

## Infections à *Clostridium difficile* : aspects cliniques épidémiologiques et thérapeutiques\*

### *Clostridium difficile* infection: clinical, epidemiological and therapeutic aspects

F. Barbut · A. Le Monnier · C. Eckert

Reçu le 18 octobre 2011 ; accepté le 1<sup>er</sup> novembre 2011  
© SRLF et Springer-Verlag France 2011

**Résumé** *Clostridium difficile* est un bacille à Gram positif anaérobie, sporulé, responsable de 15 à 25 % des diarrhées postantibiotiques et de plus de 95 % des cas de colites pseudomembraneuses (CPM). *C. difficile* représente une des causes majeures de diarrhées associées aux soins. Les principaux facteurs de risque d'infections liées à *C. difficile* (ICD) sont l'âge supérieur à 65 ans, l'administration d'antibiotiques (notamment de céphalosporines de troisième génération, d'amoxicilline + acide clavulanique, de clindamycine et de fluoroquinolones) et les antécédents d'hospitalisation. La réponse immunitaire joue un rôle majeur dans la physiopathologie des ICD et des récurrences. Ces dernières années ont été marquées par la dissémination mondiale d'une souche épidémique (027/NAP1/BI) responsable d'infections sévères et d'une mortalité plus importante. Des recommandations américaines et européennes pour le traitement des ICD ont été récemment publiées. Le métronidazole (500 mg × 3/jour, 10 jours) per os reste toujours la molécule de choix pour le traitement des formes peu à modérément sévères d'ICD. La vancomycine (125 mg × 4/jour, 10 jours)

per os (ou par voie rectale en cas d'iléus) est réservée aux formes sévères d'infections. Il n'y a pas de consensus pour le traitement des récurrences multiples, mais l'administration de doses dégressives et intermittentes de vancomycine est une stratégie fréquemment utilisée. De nouveaux traitements, telles la fidaxomixine, l'immunothérapie passive ou la vaccination, sont en cours d'évaluation. **Pour citer cette revue : Réanimation 21 (2012).**

**Mots clés** *Clostridium difficile* · Épidémiologie · Diarrhée · Colite · Antibiotiques · Toxines · Traitement

**Abstract** *Clostridium difficile* is a gram-positive spore-forming anaerobic enteropathogen. This bacillus is responsible for more than 95% of cases of pseudomembranous colitis and for 15 to 25% of cases of antibiotic-associated diarrhoea. *C. difficile* has emerged as the major cause of healthcare-associated diarrhoea. Risk factors for *C. difficile* infection (CDI) include age above 65 years, previous hospitalization, and recent antibiotic therapy (third-generation cephalosporins, amoxicillin-clavulanate, clindamycin, and new fluoroquinolones). Serum immunity plays a key role in the development of CDI and relapses. Since 2003, a new hypervirulent strain (027/NAP1/BI) has emerged and spread rapidly worldwide. This epidemic strain is responsible for outbreaks with increased mortality and severity in North America and Europe. Recent American and European guidelines have been published for the treatment of CDI. Oral metronidazole (500 mg three times a day, for 10 days) is still the drug of choice for the initial episode of mild to moderate CDI. Vancomycin (125 mg four times a day, for 10 days) should be given orally (or per rectum if ileus is present) in case of severe CDI. There is no consensus for the treatment of multiple relapses; however, vancomycin therapy using a tapered and pulse regimen is the preferred next strategy. New developments including new drugs (fidaxomixine recently approved by the FDA) or passive or active immunization are currently evaluated. **To cite this journal: Réanimation 21 (2012).**

F. Barbut (✉) · C. Eckert

Laboratoire *Clostridium difficile* associé au CNR des bactéries anaérobies et du botulisme, faculté de médecine Saint-Antoine, laboratoire de bactériologie, 27, rue de Chaligny, F-75571 Paris cedex 12, France  
e-mail : frederic.barbut@sat.aphp.fr

F. Barbut  
UHLIN, hôpital Saint-Antoine,  
Assistance publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

A. Le Monnier  
Service de microbiologie, centre hospitalier André-Mignot,  
Versailles, France

EA 4043, USC Inra, écosystème microbien digestif et santé,  
université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

\* Cet article correspond à la conférence faite par l'auteur au congrès de la SRLF 2012 dans la session : *Colites graves*.

**Keywords** *Clostridium difficile* · Diarrhoea · Colitis · Antibiotics · Toxins · Treatment

## Introduction

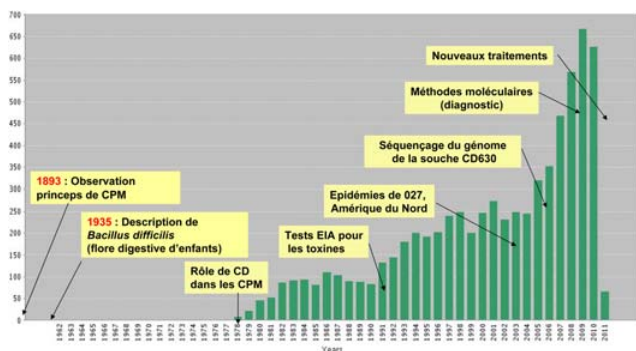
*Clostridium difficile* est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, sporulé responsable de 15 à 25 % des diarrhées postantibiotiques et de plus de 95 % des cas de colite pseudomembraneuse (CPM) [1]. Depuis la découverte de son rôle pathogène en 1978, *C. difficile* a émergé comme la première cause de diarrhée nosocomiale bactérienne chez l'adulte. Cette bactérie suscite un intérêt accru depuis 2003 du fait de l'augmentation de l'incidence des infections à travers le monde, de leur sévérité et de leur pronostic péjoratif (complications et décès).

La réémergence des infections liées à *C. difficile* (ICD) a eu pour effet de stimuler la recherche clinique et fondamentale autour de ce germe, comme en témoigne le nombre d'articles relatifs à *C. difficile* référencés dans PubMed qui a été multiplié par trois entre 2000 et 2010 (Fig. 1). Les conséquences économiques liées aux ICD sont devenues majeures, si l'on considère, par exemple, que le coût des ICD aux États-Unis est estimé à plus de trois milliards de dollars par an.

## Formes cliniques

### Portage asymptomatique

*C. difficile* est retrouvé chez moins de 3 % des adultes sains en milieu communautaire. La fréquence du portage asymptomatique de souches toxigènes ou non augmente



**Fig. 1** Les grandes étapes de l'histoire du *Clostridium difficile* et l'évolution du nombre de publications (requête sur Web of science, 9 mars 2011, keyword = « *Clostridium difficile* ») (CPM : colite pseudomembraneuse ; EIA : tests immunoenzymatiques)

avec la durée d'hospitalisation et peut atteindre jusqu'à 50 % des patients hospitalisés plus de quatre semaines [2].

### Différentes manifestations digestives

Par souci de simplicité, on distingue habituellement les diarrhées postantibiotiques simples sans colite et les CPM [1,3]. Certaines formes d'ICD sont particulièrement sévères et peuvent conduire au décès des patients.

#### *Diarrhées postantibiotiques « simples » sans colite avérée*

Le tableau clinique consiste en une diarrhée fécale (au moins trois selles non formées par jour, sans glaire ni sang visibles) et nauséabonde. Elle peut s'accompagner d'une fièvre modérée, mais il n'y a pas d'altération marquée de l'état général. Si une endoscopie est pratiquée (elle n'est pas nécessaire dans ce contexte clinique), elle mettrait en évidence une muqueuse d'aspect normal ou, au plus, un érythème, sans pseudomembrane ni ulcération franche.

#### *Colites pseudomembraneuses*

La présentation clinique des CPM est bruyante. Elle commence par une diarrhée liquide abondante (> 7 selles/j), en général non sanglante. Elle est souvent accompagnée de fièvre (> 65 %) et de douleurs abdominales (70 %). Une hyperleucocytose et un syndrome biologique inflammatoire (élévation nette de la protéine C réactive [CRP]) sont habituels. La radiographie de l'abdomen sans préparation peut montrer une aérocolie diffuse. À l'endoscopie, la muqueuse colique est recouverte de plaques surélevées jaunâtres (pseudomembranes) éparses ou confluentes selon le stade de la maladie. L'analyse histologique de ces pseudomembranes met en évidence une nécrose superficielle de la muqueuse, un exsudat fibrinoleucocytaire, une accumulation de débris tissulaires et de mucus. Dans plus de deux tiers des cas, les lésions intéressent notamment le rectum et peuvent donc être vues par une simple rectoscopie.

#### *Formes sévères*

La classification des ICD en fonction des critères de sévérité est essentielle pour :

- une prise en charge optimale des patients ;
- une catégorisation uniforme des patients au cours des études cliniques ;
- une comparaison internationale des données épidémiologiques.

L'évolution de la fréquence des formes sévères est un bon indicateur pour évaluer les changements de l'épidémiologie des ICD au cours du temps.

À ce jour, il n'y a pas de consensus international et les définitions américaines de « cas sévères » diffèrent des définitions européennes. Globalement, les critères de sévérité incluent des signes cliniques (fièvre > 38,5°, frissons, instabilité hémodynamique, péritonite, iléus ou mégacôlon toxique), des paramètres biologiques (leucocytes >  $15 \times 10^9/l$ , augmentation de la lactatémie et de la créatinémie, hypoalbuminémie < 25 g/l) et des critères d'imagerie (dilatation du côlon à la radiologie, épaississement de la paroi colique, ascite et présence de pseudomembranes lors de l'examen endoscopique) [4–6]. La colite fulminante et le mégacôlon toxique (diamètre du côlon transverse dépassant 6 cm sur le cliché de l'abdomen sans préparation ou à l'examen tomographique) sont deux complications qui doivent faire l'objet d'une prise en charge médicochirurgicale.

### Récidives

Environ 20 % des patients récidiveront dans les deux mois qui suivent l'épisode initial. Un patient qui présente une première récurrence a plus de risque de faire des récurrences ultérieures et multiples, posant alors un véritable défi thérapeutique. Certaines études ont montré que le taux de récurrences avait tendance à augmenter ces dernières années [7,8].

Dans environ 50 % des cas, les récurrences sont liées à la persistance, malgré un traitement efficace de la souche initiale dans le tube digestif sous forme sporulée (rechute) et, dans l'autre moitié, à une souche différente de la souche initiale (réinfection), acquise le plus souvent au cours d'une hospitalisation [9]. Les facteurs de risque de récurrence comprennent un âge de plus de 65 ans, l'administration concomitante d'antibiotiques, la sévérité de la maladie sous-jacente (index de Horn), la durée prolongée d'hospitalisation et un faible taux d'anticorps sériques antitoxine A [10,11].

### Épidémiologie

La contamination se fait par voie oro-fécale à partir des spores transmises par voie manuportée ou présentes dans l'environnement proche du patient : la transmission est favorisée par la résistance des spores à l'action des antiseptiques et des désinfectants classiques, la promiscuité des patients, la pression antibiotique et la pression de colonisation [12]. Le rôle majeur de l'environnement dans la transmission des souches est démontré notamment par le fait qu'être admis dans une chambre préalablement occupée par un patient ayant une ICD est un facteur indépendant d'acquisition de *C. difficile* [13].

Les ICD nosocomiales entraînent une augmentation significative des durées moyennes de séjours (DMS) des patients hospitalisés (de 6 à 20 jours en moyenne selon les études). Elles sont également à l'origine de surcoûts

importants pour la collectivité estimés entre 5 000 et 1 000 euros/cas selon plusieurs études récentes et à plus de trois milliards de dollars par an aux États-Unis [14–17].

### Évolution récente des infections à *C. difficile*

*C. difficile* connaît, depuis quelques années, un regain d'intérêt lié à l'augmentation d'incidence des infections et à la dissémination en Amérique du Nord puis en Europe d'un clone particulièrement virulent (appelé 027/NAP1/BI) responsable de formes cliniques sévères.

### Évolution des infections en Amérique du Nord

À partir de 2003, les ICD ont connu une évolution caractérisée par :

- une augmentation significative de l'incidence des ICD. Aux États-Unis, des études rétrospectives établies à partir des données hospitalières montrent que l'incidence a été multipliée par 2 ou 3 entre 1996 et 2003 [18,19] chez les personnes de plus de 65 ans. Cette augmentation a été retrouvée entre 1987 et 2001 dans les services de réanimation participant au réseau NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) des CDC (Centers for Disease Control and Prevention) [20]. Cette évolution est concomitante de la dissémination rapide d'un clone spécifique de *C. difficile* (027/NAP1/BI) qui, en l'espace de quelques années, est devenu endémique dans de nombreux hôpitaux. En 2004, la caractérisation microbiologique des souches isolées dans huit hôpitaux de six États ayant connu des épidémies au début des années 2000 a montré que la souche 027 était présente partout et représentait plus de la moitié des isolats dans cinq hôpitaux [21] ;
- une augmentation de la sévérité des ICD. Dans une étude rétrospective québécoise, la proportion de formes compliquées (choc septique et/ou mégacôlon toxique et/ou perforation digestive) est passée de 7,1 % dans les années 1991–1992 à 18,2 % en 2003 ( $p < 0,001$ ) [22]. Dans la même étude, la létalité à 30 jours a été multipliée par trois entre 1990 et 2003 où elle atteignait 13,8 %. Dans une étude prospective de 1 719 cas d'ICD d'origine nosocomiale, la mortalité directement imputable à l'infection était de 6,9 % [23] ;
- une moins bonne réponse aux traitements par métronidazole [8,22,24]. Les échecs du traitement par métronidazole ont été multipliés par 2,5 entre 2002 et 2004 (9,6 vs 25,7 %) et le taux de récurrences dans les deux mois de l'épisode initial a été multiplié par deux chez les patients âgés de plus de 65 ans (28,9 vs 58,4 %) [25]. Cette évolution n'a cependant pas été, à ce jour, directement reliée à l'émergence du clone 027. La moins bonne réponse au métronidazole serait

liée à une plus grande sévérité des ICD pour lesquelles le traitement par métronidazole est inférieur à celui par vancomycine [26].

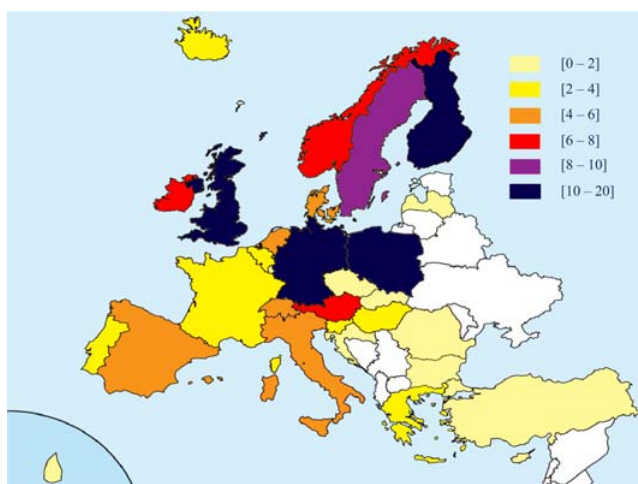
### Situation en Europe

Très rapidement, l'épidémie d'ICD 027 a touché l'Europe. Les premiers cas sont survenus au Royaume-Uni, en particulier au Stoke Mandeville Hospital (Buckinghamshire, NHS Trust) qui a connu, entre 2003 et 2005, deux épidémies successives de grande ampleur liées à la souche 027 [27] : la première totalisait 174 cas (dont 19 décès) et la seconde 160 cas (dont 19 décès). Dans les mois qui ont suivi, la souche 027 a été impliquée dans des épidémies aux Pays-Bas, en Belgique, puis en France.

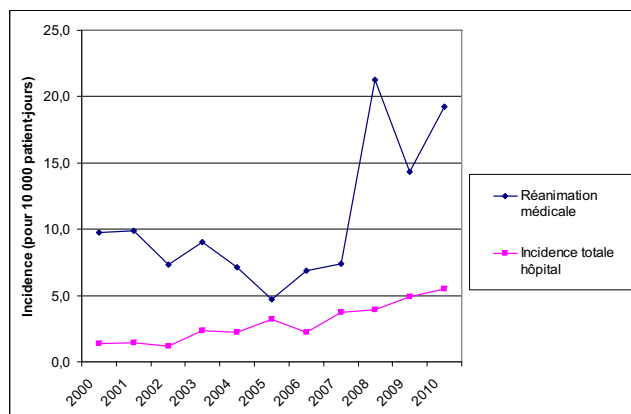
En 2009, une étude européenne a été réalisée dans plus de 100 établissements de santé de 34 pays [28]. Les résultats ont indiqué que l'incidence des ICD nosocomiales était de 4,1 cas pour 10 000 patients-jours (Fig. 2). Cette incidence globale masquait de grandes variations d'un pays à l'autre mais aussi d'un hôpital à l'autre au sein du même pays. Le clone 027 représentait 4,8 % des souches isolées et était le sixième PCR ribotype le plus fréquemment retrouvé après les PCR ribotypes 014/020 (15,7 %), 001 (9,3 %), 078 (7,8 %), 018 (5,8 %) et 106 (5,1 %).

### Situation en France

Le Nord de la France a connu, dès 2006, plusieurs épidémies d'ICD dues au clone 027. Ces épidémies ont été maîtrisées par un renforcement des mesures d'hygiène (hygiène des mains, bionettoyage associant déterction et désinfection avec



**Fig. 2** Incidence (exprimée pour 10 000 patients-jours) des infections à *Clostridium difficile* liées aux soins en Europe (d'après l'enquête européenne réalisée sous l'égide du European Study Group on *Clostridium difficile* de 2009) d'après Bauer et al. [6]



**Fig. 3** Évolution de l'incidence des infections à *Clostridium difficile*, hôpital Saint-Antoine, 2000–2011

de l'eau de Javel) et, pour certains établissements, par le regroupement des patients infectés dans des unités dédiées (*cohorting*) [29]. À ce jour, la situation en France semble être maîtrisée même si des cas groupés d'ICD sont régulièrement signalés aux autorités sanitaires.

Pour compléter les données de surveillance des ICD acquises au travers du signalement des infections sévères et des cas groupés aux autorités sanitaires, une étude multicentrique prospective de l'incidence des ICD a été réalisée en 2009 auprès d'établissements de court séjour ( $n = 105$ ) et de long séjour/soins de suite ( $n = 95$ ) sous l'égide du Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN) [étude ICD-RAISIN]. Pendant une période de six mois, ces établissements ont fourni tous les mois le nombre de cas d'ICD diagnostiqués. Ainsi, l'incidence des ICD en France a été estimée à 2,28 cas pour 10 000 patients-jours dans les hôpitaux de court séjour et à 1,14 cas pour 10 000 patients-jours dans les hôpitaux de long séjour/soins de suite et rééducation (Eckert C, 50th *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12–15 septembre 2010, Boston). Le clone 027 ne représentait que 3,6 % des souches et n'a été isolé que dans le Nord de la France.

À l'échelle d'un hôpital, l'incidence des ICD est tout à fait évolutive. Entre 2000 et 2010, nous avons constaté, à l'hôpital Saint-Antoine (hôpital de court séjour de 750 lits), une augmentation de l'incidence qui a été multipliée environ par 5 en l'espace de 11 ans. En 2011, l'incidence moyenne est de 5,5 cas pour 10 000 patients-jours. Des incidences particulièrement élevées sont notamment retrouvées dans les services de gastroentérologie, des maladies infectieuses, de gériatrie et de réanimation (Fig. 3).

### Nouvelles inquiétudes épidémiologiques

Une autre caractéristique épidémiologique récemment décrite des ICD est l'augmentation des cas communautaires

et d'infections sévères dans des populations considérées jusque-là comme à faible risque (femmes en peripartum, adultes jeunes sans antécédent d'antibiothérapie ou d'hospitalisation) [30]. Au cours de l'étude ICD-RAISIN, 28 % des cas diagnostiqués en court séjour ont été considérés comme d'origine communautaire, c'est-à-dire survenant dans les deux premiers jours suivant l'admission chez des patients sans antécédent d'hospitalisation dans les 12 semaines précédant la diarrhée. Le taux d'ICD communautaires aux États-Unis a été estimé à 7,7 cas pour 100 000 personnes années et 35 % des patients n'avaient reçu aucun traitement antibiotique dans les 42 jours précédant l'infection [31].

Les sources de contaminations potentielles comprennent le sol, l'eau, les animaux domestiques et l'alimentation (viande et légumes) [32]. Il n'y a pas de preuve absolue que l'alimentation puisse conduire à des infections cliniques chez l'homme mais cette hypothèse peut être envisagée si l'on tient compte de la fréquente contamination des aliments (20 % des viandes hachées sont contaminées aux États-Unis), de la résistance des spores à l'acidité gastrique et à la chaleur et de l'émergence récente des formes communautaires.

Les ICD ont été marquées ces dernières années par l'émergence de cette bactérie dans le monde vétérinaire. Connu pour son rôle pathogène chez le cheval, *C. difficile* a été impliqué dans des épidémies de diarrhées dans des élevages de porcelets et de veaux [33,34]. Une des caractéristiques de ces infections est qu'elles surviennent chez des animaux dont la flore de barrière est immature (jeunes animaux) ou déséquilibrée (antibiotiques). Les génotypes majeurs isolés chez l'animal sont les mêmes que ceux isolés chez l'homme [35], laissant penser que le franchissement de barrière d'espèce est possible.

## Facteurs de risque

### Antibiothérapie

Les antibiotiques agissent en détruisant le microbiote intestinal de barrière, entraînant une diminution de la résistance à la colonisation par *C. difficile*. Si les premiers cas de CPM ont été décrits après l'administration de clindamycine, il est maintenant admis que tous les antibiotiques — excepté les aminosides administrés par voie parentérale — peuvent entraîner une ICD. Les antibiotiques les plus fréquemment associés à une ICD sont la clindamycine, les céphalosporines, l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique [36] et, depuis quelques années, les nouvelles fluoroquinolones (lévofloxacine, moxifloxacine, gatifloxacine), dont le spectre d'action est élargi aux bac-

téries anaérobies [37]. La durée de traitement antibiotique semble majorer le risque [38].

### Âge

L'incidence des ICD augmente avec l'âge, avec un risque clairement accru chez les patients au-delà de 65 ans. Les raisons d'une plus grande prédisposition à la colonisation chez les patients âgés restent obscures. Elle pourrait être la conséquence des pathologies sous-jacentes plus sévères, d'une diminution de la réponse humorale, d'une modification de la résistance à la colonisation ou être la conséquence d'hospitalisations répétées.

### Hospitalisation

Ont été également identifiés comme facteurs de risque ceux qui favorisent l'acquisition nosocomiale de la bactérie : l'hospitalisation prolongée ou répétée, la densité importante en soins, la promiscuité des patients, la pression de colonisation ou l'intensité de la contamination environnementale [12,13,39].

### Autres facteurs

Certaines ICD ont été décrites après chimiothérapie notamment après des cures de méthotrexate, de doxorubicine, de cyclophosphamide ou de 5-fluoro-uracile [40]. De manière générale, tous les facteurs qui entraînent une modification du microbiote intestinal ou de la motilité intestinale (laxatifs, lavements barytés, antiacides, ralentisseurs du transit, toutes les procédures concernant l'intestin et les maladies inflammatoires de l'intestin) peuvent potentiellement favoriser la survenue d'une ICD [41,42]. En revanche, le rôle des inhibiteurs de pompe à protons est actuellement controversé [43].

L'ensemble de ces facteurs de risque n'explique pas complètement pourquoi certaines personnes développent des ICD alors que d'autres restent porteurs asymptomatiques ou échappent à la colonisation en dépit d'une exposition aux mêmes conditions environnementales et aux mêmes facteurs de risque. On ne sait pas non plus expliquer pourquoi certains patients évoluent vers des formes sévères compliquées ou vers des récurrences multiples. Ces différences pourraient être dues à des statuts immunitaires différents de l'hôte. En 2009, Hu et al. ont montré pour la première fois que la fiabilité des scores prédictifs de récurrence était augmentée en incluant le titre d'IgG sériques antitoxine A [10]. En quelques années, le rôle de la réponse immunitaire est devenu central dans la compréhension de la physiopathologie de l'infection.

## Physiopathologie

### Rôle des toxines

Seules les souches toxigènes sont pathogènes. Les toxines A (TcdA) et B (TcdB) sont les facteurs majeurs de virulence responsables de l'apparition des signes cliniques (Fig. 4). Les TcdA (308 kDa) et TcdB (269 kDa) sont des toxines de haut poids moléculaire appartenant à la famille des *large clostridial toxins* (LCTs) à activité glucosyltransférase ciblant les petites protéines liant le GTP ou guanosine triphosphate (RhoA, Rac, Cdc42). Leur glucosylation entraîne des perturbations majeures des voies de signalisation cellulaires dans les entérocytes, avec modification du cytosquelette d'actine, effet cytopathique, perturbation des jonctions serrées et réponse inflammatoire. Elles possèdent une structure et un mécanisme d'action similaires, bien que leurs effets ne soient pas complètement redondants [44]. Par ailleurs, les toxines ont aussi un rôle pro-inflammatoire : la TcdA module la production de la substance P (neuromédiateur présent dans l'épithélium intestinal), entraîne une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-8, et stimule les macrophages présents dans la lame basale responsables de la production de *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ . Enfin, les TcdA et TcdB induisent toutes deux l'apoptose cellulaire.

Une troisième toxine appelée toxine binaire (ou CDT) produite par environ 20 % des souches (étude ICD-RAISIN 2009) pourrait aussi être impliquée dans la viru-

lence [45,46]. Cette toxine binaire possède une activité ADP-ribosyl-transférase spécifique de l'actine [47]. Certaines études cliniques ont suggéré que les souches produisant cette toxine (dont les souches de PCR-ribotype 027) seraient associées à des formes cliniques plus sévères et à une mortalité plus élevée d'ICD [48,49].

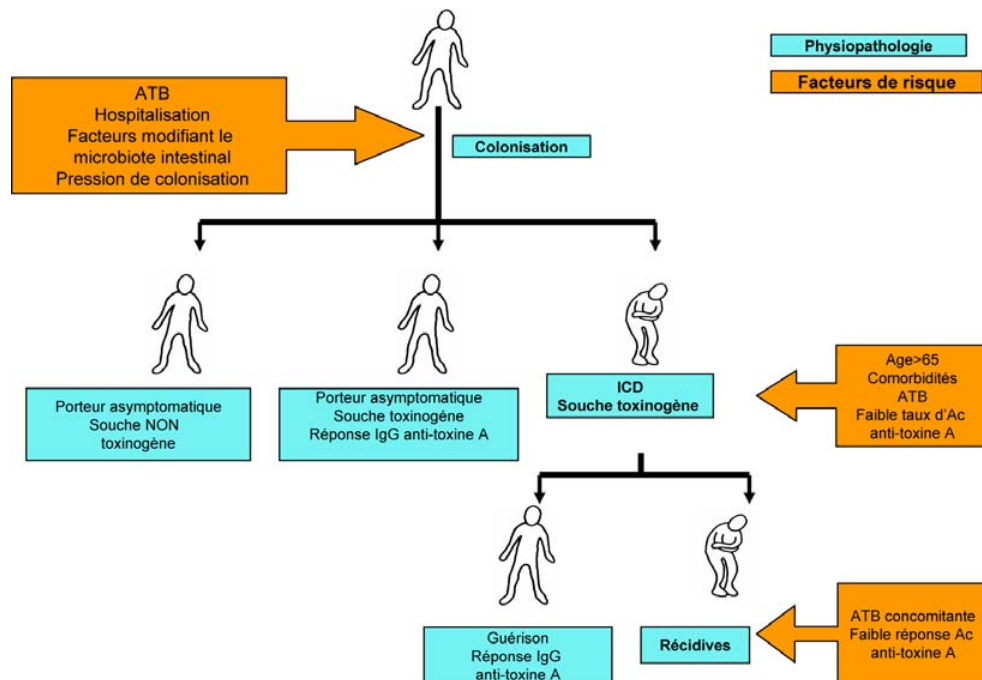
### Processus de colonisation

D'autres facteurs pourraient être impliqués dans la pathogénie et plus particulièrement dans le processus de colonisation. Plusieurs adhésines ont été identifiées chez *C. difficile* telles que les protéines de la couche S (protéines de LMW et HMW), Cwp66 (*cell wall protein*), Fbp68 (*fibronectin binding protein*), GroEL (protéine de choc thermique de 58 kDa) et les protéines flagellaires FliC (flagelline) et FliD (coiffe flagellaire) [50]. Par ailleurs, toutes les souches de *C. difficile* produisent des enzymes hydrolytiques telles que la hyaluronidase, la chondroïtine-4-sulphatase et une protéase Cwp84 (*clostridial wall protein* de 84 kDa) [51]. Cette protéase pourrait favoriser la dissémination de l'infection par dégradation des protéines de la matrice extracellulaire.

### Rôle de la réponse immunitaire

#### Réponse immunitaire vis-à-vis des TcdA et TcdB

La prévalence des anticorps dirigés contre les toxines dans la population générale est importante. En effet, 72 % des



**Fig. 4** Représentation schématique des étapes et des facteurs de risque d'infections à *Clostridium difficile*. ATB : antibiotique

adultes et 40 % des enfants de plus de deux ans ont des IgG sériques dirigées contre TcdA en dehors de toute ICD.

Une corrélation a été clairement établie entre la présence d'anticorps et une évolution clinique favorable. Les patients porteurs asymptomatiques de *C. difficile* ont un taux d'anticorps sérique anti-TcdA significativement supérieur à ceux qui, après colonisation, vont développer une diarrhée, pour une même tranche d'âge et avec des facteurs de risque similaires [52].

Par ailleurs, une corrélation a été montrée entre les taux d'anticorps et le risque de récurrence. Les patients sujets aux récurrences ont à la suite de l'épisode initial des taux d'IgM, d'IgG et d'IgA fécales dirigées contre TcdA significativement inférieurs par rapport aux patients qui ont un moindre risque de récurrence. Cela suggère que l'apparition d'une réponse anticorps sérique dirigée contre TcdA à la suite d'un épisode initial est associée à une diminution du risque de récurrence [11].

**Réponse immunitaire vis-à-vis des antigènes autres que les toxines**

Comparativement aux toxines, peu d'études ont été réalisées concernant les antigènes de surface de *C. difficile*. Les taux

d'anticorps dirigés contre les protéines de la couche S (*S-layer*) peuvent être corrélés aux signes cliniques des ICD. En effet, un taux élevé d'IgM spécifiques semble pouvoir être associé à une diminution du risque de récurrence des ICD [53]. Les IgG sériques antifacteurs de colonisation telles que l'adhésine Cwp66 (domaine N-terminal), les protéines flagellaires FliC, FliD étaient significativement plus élevés dans un groupe témoin que dans un groupe atteint d'ICD [54].

**Traitement**

Des recommandations européennes et nord-américaines ont été récemment publiées [4,6]. Les schémas thérapeutiques proposés dépendent de la sévérité clinique de l'infection (Fig. 5).

**Mesures générales**

La réhydratation du patient et l'arrêt du traitement antibiotique ou son remplacement par un antibiotique à moindre risque sont les premières mesures à mettre en place. Ces mesures simples suffisent à obtenir une amélioration

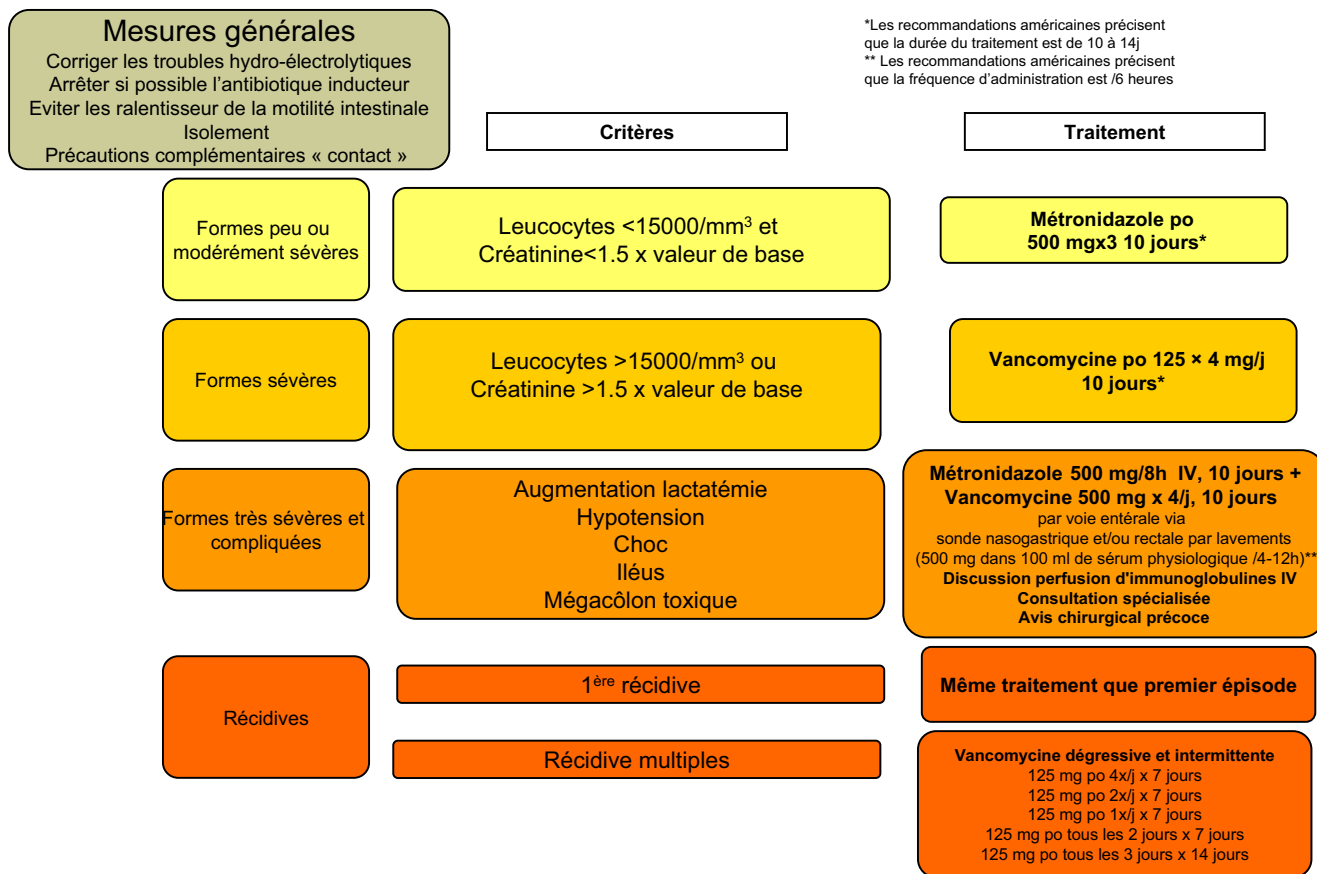


Fig. 5 Traitements des infections à *Clostridium difficile* d'après Cohen et al. et Bauer et al. [4,6]. IV : intraveineux ; po : per os.

clinique dans 25 % des cas. Si l'antibiotique responsable ne peut être arrêté ou modifié ou si les symptômes persistent, le traitement des ICD repose alors sur l'administration per os de métronidazole et/ou de vancomycine. L'utilisation d'agents antipéristaltiques (loperamide, diphénoxylate) est déconseillée, car ils peuvent favoriser une stase toxique et entraîner une aggravation du tableau clinique (mégacôlon toxique).

### Traitement d'un premier épisode d'ICD

Le métronidazole (500 mg  $\times$  3/jour, 10 jours) est recommandé à l'heure actuelle comme le traitement de première intention des diarrhées simples et des colites peu sévères à *C. difficile*. Compte tenu du prix d'un traitement par vancomycine et du risque potentiel d'émergence d'entérocoques résistants à cet antibiotique, les indications d'un traitement par la vancomycine (125 mg  $\times$  4/jour, 10 jours) sont limitées soit aux patients présentant une symptomatologie sévère, soit à ceux qui ne répondent pas au métronidazole ou qui ont une intolérance à cet antibiotique.

En cas de formes compliquées (choc septique, mégacôlon toxique, iléus), il est recommandé de traiter par métronidazole intraveineux et par vancomycine par voie intracolique (lavement, sonde nasogastrique). En cas d'échec, la perfusion d'immunoglobulines polyvalentes (200–400 mg/kg) peut être envisagée [55]. L'indication chirurgicale doit être discutée en cas de colite fulminante avec choc nécessitant l'utilisation de substances vasopressives, de perforation, de péritonite avec défaillance organique ou d'échec du traitement médical. C'est un traitement de sauvetage, consistant en une colectomie subtotala avec double stomie (iléostomie et sigmoïdostomie). Néanmoins, la mortalité périopératoire de cette chirurgie de sauvetage reste élevée, variant de 30 à 80 % [56].

L'efficacité d'un traitement repose sur des critères cliniques (amélioration de la symptomatologie digestive) et biologiques (diminution très précoce, en cas d'efficacité thérapeutique, de la CRP). Les coprocultures de contrôles ne sont pas recommandées, car environ 30 à 40 % des patients qui sont considérés comme guéris cliniquement sont encore positifs en toxine et/ou en culture à l'issue d'un traitement.

### Traitement d'une première récurrence et de récurrences multiples à *C. difficile*

Une récurrence répond bien en général à une nouvelle cure identique au traitement initial (vancomycine ou métronidazole ou même simple arrêt de l'antibiotique responsable). Cependant, certains patients présenteront des récurrences multiples posant un véritable défi thérapeutique. Aucune approche consensuelle n'existe pour ces patients mais plusieurs schémas thérapeutiques ont été proposés. Une des

approches les plus fréquemment utilisées consiste à administrer de la vancomycine à doses dégressives puis intermittentes [57], mais aucune étude randomisée prospective n'a été réalisée à ce jour. Une seconde approche qui peut être envisagée, bien que difficilement acceptable pour le patient, est l'administration de la flore fécale d'un donneur sain par sonde nasogastrique ou par lavements. Cette technique de transplantation de flore s'est avérée, dans quelques séries de cas, efficace pour traiter des rechutes multiples [58,59]. Enfin, le rôle des probiotiques dans la prévention des récurrences multiples reste encore très controversé. Néanmoins, un essai contrôlé vs placebo chez des patients ayant déjà présenté une ou plusieurs rechutes a montré que la coadministration d'une antibiothérapie standard (vancomycine ou métronidazole) et de *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) [1 g/j pendant quatre semaines] diminuait de 50 % le taux de rechutes ultérieures (35 vs 65 %,  $p = 0,004$ ) [60].

### Nouvelles approches thérapeutiques

#### Nouvelles molécules

L'augmentation de l'incidence, de la sévérité, des échecs cliniques et des récurrences d'ICD ont stimulé la recherche pharmaceutique pour le développement de nouvelles options thérapeutiques. Il y a plus d'une quinzaine d'essais cliniques en phase II ou III actuellement recensés par le site Clinical Trials du National Institute of Health (<http://clinicaltrials.gov/>). La plupart des approches proposées ont pour dénominateur commun de respecter le microbiote intestinal et de préserver son effet barrière. Les qualités recherchées parmi les nouveaux antibiotiques actuellement à l'étude sont en priorité :

- d'être au moins aussi efficace en termes de guérison clinique que la vancomycine, y compris sur les formes sévères d'infections ;
- d'entraîner significativement moins de récurrences.

La fidaxomicine (Optimer Pharmaceuticals et Astellas) a été approuvée en mai 2011 par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement des ICD. Il s'agit d'un macrocycle à 18 atomes de carbone qui présente un spectre d'activité étroit (bactéries à Gram positif) et une faible absorption digestive. Deux études internationales randomisées double insu de phase III comparant un traitement par fidaxomicine à la vancomycine (125 mg  $\times$  4/jour, 10 jours) ont abouti à des résultats semblables [61]. L'efficacité clinique de la fidaxomicine à la fin du traitement est équivalente à celle de la vancomycine (88,2 vs 85,8 % dans l'essai 003 nord-américain). En revanche, le traitement par fidaxomicine réduit de 40 % le taux de rechutes à 28 jours par rapport à la vancomycine (respectivement 15,4 vs 25,3 %). Par ailleurs, le temps de résolution de la diarrhée est plus



court et la sélection d'entérocoques résistants à la vancomycine est moins fréquente par rapport au bras vancomycine (31 vs 7 %).

D'autres molécules (ramoplanine, rifaximine, nitazoxanide) présentent une excellente activité *in vitro* sur les souches de *C. difficile* et une efficacité clinique équivalente à celle de la vancomycine sur des modèles animaux de colites ou sur des petites séries de patients. Des essais cliniques de phase III sont en cours pour la plupart de ces molécules.

- Prévention des récurrences par immunisation passive

Plusieurs cas cliniques ont montré que l'administration d'une préparation d'immunoglobulines polyvalentes par voie intraveineuse permettait d'améliorer l'état des patients ayant de multiples récurrences [62–64]. Récemment, une étude multicentrique randomisée en double insu vs placebo portant sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre les TcdA et TcdB dans la prévention secondaire des ICD a été publiée [65]. Les patients, traités soit par métronidazole, soit par vancomycine ont été randomisés pour recevoir soit un placebo ( $n = 99$ ), soit une perfusion d'immunoglobulines (10 mg/kg) [ $n = 101$ ]. Les résultats ont montré que le taux de récurrences était de 7 % dans le groupe qui a reçu des anticorps et de 25 % dans le groupe placebo ( $p < 0,001$ ). Ce traitement prévient les récurrences quel que soit l'antibiotique utilisé (vancomycine ou métronidazole). La réduction de ces rechutes est observée y compris chez les patients infectés par la souche épidémique 027 (32 vs 8 %) et chez les patients souffrant de multiples récurrences (38 vs 8 %). Ces résultats très prometteurs positionnent les anticorps monoclonaux comme un complément efficace des antibiotiques dans le traitement des récurrences multiples d'ICD. Si cette stratégie paraît efficace pour prévenir les manifestations d'ICD, elle n'a en revanche aucun effet sur la colonisation et la persistance de la bactérie dans le tractus digestif.

- Prévention des ICD par la vaccination

Compte tenu du rôle central de la réponse immunitaire de l'hôte, la vaccination apparaît comme une perspective thérapeutique intéressante. Les stratégies vaccinales envisagées reposent soit sur l'utilisation d'anatoxines seules ou en association avec certaines protéines de surface. L'objectif d'un vaccin ciblant à la fois les protéines de surfaces et les toxines est double : prévenir à la fois la pathologie digestive occasionnée par les toxines mais aussi la colonisation prolongée source de dissémination de la bactérie et de contamination de l'environnement des structures de soins. À ce jour, plusieurs laboratoires pharmaceutiques se sont engagés dans le développement et/ou la validation de leur propre vaccin (Merck, Sanofi–Aventis, Novartis et plus récemment Pfizer).

Un vaccin fondé sur l'utilisation d'une anatoxine (Sanofi Pasteur) a franchi les essais cliniques de phase I, qui ont porté sur plus de 200 sujets, visant à démontrer son innocuité et son immunogénicité. Ce vaccin a été testé avec succès chez trois personnes souffrant de récurrences multiples [66]. Le 17 février 2009, Sanofi Pasteur a lancé en Angleterre et aux États-Unis une étude de phase II pour évaluer l'efficacité de ce vaccin pour prévenir les récurrences d'ICD après un premier épisode [67].

## Conclusion

Les ICD connaissent un regain d'intérêt depuis quelques années, lié notamment à l'émergence du clone épidémique 027/NAP1/BI et à l'augmentation importante de l'incidence et de la sévérité des ICD. Cette évolution a stimulé la recherche fondamentale et clinique à travers le monde et a conduit à une meilleure connaissance de la physiopathologie des infections et à des approches thérapeutiques, innovantes.

**Conflits d'intérêt :** Frédéric Barbut : interventions ponctuelles : activités de conseils et fonds de recherche pour les laboratoires Merck, Biocodex, Astellas, Sanofi Pasteur, Pfizer et Optimer. Alban Le Monnier : interventions ponctuelles : activités de conseils pour les laboratoires Novartis, MSD, Sanofi Pasteur, Cepheid, bioMérieux, BD.

## Références

1. Bartlett JG (2006) Narrative review: the new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 145:758–64
2. Hurley BW, Nguyen CC (2002) The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhoea. *Arch Intern Med* 162:2177–84
3. Kelly CP, LaMont JT (1998) *Clostridium difficile* infection. *Annu Rev Med* 49:375–90
4. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al (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* 31:431–55
5. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 15:1053–66
6. Bauer MP, Kuijper EJ, van Dissel JT (2009) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection (CDI). *Clin Microbiol Infect* 15:1067–79
7. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM (2005) Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 5:549–57

8. Musher DM, Aslam S, Logan N, et al (2005) Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis* 40:1586–90.
9. Barbut F, Richard A, Hamadi K, et al (2000) Epidemiology of recurrences or reinfections of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *J Clin Microbiol* 38:2386–88
10. Hu MY, Katchar K, Kyne L, et al (2009) Prospective derivation and validation of a clinical prediction rule for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 136:1206–14
11. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2001) Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 357:189–93
12. Dubberke ER, Reske KA, Olsen MA, et al (2007) Evaluation of *Clostridium difficile*-associated disease pressure as a risk factor for *C. difficile*-associated disease. *Arch Intern Med* 167:1092–7
13. Shaughnessy MK, Micielli RL, DePestel DD, et al (2011) Evaluation of hospital room assignment and acquisition of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32:201–6
14. Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP (2002) Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhoea due to *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 34:346–53
15. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, et al (2008) Costs of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *J Hosp Infect* 70:15–20
16. Wilcox MH, Cunniffe JG, Trundle C, Redpath C (1996) Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 34:23–30
17. Dubberke ER, Wertheimer AI (2009) Review of current literature on the economic burden of *Clostridium difficile* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30:57–66
18. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB (2006) *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996–2003. *Emerg Infect Dis* 12:409–15
19. Polk RE, Oinonen M, Pakyz A (2006) Epidemic *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 354:1199–203
20. Archibald LK, Banerjee SN, Jarvis WR (2004) Secular trends in hospital-acquired *Clostridium difficile* disease in the United States, 1987–2001. *J Infect Dis* 189:1585–9
21. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al (2005) An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353:2433–41
22. Pepin J, Valiquette L, Alary ME, et al (2004) *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 171:466–72
23. Loo VG, Libman MD, Miller MA, et al (2004) *Clostridium difficile*: a formidable foe. *CMAJ* 171:47–8
24. Pepin J, Valiquette L, Cossette B (2005) Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ* 173:1037–42
25. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al (2005) Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 40:1591–7
26. Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB (2007) A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis* 45:302–7
27. Smith A (2005) Outbreak of *Clostridium difficile* infection in an English hospital linked to hypertoxin-producing strains in Canada and the US. *Euro Surveill* 10:E050630.2
28. Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al (2011) *Clostridium difficile* infections in Europe: a hospital-based survey. *Lancet* 377:63–67
29. Birgand G, Blanckaert K, Carbonne A, et al (2010) Investigation of a large outbreak of *Clostridium difficile* PCR-ribotype 027 infections in northern France, 2006–2007 and associated clusters in 2008–2009. *Euro Surveill* 15(25). pii:19597
30. CDC (2005) Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk: four states, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 54:1201–5
31. Hirschhorn LR, Trnka Y, Onderdonk A, et al (1994) Epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *J Infect Dis* 169:127–33
32. Rupnik M, Songer JG (2010) *Clostridium difficile* Its potential as a source of foodborne disease. *Adv Food Nutr Res* 60C:53–66
33. Rodriguez-Palacios A, Stampfli HR, Duffield T, et al (2006) *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerg Infect Dis* 12:1730–6
34. Songer JG, Anderson MA (2006) *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12:1–4
35. Keel K, Brazier JS, Post KW, et al (2007) Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol* 45:1963–4
36. Bignardi GE (1998) Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 40:1–15
37. McCusker ME, Harris AD, Perencevich E, Roghmann MC (2003) Fluoroquinolone use and *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Emerg Infect Dis* 9:730–3
38. Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB, et al (2001) Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2,462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study. *J Antimicrob Chemother* 47:43–50
39. Kyne L, Sougioultzis S, McFarland LV, Kelly CP (2002) Underlying disease severity as a major risk factor for nosocomial *Clostridium difficile* diarrhoea. *Infect Control Hosp Epidemiol* 23:653–9
40. Blot E, Escande MC, Besson D, et al (2003) Outbreak of *Clostridium difficile*-related diarrhoea in an adult oncology unit: risk factors and microbiological characteristics. *J Hosp Infect* 53:187–92
41. Brown E, Talbot GH, Axelrod P, et al (1990) Risk factors for *Clostridium difficile* toxin-associated diarrhoea. *Infect Control Hosp Epidemiol* 11:283–90
42. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE (1990) Risk factors for *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile*-associated diarrhoea in a cohort of hospitalized patients. *J Infect Dis* 162:678–84
43. Dial S, Delaney JA, Schneider V, Suissa S (2006) Proton pump inhibitor use and risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease defined by prescription for oral vancomycin therapy. *CMAJ* 175:745–8
44. Savidge TC, Pan WH, Newman P, et al (2003) *Clostridium difficile* toxin B is an inflammatory enterotoxin in human intestine. *Gastroenterology* 125:413–20
45. Barbut F, Gariazzo B, Bonne L, et al (2007) Clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections and molecular characterization of strains: results of a retrospective study, 2000–2004. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28:131–9
46. Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM, Boquet P (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect Immun* 56:2299–306
47. Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, et al (1997) Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* 65:1402–7
48. Bacci S, Molbak K, Kjeldsen MK, Olsen KE (2011) Binary toxin and death after *Clostridium difficile* infection. *Emerg Infect Dis* 17:976–82
49. Barbut F, Decre D, Lalande V, et al (2005) Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol* 54(Pt 2):181–5

50. Hennequin C, Janoir C, Barc MC, et al (2003) Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile*. *Microbiology* 149(Pt 10):2779–87
51. Janoir C, Pechine S, Grosdidier C, Collignon A (2007) Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins. *J Bacteriol* 189:7174–80
52. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP (2000) Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 342:390–7
53. Drudy D, Calabi E, Kyne L, et al (2004) Human antibody response to surface layer proteins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41:237–42
54. Pechine S, Gleizes A, Janoir C, et al (2005) Immunological properties of surface proteins of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 54(Pt 2):193–6
55. Salcedo J, Keates S, Pothoulakis C, et al (1997) Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. *Gut* 41:366–70
56. Jaber MR, Olafsson S, Fung WL, Reeves ME (2008) Clinical review of the management of fulminant *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 103:3195–203
57. McFarland LV, Elmer GW, Surawicz CM (2002) Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 97:1769–75
58. Aas J, Gessert CE, Bakken JS (2003) Recurrent *Clostridium difficile* colitis: case series involving 18 patients treated with donor stool administered via a nasogastric tube. *Clin Infect Dis* 36:580–5
59. Russell G, Kaplan J, Ferraro M, Michelow IC (2010) Fecal bacteriotherapy for relapsing *Clostridium difficile* infection in a child: a proposed treatment protocol. *Pediatrics* 126:e239–e42
60. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, et al (1994) A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 271:1913–8
61. Bartlett JG (2009) New antimicrobial agents for patients with *Clostridium difficile* infections. *Curr Infect Dis Rep* 11:21–8
62. Leung DY, Kelly CP, Boguniewicz M, et al (1991) Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J Pediatr* 118:633–7
63. McPherson S, Rees CJ, Ellis R, et al (2006) Intravenous immunoglobulin for the treatment of severe, refractory, and recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Dis Colon Rectum* 49:640–5
64. Wilcox MH (2004) Descriptive study of intravenous immunoglobulin for the treatment of recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *J Antimicrob Chemother* 53:882–4
65. Lowy I, Molrine DC, Leav BA, et al (2010) Treatment with monoclonal antibodies against *Clostridium difficile* toxins. *N Engl J Med* 362:197–205
66. Sougioultzis S, Kyne L, Drudy D, et al (2005) *Clostridium difficile* toxoid vaccine in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea. *Gastroenterology* 128:764–70
67. US National Institute of Health (2010) Study of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine (Acam-CDIFF) in subjects with *Clostridium difficile* infection. [cited; Available from: <http://clinicaltrials.gov/cta/show/NCT00772343>]