

# ***Clostridium difficile* :** **Un entéropathogène ré-émergent**

**Dr Frédéric BARBUT**

UPRES n°EA2392, Université Pierre et Marie Curie,

Hôpital Saint-Antoine  
184 rue du faubourg Saint-Antoine  
75012 PARIS

Juin 2006

## **HISTORIQUE**

- **1893 : Observation princeps de colite pseudo-membraneuse CPM (*Finley et al.*)**
- **1935 : Description de *Bacillus difficilis* (flore digestive d'enfants) (*Hall et O'Toole*)**
- **1978 : Rôle de *C. difficile* dans les CPM (*Bartlett & Larson*)**



## **Clostridium difficile**

- BGP anaérobie strict
- Spore subterminale
- Souches toxigènes (pathogènes) ou non toxigènes (non pathogènes)
  - Toxine A = « entérotoxine » = TcdA
  - Toxine B = « cytotoxine » = TcdB

## **SPECTRE CLINIQUE**

<b>Population étudiée</b>	<b>Toxine B (%)</b>
• <b>Patients avec CPM post-ATB</b>	<b>95-100</b>
• <b>Patients avec diarrhée post-ATB sans CPM</b>	<b>10-25</b>
• <b>Adultes sains</b>	<b>&lt;1</b>
• <b>Nouveau-nés sains</b>	<b>5-63</b>

D'après Bartlett et coll., Clin. Infect. Dis. 1994 ; 18 : 265-272

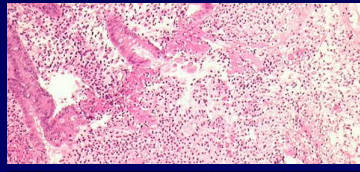
## Infections à *C. difficile* : clinique

- diarrhées simples post-antibiotiques
  - modérées, signes généraux absents
  - endoscopie : muqueuse normale ou érosive
  - amélioration clinique en 2-3 jours après arrêt des antibiotiques (25%)
- colites pseudomembraneuses
  - diarrhée liquide abondante (>7 selles / jour)
  - fièvre (75%), hyperleucocytose
  - déshydratation extracellulaire, entéropathie exsudative
  - endoscopie : lésions aphtoïdes jaunâtres éparses ou confluentes
  - complications : choc septique, mégacôlon toxique, perforation, décès

Bartlett JG. *Clin Infect Dis* 1994  
Kelly CP et al. *N Engl J Med* 1994

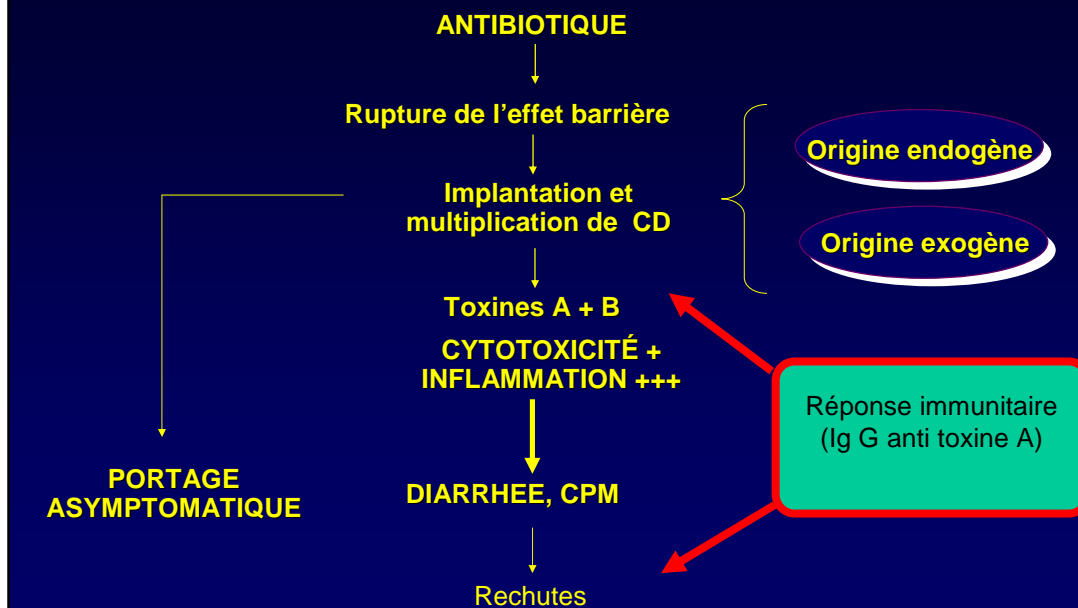


Endoscopie (Source : Hôpital Saint-Antoine, Paris)



Epithélium superficiel détruit (Source : Université Libre de Bruxelles)

## PHYSIOPATHOLOGIE



## ANTIBIOTIQUES et INFECTIONS à *C. DIFFICILE*

≈ TOUS LES ATB ont été incriminés

- ⇒ large spectre
- ⇒ actifs sur la flore anaérobie dominante
- ⇒ associations plus à risque
- ⇒ une seule dose est suffisante

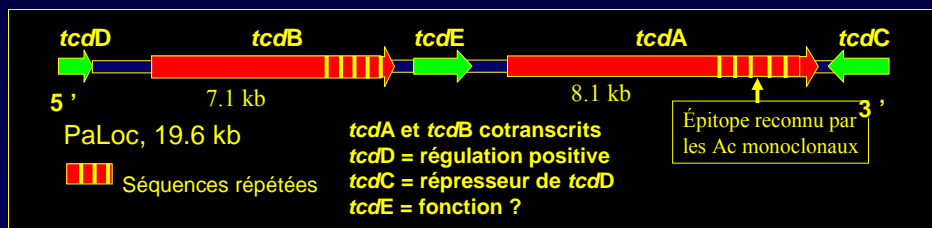
Fréquent	céphalosporines, amoxicilline+acide clavulanique, clindamycine, <b>fluoroquinolones</b>
Peu fréquent	macrolides, autres pénicilline, cyclines, cotrimoxazole,
Rarement	métronidazole, vancomycine

(Spencer JAC 1998)

## Virulence

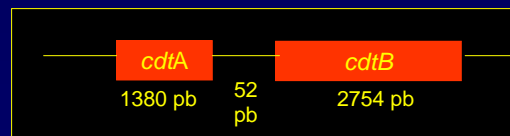
### • Large clostridial toxins (LCT) +++

- 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



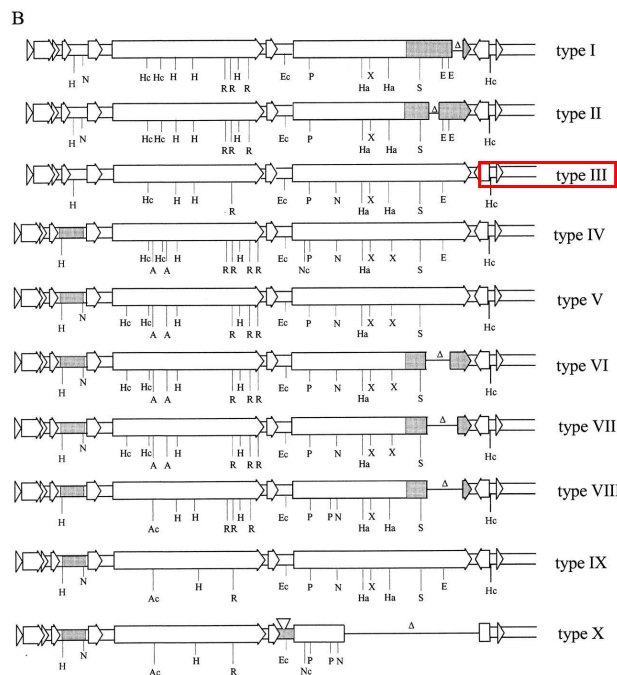
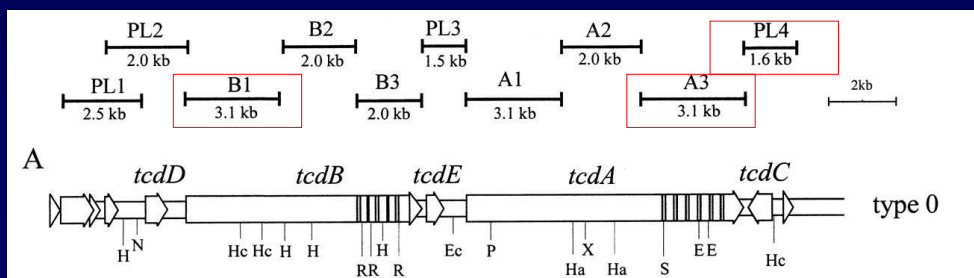
## TOXINOTYPAGE (Rupnik et al., JCM 1998, 2240-2247)

### • 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)



## 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

## Infections à *C. difficile* : incidence habituelle

- À l'hôpital : 1 – 10 p. 1000 admissions
  - type de services
  - pression antibiotique
  - mesures d'isolement en place
  - prescriptions de recherche de *C. difficile*

Olson MM et al, *ICHE* 1994  
Alfa MJ et al, *J Clin Microbiol* 1998
- Nosocomiales dans >70% des cas
  - souvent épidémiques
  - réanimation, maladies infectieuses, hématologie, gériatrie
  - favorisées par méconnaissance, diagnostic tardif, difficulté à reconnaître un clone épidémique
  - CD est responsable de plus de 10% des diarrhées nosocomiales

Svenugsson B et al, *J Clin Microbiol* 2003
- Portage asymptomatique encore plus fréquent
  - 8 – 21% des patients acquièrent *C. difficile*
  - restent asymptomatiques dans 2/3 cas

McFarland LV et al, *N Engl J Med* 1989  
Clabots CR et al, *J Infect Dis* 1992

## Le nouveau visage des infections à *C. difficile* (ILCD)

- L'incidence des ILCD augmente aux USA et au Canada
  - X8 au Québec entre 1994 et 2004
  - X3 aux Etats Unis depuis 1996
- La fréquence des formes sévères d'ILCD augmente
  - Choc septique, mégacolon toxique, perforation, colectomie....
  - Létalité x3 entre 1990 et 2003
- Les échecs thérapeutiques par métronidazole deviennent plus fréquents
  - Échec par MTZ X2.5 entre 2002 et 2004 (9.6% vs 25.7%)
  - Taux de rechutes à M+2 X2 chez les patients >65 ans
- Un clone particulière hypervirulent dissémine aux USA, Canada et en Europe
  - Hypervirulence liée à l'hypersecrétion de toxines A et B et/ou de toxine binaire

***Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity**

Jacques Pépin, Louis Valiquette, Marie-Eve Alary, Philippe Villemure, Anick Pelletier, Karine Forget, Karine Pépin, Daniel Chouinard

Fast-tracked article. Early release, published at www.cmaj.ca on Aug. 4, 2004. Subject to revision.

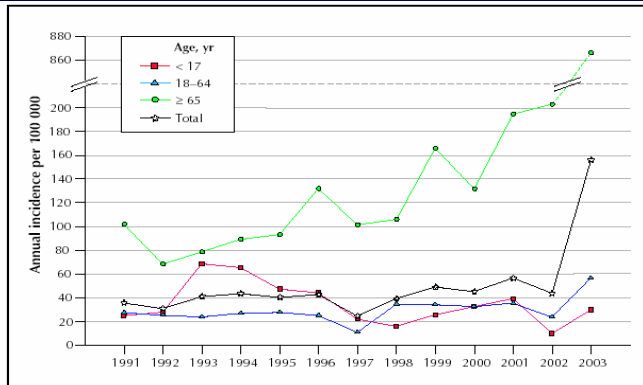


Fig. 1: Annual incidence (per 100 000 population) of *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) in Sherbrooke, Que., 1991-2003.

**Table 1: Patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) in the Estrie region of Quebec who died within 30 days after diagnosis or who had complicated CDAD, 1991-2003**

Period	No. of patients with CDAD*	No. (%) who died within 30 days after diagnosis	Adjusted OR (95% CI)†	No. (%) who had complicated CDAD‡	Adjusted OR (95% CI)†
1991-1992	169	8 (4.7)	1.0	12 (7.1)	1.0
1993-1994	217	11 (5.1)	1.7 (0.5-5.3)	14 (6.5)	1.0 (0.4-2.7)
1995-1996	215	13 (6.0)	1.6 (0.5-5.0)	17 (7.9)	0.9 (0.3-2.2)
1997-1998	192	11 (5.7)	1.1 (0.4-3.7)	13 (6.8)	0.6 (0.3-1.7)
1999-2000	248	19 (7.7)	1.5 (0.5-4.6)	28 (11.3)	1.2 (0.5-2.9)
2001-2002	244	21 (8.6)	1.6 (0.5-4.7)	28 (11.5)	1.1 (0.5-2.5)
2003	390	54 (13.8)	3.0 (1.1-8.4)	71 (18.2)	2.2 (1.0-4.9)
<i>p</i> value		< 0.001§	< 0.001¶	< 0.001§	0.001¶

Note: OR = odds ratio, CI = confidence interval.

\*Includes only patients for whom enough information was available to assess these outcomes.

†Adjusted for age, sex, initial treatment, immune status, and tube feeding and surgery in the 2 months preceding diagnosis; 1991-1992 was used as the baseline period.

‡Presence of one or more of the following: megacolon, perforation, colectomy, shock requiring vasopressor therapy, death within 30 days after diagnosis.

§ $\chi^2$  test for trend.

¶ $\chi^2$  test, comparing 2003 with all other years.

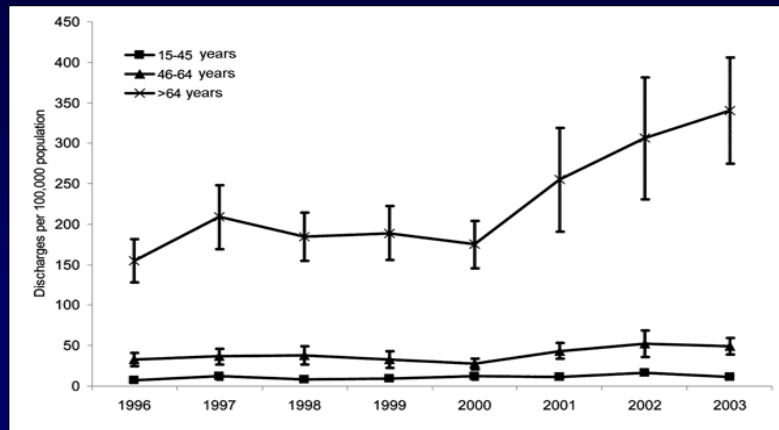


A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea with High Morbidity and Mortality (Loo V. et al., NEJM, 2005, 353, 2442-9)

- Etude prospective dans 12 hôpitaux québécois (8 à Montréal, 2 à Sherbrooke, 1 à Laval, 1 à St Hyacinthe)
- 1703 ILCD de Janvier à Juin 2004
- 157 souches caractérisées par ECP, toxine binaire, polymorphisme du gène *tcdC*
- Un clone prédomine :
  - 82.2% (129/157) des souches ont le même pulsotype
  - positif en toxine binaire
  - présence d'une délétion de 18 bp dans *tcdC*
  - R CIP, MOXI, GATI, LEVO (>32 mg/l) (vs 33% pour les autres souches)
  - S CM (clindamycine)
  - Associé à une forme plus sévère d'ILCD (15.5% vs 7.1% p=0.34)

## Taux d'hospitalisation avec diagnostic de *C. difficile*, par classe d'âge et année, Etats-Unis, 1996 - 2003

(C. McDonald LC et al, *Emerg Infect Dis* 2006)



### An Epidemic, Toxin Gene-Variant Strain of *Clostridium difficile*

L. Clifford McDonald, M.D., George E. Killgore, Dr.P.H., Angela Thompson, M.M.Sc., Robert C. Owens, Jr., Pharm.D., Sophia V. Kazakova, M.D., M.P.H., Ph.D., Susan P. Sambol, M.T., Stuart Johnson, M.D., and Dale N. Gerding, M.D.

(NEJM 2005, 353, 2433-41)

- Etude de 187 souches isolées de 8 établissements (6 états) ayant connu des épidémies entre 2001-2003
- Caractérisation par REA, ECP, toxinotypage, toxine binaire, profil de résistance aux antibiotiques
- Comparaison des résultats à ceux obtenus à partir d'une collection historique de 6000 souches (1984-90)

**Table 1. Isolates of *Clostridium difficile* According to Health Care Facility and the Proportion of Isolates Belonging to the BI/NAP1 Strain.**

Health Care Facility	Date of Onset of Outbreak	No. of Isolates Tested	BI/NAP1 Strain no. (%)
Georgia	Oct. 2001	46	29 (63)
Illinois	July 2003	14	6 (43)
Maine, Facility A	March 2002	13	9 (69)
Maine, Facility B	July 2003	48	30 (62)
New Jersey	June 2003	12	9 (75)
Oregon*	April 2002	30	3 (10)
Pennsylvania, Facility A	2000–2001	18	7 (39)
Pennsylvania, Facility B	Oct. 2003	6	3 (50)
Total		187	96 (51)

- 51% des souches BI/NAP1 (vs seulement 18 souches historiques)

- Toxinotype III,
- Toxine binaire +,
- délétion 18 pb dans *tcdC*
- R Moxiflo (vs 0% historic BI/NAP1)

**Table 2. Resistance of Current BI/NAP1 *Clostridium difficile* Isolates, Current Non-BI/NAP1 Isolates, and Historic BI/NAP1 Isolates to Clindamycin and Fluoroquinolones.\***

Antimicrobial Agent	Current BI/NAP1 Isolates (N=24) no. with intermediate resistance or resistant (%)§	Current Non-BI/NAP1 Isolates (N=24) no. with intermediate resistance or resistant (%)§	P Value¶	Historic BI/NAP1 Isolates (N=14) no. with intermediate resistance or resistant (%)	P Value¶
Clindamycin	19 (79)	19 (79)	1.0	10 (71)	0.7
Levofloxacin	24 (100)	23 (96)	1.0	14 (100)	1.0
Gatifloxacin	24 (100)	10 (42)	<0.001	0	<0.001
Moxifloxacin	24 (100)	10 (42)	<0.001	0	<0.001

\* The fluoroquinolones are levofloxacin, moxifloxacin, and gatifloxacin. Current BI/NAP1 isolates are those obtained since 2001, and historic BI/NAP1 isolates are those obtained before 2001.  
 † The P value is for the comparison between BI/NAP1 and non-BI/NAP1 isolates.  
 ‡ The P value is for the comparison between current and historic BI/NAP1 isolates.  
 § A minimal inhibitory concentration breakpoint of not more than 2 µg per milliliter was used for the definition of susceptibility, on the basis of the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute for trovafloxacin.

### Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe

Michel Warny, Jacques Pepin, Aiqi Fang, George Killgore, Angela Thompson, Jon Brazier, Eric Frost, L Clifford McDonald

Lancet 2005, 366, 1069-1084

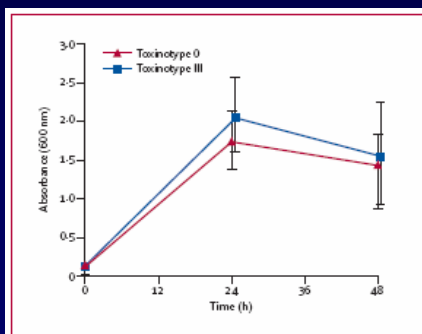


Figure 2: Growth curves of toxinotype 0 and toxinotype III (NAP1/027). Mean cell density and SDs are shown.

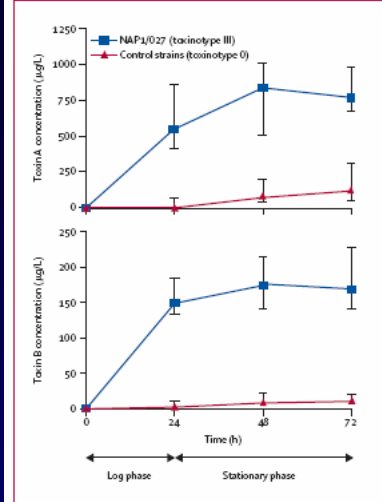


Figure 3: In vitro production of toxins A and B by *C. difficile* isolates. Median concentration and IQRs are shown. *C. difficile* strains included 25 toxinotype 0 and 15 NAP1/027 strains (toxinotype III) from various locations.

- Le clone épidémique produit en moyenne 16 et 23 fois plus de toxines A et B que les souches de toxinotype 0

# Infections à *C. difficile* : évolution récente en Europe

Eurosurveillance, 30 juin 2005

## Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypotoxin-producing strains in Canada and the US

Alyson Smith ([alyson.smith@bssmail.nhs.uk](mailto:alyson.smith@bssmail.nhs.uk)), Thames Valley Health Protection Unit, Buckinghamshire, United Kingdom

Laboratory tests have confirmed that 59% of the *C. difficile* isolates from this outbreak belong to **PCR ribotype 027**, which is unusual in the United Kingdom (UK), and which has also been associated with outbreaks in Canada and the United States (US) [1,2].

Eurosurveillance, 14 juillet 2005

## Isolation of *Clostridium difficile* ribotype 027, toxinotype III in the Netherlands after increase in *C. difficile*-associated diarrhoea

Jim van Steenberghe<sup>1</sup> ([Jim.van.Steenbergen@rivm.nl](mailto:Jim.van.Steenbergen@rivm.nl)), Sylvia Debast<sup>2</sup>, Eric van Kregten<sup>3</sup>, Renate van den Berg<sup>4</sup>, Daan Notermans<sup>1</sup> and Ed Kuijper<sup>4</sup>

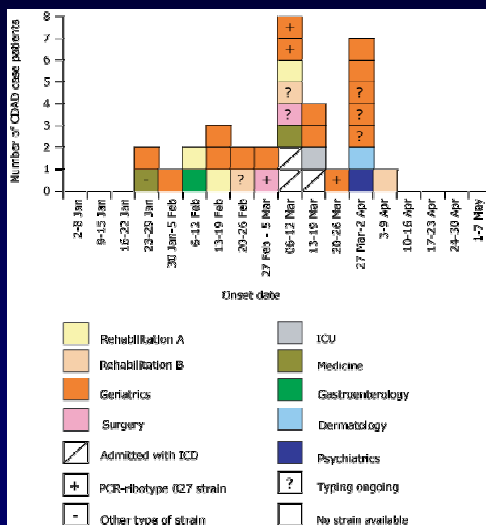
Eurosurveillance, 20 Octobre 2005

## First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027, toxinotype III in Belgium

Rafael Joseph<sup>1</sup>, Danny Demeyer<sup>1</sup>, Dirk Vanrenterghem<sup>1</sup>, Renate van den Berg<sup>2</sup>, Ed Kuijper ([E.J.Kuijper@lumc.nl](mailto:E.J.Kuijper@lumc.nl))<sup>2</sup>, M. Delmée<sup>3</sup>

## First cluster of *C. difficile* toxinotype III, PCR-ribotype 027 associated disease in France: preliminary report

M Tachon<sup>1</sup>, C Cattoen<sup>1</sup>, K Blanckaert<sup>2</sup>, I Poujol<sup>3</sup>, A Carbonne<sup>2</sup>, F Barbut<sup>4</sup>, JC Petit<sup>4</sup>, B Coignard<sup>3</sup> ([b.coignard@invs.sante.fr](mailto:b.coignard@invs.sante.fr))



Eurosurveillance  
weekly release

volume 11  
issue 5  
date 4 May 2006

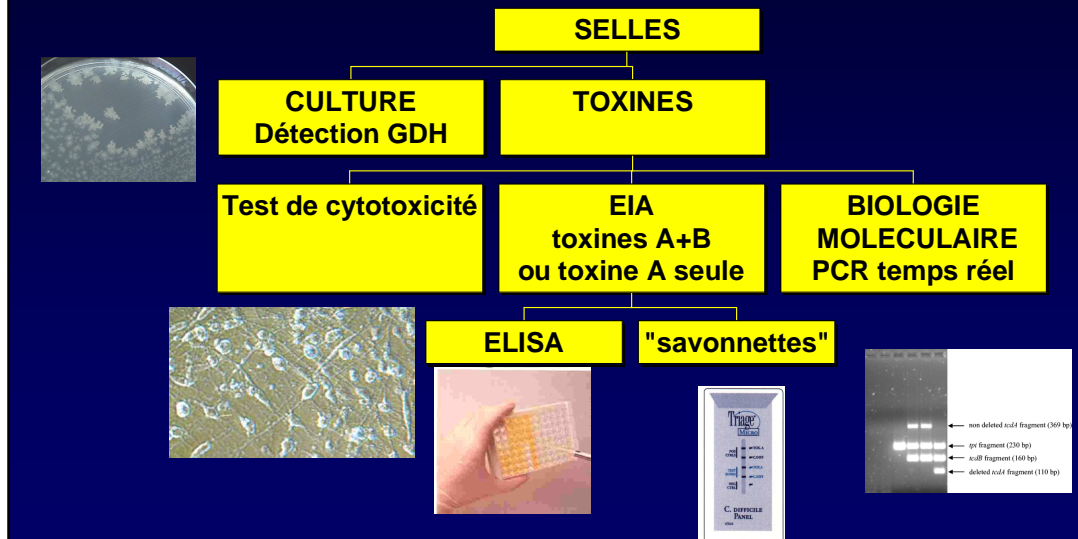
## POURQUOI UNE TELLE EVOLUTION ?

- Vieillessement de la population ?
- Changement dans les pratiques d'hygiène (SHA) ?
- Augmentation de la pression de sélection (fluoroquinolones)
- Plus grande résistance des spores ? Meilleure adaptation à l'environnement ?

## De nombreuses interrogations...

- Pourquoi les souches « 027 » sont-elles plus virulentes ?
  - Hyperproduction de toxines A et B ?
  - Toxine Binaire ?
  - Autres mécanismes ?
- Pourquoi les souches «027» produisent-elles une grande quantité de toxines A et B ?
  - Est-ce spécifique du clone épidémique «027»?
  - Rôle de la délétion de 18 bp de *tcdC* ?

# DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE DES ILCD



## METHODES DE DIAGNOSTIC (Lalande V. , Barbut F, RFL 2005)

Méthodes	Détection	Avantages	Inconvénients
Endoscopie	Fausses membranes	Spécifique	Long, invasif Faible VPN
Effet cytopath.	Toxine B	Gold Standard Sensibilité +++	Long (48h) Neutralisation ECP Infrastructure
EIA	Toxine A et / ou B	Rapide++ (<3h) Simple	Sensibilité 59-90% Coût +++
EIA	Antigène (GDH)	Rapide +++ Tests unitaires	Excellente VPN Peu spécifique Coût++
Culture toxigénique	Germe	Sensibilité+++ Etudes épidémiologiques (typage, sensibilité)	Long (>48 h) Peu spécifique Porteur asymptom

## DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE DU CLONE EPIDEMIQUE « 027 »

- Méthode de dépistage
  - Soit par le profil de résistance aux antibiotiques (MOX, ERY, CM)
  - Soit par le toxinotype (III)
  - Soit par la toxine binaire
- Méthode de référence
  - PCR ribotypage : souche ayant le profil « 027 » par rapport à une souche épidémique de référence (par ex. souche CD196 ou souche épidémique américaine)

Nécessité d'isoler la souche en culture

## Infections à *C. difficile* : prévention

- Prévention des diarrhées simples
  - prévention primaire = prescription antibiotique raisonnée
  - réduction de prescription de certains antibiotiques corrélée à la réduction de l'incidence des ICD
- Prévention de la transmission croisée
  - diagnostic rapide des ICD
  - isolement géographique / *cohorting* (levée 72h après fin des symptômes)
  - précautions « contact »
  - renforcement du port de gants
  - renforcement du lavage des mains
    - inefficacité des produits hydro-alcooliques
    - seule l'action mécanique du lavage est efficace
  - en cas d'épidémie d'ICD, se laver les mains avec du savon et de l'eau après avoir enlevé ses gants
  - entretien des locaux (hypochlorite de sodium à 0,5% de chlore actif)

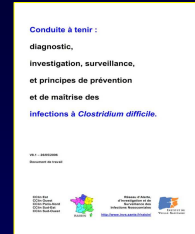
Climo MW et al, *Ann Intern Med* 1998  
Carling P et al, *ICHE* 2003  
Khan R et al, *JHI* 2003  
Pear SM et al, *Ann Intern Med* 1994

INSPQ, 2005

Boyce JM et al, *ICHE* 2002

## C. difficile en France : préparation

- Guide Raisin : consultation publique juin 2006  
<http://www.invs.sante.fr/raisin>
- Contenu
  - état des lieux des connaissances
  - définitions de cas
  - recommandations pour l'alerte et la surveillance
    - signalement des ICD sévères et des épidémies d'ICD (critère 1a ± critère 2)
    - promotion de la culture de souches pour expertise ultérieure
    - conduite à tenir (investigation)
  - structuration d'un réseau de laboratoires avec CNR pour expertise
  - recommandations de prévention et de contrôle ➔ CTINILS/CSHPF
- Mise en place d'une surveillance des ICD à échéance 2007 ?



## Conclusion

- Situation préoccupante
  - augmentation de l'incidence des ILCD
  - augmentation de la sévérité des ILCD
    - Québec : 18,2% formes compliquées
    - Québec : létalité x3 (13,8%)
  - moins bonne réponse au métronidazole
- Emergence et dissémination rapide d'un clone hypervirulent
  - 82% des souches isolées au Québec
  - 51% dans certains hôpitaux des Etats-Unis
  - PCR-ribotype « 027 », pulsotype NAP1, toxinotype III,
  - toxine binaire (+),
  - résistance aux nouvelles fluoroquinolones,
  - hyperproduction de toxines A et B, délétion du gène *tcdC*

Gilca R et al, *INSPQ* 2005

McDonald LC et al, *Emerg Infect Dis* 2006

Gilca R et al, *INSPQ* 2005

Pépin J et al, *CMAJ* 2005

Loo VG et al, *CMAJ* 2004

Loo VG et al, *N Engl J Med* 2005

McDonald LC et al, *N Engl J Med* 2005

## Conclusion

- Investiguer tout cas de diarrhée nosocomiale à la recherche de *C. difficile* en l'absence d'une autre étiologie évidente
- Si infection à *C. difficile* confirmée, de forme sévère ou épidémique, signaler l'épisode au CCLin et à la Ddass
- Promouvoir la culture de selles pour expertise ultérieure des souches en lien avec le CNR Anaérobies
- Mettre en place des mesures de contrôle adaptées
- Instituer une surveillance des ICD pour évaluer leur impact
- Suivi via <http://www.invs.sante.fr/raisin> , rubrique « Alerte »