, 1792–1801.

Pollock, N.R., Banz, A., Chen, X., Williams, D., Xu, H., Cuddemi, C.A., Cui, A.X., Perrotta, M., Alhassan, E., Riou, B., et al. (2019). Comparison of *Clostridioides difficile* Stool Toxin Concentrations in Adults With Symptomatic Infection and Asymptomatic Carriage Using an Ultrasensitive Quantitative Immunoassay. *Clin Infect Dis* 68, 78–86.

Popoff, M.R., Rubin, E.J., Gill, D.M., and Boquet, P. (1988). Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 56, 2299–2306.

QUAMIC (2016). Comité Qualité de la Société Française de Microbiologie.

Rabold, D., Espelage, W., Sin, M.A., Eckmanns, T., Schneeberg, A., Neubauer, H., Möbius, N., Hille, K., Wieler, L.H., Seyboldt, C., et al. (2018). The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. *PLOS ONE* 13, e0193411.

Rodriguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., and Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in Food and Animals: A Comprehensive Review. *Adv. Exp. Med. Biol.* 932, 65–92.

Rodriguez-Palacios, A., and Lejeune, J.T. (2011). Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3085–3091.

- Rodriguez-Palacios, A., Ilic, S., and LeJeune, J.T. (2017). Food Indwelling *Clostridium difficile* in Naturally Contaminated Household Meals: Data for Expanded Risk Mathematical Predictions. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 38, 509–510.
- Rolfe, R.D., and Song, W. (1993). Purification of a functional receptor for *Clostridium difficile* toxin A from intestinal brush border membranes of infant hamsters. *Clin. Infect. Dis.* 16 *Suppl* 4, S219–227.
- Rousseau, C., Poilane, I., Diakite, F., Feghoul, L., Cruaud, P., and Collignon, A. (2010). Comparaison de trois milieux pour la culture de *Clostridium difficile* : intérêt des milieux favorisant la germination des spores ? *Pathologie Biologie* 58, 58–61.
- Rousseau, C., Poilane, I., De Pontual, L., Maherault, A.-C., Le Monnier, A., and Collignon, A. (2012). *Clostridium difficile* Carriage in Healthy Infants in the Community: A Potential Reservoir for Pathogenic Strains. *Clin Infect Dis* 55, 1209–1215.
- Rupnik, M., Wilcox, M.H., and Gerding, D.N. (2009). *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 7, 526–536.
- Rutala, W.A., Gergen, M.F., and Weber, D.J. (2012). Efficacy of different cleaning and disinfection methods against *Clostridium difficile* spores: importance of physical removal versus sporicidal inactivation. *Infect Control Hosp Epidemiol* 33, 1255–1258.
- Saginur, R., Fogel, R., Begin, L., Cohen, B., and Mendelson, J. (1983). Splenic abscess due to *Clostridium difficile*. *J. Infect. Dis.* 147, 1105.
- Salles, N. (2009). *Clostridium difficile*: prévalence, conséquences et traitement chez la personne âgée. *Les cahiers de l'année gérontologique* 1, 73–79.
- Sandlund, J., Bartolome, A., Almazan, A., Tam, S., Biscocho, S., Abusali, S., Bishop, J.J., Nolan, N., Estis, J., Todd, J., et al. (2018). Ultrasensitive Detection of *Clostridioides difficile* Toxins A and B by Use of Automated Single-Molecule Counting Technology. *Journal of Clinical Microbiology* 56, e00908-18.
- Schmidt, C., Löffler, B., and Ackermann, G. (2007). Antimicrobial phenotypes and molecular basis in clinical strains of *Clostridium difficile*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 59, 1–5.
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., Ham, M. van, Rohde, M., Hardt, W.-D., Wehland, J., and Aktories, K. (2009). *Clostridium difficile* Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLOS Pathogens* 5, e1000626.
- Schwan, C., Kruppke, A.S., Nölke, T., Schumacher, L., Koch-Nolte, F., Kudryashev, M., Stahlberg, H., and Aktories, K. (2014). *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 2313–2318.
- Seksik, P. (2019). Colite à *Clostridium difficile* : quelle prise en charge en 2019 ? *GASTRO ENTÉROLOGIE* 10.
- Simango, C. (2006). Prevalence of *Clostridium difficile* in the environment in a rural community in Zimbabwe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 1146–1150.
- Simor, A.E. (2010). Diagnosis, Management, and Prevention of *Clostridium difficile* Infection in Long-Term Care Facilities: A Review. *Journal of the American Geriatrics Society* 58, 1556–1564.
- Simpson, A.J., Das, S.S., and Tabaqchali, S. (1996). Nosocomial empyema caused by *Clostridium difficile*. *J. Clin. Pathol.* 49, 172–173.
- Smith, A. (2005). Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypotoxin-producing strains in Canada and the US. *Weekly Releases (1997–2007)* 10, 2735.
- Smith, L.Ds., and King, E.O. (1962). Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. *J Bacteriol*

84, 65–67.

Smits, W.K., Lyras, D., Lacy, D.B., Wilcox, M.H., and Kuijper, E.J. (2016). *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers 2, 16020.

Snyder, M.L. (1937). Further Studies on *Bacillus Difficilis* (Hall and O'Toole). J Infect Dis 60, 223–231.

Snyder, M.L. (1940). The Normal Fecal Flora of Infants between Two Weeks and One Year of Age. Serial Studies. J Infect Dis 66, 1–16.

Song, L., Zhao, M., Duffy, D.C., Hansen, J., Shields, K., Wungjiranirun, M., Chen, X., Xu, H., Leffler, D.A., Sambol, S.P., et al. (2015). Development and Validation of Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Ultrasensitive Detection and Quantification of *Clostridium difficile* Toxins in Stool. J Clin Microbiol 53, 3204–3212.

Spigaglia, P., Barbanti, F., Mastrantonio, P., Brazier, J.S., Barbut, F., Delmée, M., Kuijper, E., Poxton, I.R., and European Study Group on *Clostridium difficile* (ESGCD) (2008). Fluoroquinolone resistance in *Clostridium difficile* isolates from a prospective study of *C. difficile* infections in Europe. J. Med. Microbiol. 57, 784–789.

Staneck, J.L., Weckbach, L.S., Allen, S.D., Siders, J.A., Gilligan, P.H., Coppitt, G., Kraft, J.A., and Willis, D.H. (1996). Multicenter Evaluation of Four Methods for *Clostridium difficile* Detection: ImmunoCard C. difficile, Cytotoxin Assay, Culture, and Latex Agglutination. 34, 4.

Stewart, D.B., Hollenbeak, C.S., and Wilson, M.Z. (2013). Is colectomy for fulminant *Clostridium difficile* colitis life saving? A systematic review. Colorectal Disease 15, 798–804.

Sun, X., Wang, H., Zhang, Y., Chen, K., Davis, B., and Feng, H. (2011). Mouse relapse model of *Clostridium difficile* infection. Infect. Immun. 79, 2856–2864.

Sutens, C., Kinross, P., and European Centre for Disease Prevention and Control (2017). European surveillance of *Clostridium difficile* infections surveillance protocol version 2.3. (Stockholm: ECDC).

Tamma, P.D., and Sandora, T.J. (2012). *Clostridium difficile* Infection in Children: Current State and Unanswered Questions. J Pediatric Infect Dis Soc 1, 230–243.

Tedesco, F.J. (1974). Clindamycin-Associated Colitis: A Prospective Study. Annals of Internal Medicine 81, 429.

Tedesco, F.J. (1982). Pseudomembranous Colitis: Pathogenesis and Therapy. Medical Clinics of North America 66, 655–664.

Thabit, A.K., and Nicolau, D.P. (2015). Lack of Correlation between Bristol Stool Scale and Quantitative Bacterial Load in *Clostridium difficile* Infection. Infect Dis (Auckl) 8, 1–4.

Thiolet, J.M., Vaux, S., Lamy, M., and Gautier, A. (2012). Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, mai-juin 2012. Résultats.

Thomas, D.F.M., Malone, M., Fernie, D.S., Bayston, R., and Spitz, L. (1982). Association between *Clostridium difficile* and enterocolitis in Hirshsprung's disease. The Lancet 319, 78–79.

Thorpe, C.M., Kane, A.V., Chang, J., Tai, A., Vickers, R.J., and Snyderman, D.R. (2018). Enhanced preservation of the human intestinal microbiota by ridinilazole, a novel *Clostridium difficile*-targeting antibacterial, compared to vancomycin. PLOS ONE 13, e0199810.

Trifan, A., Stanciu, C., Girleanu, I., Stoica, O.C., Singeap, A.M., Maxim, R., Chiriac, S.A., Ciobica, A., and Boiculese, L. (2017). Proton pump inhibitors therapy and risk of *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta-analysis. World J. Gastroenterol. 23, 6500–6515.



- Tulli, L., Marchi, S., Petracca, R., Shaw, H.A., Fairweather, N.F., Scarselli, M., Soriani, M., and Leuzzi, R. (2013). CbpA: a novel surface exposed adhesin of *Clostridium difficile* targeting human collagen. *Cell. Microbiol.* *15*, 1674–1687.
- Turgeon, D.K., Novicki, T.J., Quick, J., Carlson, L., Miller, P., Ulness, B., Cent, A., Ashley, R., Larson, A., Coyle, M., et al. (2003). Six Rapid Tests for Direct Detection of *Clostridium difficile* and Its Toxins in Fecal Samples Compared with the Fibroblast Cytotoxicity Assay. *J Clin Microbiol* *41*, 667–670.
- Ulger Toprak, N., Balkose, G., Durak, D., Dulundu, E., Demirbaş, T., Yegen, C., and Soyletir, G. (2016). *Clostridium difficile*: A rare cause of pyogenic liver abscess. *Anaerobe* *42*, 108–110.
- Verity, P., Wilcox, M.H., Fawley, W., and Parnell, P. (2001). Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *Journal of Hospital Infection* *49*, 204–209.
- Viala, C., Le Monnier, A., Maataoui, N., Rousseau, C., Collignon, A., and Poilane, I. (2012). Comparison of commercial molecular assays for toxigenic *Clostridium difficile* detection in stools: BD GeneOhm Cdiff, XPert C. difficile and illumigene C. difficile. *J. Microbiol. Methods* *90*, 83–85.
- Vickers, R.J., Tillotson, G.S., Nathan, R., Hazan, S., Pullman, J., Lucasti, C., Deck, K., Yacyshyn, B., Maliakkal, B., Pesant, Y., et al. (2017). Efficacy and safety of ridinilazole compared with vancomycin for the treatment of *Clostridium difficile* infection: a phase 2, randomised, double-blind, active-controlled, non-inferiority study. *The Lancet Infectious Diseases* *17*, 735–744.
- Vonberg, R.-P., Kuijper, E.J., Wilcox, M.H., Barbut, F., Tüll, P., Gastmeier, P., van den Broek, P.J., Colville, A., Coignard, B., Daha, T., et al. (2008). Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection* *14*, 2–20.
- Walkty, A., Lagacé-Wiens, P.R.S., Manickam, K., Adam, H., Pieroni, P., Hoban, D., Karlowsky, J.A., and Alfa, M. (2013). Evaluation of an Algorithmic Approach in Comparison with the Illumigene Assay for Laboratory Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* *51*, 1152–1157.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., and McDonald, L.C. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *The Lancet* *366*, 1079–1084.
- WHO (2013). Diarrhoea.
- Wilcox, M.H., Mooney, L., Bendall, R., Settle, C.D., and Fawley, W.N. (2008). A case–control study of community-associated *Clostridium difficile* infection. *J Antimicrob Chemother* *62*, 388–396.
- Wilcox, M.H., Gerding, D.N., Poxton, I.R., Kelly, C., Nathan, R., Birch, T., Cornely, O.A., Rahav, G., Bouza, E., Lee, C., et al. (2017). Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *New England Journal of Medicine* *376*, 305–317.
- Xu, C., Weese, J.S., Flemming, C., Odumeru, J., and Warriner, K. (2014). Fate of *Clostridium difficile* during wastewater treatment and incidence in Southern Ontario watersheds. *Journal of Applied Microbiology* *117*, 891–904.
- Ylisiurua, P., Koskela, M., Vainio, O., and Tuokko, H. (2013). Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins. *Scand. J. Infect. Dis.* *45*, 19–25.
- Yui, S., Ali, S., Muzslay, M., Jeanes, A., and Wilson, A.P.R. (2017). Identification of *Clostridium difficile* Reservoirs in The Patient Environment and Efficacy of Aerial Hydrogen Peroxide Decontamination. *Infection Control & Hospital Epidemiology* *38*, 1487–1492.
- Zar, F.A., Bakkanagari, S.R., Moorthi, K.M.L.S.T., and Davis, M.B. (2007). A Comparison of Vancomycin and Metronidazole for the Treatment of *Clostridium difficile*–Associated Diarrhea, Stratified by Disease Severity. *Clin Infect Dis* *45*, 302–307.

Ziakas, P.D., Zacharioudakis, I.M., Zervou, F.N., Grigoras, C., Pliakos, E.E., and Mylonakis, E. (2015). Asymptomatic Carriers of Toxigenic *Clostridium difficile* in Long-Term Care Facilities: A Meta-Analysis of Prevalence and Risk Factors. PLOS ONE 10, e0117195.

## Serment d'Hippocrate

*“Au moment d’être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.*

*Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.*

*Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J’interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.*

*Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l’humanité.*

*J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.*

*Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.*

*Je donnerai mes soins à l’indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admise dans l’intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.*

*Reçue à l’intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.*

*Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l’indépendance nécessaire à l’accomplissement de ma mission. Je n’entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J’apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu’à leurs familles dans l’adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j’y manque.”*