



CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Eric Kipnis (2), Karine Faure (1), Benoît Guery (1)

(1) Unité des Maladies Infectieuses Pôle Médecine Huriez, Service de Gestion du Risque Infectieux et des Vigilances, CHRU Lille

(2) Réanimation chirurgicale, Pôle d'Anesthésie et Réanimation Huriez, CHRU Lille

INTRODUCTION : UNE MALADIE (RÉ)ÉMERGENTE?

Depuis 2000, nous avons assisté, de manière préoccupante, à une augmentation à la fois de l'incidence des infections digestives à *Clostridium difficile* (ICD) sous formes d'épidémies en Amérique du Nord et en Europe [1-4] et de la gravité des atteintes dues à *C. difficile* [5]. Ces épidémies sont en rapport avec la dissémination d'une souche rendue particulièrement virulente par hypersécrétion de toxines A et B alors que depuis la découverte du pathogène par Hall et O'Toole en 1935 [6], et surtout depuis son imputation dans la colite pseudomembraneuse associée à l'antibiothérapie en 1978 [7], *C. difficile* était surtout retenu comme étant la cause la plus fréquente de diarrhée post-antibiothérapie (15 à 25 % des cas). Cette nouvelle forme émergente d'une pathologie connue concerne particulièrement les praticiens d'Anesthésie-Réanimation du fait des facteurs de risque tels que l'antibiothérapie ou les antisécrétoires largement utilisés en péri-opératoire, par la gravité des atteintes qui justifient une prise en charge de soins intensifs voire de réanimation avec des mesures spécifiques de prévention de la transmission croisée, ainsi que par les mesures thérapeutiques pouvant aller jusqu'à la chirurgie en urgence. Nous passerons en revue les différents aspects des infections digestives à *C. difficile* (ICD) pertinents pour les soins-intensifs et la réanimation en insistant dans chaque section sur les particularités de la forme émergente des ICD.

1. LE PATHOGENE ET LA PHYSIOPATHOGENIE

1.1. ACQUISITION

Clostridium difficile est un bacille Gram positif anaérobie formant des spores capables de survivre de manière prolongée dans l'environnement sur des surfaces [8]. L'acquisition se fait par voie orale par ingestion de spores qui résistent à l'acidité gastrique, n'évoluant en formes végétatives plus sensibles [9] qu'après l'estomac grâce aux sels biliaires [8], et permettant donc à *C. difficile* d'atteindre et coloniser l'intestin.

1.2. PERSISTANCE/COLONISATION

La pullulation bactérienne favorisée par les traitements antibiotiques, d'autant plus qu'ils sont à large spectre, ainsi que par les traitements antiacides ou antisécrétoires, entraînent un déséquilibre de la flore digestive permettant à *C. difficile* de germiner et coloniser le tube digestif [8].

Ainsi, *C. difficile* est présent dans les selles de 40 à 80 % des nouveaux-nés porteurs asymptomatiques «protégés» de la forme toxigène par des anticorps maternels et par l'absence de récepteurs à la toxine A à la surface des entérocytes [10]. L'acquisition de *C. difficile* chez le nouveau né n'est pas élucidée entre la transmission de *C. difficile* colonisant le vagin ou l'acquisition à partir de l'environnement de soins du nouveau-né [11,12]. Chez l'adulte, seulement 2 à 4 % sont porteurs sains des souches non toxigènes, non-pathogènes.

1.3. PATHOGÉNICITÉ

C. difficile produit deux toxines majeures parmi les plus volumineuses du règne bactérien, les toxines A (TcdA, 308 kDa) et/ou B (TcdB, 270 kDa). Toutes deux sont des glucosyltransférases, action par laquelle elles modulent de nombreuses activités cellulaires notamment par la glycosylation de protéines régulatrices de la superfamille Ras [13].

La toxine se fixe sur un récepteur membranaire à la surface entérocytaire puis est internalisée par endocytose [14]. Il a récemment été montré que les toxines A et B subissent un clivage auto catalytique en toxines actives lors de leur internalisation grâce à des cofacteurs eucaryotes [15]. Après internalisation, les toxines inactivent les protéines Rho, Rac, et Cdc42, aboutissant à une condensation de l'actine et une perte de l'organisation cytosquelettique. Cette perte de l'architecture comprend une destruction des fibres qui sous-tendent les jonctions serrées [16] et aboutit à des troubles de perméabilité et une altération fonctionnelle de la barrière épithéliale intestinale [17]. L'altération architecturale en soi peut faire entrer la cellule dans une cascade apoptotique aboutissant à la mort cellulaire. Mais celle-ci survient de manière décalée par rapport aux effets sur le cytosquelette et est probablement due au déclenchement direct des voies de l'apoptose, notamment la voie caspase-3 par les toxines A et B [13,18]. Également par l'intermédiaire de Rho, Rac et Cdc42, les toxines A et B entraînent des troubles de la perméabilité et activent des voies pro-inflammatoires médiées par des phospholipases, la protéine-kinase C, et des MAP-kinases [19-22]. La toxine A entraîne également une production d'espèces réactives de l'oxygène, et, par l'intermédiaire de NfκB [23], une production de médiateurs pro-inflammatoires [24]. La réaction inflammatoire et la perte d'intégrité de la barrière favorisent un recrutement neutrophile important participant à la pathogénie [25]. De plus, un mécanisme neurohumoral local médié par la production de substance P exacerbe la réaction inflammatoire et le recrutement leucocytaire [26, 27]

En plus des toxines A et B, *C. difficile* produit des toxines dites binaires car nécessitant deux sous unités l'une catalytique et l'autre enzymatique possédant une activité ADP-ribosyltransférase capable de participer à la désorganisation cytosquelettique observée avec *C. difficile* mais qui n'ont fait preuve que d'une entérocytotoxicité in vitro [28].

1.4. PATHOGÉNICITÉ CLINIQUE

La part respective des toxines dans la physiopathologie varie en fonction de l'utilisation de modèles animaux qui semble indiquer un rôle prédominant de la toxine A ou de la cytotoxicité sur lignées cellulaires qui est majeure avec la toxine B [13]. D'autre part, on constate des atteintes manifestes alors que l'une ou l'autre des toxines est la seule produite, le plus souvent A mais aussi parfois isolément B [29]. En revanche, la sécrétion et le niveau de sécrétion des toxines semblent déterminer la pathogénicité des souches de *C. difficile*. Les souches non-productrices sont non-pathogènes alors que toutes les souches pathogènes produisent au moins l'une des toxines. De plus, la souche hypervirulente épidémique est, elle, hypersécrétrice des deux toxines A et B. Cette souche se caractérise par une délétion de 18 paires de bases au sein du gène *tcdC*, gène régulateur, et une délétion en position 117, résultant en une augmentation potentielle de la production des toxines A et B. La souche épidémique produit 16 fois plus de toxine A et 23 fois plus de toxine B par comparaison aux souches habituelles [30]. Cette surproduction pourrait être à l'origine de la sévérité inhabituelle des ICD dues à la souche épidémique. Cependant, le rôle actuel des délétions au sein du gène *tcdC* dans la production des toxines n'est pas totalement déterminé [31]. De plus, la toxine binaire est uniformément retrouvée chez la souche épidémique [32] bien que son rôle clinique soit mal précisé [33], et alors qu'elle n'était présente que dans 6 % des isolats cliniques auparavant [34].

2. LES FACTEURS DE RISQUE

Tous les antibiotiques sont susceptibles de rompre l'équilibre de la flore intestinale qui fait barrière à la colonisation digestive par *C. difficile* [35]. L'antibiothérapie est donc le facteur de risque majeur des ICD. Certains antibiotiques sont considérés à risque particulièrement élevé, tels que la clindamycine ou les céphalosporines, mais en fait, les classes d'antibiotiques les plus prescrites de chaque décennie ont été mis en évidence comme facteur de risque majeur de ICD à l'époque. En effet, cela a été le cas pour la clindamycine, l'ampicilline et l'amoxicilline dans les années 70-80 [36], puis pour les céphalosporines depuis les années 80-90 [37], et enfin, depuis 2000, un rôle des fluoroquinolones qui ont été identifiés comme facteur de risque dans l'émergence de la souche épidémique hypervirulente qui est résistante aux fluoroquinolones.

La durée prolongée et/ou la multiplication des antibiothérapies représentent des facteurs de risque surajoutés [38,39].

Le séjour en milieu hospitalier et sa prolongation [40] sont des facteurs de risque qui se combinent notamment lorsqu'il s'agit de patients âgés, institutionnalisés, ou en maison de retraite. Ce d'autant plus que l'âge est, en soi, un facteur de risque majeur [38, 39].

De manière comparable, toute cause de rupture de la barrière écologique bactérienne digestive à la colonisation par *C. difficile* est un facteur de risque favorisant l'émergence de *C. difficile* toxigène [38, 39]: alimentation entérale par sonde, stase gastrique, stase fécale, chirurgie digestive, et notamment les traitements antiacides et antisécrétoires [41]. Tous les traitements antiacides multiplient le risque de ICD par 2 et particulièrement les inhibiteurs de pompe à protons (IPP) qui font passer ce risque relatif à 2,9, même en corrigeant pour le risque lié aux antibiotiques [41]. Ceci est probablement dû à la survie accrue

des formes végétatives de *C. difficile* dans le liquide gastrique moins acide des patients recevant des IPP [9].

Sur le versant de la réponse de l'hôte, l'immunodépression, notamment humorale, représente un facteur de risque. En effet, de même que les nourrissons semblent protégés par des anticorps maternels antitoxine A alors qu'ils sont porteurs de souches toxigènes, les patients colonisés présentant une réponse IgG antitoxine A faible sont à haut risque de colite et de rechutes [42,43].

De ces constatations découle que les soins intensifs postopératoires et la réanimation, par le recrutement croissant de patients âgés ayant de multiples comorbidités, l'utilisation courante d'antibiothérapies de large spectre, l'utilisation d'antiacides ou antisécrétoires pour la prévention de l'ulcère de stress, l'immunodépression du fait des agressions et le recours fréquent à l'alimentation entérale sont des milieux à très haut risque d'ICD.

3. LE DIAGNOSTIC

Le «gold standard» est la culture du pathogène à partir d'un échantillon de selles associé à la détection des toxines dans l'isolat par test de cytotoxicité pour distinguer les souches pathogènes [44]. Du fait de la lourdeur et de la durée des méthodes de culture de *C. difficile* elles tendent à être abandonnées, surtout en Amérique du Nord, au seul profit des méthodes de détection des toxines. Le test de cytotoxicité s'effectue sur lignées cellulaires et met en évidence surtout l'effet de la toxine B [7] suite à l'inoculation d'un extrait de selles fraîches conservées à 4°C sous peine de perdre l'effet cytotoxique [45]. Le test comporte l'inhibition de ces effets cytotoxiques par utilisation d'un antisérum antitoxine B d'où la désignation de «culture cytotoxicity neutralization assay» (CCNA). Toutefois, il s'agit d'un test techniquement lourd, long (24 à 48 h) et coûteux à maintenir en place dans un laboratoire de par l'infrastructure nécessaire. Ces limites font que les tests de détection de toxines de *C. difficile* les plus répandus sont les tests par méthode ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) simples, rapides, reproductibles et commercialisés en kits. Ces kits de détection ELISA détectent soit la toxine A seule, les deux toxines A et B ou la toxine A couplée à la détection antigénique de la glutamate déshydrogénase, une enzyme de *C. difficile*, d'où une étendue de sensibilités variables allant de 70 à 80 % [46,47]. De ce fait, il est nécessaire de tester 2 voire 3 échantillons distincts [48].

D'autres stratégies visent à remplacer l'étape hautement sensible mais peu spécifique de la culture par un équivalent rapide et simple tel que la détection antigénique de la glutamate déshydrogénase, et de suivre par un test de cytotoxicité ou ELISA [49, 50]. Ainsi, une telle stratégie, ne nécessitant que 4 heures, et n'ayant recours à la culture qu'en cas négativité de la détection des toxines, a fait preuve d'une sensibilité de 92 % [51].

Toutefois, même difficile, la culture garde un intérêt, surtout dans le contexte actuel de réémergence en rapport avec des phénotypes précis, qui est d'obtenir des isolats qui pourront être typés et étudiés afin d'assurer un suivi épidémiologique et avancer sur le plan des connaissances physiopathologiques.

En pratique, en présence de selles liquides et d'un contexte épidémique clinique ou de facteurs de risques évocateurs, une demande explicite de recherche de *C. difficile* et des toxines A et B dans les selles, et non une coproculture, doit être effectuée avec acheminement rapide à 4°C de l'échantillon au laboratoire de

microbiologie. La culture doit s'accompagner de la réalisation d'un antibiogramme uniquement à visée épidémiologique afin de suspecter la souche épidémique en cas de résistance à l'érythromycine et aux nouvelles fluoroquinolones et transmettre l'isolat au centre de référence pour identification [52].

4. TYPAGE

Le typage des souches peut sembler loin des préoccupations des anesthésistes-réanimateurs, intensivistes, et réanimateurs, mais il s'agit de l'outil primordial de caractérisation épidémique et il est nécessaire de l'aborder ne serait-ce que pour comprendre la terminologie utilisée dans l'identification et la surveillance épidémiologique de *C. difficile* qui est d'actualité.

Il s'agit essentiellement du phénotypage/génotypage de *C. difficile* selon diverses méthodes qui ont été récemment comparées quand à leur capacité à distinguer les isolats cliniques impliqués dans les récentes épidémies [53]. Les méthodes traditionnelles de phénotypage caractérisent les souches sur différentes caractéristiques observables: l'antibiogramme sur un profil de résistance, le biotypage sur une activité biochimique, le sérotypage sur une réactivité avec certains antisérums, la lysotypie sur la sensibilité du germe à un panel de bactériophages, et l'électrophorèse des protéines sur gel d'acrylamide (PAGE) sur la migration des protéines. Ces méthodes phénotypiques ont été supplantées par des méthodes fondées sur le génotypage. Le génotypage regroupe essentiellement deux catégories de méthodes : les méthodes de «Restriction fragment length polymorphism» étudiant le polymorphisme de fragments de restriction, et les méthodes de «Amplified fragment length polymorphism» étudiant le polymorphisme des fragments d'amplification. De nombreuses techniques sont utilisées en routine aboutissant à une nomenclature variée désignant une seule et même souche selon la technique utilisée. Ainsi la souche hypervirulente de *C. difficile* émergente depuis 2000 est-elle désignée «type BI» en «restriction endonuclease analysis (REA)», «North American (NA) pulsed-field type 1,(NAP1)» en «pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)» ou encore «027» en «16s PCR-ribotyping» ou encore une dénomination commune de la souche «BI/NAP1/027» [53,54]. Dans une étude récente des méthodes les plus récentes de génotypage, toutes étaient capables de typer la souche (BI/NAP1/027) mais seules deux pouvaient distinguer des sous-types responsables soit de l'épidémie nord-Américaine soit de l'épidémie Européenne [53].

L'InVs résume de la manière suivante les caractéristiques permettant d'identifier la souche épidémique [52] :

- PCR-ribotype 027, selon la nomenclature définie par Brazier au Centre de Référence des Anaérobies de Cardiff en Grande-Bretagne.
- Pulsotype «NAP1» en électrophorèse en champ pulsé.
- Profil de restriction enzymatique de type «BI».
- Toxinotype III selon la méthode de toxintypage développée par Rupnik.
- Positive pour la toxine binaire (ADP-ribosyltransférase spécifique de l'actine).
- Délétion de 18pb dans le gène *tcdC* (gène contrôlant l'expression des toxines A et B).
- Hyperproduction de toxines A et B : respectivement 16 et 23 fois plus élevée que des souches d'autres génotypes.

- Résistance aux macrolides (érythromycine) et aux fluoroquinolones (moxifloxacine, gatifloxacine, et levofloxacine).

5. ÉPIDÉMIOLOGIE

Cette revue a été motivée par l'existence d'une réémergence épidémique mondiale de *C. difficile* depuis 2000, et il est donc nécessaire d'aborder cette épidémiologie récente. L'incidence des ICD rapportée dans la littérature était habituellement de 0 à 15 cas pour 100 patients dans les structures de soins, en dehors de période d'épidémie, mais s'élevait entre 16 et 20 cas pour 100 patients en période épidémique. Cette variabilité d'incidence était dépendante du type de patients pris en charge, de l'utilisation d'antibiotiques et de l'occurrence d'épidémies. Aux Etats-Unis, une augmentation d'incidence des ICD était observée depuis les années 90 malgré la mise en place de programmes de surveillance, de contrôle et de traitement. Dans la communauté, la prévalence des ICD était largement plus basse, de 7 à 12 cas pour 100 000 personnes par an. Depuis 2003, l'incidence des ICD s'est modifiée à la hausse dans de nombreux établissements de soins aux USA, au Canada et en Europe, avec une augmentation des ICD sévères, fulminantes ou récidivantes [55].

La première alerte d'une évolution épidémique inhabituelle est apparue en Amérique du Nord. Au Canada, une étude de 1771 cas de 1191 à 2003 à montré une incidence des entéropathies à *C. difficile* multipliée par 4 de manière globale et par 10 dans le sous-groupe à risque des patients âgés [56] avec une incidence croissante des formes graves ou fatales [56, 57]. D'autre part, l'évolution se faisait vers une résistance croissante au traitement avec échecs de traitement et formes récidivantes [58]. L'épidémie canadienne fut confirmée par une étude prospective en 2004, mettant en évidence la souche épidémique (BI/NAP1/027) dans 82 % des cas [1].

En parallèle, aux USA, une analyse des registres déclaratifs montrait un doublement des cas entre 1996 et 2003 [59]. De même, en 2000, à Pittsburgh, une épidémie d'ICD avec une incidence élevée de formes sévères était signalée [60]. Les équipes du CDC ont analysé les souches d'épidémies repérées entre 2000 et 2003 dans huit états différents et ont trouvé qu'une souche différente des souches habituelles était responsable et l'ont caractérisé par des méthodes de génotypage (NAP1), ont mis en évidence la délétion du gène *tcdC* la rendant potentiellement hypersécrétrice de toxines ainsi que son profil résistant aux fluoroquinolones [2].

Ces épidémies nord-américaines ont eu leurs parallèles en Europe avec les mêmes constatations rétrospectives d'incidences et de gravité anormalement élevés suivies d'une identification prospective de l'épidémie vers 2004. L'ensemble des épidémies identifiées depuis l'identification de la souche épidémique en Europe en 2004 touchant 75 établissements en Angleterre, 16 aux Pays-Bas, 13 en Belgique et 9 en France a été rapportée en 2006 [61].

En mars 2006, l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS) recevait le signalement de 16 cas groupés parmi 41 ICD dans un établissement du Nord-Pas-de-Calais avec une progression très médiatisée à plusieurs établissements jusqu'à totaliser 347 cas recensés en Octobre 2006 sur lesquels 98 (28 %) sont décédés et pour 21 (6 %) desquels le décès a été considéré par les cliniciens comme au moins partiellement imputable à l'infection. Sur 176 souches isolées

lors de ces épisodes et expertisées par les laboratoires du CNR, 122 (69 %) étaient de type 027 [52].

6. CLINIQUE

6.1. CLINIQUE HABITUELLE

La diarrhée, parfois le seul symptôme est constituée typiquement de selles liquides voire aqueuses, nauséabondes et verdâtres voire muco-purulentes dans les 72 h de toute antibiothérapie mais aussi après interruption de l'antibiothérapie et ce jusqu'à 8 semaines [62]. Il s'agit d'une entéropathie exsudative accompagnant les troubles de perméabilité de la barrière épithéliale intestinale lésée et donc susceptible d'entraîner une hypoalbuminémie [63]. D'autres symptômes sont fréquents tels que douleurs abdominales à type de crampes (22 %), fièvre (28 %) et hyperleucocytose pouvant atteindre les 50000/mm³ (50 %) [64]. Les formes sévères peuvent entraîner un iléus, et donc une forme ou la diarrhée est absente, évoluant vers le mégacôlon toxique avec nausées, vomissements, sensibilité abdominale voire syndrome péritonéal, et atteinte générale allant du SIRS au choc septique.

Ainsi, dans un contexte d'exposition aux antibiotiques, soit la diarrhée post-antibiotique ou l'apparition de fièvre, de douleurs abdominales, d'hyperleucocytose ou d'hypoalbuminémie inexplicables doivent faire évoquer le diagnostic d'ICD et faire réaliser une recherche explicite de *C. difficile* et des toxines A et B dans un échantillon frais de selles liquides ou, en l'absence de diarrhée, faire réaliser les examens complémentaires détaillés ci-dessous. Une tomodensitométrie réalisée pour une suspicion de complication digestive peut étayer la suspicion d'ICD en mettant en évidence un épaississement de la paroi colique ou une complication telle que la dilatation du mégacôlon toxique voire la perforation. Enfin, et surtout, la réalisation d'une recto-sigmoidoscopie puis d'une coloscopie en cas de négativité peut mettre en évidence de manière variablement sensible (50 à 95 % selon les séries) mais très spécifique, une colite pseudomembraneuse [65]. La colite pseudomembraneuse se caractérise par une muqueuse inflammatoire tapissée de fausses membranes blanc jaunâtre, qui, en les mobilisant, laissent apparaître des ulcérations de la muqueuse. En cas de doute, une biopsie peut être pratiquée et l'analyse histologique mettra en évidence une nécrose superficielle de la muqueuse, un exsudat fibrinoleucocytaire, et une accumulation de leucocytes, de débris tissulaires, et de mucus.

Du fait de toutes les considérations abordées au sujet du diagnostic et de la clinique habituelle, l'InVs retient la définition suivante d'une infection digestive liée à *C. difficile* (ICD) [52] :

Un patient qui réunit un ou plusieurs des critères suivants :

- Diarrhée* ou mégacôlon toxique, et test positif pour la présence de toxine de *C. difficile* dans les selles (test immuno-enzymatique détectant la toxine A et/ou B ou test de cytotoxicité cellulaire avec neutralisation) ou culture de selles positive pour une souche toxigène
- Diagnostic de colite pseudomembraneuse lors d'une endoscopie digestive basse
- Diagnostic histo-pathologique de colite à *C. difficile* (avec ou sans diarrhée) sur un prélèvement obtenu lors d'une endoscopie, colectomie ou d'une autopsie.

*on définira alors une diarrhée comme la survenue d'au moins 3 selles liquides ou prenant la forme du récipient par 24 heures. Cette définition exclut les diarrhées liées à une autre cause (après avis du médecin responsable du patient) et les patients asymptomatiques avec un test positif pour la présence de toxine A et/ou B ou avec une culture de selles positive pour *C. difficile* (colonisation).

6.2. CLINIQUE ÉMERGENTE : ÉVOLUTION ÉPIDÉMIQUE VERS DES FORMES GRAVES

L'analyse rétrospective entre 1991 et 2003 repérant l'épidémie canadienne rapporta une augmentation de l'incidence des formes graves de 7 à 18 % et une augmentation de la mortalité de 5 % à 14 % [56]. L'analyse prospective confirmant cette épidémie a mis également en évidence une incidence élevée (16 %) de formes sévères [1]. La poursuite et l'élargissement du suivi prospectif de l'épidémie canadienne a récemment rapporté un risque relatif de forme sévère de 2 avec la souche épidémique [66].

Lors de l'épidémie de Pittsburgh, il a été établi que 81 % des formes graves étaient imputables à la souche épidémique [67]. Dans une étude rétrospective nord-américaine entre 2002 et 2005 chez les patients hospitalisés en réanimation ayant eu une recherche de toxines positives dans les selles, un taux de choc septique de 33 %, une mortalité à 14 j de 17 % et une mortalité hospitalière de 28 % a été rapporté [68].

Lors de l'épidémie européenne, la même surmortalité a été mise en évidence avec un odds-ratio de 3 en cas d'ICD avec la souche épidémique [69]. Enfin, lors de l'épidémie dans le Nord-Pas-de-Calais on a retrouvé une mortalité élevée de 28 % avec toutefois que 6 % imputables à l'ICD [52].

Cette association observée entre la souche épidémique et la sévérité est mise en doute par une étude cas-témoins récente qui ne retrouve le type de la souche comme facteur de sévérité qu'en analyse monovariée et non en multivariée [70]. Toutefois, cette étude ne retenait comme critère de sévérité générale (hors mégacôlon toxique etc...) que l'existence d'un choc ou d'une oligurie. Or, une étude récente a bien montré qu'une défaillance d'organe quelle qu'elle soit, ou le SOFA score étaient prédictifs de mortalité dans une cohorte d'ICD en réanimation [68]. Ainsi, l'équipe mettant en doute la responsabilité de la souche épidémique dans les ICD graves a possiblement mal réparti les cas.

Au total on peut retenir de cette évolution une augmentation des formes graves susceptibles de nécessiter des soins intensifs ou de la réanimation voire de la chirurgie urgente. Face à cette constatation l'InVs préconise de reconnaître ces formes sévères en utilisant la définition suivante [52] :

ICD sévère : un patient atteint d'ICD qui réunit un ou plusieurs des critères suivants :

- Si d'origine communautaire, admission dans un établissement de santé pour traitement de l'ICD
- Admission dans une unité de réanimation pour traitement de l'ICD ou de ses complications (par exemple, choc nécessitant le maintien des fonctions vitales)*
- Hyperleucocytose ($\geq 20\ 000/\text{mm}^3$)
- Chirurgie (colectomie) pour mégacôlon, perforation ou colite réfractaire
- décès dans les 30 jours qui suivent le début des symptômes si l'ICD est la cause initiale ou associée.

(*commentaire de l'auteur: toute défaillance d'organe signe la gravité de l'ICD [68]).

7. TRANSMISSION CROISÉE

McFarland a étudié extensivement les modes de transmission de *C. difficile* et observa une transmission interhumaine à la fois directe entre patients, et indirecte via manuportage par les soignants ainsi que via des objets inertes [30]. Ce mode de transmission est favorisé par une survie prolongée des spores hautement résistants à la dessiccation jusqu'environ 5 mois sur toutes les surfaces inertes de l'environnement hospitalier des patients [8, 71]. L'acquisition de *C. difficile* par des patients séjournant dans des chambres dans lesquelles ont précédemment séjourné des patients porteurs de *C. difficile* illustre bien ce mode de transmission du aux spores [72]. De plus, les souches épidémiques ont une tendance à l'hypersporulation [73].

Une étude récente a estimé que le portage asymptomatique de souches toxigènes et donc pathogènes s'élevait à 51 % dont 37 % de souches épidémiques dans le contexte de l'épidémie aux USA [74]. Les souches présentes dans les selles des porteurs asymptomatiques étaient retrouvées dans les prélèvements de l'environnement des patients et sur les mains des porteurs. Ainsi les porteurs asymptomatiques représentent un réservoir possible dans la transmission croisée de *C. difficile* en période épidémique justifiant les mesures de dépistage systématique et de cohorting des sujets contacts même asymptomatiques. Par contre, les tentatives d'éradication de ce réservoir par traitement anti-Clostridium difficile se sont révélés inefficaces [75,76]. De manière préoccupante, une étude récente a mis en évidence une dissémination aérienne de spores de *C. difficile* dans un établissement de soins [77]. Bien qu'aucune preuve n'existe à ce jour d'une transmission aéroportée de *C. difficile*, une dissémination aérienne des spores pourrait participer aux difficultés d'éradication rencontrées.

8. PRÉVENTION

Étant donné le mode d'acquisition de *C. difficile*, la prévention repose de manière primordiale sur des mesures d'éradication des spores de *C. difficile* de l'environnement. A ce jour il n'y a que l'hypochlorite de soude (eau de Javel) et les vapeurs de peroxyde d'hydrogène qui sont des sporicides reconnus [78, 79, 80]. De plus, comme les spores sont des formes de résistance au stress, toute formulation insuffisamment sporicide d'un détergent provoque une sporulation induite des formes survivantes [80]. En matière de bionettoyage, il n'y a qu'une détersion des surfaces à l'hypochlorite de soude qui ait fait preuve d'une efficacité sur la diminution de l'incidence des ICD dans des unités à haute incidence [81, 82] en sachant qu'environ 50 % des surfaces d'une chambre et des objets s'y trouvant peuvent être concernées [30].

La détersion des mains des soignants est évidemment la deuxième mesure nécessaire. Les solutions hydro-alcooliques, qui ont permis une diminution des transmissions croisées par ailleurs, sont inefficaces sur *C. difficile* et les spores de *C. difficile*. Toutefois, leur utilisation croissante n'a pas entraîné d'augmentation de l'incidence des ICD car elle a probablement également permis une meilleure sensibilisation des personnels de santé aux mesures d'hygiène dans la prévention des transmissions croisées [83].

Les mesures barrières pour éviter le contact sont donc indispensables, et au premier lieu desquelles, le port de gants, qui est la mesure la plus efficace dans la prévention de la transmission croisée de tout organisme. De même, les précautions de contact doivent être étendues au port de blouses jetables. Par extension, les patients atteints d'ICD ou porteurs de *C. difficile* toxinogène doivent être isolés avec mise en place des précautions de contact, et cohortés de manière à n'être pris en charge que par une équipe de soignants dédiés avec des équipements dédiés, au mieux dans une aile géographiquement individualisée [52].

Ces mesures doivent être accompagnés d'un niveau de suspicion clinique d'ICD permettant, notamment face aux formes graves, de déclencher des procédures d'alerte interne à l'établissement et externes aux tutelles permettant de réagir dès le début d'une épidémie. Ceci implique des procédures concertées préalablement mis au point entre les différents acteurs et notamment les anesthésistes-réanimateurs, urgentistes et réanimateurs destinés à prendre en charge ces patients graves.

D'autre part il convient de minimiser l'exposition aux facteurs de risque au premier plan desquels l'antibiothérapie ce qui implique la mise en place d'une rationalisation de l'utilisation des antibiotiques, notamment dans des services prescripteurs d'antibiothérapie à large spectre tels que les soins intensifs et la réanimation. Plusieurs études utilisant des stratégies non restrictives de bon usage des antibiotiques ont fait la preuve de leur efficacité dans la réduction de l'incidence des ICD [84-86]. Concernant les autres facteurs de risque potentiellement évitables, aucune étude n'a abordé les effets d'une maîtrise de l'utilisation des antiacides et antisécrétoires ou de la nutrition entérale via une sonde sur l'incidence des ICD. Par contre, on peut sûrement éviter l'utilisation non justifiée des traitements antisécrétoires pour prévention de l'ulcère de stress qui peut atteindre plus de 50 % et se prolonger au-delà de l'hospitalisation [87].

Face à l'épidémie française, le comité technique des infections nosocomiales et infections liées aux soins (CTINILS) a émis des recommandations qui reprennent et formalisent les notions développés ci-dessus [88].

9. TRAITEMENT

9.1. ÉVICTION DES ANTIBIOTHÉRAPIES

La première mesure en cas d'ICD est d'interrompre, si possible, l'antibiothérapie ayant favorisée l'ICD. En effet, une étude de patients ayant une diarrhée à *C. difficile* a montré qu'en cas de non interruption de l'antibiothérapie causale, le taux d'échec sous métronidazole s'élevait à 40 % alors qu'aucun échec n'était rapporté si l'antibiothérapie causale était interrompue [89]. En milieu réanimatoire, il peut s'avérer problématique d'interrompre une antibiothérapie et il faut donc envisager une modification de l'antibiothérapie en cours privilégiant l'utilisation de classes moins fréquemment en cause dans les ICD. L'adaptation rapide des antibiothérapies probabilistes par décrémentation des antibiothérapies à large spectre vers des antibiotiques adaptés à l'antibiogramme prend alors tout son sens.

9.2. ANTIBIOTHÉRAPIE ANTI-CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Les traitements de référence sont le métronidazole et la vancomycine pour lesquels une équivalence d'efficacité de plus de 90 % avait été démontrée dans

un essai randomisé contrôlé en 1983 [90]. Pour des raisons de coût élevé de la vancomycine et de pression de sélection trop importante sur les entérocoques résistants à la vancomycine, le traitement par métronidazole a été favorisé [90, 91]. Mais au fur et à mesure de l'analyse des épidémies à partir de 2000, le taux de succès avec le métronidazole diminue et le nombre de rechutes augmente [58]. Ce taux d'échec atteint 50 % dans une étude prospective en 2005, avec 22 % de persistance, 28 % de récurrences et une mortalité plus élevée en cas d'échec initial [89]. C'est un essai randomisé contrôlé en double aveugle réalisé sur 8 ans qui tranche en mettant en évidence une quasi-équivalence entre métronidazole et vancomycine pour les formes non-graves (90 % et 98 % de succès) mais une supériorité de la vancomycine par rapport au métronidazole dans les formes graves (97 % vs 76 %) [92]. Il est intéressant de noter que l'on retrouve cette supériorité de la vancomycine par rapport au métronidazole (85 % vs 65 %) dans le traitement des formes graves dans un essai randomisé contrôlé évaluant une nouvelle thérapeutique non-antibiotique [93]. De plus, une étude conçue pour déceler les facteurs d'échec du métronidazole retrouve indirectement la gravité comme facteur d'échec en identifiant l'hypoalbuminémie et l'hospitalisation en réanimation comme facteurs d'échec [94]. En reprenant toutes les caractéristiques des formes graves conduisant à l'échec du métronidazole dans les études ci-dessus, on peut préconiser l'utilisation de la vancomycine en présence des critères suivants: hospitalisation en réanimation, défaillance d'organe, insuffisance rénale, fièvre, syndrome douloureux abdominal, diarrhées intenses, hypoalbuminémie, et hyperleucocytose. La voie d'administration préférentielle est orale pendant 10 à 15 jours mais la vancomycine peut aussi être administrée par voie entérale par sonde nasogastrique et/ou par lavements en cas d'iléus. De plus, du fait des problèmes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques chez les patients graves de réanimation, administration entérale et/ou rectale de vancomycine peuvent être combinées à une administration intraveineuse de métronidazole [95]. Ainsi, les protocoles suivants en fonction de la gravité ont été récemment proposés par des experts du CDC [96] :

- Formes non-graves :
Diarrhée modérée, leucocytose < 15 000/ μ l
Métronidazole 500 mg x 3/j per os pendant 10 à 14 jours
- Formes sévères :
Diarrhées profuses, fièvre, syndrome douloureux abdominal
Hyperleucocytose \geq 15 000/ μ l, élévation de la créatinémie...
Vancomycine 125 à 500 mg x 4/j per os pendant 10 à 14 jours
- Formes compliquées :
Iléus, mégacôlon toxique, choc
Vancomycine 500 mg x 4/j
Par voie entérale via sonde nasogastrique et/ou rectale par lavements
+/- métronidazole 500 mg/8h par voie intraveineuse

Sous traitement efficace, un succès thérapeutique entraîne, en moyenne, une régression des signes généraux en trois jours et de la diarrhée en cinq [71]. En cas d'échec, et/ou de récurrences qui sont de plus en plus fréquentes lors des épidémies récentes, jusqu'à 20 % dans les 2 mois suivant un succès initial, il n'y a aucun consensus. Certains préconisent des doses décroissantes de vancomycine voire des «pulses» discontinus ou encore les probiotiques voire

des «transplantations» de flore digestive hétérologue par administration entérale ou en lavement de selles diluées ! [95, 97, 98].

9.3. PROBIOTIQUES

Étant donné le rôle de la rupture de l'équilibre de la flore digestive dans la physiopathologie des ICD, toute thérapeutique visant à rétablir cet équilibre apparaît séduisante. Dans cette optique, l'utilisation de probiotiques a été proposée avec des résultats variables [95]. Une étude récente a montré une efficacité d'un mélange de *Lactobacillus* et de *Saccharomyces* dans la diminution des diarrhées à *C. difficile* [99]. Toutefois une revue systématique récente concluait à l'insuffisance de preuves pour recommander l'utilisation des probiotiques dans les ICD [99] et surtout, la récente surmortalité directement liée aux probiotiques dans un essai de leur utilisation au cours de la pancréatite aiguë engage à la prudence [100].

9.4. NOUVELLES THÉRAPEUTIQUES

De nouvelles thérapeutiques sont en cours d'évaluation. Il s'agit soit de nouveaux antibiotiques utilisés dans d'autres infections digestives (rifamixine et nitazoxanide), soit de thérapeutiques non antibiotiques telles que les immunoglobulines par voie intraveineuse ou encore l'administration orale de polymères liant et inactivant les toxines A et B [95, 98]. Les essais les plus aboutis concernent un polymère, le Tolevamer qui a déjà complété des essais phase I et II et montré une non-infériorité par rapport à la vancomycine dans des formes non-graves d'ICD et semble donc prometteur [95, 98].

9.5. LA CHIRURGIE

La place de la chirurgie est mal codifiée au cours des ICD en dehors des évidentes complications chirurgicales telles que la péritonite par perforation et le mégacôlon toxique grave [97]. Il s'agit alors généralement de colectomie subtotalaire voire totale ou de simple dérivation par stomie en cas de mégacôlon toxique peu grave [97]. Le recours à la chirurgie en doit être rapidement évoqué en cas d'aggravation clinique marquée. En effet, une indication chirurgicale posée avant le stade d'instabilité hémodynamique était un facteur pronostique dans une des rares séries récentes chirurgicales de colite pseudomembraneuse [101].

CONCLUSION

Bien que l'épidémie dans le Nord-Pas-de-Calais ait été qualifiée de «maîtrisée» du fait de l'implémentation de mesures de contrôle et d'une diminution des cas déclarés, la souche de *C. difficile* 027 est loin d'être éradiquée [102]. À ce jour, plusieurs foyers persistent en France et dans le monde, et tous s'accordent à dire que d'autres épidémies sont à prévoir. Prévoir l'apparition de ces épidémies et avoir des mesures prêtes à être implémentées à tous les niveaux par tous les acteurs dans chaque établissement sont les conditions nécessaires pour enrayer rapidement la diffusion épidémique de la souche hypervirulente (BI/NAP1/027). Les anesthésistes-réanimateurs, les urgentistes et les réanimateurs prennent en charge quotidiennement des patients qui s'avèrent de facto à haut risque d'ICD. De plus, en période épidémique, ils sont destinés à prendre en charge les patients atteints de formes graves d'ICD. Dans ce contexte, ils doivent maintenir un haut niveau de suspicion d'ICD, connaître les moyens de confirmer les cas suspects,

connaître les mesures à prendre dans les unités ainsi que les traitements à mettre en oeuvre et se concerter avec les autres acteurs, infectiologues, microbiologistes, hygiénistes et chirurgiens, dans la prise en charge multidisciplinaire des pathologies dues à cette bactérie qui porte bien son nom : *C. difficile*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault AM, Nguyen T, Frenette C, Kelly M. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005;353:2442-2449
- [2] McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;353:2433-2441
- [3] Kuijper EJ, Coignard B, Brazier JS, Suetens C, Drudy D, Wiuff C, Pituch H, Reichert P, Schneider F, Widmer AF, Olsen KE, Allerberger F, Notermans DW, Barbut F, Delmée M, Wilcox M, Pearson A, Patel BC, Brown DJ, Frei R, Akerlund T, Poxton IR, Tüll P. Update of *Clostridium difficile*-associated disease due to pcr ribotype 027 in europe. *Euro Surveill* 2007;2:E1-2
- [4] (CDC) CfDcAP. Severe *Clostridium difficile*-associated disease in populations previously at low risk—four states, 2005. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54:1201-1205
- [5] Dobson G, Hickey C, Trinder J. *Clostridium difficile* colitis causing toxic megacolon, severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med* 2003;29:1030
- [6] Hall JC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Amer. J. Dis. Child* 1935; 390-402
- [7] Bartlett JG. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *Clostridia*. *N Engl J Med* 1978;298:531-534
- [8] Weaver L, Michels HT, Keevil CW. Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: Futuristic options for hospital hygiene. *J Hosp Infect* 2008;68:145-151
- [9] Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: A potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. Difficile*-associated diarrhea? *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2883-2887
- [10] Krivan HC, Clark GF, Smith DF, Wilkins TD. Cell surface binding site for *Clostridium difficile* enterotoxin: Evidence for a glycoconjugate containing the sequence gal-alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNac. *Infect Immun* 1986;53:573-581
- [11] Tabaqchali S, O'Farrell S, Nash JQ, Wilks M. Vaginal carriage and neonatal acquisition of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 1984;18:47-53
- [12] Al-Jumaili IJ, Shibley M, Lishman AH, Record CO. Incidence and origin of *Clostridium difficile* in neonates. *J Clin Microbiol* 1984;19:77-78
- [13] Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*, 2005;18:247-263
- [14] Florin I, Thelestam M. Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1983;763:383-392
- [15] Reineke J, Tenzer S, Rupnik M, Koschinski A, Hasselmayer O, Schratzenholz A, Schild H, von Eichel-Streiber C. Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. *Nature* 2007;446:415-419
- [16] Hecht G, Koutsouris A, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. *Clostridium difficile* toxin B disrupts the barrier function of t84 monolayers. *Gastroenterology* 1992;102:416-423
- [17] Feltis BA, Wiesner SM, Kim AS, Erlandsen SL, Lyerly DL, Wilkins TD, Wells CL. *Clostridium difficile* toxins A and B can alter epithelial permeability and promote bacterial paracellular migration through HT-29 enterocytes. *Shock* 2000;14:629-634
- [18] Hippenstiel S, Schmeck B, N'Guessan PD, Seybold J, Krull M, Preissner K, Eichel-Streiber CV, Suttorp N. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L830-838

- [19] Shoshan MC, Florin I, Thelestam M. Activation of cellular Phospholipase A2 by *Clostridium difficile* toxin B. *J Cell Biochem* 1993;52:116-124
- [20] Schmidt M, Rumenapp U, Bienek C, Keller J, von Eichel-Streiber C, Jakobs KH. Inhibition of receptor signaling to Phospholipase D by *Clostridium difficile* toxin B. Role of Rho proteins. *J Biol Chem* 1996;271:2422-2426
- [21] Chen ML, Pothoulakis C, LaMont JT. Protein Kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of t84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin A. *J Biol Chem*, 2002;277: 4247-4254
- [22] Warny M, Keates AC, Keates S, Castagliuolo I, Zacks JK, Aboudola S, Qamar A, Pothoulakis C, LaMont JT, Kelly CP. P38 MAP Kinase activation by *Clostridium difficile* toxin A mediates monocyte necrosis, IL-8 production, and enteritis. *J Clin Invest*, 2000;105:1147-1156
- [23] Jefferson KK, Smith MF, Jr., Bobak DA. Roles of intracellular calcium and Nf-kappa B in the *Clostridium difficile* toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes. *J Immunol* 1999;163:5183-5191
- [24] He D, Sougioultzis S, Hagen S, Liu J, Keates S, Keates AC, Pothoulakis C, Lamont JT. *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology* 2002; 122:1048-1057
- [25] Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, Joshi MA, O'Keane JC, Dickey BF, LaMont JT, Pothoulakis C. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *J Clin Invest*, 1994; 93: 1257-1265
- [26] Mantyh CR, Maggio JE, Mantyh PW, Vigna SR, Pappas TN. Increased Substance P receptor expression by blood vessels and lymphoid aggregates in *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis. *Dig Dis Sci* 1996;41:614-620
- [27] Castagliuolo I, Keates AC, Qiu B, Kelly CP, Nikulasson S, Leeman SE, Pothoulakis C. Increased Substance P responses in dorsal root ganglia and intestinal macrophages during *Clostridium difficile* toxin a enteritis in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4788-4793
- [28] Geric B, Carman RJ, Rupnik M, Genheimer CW, Sambol SP, Lyerly DM, Gerding DN, Johnson S. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxigenic but do not cause disease in hamsters. *J Infect Dis* 2006;193:1143-1150
- [29] Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A- B+ strain of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1696-1697
- [30] McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. *N Engl J Med* 1989;320:204-210
- [31] Curry SR, Marsh JW, Muto CA, O'Leary MM, Pasculle AW, Harrison LH. *tcdC* genotypes associated with severe *tcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2007;45:215-221
- [32] Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J, Frost E, McDonald LC. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005;366:1079-1084
- [33] Barbut F, Decre D, Lalande V, Burghoffer B, Noussair L, Gigandon A, Espinasse F, Raskine L, Robert J, Mangeol A. Clinical features of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase)-producing strains. *J Med Microbiol* 2005;54:181-185
- [34] Goncalves C, Decre D, Barbut F, Burghoffer B, Petit JC. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004;42:1933-1939
- [35] Bartlett JG. Narrative review: The new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease. *Ann Intern Med* 2006;145:758-764
- [36] Aronsson B, Mollby R, Nord CE. Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: Epidemiological data from Sweden, 1980-1982. *J Infect Dis* 1985;151:476-481
- [37] Wistrom J, Norrby SR, Myhre EB, Eriksson S, Granstrom G, Lagergren L, Englund G, Nord CE, Svenungsson B. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: A prospective study. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:43-50
- [38] Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:405-410
- [39] Bignardi GE. Risk factors for *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect* 1998; 40:1-15

- [40] Shim JK, Johnson S, Samore MH, Bliss DZ, Gerding DN. Primary symptomless colonisation by *Clostridium difficile* and decreased risk of subsequent diarrhoea. *Lancet* 1998;351:633-636
- [41] Dial S, Delaney JA, Barkun AN, Suissa S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. *Jama*, 2005; 294: 2989-2995
- [42] Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. *N Engl J Med* 2000;342:390-397
- [43] Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357:189-193
- [44] Delmee M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: A plea for culture. *J Med Microbiol* 2005;54:187-191
- [45] Brazier JS, Borriello SP. Microbiology, epidemiology and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;250:1-33
- [46] DiPersio JJR, Varga FFJ, Conwell DDL, Kraft JJA, Kozak KKJ, Willis DDH. Development of a rapid enzyme immunoassay for *Clostridium difficile* toxin A and its use in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. *J Clin Microbiol* 1991;29:2724-2730
- [47] Doern GGV, Coughlin RRT, Wu LL. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated gastrointestinal disease: Comparison of a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxins A and B with a monoclonal antibody enzyme immunoassay for toxin A only and two cytotoxicity assays. *J Clin Microbiol* 1992;30:2042-2046
- [48] Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, Merz C, Charache P, Bartlett JG. *Clostridium difficile* colitis: An efficient clinical approach to diagnosis. *Ann Intern Med* 1995;123:835-840
- [49] Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, Borek AP, Hargrove JT, Carroll KC. Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin. *J Clin Microbiol* 2006;44:1145-1149
- [50] Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, Carroll KC. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2007;45: 3601-3605
- [51] Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2008;46:328-330
- [52] Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin), Institut de Veille Sanitaire. Conduite à tenir : Diagnostic, investigation, surveillance, et principes de prévention et de maîtrise des infections à *Clostridium difficile*. 2006.http://www.invs.sante.fr/publications/2006/guide_raisin/index.html
- [53] Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, Frost EH, Savelkoul P, Nicholson B, van den Berg RJ, Kato H, Sambol SP, Zukowski W, Woods C, Limbago B, Gerding DN, McDonald LC. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: Restriction Endonuclease Analysis, Pulsed-field Gel Electrophoresis, PCR-ribotyping, Multilocus Sequence Typing, Multilocus Variable-number Tandem-Repeat analysis, Amplified Fragment Length Polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 2008;46:431-437
- [54] Biron M, Berche P, Ferroni A. [contribution of the laboratory to the epidemiologic study of bacterial infections]. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49:128-137
- [55] McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:40-48
- [56] Pepin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pepin K, Chouinard D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: A changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004;171:466-472
- [57] Pepin J, Valiquette L, Cossette B. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ* 2005;173:1037-1042
- [58] Pepin J, Alary ME, Valiquette L, Raiche E, Ruel J, Fulop K, Godin D, Bourassa C. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 2005;40:1591-1597
- [59] McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. *Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006;12:409-415

- [60] Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Krystofiak S, Patel-Brown S. A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005;26:273-280
- [61] Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:2-18
- [62] Mogg GA, Keighley MR, Burdon DW, Alexander-Williams J, Youngs D, Johnson M, Bentley S, George RH. Antibiotic-associated colitis—a review of 66 cases. *Br J Surg*, 1979; 66: 738-742
- [63] Olson MM, Shanholtzer CJ, Lee JT, Jr., Gerding DN. Ten years of prospective *Clostridium difficile*-associated disease surveillance and treatment at the Minneapolis VA medical center, 1982-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994;15:371-381
- [64] Bartlett JG, Taylor NS, Chang T, Dzink J. Clinical and laboratory observations in *Clostridium difficile* colitis. *Am J Clin Nutr* 1980;33:2521-2526
- [65] Bartlett JG, Gerding DN. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46:S12-18
- [66] Hubert B, Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Dascal A, Fortin E, Dionne M, Lorange M. A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American Pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. Difficile*-associated disease in Quebec. *Clin Infect Dis* 2007;44:238-244
- [67] McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, Genheimer CW, Zheng L. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes. *Clin Infect Dis* 2005;40:265-272
- [68] Marra A, Edmond M, Wenzel R, Bearman G. Hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated disease in the Intensive Care Unit setting: Epidemiology, clinical course and outcome. *BMC Infectious Diseases* 2007;7:42
- [69] Goorhuis A, Van der Kooij T, Vaessen N, Dekker FW, Van den Berg R, Harmanus C, van den Hof S, Notermans DW, Kuijper EJ. Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 2007;45:695-703
- [70] Morgan OW, Rodrigues B, Elston T, Verlander NQ, Brown DF, Brazier J, Reacher M. Clinical severity of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: A case-case study. *PLoS ONE*, 2008; 3: e1812
- [71] Fekety R, Kim KH, Brown D, Batts DH, Cudmore M, Silva J, Jr. Epidemiology of antibiotic-associated colitis; isolation of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *Am J Med* 198; 70:906-908
- [72] Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med* 2006;166:1945-1951
- [73] Wilcox MH, Fawley WN. Hospital disinfectants and spore formation by *Clostridium difficile*. *Lancet* 2000; 356:1324
- [74] Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and non-epidemic *Clostridium difficile* strains among long-term care facility residents. *Clin Infect Dis* 2007;45:992-998
- [75] Johnson S, Homann SR, Bettin KM, Quick JN, Clabots CR, Peterson LR, Gerding DN. Treatment of asymptomatic *Clostridium difficile* carriers (fecal excretors) with vancomycin or metronidazole. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1992;117:297-302
- [76] Kerr RB, McLaughlin DI, Sonnenberg LW. Control of *Clostridium difficile* colitis outbreak by treating asymptomatic carriers with metronidazole. *Am J Infect Control* 1990;18: 332-335
- [77] Roberts K, Smith CF, Snelling AM, Kerr KG, Banfield KR, Sleigh PA, Beggs CB. Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infect Dis*, 2008; 8: 7
- [78] Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:597-610
- [79] Otter JA, French GL, Adams NM, Watling D, Parks MJ. Hydrogen peroxide vapour decontamination in an overcrowded tertiary care referral centre: Some practical answers. *J Hosp Infect*, 2006;62:384-385
- [80] Fawley WN, Underwood S, Freeman J, Baines SD, Saxton K, Stephenson K, Owens RC, Jr., Wilcox MH. Efficacy of hospital cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007;28:920-925

- [81] Mayfield JL, Leet T, Miller J, Mundy LM. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2000;31:995-1000
- [82] Apisarnthanarak A, Zack JE, Mayfield JL, Freeman J, Dunne WM, Little JR, Mundy LM, Fraser VJ. Effectiveness of environmental and infection control programs to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis* 2004;39:601-602
- [83] Boyce JM, Ligi C, Kohan C, Dumigan D, Havill NL. Lack of association between the increased incidence of *Clostridium difficile*-associated disease and the increasing use of alcohol-based hand rubs. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27:479-483
- [84] Patel D, Lawson W, Guglielmo BJ. Antimicrobial stewardship programs: Interventions and associated outcomes. *Expert review of anti-infective therapy* 2008;6:209-222
- [85] Fowler S, Webber A, Cooper BS, Phimister A, Price K, Carter Y, Kibbler CC, Simpson AJ, Stone SP. Successful use of feedback to improve antibiotic prescribing and reduce *Clostridium difficile* infection: A controlled interrupted time series. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:990-995
- [86] Valiquette L, Cossette B, Garant MP, Diab H, Pépin J. Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain. *Clin Infect Dis* 2007;45:S112-121
- [87] Parente F, Cucino C, Gallus S, Bargiggia S, Greco S, Pastore L, Bianchi Porro G. Hospital use of acid-suppressive medications and its fall-out on prescribing in general practice: A 1-month survey. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1503-1506
- [88] Ministère de la Santé et des Solidarités. Avis du ctinils relatif à la maîtrise de la diffusion des infections à *Clostridium difficile* dans les établissements de santé français, adopté le 21/08/2006. 2006. <http://nosobase.chu-lyon.fr/Actualites/annexeCTINILS.pdf>
- [89] Musher DM, Aslam S, Logan N, Nallacheru S, Bhaila I, Borchert F, Hamill RJ. Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis* 2005;40:1586-1590
- [90] Teasley DG, Gerding DN, Olson MM, Peterson LR, Gebhard RL, Schwartz MJ, Lee JT, Jr. Prospective randomised trial of metronidazole versus vancomycin for *clostridium-difficile*-associated diarrhoea and colitis. *Lancet* 1983;2:1043-1046
- [91] Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance: Recommendations of the hospital infection control practices advisory committee (HICPAC). *Am J Infect Control* 1995;23:87-94
- [92] Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, Davis MB. A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. *Clin Infect Dis* 2007;45:302-307
- [93] Louie T, Gerson M, Grimard D, Johnson S, Poirier A, Weiss K, Peppe J, Donovan J, Davidson D, for the Polymer Alternative for CTI. Results of a phase III trial comparing tolevamer, vancomycin and metronidazole in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD). Programs and Abstracts of the 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Chicago IL. American Society for Microbiology; September 17-20, 2007
- [94] Fernandez A, Anand G, FriedenberG F. Factors associated with failure of metronidazole in *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:414-418
- [95] Gerding DN, Muto CA, Owens RC, Jr. Treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008;46:S32-42
- [96] Gould C, McDonald LC. Bench-to-bedside review: *Clostridium difficile* colitis. *Critical Care* 2007;12:203
- [97] Berman L, Carling T, Fitzgerald TN, Bell RL, Duffy AJ, Longo WE, Roberts KE. Defining surgical therapy for pseudomembranous colitis with toxic megacolon. *J Clin Gastroenterol* 2008;13
- [98] McFarland LV. Alternative treatments for *Clostridium difficile* disease: What really works? *J Med Microbiol* 2005;54:101-111
- [99] Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ. Use of probiotic lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: Randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007;335:80-86

- [100] Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, Bollen TL, van Ramshorst B, Witteman BJ, Rosman C, Ploeg RJ, Brink MA, Schaapherder AF, Dejong CH, Wahab PJ, van Laarhoven CJ, van der Harst E, van Eijck CH, Cuesta MA, Akkermans LM, Gooszen HG. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008;371:651-659
- [101] Ali SO, Welch JP, Dring RJ. Early surgical intervention for fulminant pseudomembranous colitis. *Am Surg*, 2008; 74: 20-26
- [102] Blanckaert K, Coignard B, Grandbastien B, Astagneau P, Barbut F. [update on *Clostridium difficile* infections]. *Rev Med Interne* 2008;29:209-214