




Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
 www.em-consulte.com



## Comparaison de trois milieux pour la culture de *Clostridium difficile* : intérêt des milieux favorisant la germination des spores ?

### Comparison of three *Clostridium difficile* culture media: Interest of enhancing spore germination media?

C. Rousseau<sup>a,b,\*</sup>, I. Poilane<sup>a</sup>, F. Diakite<sup>a</sup>, L. Feghoul<sup>a</sup>, P. Cruaud<sup>a</sup>, A. Collignon<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de microbiologie, hôpital Jean-Verdier–René-Muret, Assistance publique–Hôpitaux de Paris, avenue du 14-Juillet, 93143 Bondy cedex, France

<sup>b</sup> EA4043, faculté de pharmacie, université Paris-Sud-11, 92290 Châtenay-Malabry, France

#### INFO ARTICLE

##### Historique de l'article :

Reçu le 24 juin 2009

Accepté le 12 juillet 2009

Disponible sur Internet le 4 novembre 2009

##### Mots clés :

*Clostridium difficile*

Milieux de culture

Spores

Taurocholate

Choc alcoolique

##### Keywords:

*Clostridium difficile*

Culture media

Spores

Taurocholate

Alcoholic shock

#### RÉSUMÉ

**But de l'étude.** – *Clostridium difficile* est le principal agent des diarrhées bactériennes postantibiotiques et nosocomiales. Depuis l'émergence du clone NAP1/027 hypervirulent et épidémique en Europe, il apparaît nécessaire d'isoler les souches de *C. difficile* pour réaliser un suivi épidémiologique par typage moléculaire. Ce travail a eu pour objectif de comparer trois conditions de culture sélective pour l'isolement de *C. difficile*.

**Méthodes.** – Cent trente selles de patients hospitalisés à l'hôpital Jean-Verdier ont été ensemencées sur le milieu commercial CLO (BioMérieux) et sur un milieu préparé au laboratoire (CCTa : Columbia, céfoxitine 8 mg/l, cycloserine 250 mg/l, sang de cheval 5 %, taurocholate de sodium 0,1 %) avec et sans choc alcoolique (EtOH) préalable. *C. difficile* a été isolé dans 38 selles et les colonies ont été dénombrées sur chaque milieu.

**Résultats.** – L'intensité de fluorescence des colonies de *C. difficile* est comparable sur CLO et CCTa-EtOH, leur aspect étant plus caractéristique sur CLO. Ce milieu apparaît très sélectif contrairement au milieu CCTa sur lequel une flore associée gêne la lecture de la fluorescence et nécessite le réisolement des colonies suspectes. Sur CCTa ± EtOH on dénombre en moyenne 30 fois plus de colonies de *C. difficile* que sur CLO, suggérant une forte proportion de spores dans les selles.

**Conclusions.** – Le milieu CLO est performant pour l'isolement de *C. difficile* malgré sa sélectivité. Néanmoins, il apparaît intéressant d'associer un milieu favorisant la germination des spores tel que le milieu CCTa ensemencé après choc alcoolique, permettant d'augmenter la sensibilité de détection en s'affranchissant des conditions de conservation et de transport.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### ABSTRACT

**Aim.** – *Clostridium difficile* is the most common agent of postantibiotic and nosocomial bacterial diarrhoea. Since the emergence of the highly virulent and epidemic strain NAP1/027 in Europe, it appears necessary to isolate *C. difficile* strains to realize an epidemiologic follow-up by molecular typing. The aim of this work was to compare three selective culture conditions for the isolation of *C. difficile*.

**Methods.** – One hundred and thirty stools collected from patients hospitalized at Jean Verdier were swabbed on the commercial medium CLO (BioMérieux) and on a medium prepared at the laboratory (CCTa: Columbia, cefoxitine 8 mg/l, cycloserine 250 mg/l, horse blood 5%, sodium taurocholate 0.1%) with and without preliminary alcoholic shock (EtOH). *C. difficile* was isolated from 38 stools and colonies were counted on each medium.

**Results.** – The fluorescence intensity of *C. difficile* colonies is comparable on CLO and CCTa-EtOH media, however their aspect is more characteristic on CLO. This medium appears very selective contrary to the CCTa medium on which an associated flora obstructs the fluorescence reading and requires a new isolation of the suspect strains. On average 30 times more colonies of *C. difficile* are counted on CCTa ± EtOH than on CLO, suggesting the presence of great proportions of spores in the stools.

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : clotilde.rousseau@jvr.aphp.fr (C. Rousseau).

**Conclusions.** – The medium CLO is successful for the isolation of *C. difficile* despite of its selectivity. Nevertheless, it appears interesting to associate a medium enhancing spore germination as the CCTa medium inoculated after alcoholic shock to increase the sensitivity of detection while being freed from conservation and transport conditions.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Clostridium difficile* est le principal agent des colites pseudo-membraneuses et des diarrhées bactériennes postantibiotiques. Cet entéropathogène majeur est principalement impliqué dans les diarrhées nosocomiales de l'adulte. Depuis les années 2000, l'incidence et la mortalité des infections à *C. difficile* (ICD) ont fortement augmenté avec l'apparition de foyers épidémiques en Amérique du Nord [1] puis en Europe [2,3], les premiers cas groupés en France étant apparus en 2006 [4]. Ces épidémies sont dues à l'émergence d'un clone particulièrement virulent nommé NAP1/027/III selon la méthode de typage moléculaire utilisée respectivement champs pulsés, PCR-ribotypage et toxintypage. Cette souche fortement toxigène présente de plus un haut niveau de résistance à l'érythromycine et aux nouvelles fluoroquinolones. La dissémination de ce clone est à l'origine d'une évolution des données épidémiologiques des ICD associant des infections nosocomiales de sévérité et de fréquence accrue et, l'apparition de formes communautaires. Ainsi, il apparaît désormais nécessaire d'isoler les souches de *C. difficile* afin de réaliser un suivi épidémiologique par typage moléculaire, notamment en cas d'infection sévère ou de cas groupés [5]. De plus, la détection des souches toxigènes a une meilleure sensibilité à partir de la culture par rapport aux tests réalisés sur les selles. La détermination de la sensibilité de la souche isolée aux antibiotiques peut également présenter un intérêt en cas d'échec au traitement ou dans un but de surveillance épidémiologique.

À l'heure actuelle, il n'y a pas de réel consensus pour le diagnostic des ICD. Concernant la culture à partir des selles, plusieurs milieux et techniques d'isolement existent [6]. L'objectif de cette étude a été de comparer trois conditions de culture sélectives des formes végétatives et/ou des formes sporulées de *C. difficile* à partir de prélèvements de selles pour une application de routine au laboratoire.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Échantillons

Au total 130 selles prélevées dans un but diagnostique chez des patients symptomatiques hospitalisés au CHU Jean-Verdier–René-Muret ont été analysées de façon prospective pour la recherche de *C. difficile*. Les échantillons ont été étudiés comme habituellement en routine dès leur arrivée au laboratoire ou plus exceptionnellement après un maximum de 24 à 36 heures de conservation à +4 °C.

### 2.2. Culture sélective

Les selles ont été mises en culture pour isoler sélectivement et en semi-quantitatif *C. difficile* selon trois méthodes différentes. Une suspension a été réalisée pour chaque selle dans de l'eau distillée au 1/10<sup>e</sup> et 1/100<sup>e</sup> (m/v). Dans certains cas une dilution au 1/1000<sup>e</sup> a été ajoutée. 100 µl de ces dilutions ont été ensemencés sur :

- un milieu commercial CLO (BioMérieux) ;
- un milieu préparé au laboratoire (CCTa) ;
- un milieu CCTa après traitement de la selle par choc alcoolique (CCTa-EtOH).

Le milieu CCTa est composé d'une gélose Columbia (Oxoid) 39 g/l (pH = 7,3 ± 0,2) supplémentée avec de la céfoxitine et de la cyclosérine (Culture Media Supplement Oxoid) aux concentrations respectives de 8 mg/l et 250 mg/l en tant qu'agents sélectifs, du sang de cheval défibriné (5 % v/v) (AES) et du taurocholate de sodium 0,1 % (Sigma) favorisant la germination des spores. Le choc

alcoolique consiste à mélanger vol/vol la suspension de selle diluée avec de l'éthanol absolu pendant une heure à température ambiante afin de détruire toutes les formes végétatives bactériennes. Les cultures ont été incubées en atmosphère anaérobie (sachets AnaeroGen, Oxoid) pendant 48 heures à 37 °C.

### 2.3. Identification et dénombrement des colonies

Les colonies de *C. difficile* ont été dénombrées sur chaque milieu après identification présomptive par l'odeur caractéristique de « crottin de cheval », l'aspect grisâtre et étalé des colonies et leur fluorescence jaune chartreuse sous UV 360 nm. L'intensité de la fluorescence a été évaluée en unités arbitraires sur une échelle allant de 1 à 4. En cas de doute, l'identification a été complétée par une identification antigénique (*C. Difficile* Test Kit, Oxoid) confirmée si nécessaire par une identification biochimique (API ID 32ANA, BioMérieux).

## 3. Résultats

### 3.1. Comparaison des trois milieux pour l'identification de *C. difficile*

Des différences ont pu être notées entre les trois milieux sur les critères permettant l'isolement et l'identification de *C. difficile* au sein de la flore fécale tels que l'intensité de la fluorescence, l'aspect des colonies et le caractère sélectif du milieu. Sur le milieu CCTa, la sélectivité était médiocre. Une flore associée trop importante masquait les aspects caractéristiques des colonies de *C. difficile* et notamment la fluorescence, gênant considérablement son identification présomptive. De plus, il était souvent nécessaire de réisoler les colonies suspectes pour leur identification. Sur le milieu CLO et le milieu CCTa-EtOH, l'aspect des colonies et l'intensité de la fluorescence permettaient une identification présomptive acceptable en primoculture avec dans 94 % des cas pour CLO et 91 % des cas pour CCTa-EtOH une intensité élevée de 3 ou 4 en unités arbitraires (Tableau 1). Concernant le milieu CCTa, dans 27 % des cas pour lesquels l'intensité était douteuse (1 ou 2) les colonies de *C. difficile* n'auraient pas été détectées avec ce seul milieu. Par ailleurs, aucune différence de temps de croissance n'a été notée entre les trois milieux.

### 3.2. Comparaison du nombre d'UFC/g de selles de *C. difficile* sur les trois milieux

Un total de 130 selles a été testé dont 38 ont présenté une culture positive sur au moins un des trois milieux. Parmi ces 38 selles positives, 27 ont pu faire l'objet d'un dénombrement des colonies sur l'ensemble des trois milieux et permettre ainsi la comparaison du rendement des cultures (Fig. 1). Le nombre de colonies était compris entre 10<sup>2</sup> et 7.10<sup>5</sup> UFC/g de selles sur le milieu CLO, 2.10<sup>3</sup> et 8.10<sup>6</sup> UFC/g sur le milieu CCTa et 2.10<sup>3</sup> et 10<sup>7</sup> UFC/g sur le milieu CCTa-EtOH. Dans la majorité des cas (25/27 selles), le nombre de colonies sur milieu CLO était inférieur à celui obtenu sur le milieu CCTa-EtOH pour un même échantillon. Le nombre d'UFC obtenu sur milieu CCTa était dans la plupart des cas comparable à celui sur CCTa-EtOH (24/27 selles) et lorsqu'une différence était observée, un nombre plus important de colonies était isolé sur CCTa.

Pour les 11 autres selles positives à *C. difficile*, les résultats entre les trois milieux étaient soit discordants soit ininterprétables (Tableau 2). Dans le cas des selles 28 à 32, le milieu CCTa manquait de sélectivité rendant impossible le repérage et le dénombrement des colonies. Pour les selles 33, 36 et 37, seuls les milieux favorisant

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4136600>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4136600>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)