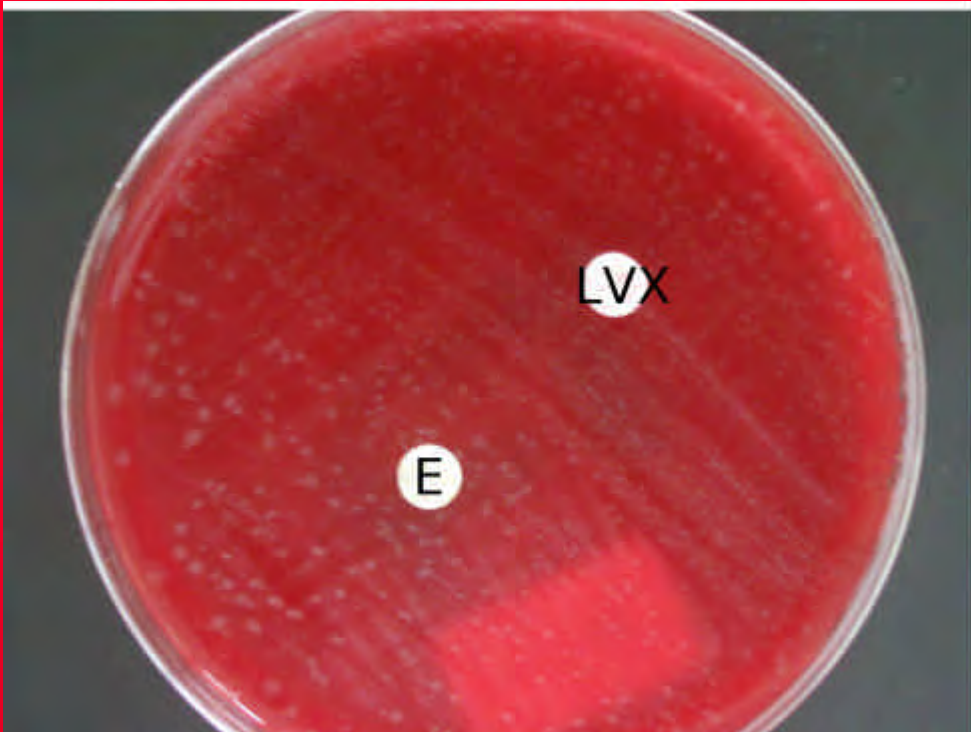


Clostridium difficile

new controversies for an old problem



Clostridium difficile

- **Historique**

- Découverte chez l'enfant : *Bacillus difficilis*
Hall et Toole 1935
- Lien avec colite et colite pseudomembraneuse
Bartlett *et al.* 1977, 1978

- **Caractéristiques**

- Bacille à Gram + anaérobie strict
- Spore subterminale

Pouvoir pathogène: CDAD

- **Responsable de 30% des cas de diarrhée post antibiotiques**
- **Responsable de 50 à 80% des cas de colite associée aux antibiotiques**
- **Responsable de 95% des cas de CPM**
- **Cause la plus importante de diarrhée nosocomiale d'origine bactérienne**
- **Manifestations cliniques très variées: portage asymptomatique, diarrhée modérée à CPM gravissime, rechutes fréquentes**

Épidémiologie

- **Enfant de moins de 2 ans**

- 25 à 80 % porteurs sains

- **Adulte**

- 2 à 5% de porteurs sains chez l'adulte

- 10 à 20% à l'hôpital

- Taux augmenté par les traitements antibiotiques

Physiopathologie de l'infection

- **Perturbation de la flore intestinale de barrière**
 - Antibiotiques
 - Antinéoplasiques
- **Prolifération de *C. difficile***
 - Origine endogène
 - Origine exogène
- **Colonisation par *C. difficile***
- **Production des toxines A et B**

Facteurs de virulence chez *Clostridium difficile*

- **Facteurs de virulence majeurs**

- **Toxines A (308 kDa) et B (269 kDa)**

- Glucosylation des petites protéines Rho

- **Toxine binaire: toxine CDT**

- ADP-ribosylation de l'actine

- **Facteurs de virulence potentiels**

- **Adhésines**

- **Flagelles**

- **Enzymes hydrolytiques : hyaluronidase, protéases**

- **Spore...**

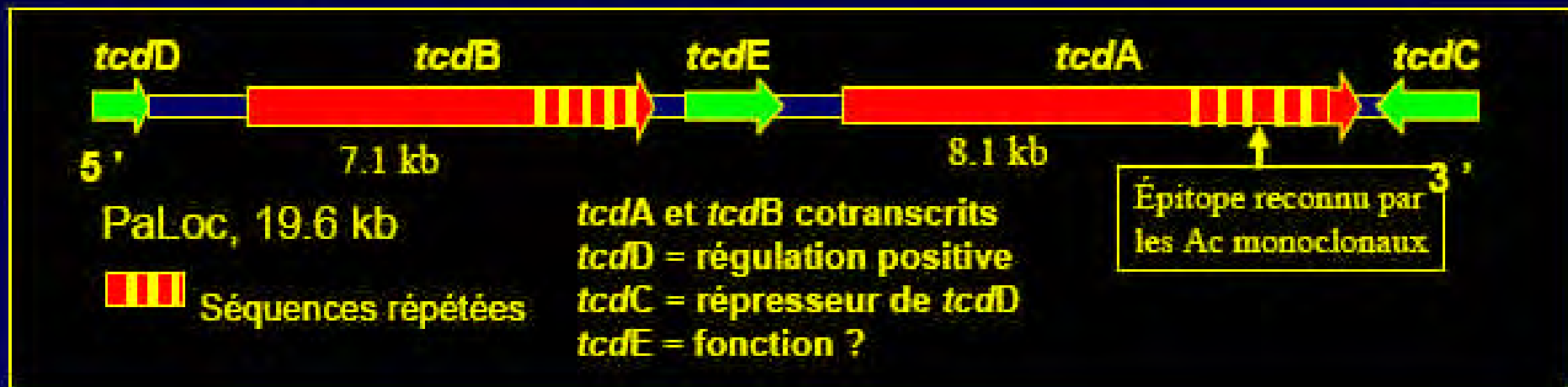
Mécanisme d'action des toxines

- **Synergie d'action : toxine A (entérotoxine) et toxine B (cytotoxine)**
- **Rôle prépondérant de la toxine A**
 - Destruction partielle du cytosquelette
 - Destruction des jonctions interentérocytaires
 - Libération de médiateurs de l'inflammation dans la lamina propria
- **Toxine B**
 - Destruction totale du cytosquelette
- **Toxine binaire CDT ?**

Virulence

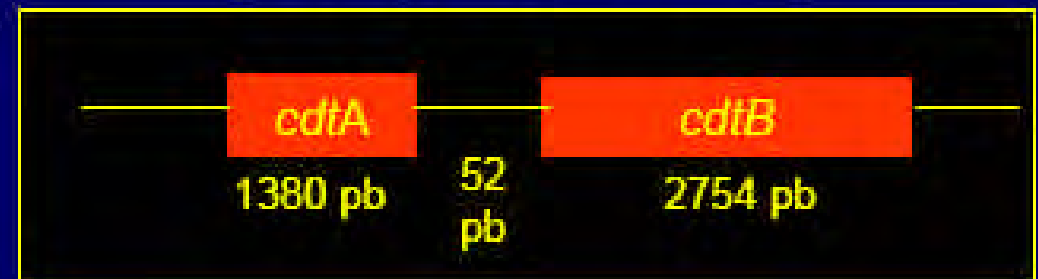
- Large clostridial toxins (LCT) +++

- Toxine A : entérotoxine , TcdA (308 kDa)
- Toxine B : cytotoxine, TcdB (270 kDa)



- Toxine binaire (ADP-ribosyl transferase spécifique de l'actine) ?

- CDTa (48kDa) : sous-unité enzymatique
- CDTb (99kDa) : sous-unité ligand



Diagnostic biologique: isolement de *C. difficile*

- **Milieux sélectifs**

- **CCFA (Georges)**

- Cyclosérine (500mg/l), cefoxitine (16 mg/l), fructose, rouge neutre, jaune d'œuf

- **Milieux dérivés du CCFA**

- Cyclosérine (250mg/l), cefoxitine (8 mg/l), 5% sang mouton, ...

- Commercialisation: bioMérieux, AES, Biorad, Oxoid

- **Milieux d'enrichissement**

- **Milieux liquides + cyclosérine + cefoxitine**

Diagnostic biologique: identification de *C. difficile*

- **Aspect macroscopique**
 - Gélose CCFA + sang : colonies plates, grisâtres, aspect étoilée, pas d'hémolyse
 - Fluorescence jaune chartreuse sous UV (360 nm)
- **Aspect microscopique**
 - Bacille à Gram positif, spores subterminales non déformantes
- **Identification présomptive: aspect, odeur**

Sang



CCFA



UV 360 nm





Clostridium difficile

Diagnostic biologique: détection des toxines A et B

- **Détection sur culture**
 - Milieu liquide (BHI) ou solide (culture toxigénique)
- **Détection dans les selles**
- **Caractéristiques des souches**
 - Souches Tox A-, Tox B-: sérogroupes B, D, I, X
 - Souches Tox A+, Tox B+: sérogroupes A, C, G, H, K isolées de CPM
 - Souches Tox A-, Tox B+: sérogroupe F ...
- **Intérêt à rechercher les 2 toxines**

Détection de la toxine B: test de cytotoxicité

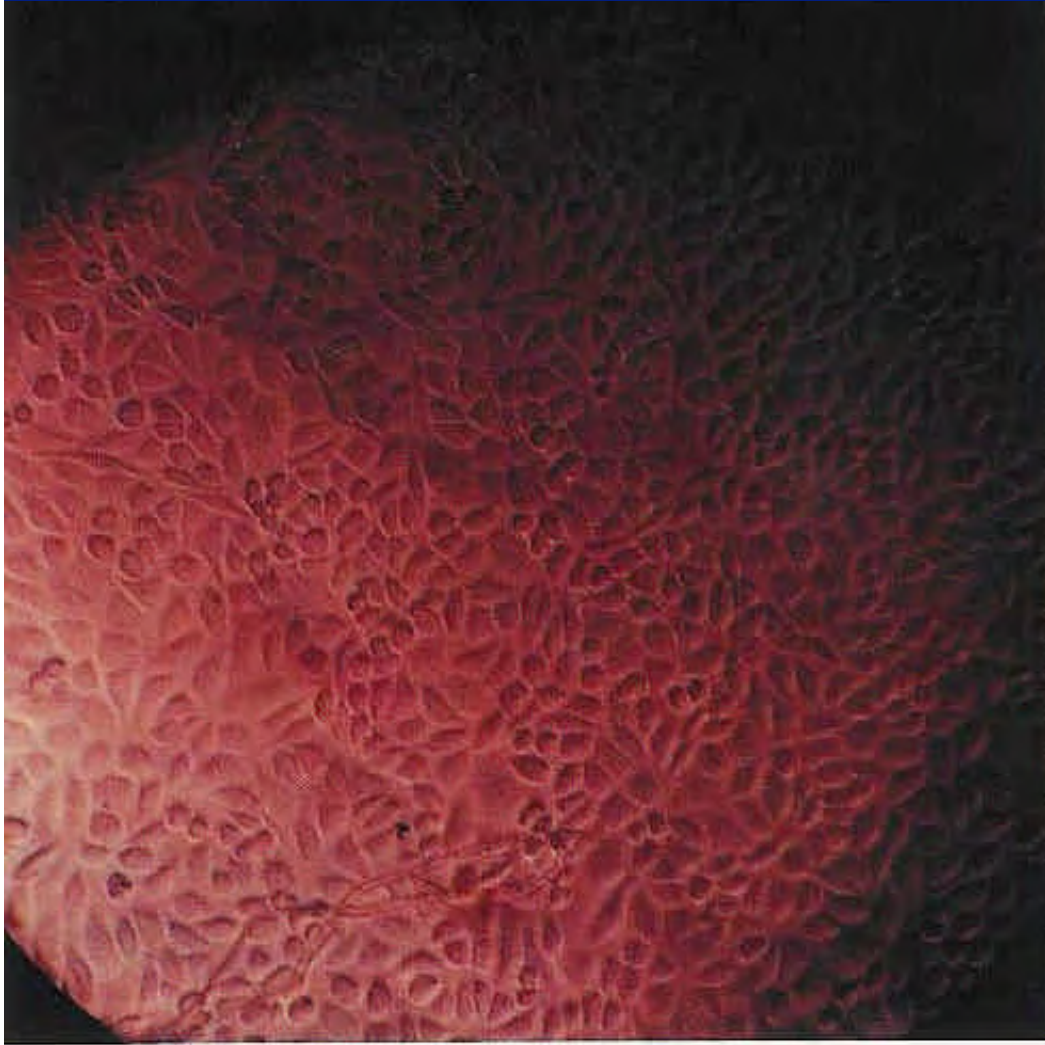
- **Cellules en culture**

- Cellules fibroblastiques: W138, MRC5, L929
- Cellules rénales: Vero
- Cellules CHO, Hela, MacCoy, Hep2

- **Effet cytopathogène d'une dilution de selle (1/10) ultrafiltrée en 24h**

- Arrondissement et aspect actinomorphique
- Neutralisation par anti-sérum anti *C. difficile* ou anti *C. sordellii* (toxine LT)

Cytotoxicité sur cellules L929



Témoin négatif



Réaction positive

Détection des toxines A et B: tests immunoenzymatiques

- **Méthode type sandwich**
 - Anticorps polyclonaux ou monoclonaux :
antigène partie C-ter des toxines
 - Méthodologie
 - Plaque à 96 puits
 - Tests unitaires (Toxine A, Toxines A + B)
- **Méthodes unitaires d'immuno-
chromatographie**



Meridian/Gull



Oxoid

Biosite
Diagnostics
/BMD



Valeur du test Triage (F. Barbut)

Sensibilité 97%

Spécificité 85,6%

VPP 99,6%

VPN 96%

Si on teste une seule toxine on rate 4,1% des souches

Il faut cultiver C. difficile (M. Delmée)

Culture	Détection toxine	N°	%
-	-	17731	86%
-	+	18	0,1%
+	+	1149	5,6%
+	-	1420	6,9%
+	NS	53	0,2%

Culture + 12,7%

Diagnostic biologique: méthodes complémentaires

- **Méthodes moléculaires de recherche des toxines**

- PCR *tcd A*, *tcd B*

- Surnageants culture et extraits de selles

- Détection des variants de toxine : *PCR-RFLP*

- *Détection de la toxine binaire*

- **Typage épidémiologique**

- Sérogroupage selon M. Delmée: 10 sérogroupe

- A (A1- A12), B, C, D, F, G, H, I, K, X

- Méthodes moléculaires

- Ribotypage

- Champs pulsé

- AP-PCR

- PCR-ribotypage

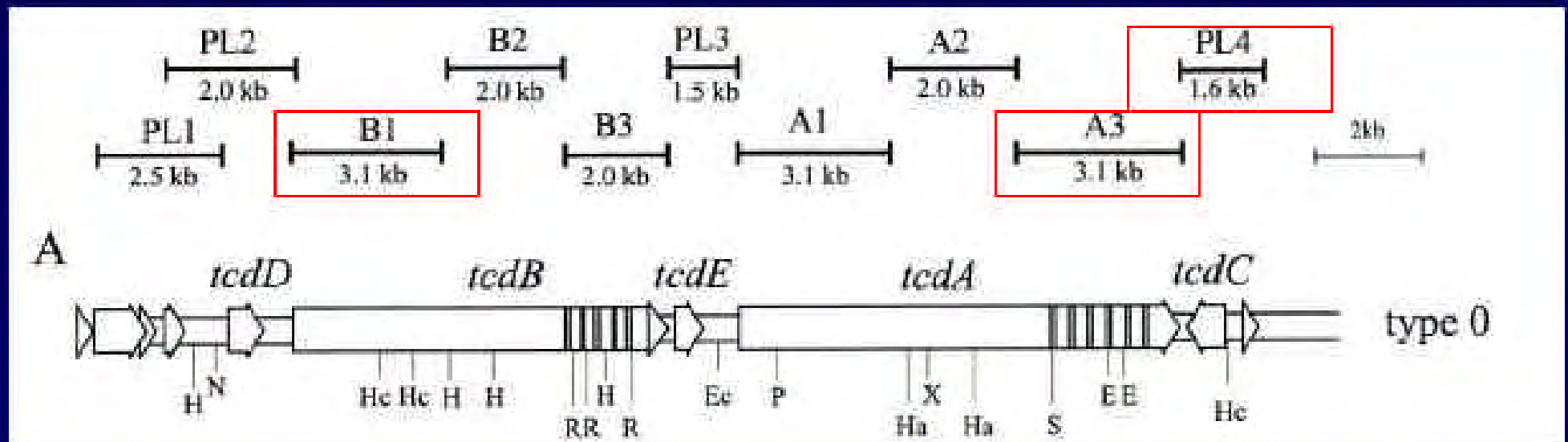
TOXINOTYPAGE (Rupnik et al., JCM 1998, 2240-2247)

- Définition :

analyse du polymorphisme du locus de pathogénicité PaLoc de *C. difficile* par une PCR-restriction

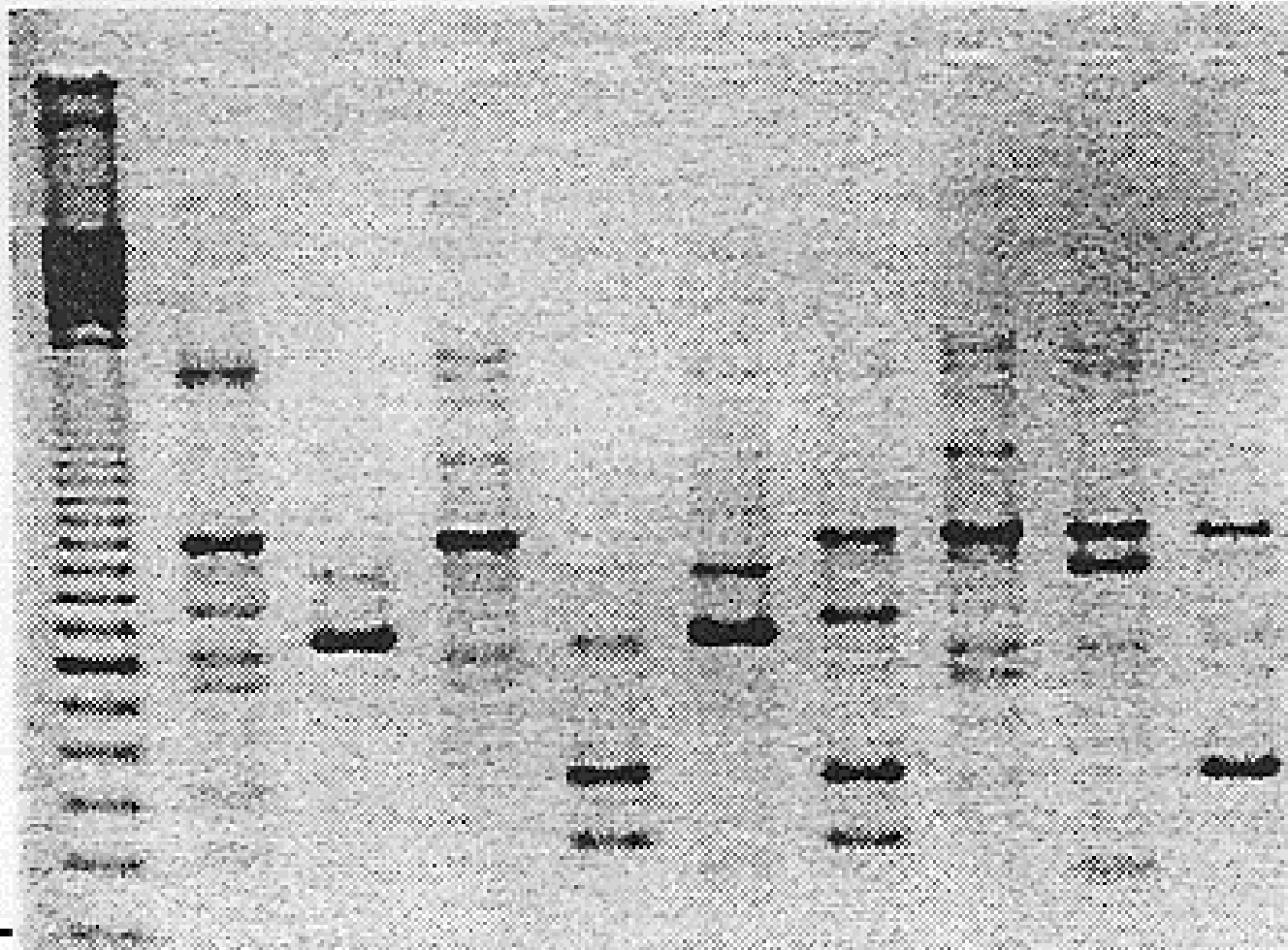
- Méthode de référence :

- Amplification de A3 et B1 et *tcdC* puis digestion
- Comparaison à la souche de référence VPI 10463 (toxintype 0)



AP-PCR - amorce AP3 (Bidet *et al.* J Clin Microb 2000)

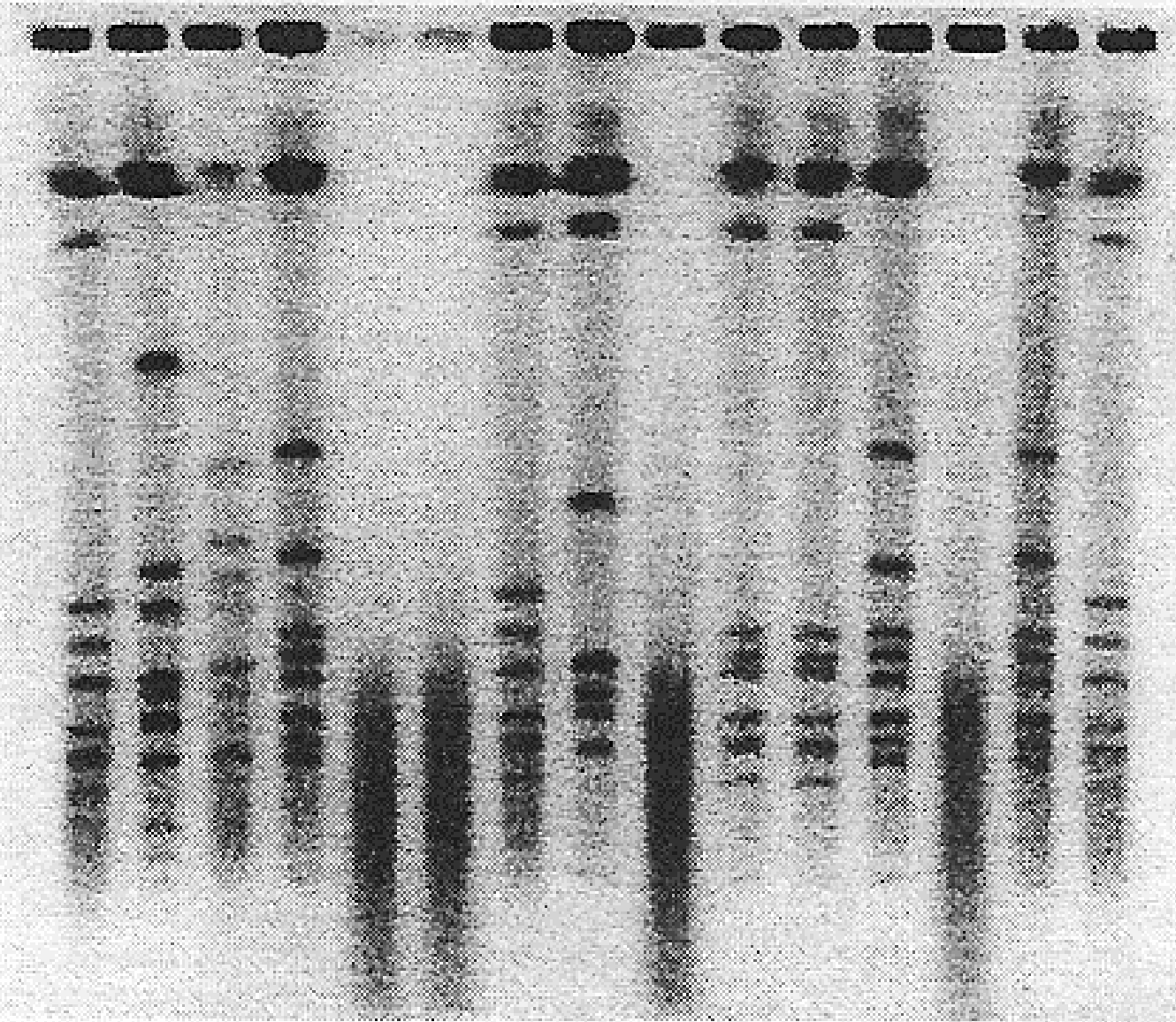
MW A I B C D F G H I K



100 bp —

Electrophorèse en Champ pulsé (Bidet et al. 2000)

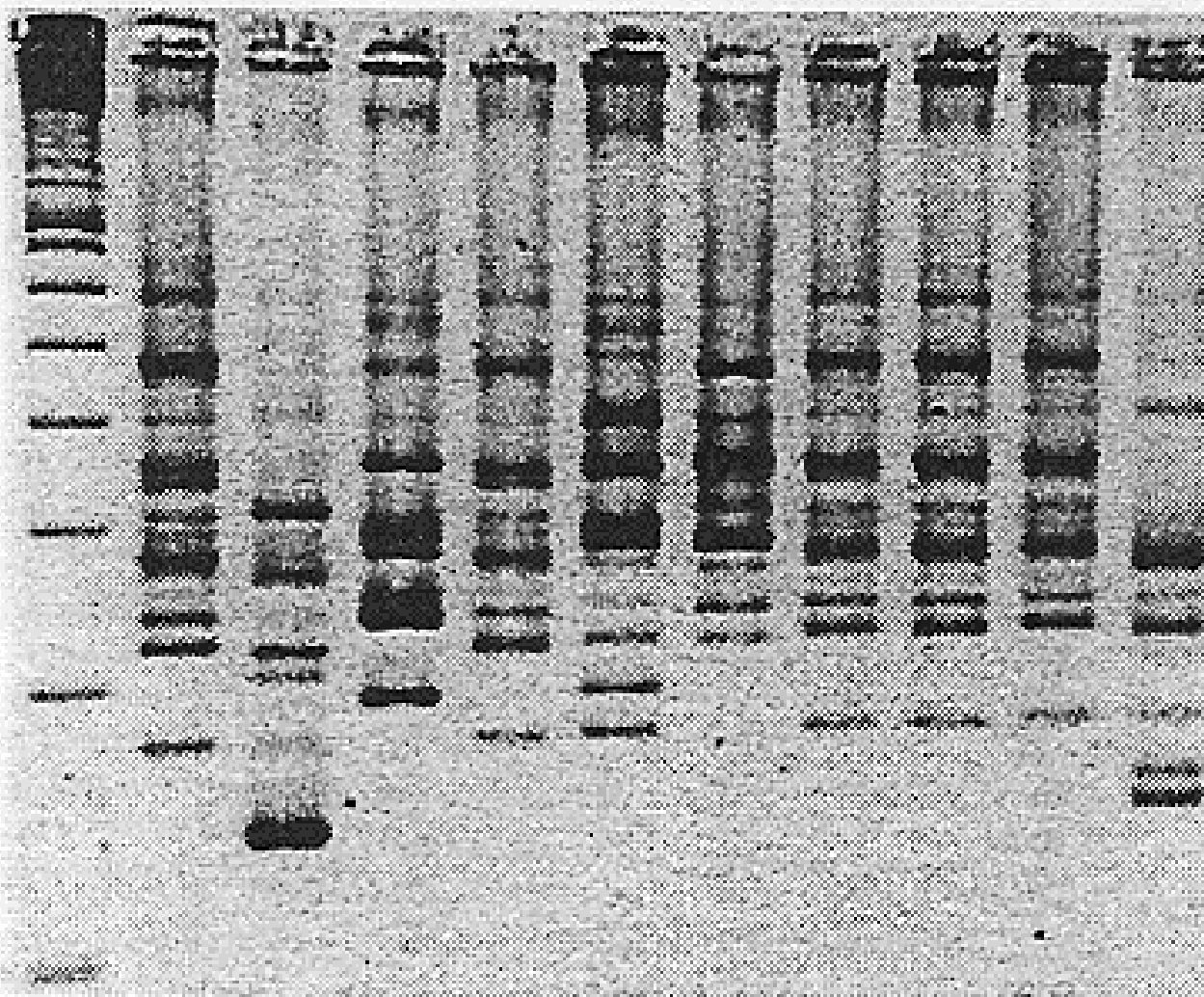
A2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 A2



Lignes 1 à 13:
souches
sporadiques
Lignes 4, 5, 8,
12: souches G

PCR - Ribotypage (Bidet et al. 2000)

MW 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Lignes 1,
4, 7, 8, 9 :
Souches
Épidémiques
Sérogroupe C

C. difficiledes souches !

24 toxinotypes

(polymorphisme des gènes des deux toxines et de leurs régulateurs)

150 ribotypes (PCR espace intergénique 16S- 23S)

100 groupes REA (restriction endonuclease analysis)

TOXINOTYPAGE

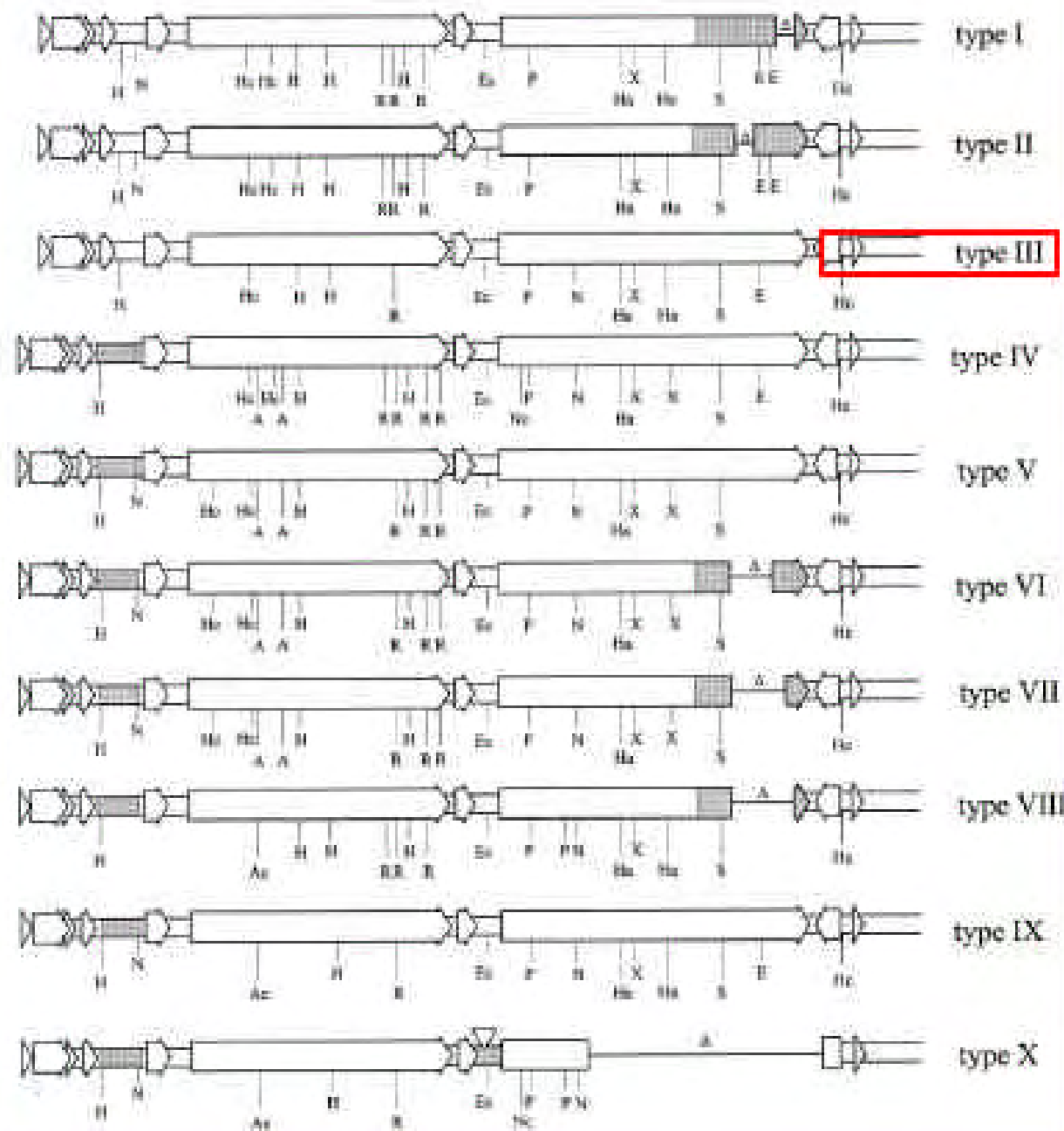
(Rupnik et al.,
JCM 1998, 2240-2247
JCM, 2003, 1118-1125)

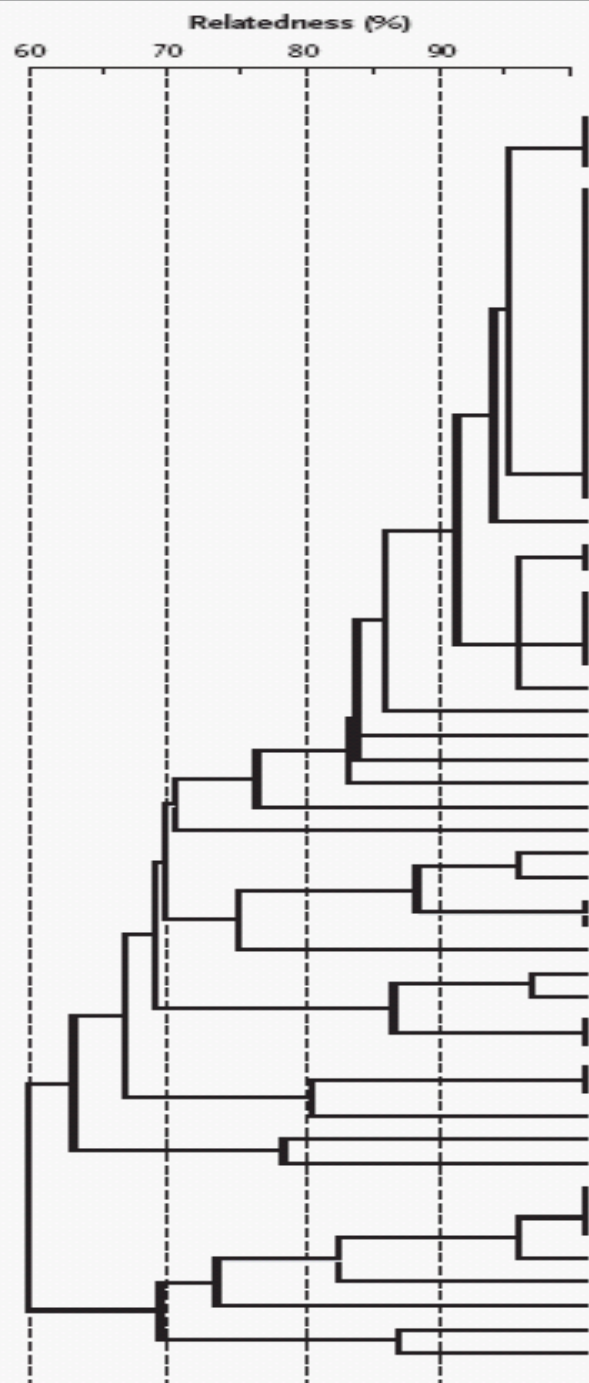
- *tcdB* moins bien conservé que *tcdA*

- Mutations
- Délétions
- Insertions

24 « variants » : I à XXIV

B





Location	Toxinotype	Binary CDT	18-bp <i>tcdC</i> Deletion
Historic, 1988-91	III	+	+
Historic, 1993	III	+	+
Historic, >1993	III	+	+
Maine, Facility B	III	+	+
Maine, Facility B	III	+	+
Maine, Facility B	III	+	+
Pennsylvania, Facility B	III	+	+
Pennsylvania, Facility B	III	+	+
Pennsylvania, Facility B	III	+	+
Maine, Facility A	III	+	+
Maine, Facility A	III	+	+
Illinois	III	+	+
Illinois	III	+	+
Illinois	III	+	+
Georgia	III	+	+
Georgia	III	+	+
Georgia	III	+	+
Maine, Facility A	III	+	+
Pennsylvania, Facility A	III	+	+
Pennsylvania, Facility A	III	+	+
New Jersey	III	+	+
New Jersey	III	+	+
Oregon	III	+	+
Oregon	III	+	+
Oregon	III	+	+
Historic, 1990-91	III	+	+
Pennsylvania, Facility A	III	+	+
New Jersey	III	+	+
Historic, 1984-91	III	+	+
Maine, Facility B	0	-	-
New Jersey	IX	+	-
Maine, Facility A	0	-	-
Maine, Facility A	0	-	-
New Jersey	0	-	-
Illinois	0	-	-
Maine, Facility B	XIV/XV	+	+
New Jersey	0	-	-
Pennsylvania, Facility A	0	-	-
Georgia	0	-	-
Georgia	0	-	-
Oregon	0	-	-
Maine, Facility A	0	-	-
Maine, Facility B	0	-	-
Pennsylvania, Facility A	Unknown	+	-*
Illinois	Unknown	+	-*
Pennsylvania, Facility B	0	-	-
Pennsylvania, Facility B	0	-	-
Pennsylvania, Facility A	0	-	-
Pennsylvania, Facility B	0	-	-
Georgia	0	-	-
Oregon	0	-	-
Illinois	0	-	-
Oregon	0	-	-

The *C. difficile* O27 saga

It has recently been determined that two-thirds of the nosocomial cases in the Sherbrooke region (and a similar proportion in other hospitals within Quebec) were the result of infection with one strain, a ribotype 27, North American pulso-type 1 (NAP1), toxinotype III organism that makes roughly 15–20 times the amount of toxin as "normal" strains.

The organism has an altered repressor gene with an 18 base-pair nucleotide deletion.

C. difficile O27 the story

PFGE NAP1, REA groupe B1, Toxinotype III, ribotype027

Mars 2003

Expérience québécoise 82% Fluoroquinolone -R

84% toxine binaire et délétion TcdC

Royal Devon and Exeter hospital apparue avec introduction de la moxifloxacin pour les CAP

Juillet 2005 Leiden Jansdal à Harderwijk. , Bruxelles 2004,

Ypres septembre 2005

Valenciennes Mars 2006

C. difficile O27 the story

Thomas J. Louie Calgary

Death within 30 days was more than 3 times as likely if CDAD complicated the hospital stay:

23% (37/161) of patients with CDAD died, versus 7% (46/656) of controls.

At 12 months, the cumulative attributable mortality was 16.7% (mean age 77 years) .

Fulminant disease poorly responsive to front-line metronidazole therapy

C. difficile O27 the story

What factors account for the emergence of this strain ?

An elderly hospital population, crowded wards, suboptimal toilet-bed ratios and poor infection control performance

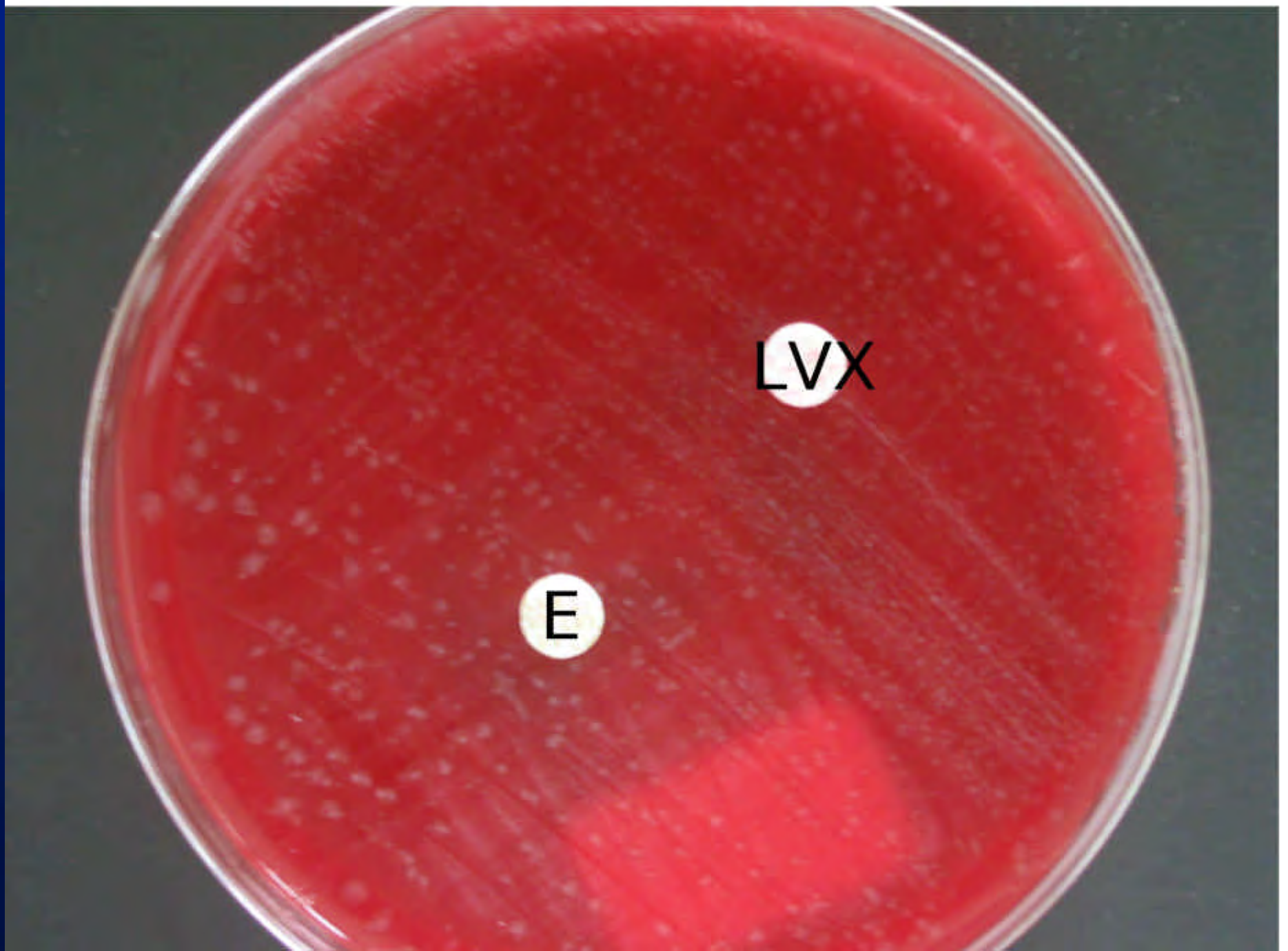
present long before the Quebec outbreak

Imipenem 3.3 Ceftazidime 2.45 Clindamycine 2 Moxiflo 1.7

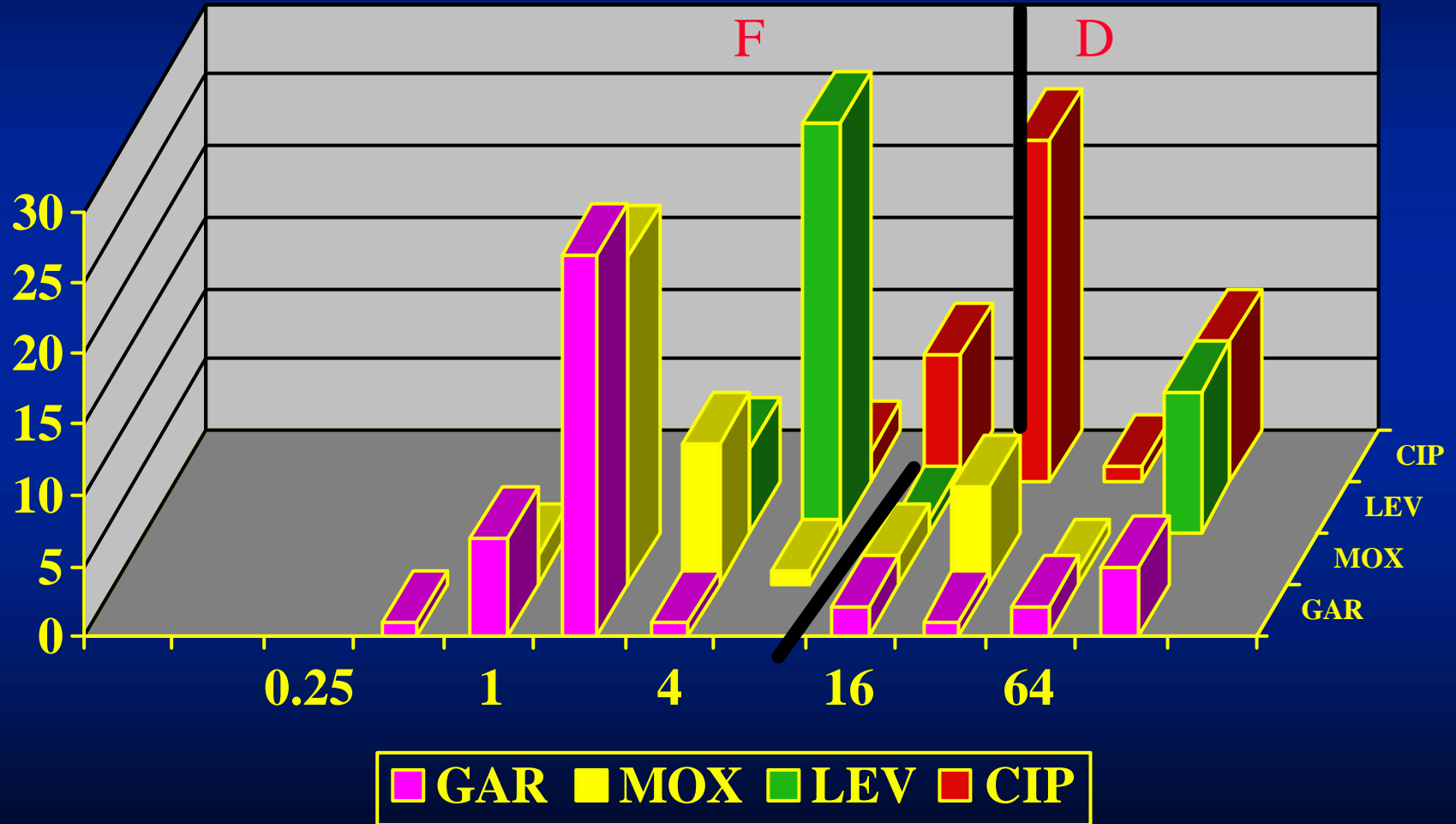
Dial and colleagues also raised the issue of proton-pump inhibitors as a co-factor associated with a higher risk of CDAD.

Antibiotic restriction leading to deselection of this lethal strain.
The acquisition of quinolone resistance by this strain could account for the outbreaks.

Cephalosporins, being the most common inducers of CDAD,



Activity of fluoroquinolones against *C. difficile*



C. difficile and fluoroquinolones

Antecedent use of fluoroquinolone is associated with resistance to moxifloxacin in C. difficile

Ackermann Clin Microbiol Inf 2003

56% of C. difficile Moxifloxacin -R

Not a single clone

Relationship between fluoroquinolone treatment and resistance $p = 0.009$

Metronidazole resistance

C. difficile MIC =16 mg/L in Hong Kong, Madrid and Cardiff

Wong et al. Diagn Microbiol Infect Dis 1999 ;34:1-6

Pelaez AAC 2002,46:1647-1650

Brazier et al. JAC 2001;48:471-472

Equine isolates in Sacramento MIC = 32 mg/l

Jang et al. Clin Infect Dis 1997, S2 66 -267

C. difficile 027

Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P. Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 1988;56:2299-306

Souche ribotype 027 (FQ-S)

Délétion de 18bp dans le gène régulateur (sans augmentation de la quantité de toxine)

+ mutation 117 codon stop sur le régulateur

+toxine binaire

REA 24 sous-types dans le ribotype 0 27

Bref on ne sait pas !

Clostridium difficile

the name of the game is isolation and cleaning