

Clostridium

Mme GHAROUT A.

- Le genre *Clostridium* compte plus de 200 espèces. Ce genre très hétérogène comprend des bacilles à Gram positif mobiles (sauf *C. perfringens*, *C. ramosum* et *C. innocuum*) formant des **spores** souvent **déformantes terminales ou subterminales**.
- Grace à **ces spores** qui permettent une **très grande résistance à la chaleur, à la dessiccation et aux traitements antiseptiques**, les *Clostridium* sont **très répandus dans l'environnement, notamment au niveau du sol**.
- Sauf quelques espèces qui sont aérotolérantes, les *Clostridium* sont des **bactéries à métabolisme strictement anaérobie**.
- Les *Clostridium* ne produisent **ni catalase ni oxydase**.

- Espèces pathogènes productrices de toxines
- bactéries du sol
- Espèces ingérées colonisation du tube digestif

Clostridium difficile

- Bacille à Gram Positif anaérobie, **mobile.**
- Spore **ovale, subterminale,**
déformante et **résistante aux désinfectants.**



- **Forme sporulée:**
- survie ++
- résistance aux désinfectants chimiques
- source de l'infection
- résistance aux antibiotiques: récurrence de l'infection
- **Forme végétative**
- Production de toxines

Commensal du tube digestif de l'homme:

Colonisation variable selon l'âge:

Nouveau-nés: 20 à 70%

↓ progressive → 2 ans

Adulte: 1 à 3%

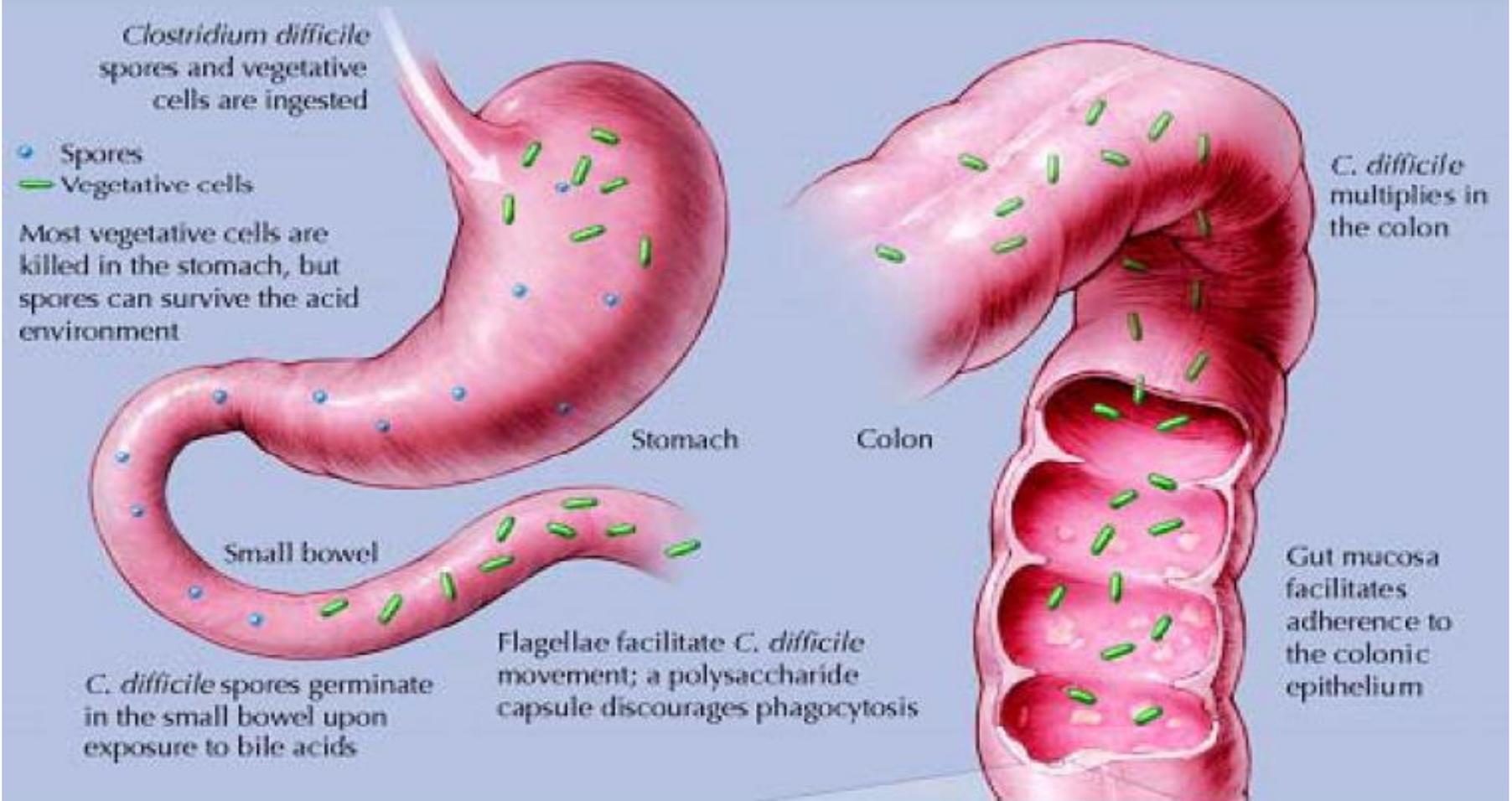
Tube digestif des animaux; environnement (sol)

- □ **Facteurs de virulence:**
- Toxines A « entérotoxine » (gène *tcdA*)
- Toxines B +++ « cytotoxine » (gène *tcdB*)
- Toxine binaire CDT (gènes *ctdA* et *ctdB*)
- *C. difficile* toxines-négatif : **non pathogène**
- Colonisation chez les hospitalisés: 20 – 40%

Colonisation adultes sains : 2 – 3%

Physiopathologie

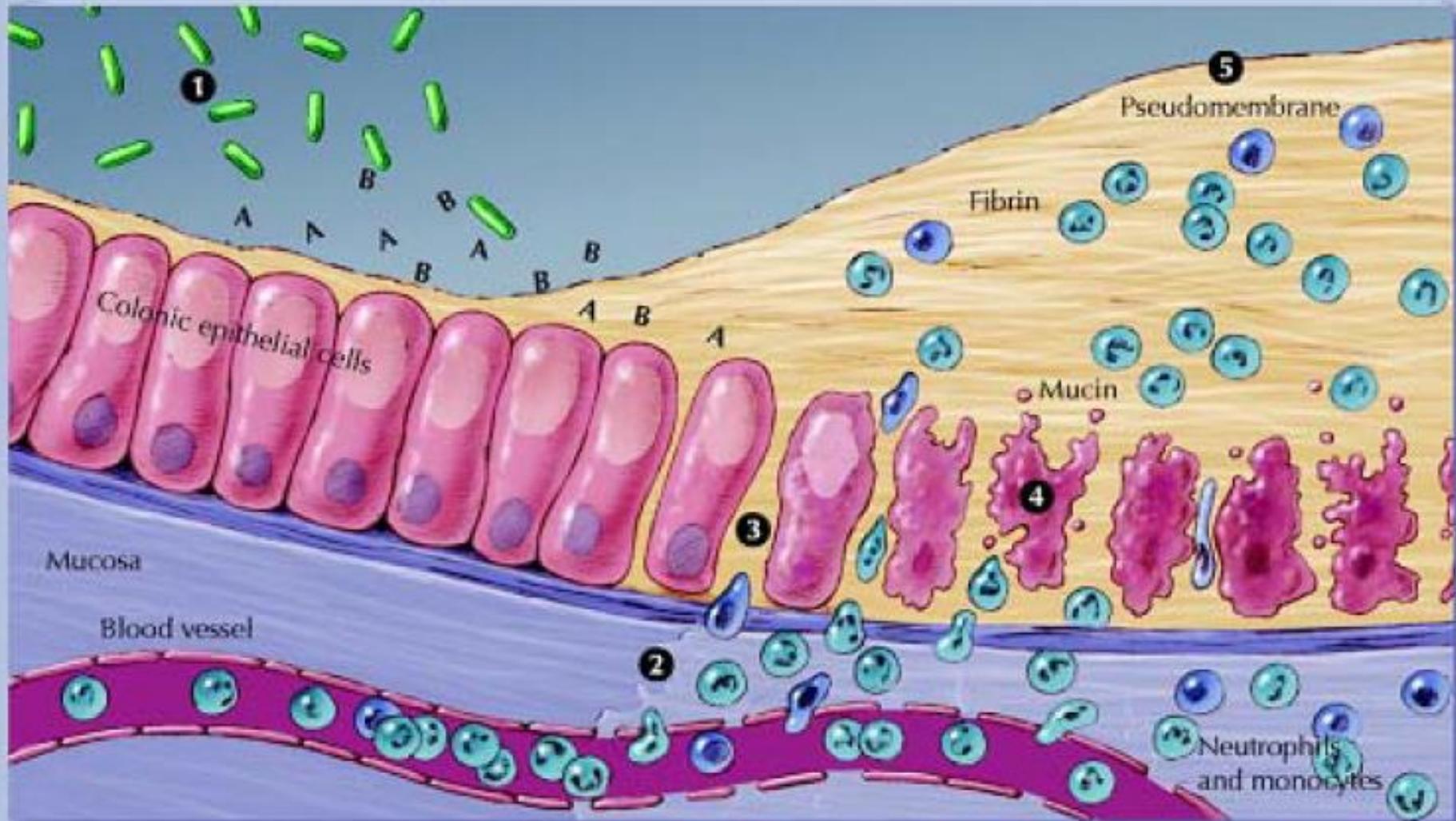
Infection à *Clostridium difficile* Colites pseudo-membraneuses



- La bactérie elle-même n'est pas invasive. Les toxines A et B produites par la bactérie pénètrent dans l'entérocyte conduisant à la désorganisation du cytosquelette et l'altération des jonctions serrées inter-cellulaires.
- Les toxines induisent également la production de différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL1, IL6...) au niveau de la lamina propria. Des lésions de colite de gravité variées s'ensuivent, avec une composante pathogénique ischémique, expliquant la production des pseudo-membranes caractéristiques.

Infection à *Clostridium difficile*

Colites pseudo-membraneuses



Souches toxigènes:

2 toxines: A et B: induisent des lésions intestinales:

A: entérotoxine: inflammation et exsudation de la muqueuse
nécrose des cellules épithéliales, hémorragies intestinales

B: cytotoxine: arrêt de la multiplication cellulaire, inhibition de la
motilité intestinale

⇒ Sécrétion liquidienne et formation de fausses membranes

Rôle des ATB: (clindamycine, cotrimoxazole, céphalosporines...)

disparition de la flore colique

→ perte de l'effet de barrière: prolifération de *C. difficile*

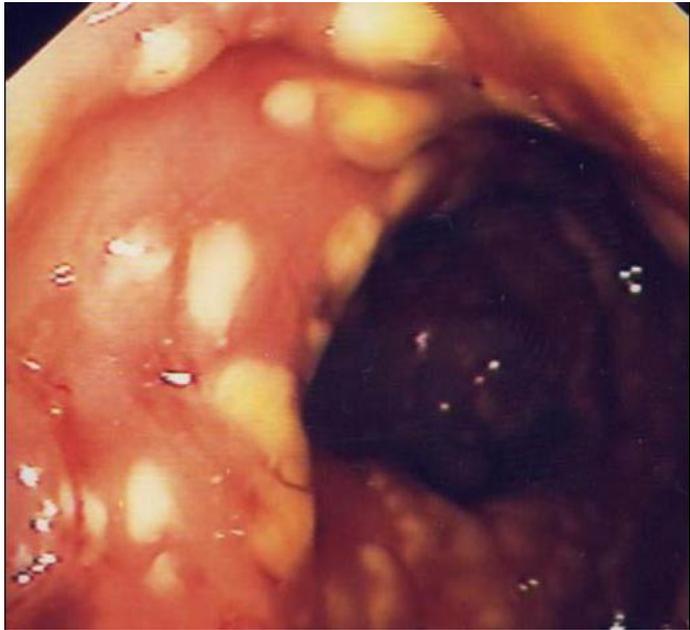
- **Facteurs de risque d'Infection à *C. difficile***
- Exposition antibiotique dans les 2-3 mois
- Hospitalisation ou soins de longue durée
- Unité de soins intensifs
- Âge > 65 ans
- Comorbidité

- **Infection à *Clostridium difficile***

- Colites pseudo-membraneuses

3 à 8 selles/j, crémeuses ou verdâtres, rarement hémorragiques (< 5 %)

- Fièvre modérée ($\approx 75\%$ des cas)
- Douleurs abdominales habituelles
- Biologie : hyperleucocytose à polynucléaires,
- syndrome inflammatoire



- **Diagnostic des infections à *C. difficile***
- Diagnostic endoscopique
- Diagnostic bactériologique

culture

toxines

méthodes

cibles

interprétations

**Test de cytotoxicité
des selles**

EIA toxines A et B



Présence de toxines
libres dans les selles



ICD

GDH

culture



Présence d'une souche
de *C.difficile*



**Souche toxigène
ou
non toxigène?**

Culture toxigénique

Méthodes
moléculaires

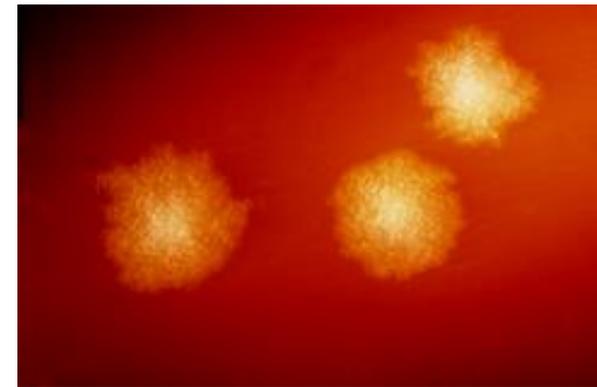


Présence d'une souche
toxigène de *C.difficile*



ICD
ou
portage asymptomatique

- L'isolement de *C. difficile* peut se faire sur milieu sélectif (**CCFA pour cycloserine-cefoxitine-fructose-agar**) ou sur **milieu chromogène**.
- Après 48 heures d'incubation à 35 °C en anaérobiose, les colonies sur milieu CCFA sont reconnaissables (d'un diamètre de 3 à 5 mm, grises, circulaires à bords irréguliers et non hémolytiques) avec un aspect de « **verre dépoli** » à la **loupe binoculaire** et une odeur caractéristique de « **crottin de cheval** ».
- **Lumière UV: fluorescence jaune-vert**



- **Immunochromatographie: (test rapide en moins de 30 minutes)**
- Le test *C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE*[®] est un test qui permet de détecter simultanément les antigènes de **la glutamate déshydrogénase (GDH)** et des **toxines A, B** de *C. difficile* dans les échantillons de selles. Le test détecte les antigènes de *C. difficile*, GDH, dans des cas de suspicion de *C. difficile* et confirme ainsi la présence de souches toxigènes de *C. difficile*.

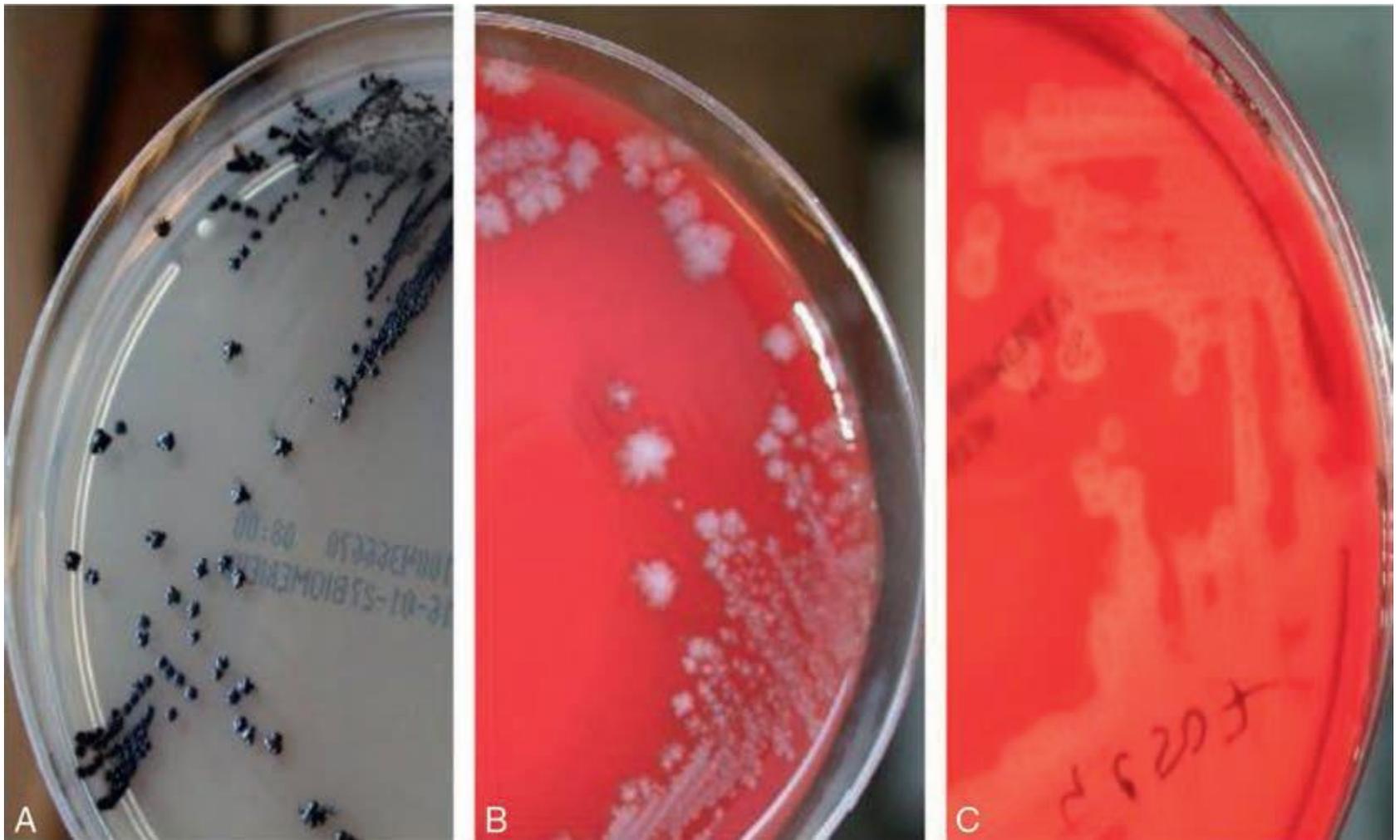
Si Ag + et toxine +: *C. difficile* toxigène

Si Ag – et toxine -: absence de *C. difficile*

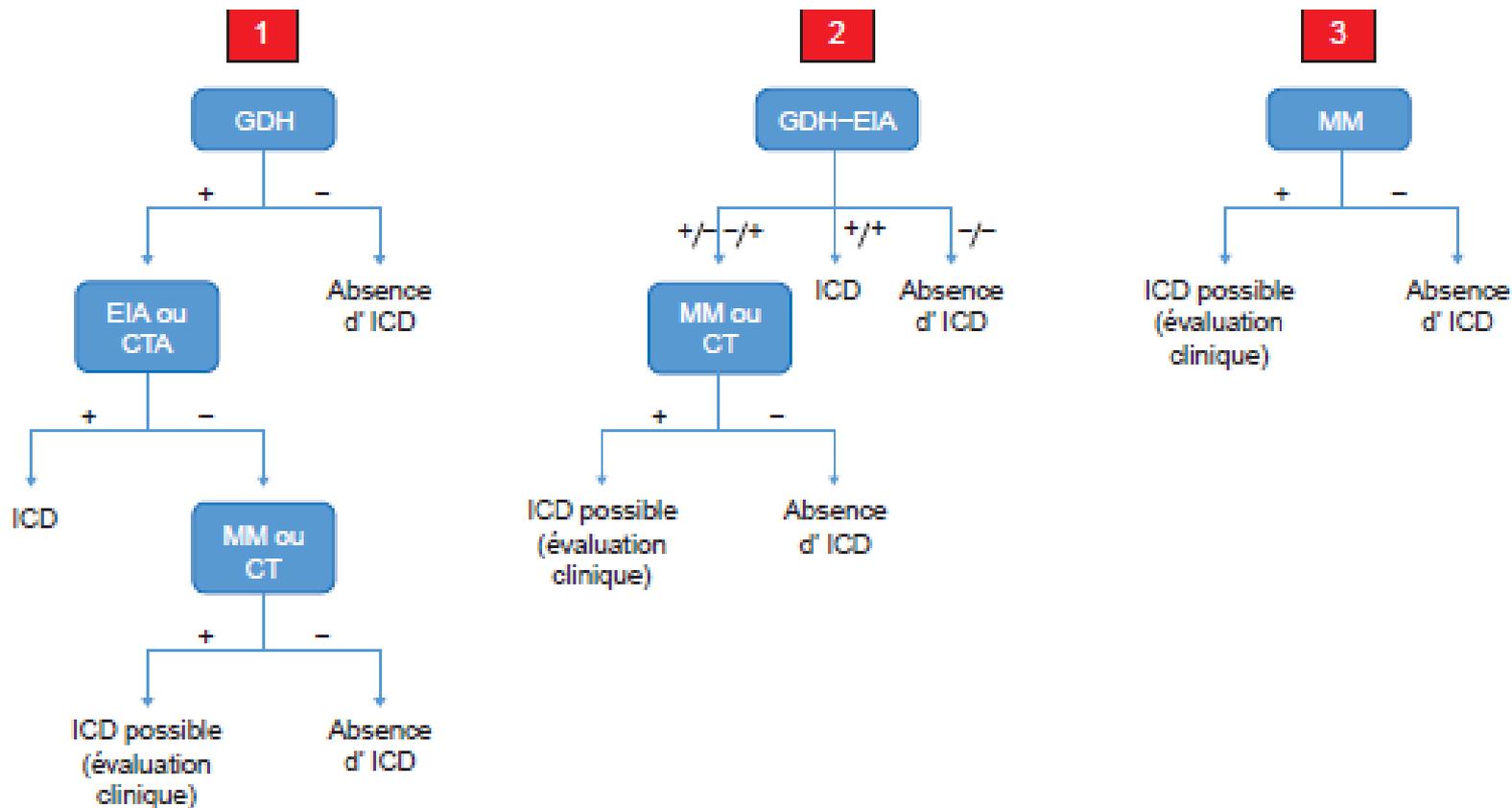
Si Ag + et toxine -: présence de *C. difficile* :

→ pouvoir toxigène sur les colonies





Aspect macroscopique des colonies de *C. difficile* sur milieu chromogénique CDIF de chez bioMérieux (A) ou sur milieu CCFA (B) et de colonies β -hémolytiques sur gélose au sang frais (C).



Algorithmes pour le diagnostic des infections à *C. difficile*. CT : culture toxigénique ; CTA : test de cytotoxicité des selles ; EIA : test immuno-enzymatique ou immunochromatographique ; GDH : glutamate déshydrogénase ; ICD : infections à *C. difficile* ; MM : méthode moléculaire.

Le test de cytotoxicité est le gold standard pour détecter les toxines libres dans les selles mais requiert une infrastructure adaptée à la culture cellulaire et la technique est longue.

La culture toxigénique consiste à isoler une souche de *C. difficile* à partir des selles sur un milieu sélectif adapté en atmosphère anaérobie puis à déterminer in vitro sa capacité à produire des toxines. Cette méthode est également longue;

- La GDH est une enzyme produite par les souches de *C. difficile*. La détection de cette enzyme par des tests immunoenzymatiques (EIA) dans les selles permet de renseigner sur la présence de la bactérie. Cette méthode est sensible (de l'ordre de 90 % comparativement à la culture) mais manque de spécificité.
- La GDH est produite aussi bien par les souches toxigènes que les souches non toxigènes. Elle représente donc un bon marqueur de la présence de *C. difficile* dans les selles, mais ne permet pas de prédire le caractère pathogène de la souche qui devra être confirmé ou infirmé par un second test.

Clostridium botulinum

Bacille à Gram, sporulé

Bactérie tellurique:

spores contaminent légumes et fruits

Mauvaise stérilisation de conserves

Spore: thermo-résistante: **3 à 5h à 100°C**

→ Chauffer 10 min à 120°C (conserves industrielles)

Présence d'une toxine: toxine botulique:

7 sérotypes (A à G): **A, B, E, F**: pathogène chez l'homme

Responsable du botulisme: intoxication

! Maladie à déclaration obligatoire



3 formes de botulisme:

- Botulisme classique:

Ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment

→ Fixation irréversible sur les terminaisons nerveuses au niveau de la jonction neuro-musculaire

→ empêche libération d'acétylcholine → paralysie.

1^{ers} signes en **18 à 96h**

Troubles oculaires (mydriase: La *mydriase* est une augmentation du diamètre de la pupille par contraction du muscle dilatateur de l'iris), puis dysphagie avec sécheresse buccale, troubles de l'élocution

Troubles digestifs: nausées, vomissements, constipation

- **Botulisme infantile**: (et chez adultes immunodéprimés)

Paralysie flasque du nouveau-né

Ingestion de spores contenues dans miel ou poussières

Immaturité du TD: multiplication de *C. botulinum* → sécrétion de toxine botulique



- « **Wound-botulism** »: botulisme par plaie ou d'innoculation

Pénétration de la bactérie au niveau d'une blessure

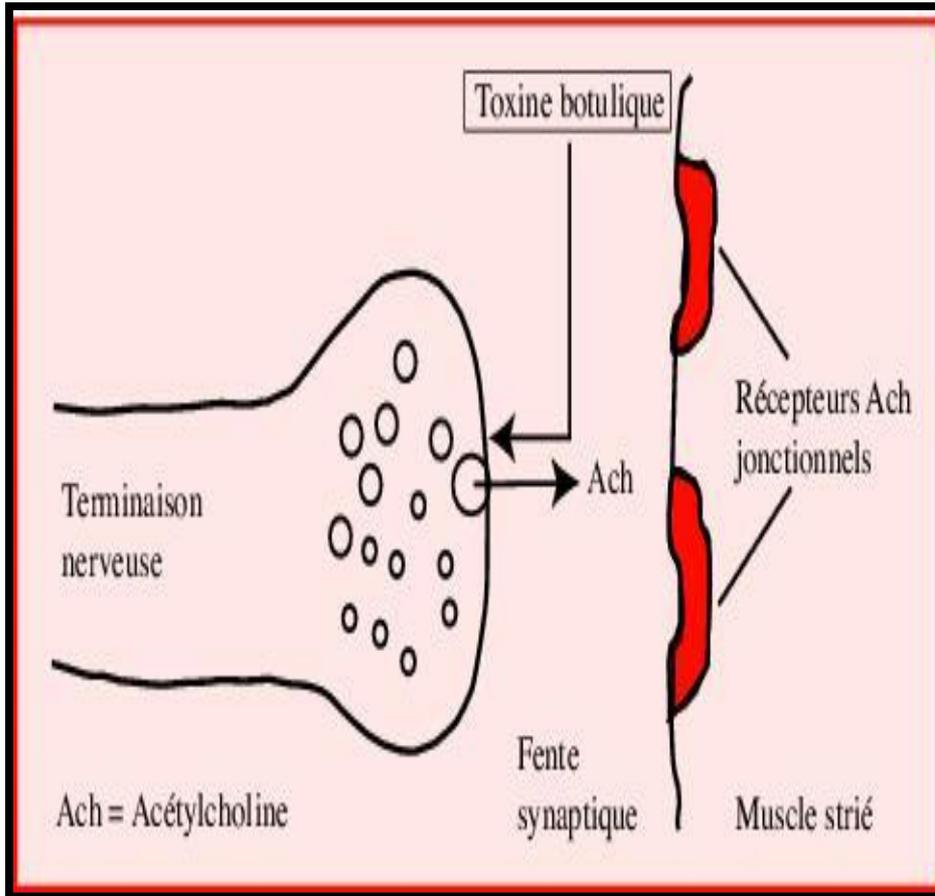
Sécrétion de la toxine *in situ* → neuroparalyse

Chez utilisateurs de drogues par voie intraveineuse

- **Pouvoir pathogène**
- Après une incubation qui **dépend de la quantité de toxine ingérée (quelques heures à quelques jours)**, le botulisme se traduit par des troubles oculaires, une sécheresse de la bouche et des paralysies d'évolution descendante, plus ou moins étendues. Les symptômes peuvent persister plusieurs semaines.
- L'atteinte des muscles respiratoires peut entraîner le décès. La maladie touche généralement plusieurs personnes (celles qui ont partagé le repas responsable).
- Chez le nourrisson, la maladie se traduit surtout par une hypotonie et une difficulté à la succion.

- **Facteurs de pathogénicité**
- La bactérie agit par la sécrétion d'une **neurotoxine**.
- Il en existe plusieurs variétés immunologiques désignées par les lettres A à G.
- Les **types A et B sont les plus fréquents**. La fraction de toxine, qui n'est pas dégradée dans l'estomac, passe dans la circulation et bloque la libération d'acétylcholine au niveau des plaques motrices, ce qui entraîne des paralysies. Comme la toxine tétanique, la toxine botulique agit en dégradant des protéines des vésicules synaptiques.
- La toxine botulique est parfois injectée à titre thérapeutique chez des patients souffrant de contractures spastiques chroniques.
- Elle est également utilisée pour l'atténuation des rides du visage.

Physiopathologie



- ⇒ Action de la toxine sur la jonction neuromusculaire, en bloquant la libération d'Acétylcholine au niveau pré-synaptique.
- ⇒ **Effet rémanent** : la toxine dans les terminaisons nerveuses ne peut pas être détruite... la synapse n'est plus fonctionnelle...
- ⇒ 6 mois pour reconstituer une nouvelle synapse...

Diagnostic:

- **Essentiellement clinique**

! Rechercher cas similaires dans l'entourage

- **Diagnostic biologique:**

Recherche du germe: aliment, selles

Recherche de la toxine: sang, aliment, selles

Toxines puissantes (1 mg contient $20 \cdot 10^6$ doses minimales mortelles, DDM pour la souris) qui inhibent la synthèse d'acétylcholine au niveau des synapses ou des plaques neuro-musculaires. De nature protéique (détruites par chauffage de 20 min à 100°C)

La toxine peut être négative mais clinique très évocatrice

10 g d'aliments suspects mis dans 30 mL de diluant

Centrifugation 15 min à 6000 tours.min⁻¹

Culot : recherche de *C. botulinum*
Mise en culture sur des milieux adéquats

Sumageant : contient éventuellement la toxine botulinique.

Deux souris sont utilisées pour confirmer la présence de toxine botulinique dans le sumageant

Injection de 1 mL de sumageant à chaque souris.

Injection simultanée à l'une des souris d'anticorps anti-toxine botulinique

La souris survit

La souris meurt en 24 heures par arrêt respiratoire

Clostridium tetani



Рис. 3.79. Опистотонус

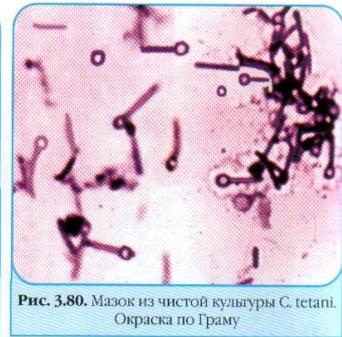


Рис. 3.80. Мазок из чистой культуры *C. tetani*.
Окраска по Граму

- C'est l'agent du tétanos.
- La bactérie pénètre au niveau d'une effraction cutanée : classiquement plaie souillée de terre, mais aussi plaie minime, lésion cutanée chronique (ulcère de jambe), plaie opératoire.
- Dans les pays en voie de développement, le tétanos néonatal est fréquent. Il est dû à l'utilisation d'instruments non stériles pour sectionner le cordon.
- On l'observe surtout chez des sujets âgés ayant perdu leur immunité

- *Clostridium tetani* : bacille anaérobie strict Gram positif formant des spores,
- Vit dans le sol,
- Bacille de Nicolaier très résistant (chaleur, antiseptiques) grâce aux spores,
- Production d'une **exotoxine** protéique neurotrope puissante,
- Bactérie localisée à la porte d'entrée, toxine se dissémine dans tout l'organisme.

- **Pouvoir pathogène**
- Après une incubation de **4 à 15 jours**, la maladie se traduit par des contractures musculaires qui débutent au niveau des masséters (muscles de la mastication) (trismus) et des muscles du visage, puis se généralisent.
- Le tétanos entraîne une mortalité de l'ordre de 25 à 30 %.
- **Facteurs de pathogénicité**
- La bactérie n'a pas de propriétés invasives. Elle prolifère localement en produisant une **toxine** protéique extrêmement active. La toxine acheminée jusqu'au système nerveux central. Elle bloque la transmission entre les neurones inhibiteurs et les neurones moteurs, ce qui entraîne la contracture des muscles. La toxine agit au niveau de la synapse en exerçant une dégradation protéolytique de certaines protéines des vésicules synaptiques.

- **Diagnostic**
- Le diagnostic clinique repose sur la constatation des contractures et la notion de blessure antérieure.
- On peut éventuellement rechercher *Clostridium tetani* dans les tissus contaminés mais cette recherche n'a aucun intérêt diagnostique ou thérapeutique.

Clostridium perfringens

- Cette bactérie est très répandue dans l'environnement et fait partie de la flore commensale de l'intestin.
- On la trouve fréquemment sur le revêtement cutané.
- Elle peut aussi contaminer des aliments.

- **A. Transmission**

- Malgré le caractère ubiquitaire de la bactérie, les infections dues à ce germe sont rares.
- Cette bactérie anaérobie ne peut se multiplier que dans des tissus anoxiques (manque d'oxygène). C'est classiquement après des traumatismes délabrants (plaie de guerre, écrasement) que l'infection à *C. perfringens* risque de se développer.
- Elle peut aussi survenir après certaines interventions chirurgicales (amputation pour artérite, chirurgie abdominale).

- **Pouvoir pathogène**
- ***1. Gangrène gazeuse***
- Dans les suites d'un traumatisme, la gangrène se traduit par une douleur locale, un oedème, la présence de crépitations à la palpation et une altération sévère de l'état général. À l'intervention chirurgicale on constate une myonécrose. La mortalité reste importante.
- ***2. Autres infections***
- *C. perfringens* peut être impliqué dans diverses suppurations intra-abdominales et dans des septicémies secondaires à des avortements clandestins.
- ***3. Intoxication alimentaire***
- Elle survient quelques heures après l'ingestion de viandes peu cuites et non conservées au froid. Elle se traduit par de la diarrhée, des douleurs abdominales et parfois des vomissements. L'évolution est en règle rapidement favorable

- **Facteurs de pathogénicité**
- *C. perfringens* peut produire une douzaine de **toxines**. Suivant la nature des *toxines* produites, on distingue plusieurs types de bactéries, désignées par les lettres **A à E**. En pathologie humaine, c'est essentiellement le **type A** qui est impliqué.
- La principale toxine est **la toxine α , une phospholipase** qui détruit la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (et qui possède une activité hémolytique).
- Dans les intoxications alimentaires, la diarrhée est due à la production d'une entérotoxine
- Par ailleurs *C. perfringens* produit de nombreuses enzymes (protéase, collagénase, hyaluronidase) qui contribuent à la digestion des tissus infectés.

- **Diagnostic biologique**
- L'isolement de *C. perfringens* à partir du foyer infectieux ou parfois des hémocultures est en général facile à obtenir. Dans les foyers infectieux, la bactérie est souvent associée à d'autres espèces bactériennes aérobies ou anaérobies.
- Si *C. perfringens* est l'espèce la plus souvent impliquée dans la gangrène gazeuse, d'autres espèces de *Clostridium* (*C. septicum*, *C. novyi*, *C. histolyticum*) sont parfois en cause.
- La présence de *C. perfringens* dans un prélèvement doit être interprétée en fonction du contexte clinique, car cette bactérie ubiquitaire peut aussi être un simple contaminant.
- Dans le cas des intoxications alimentaires, la bactérie doit être recherchée dans les aliments.
- On peut aussi rechercher dans les selles la concentration de spores ou la présence d'entérotoxine de *C. perfringens*.

- **Culture** sur gélose au sang placée en atmosphère anaérobie et sur bouillon anaérobie. L'hémolyse,
- la production importante de gaz et l'inhibition de l'effet de la lécithinase (observés lors de culture sur gélose au jaune d'oeuf) par le sérum spécifique rendent le diagnostic bactériologique aisé.