

Surveillance van diarree geassocieerd met *Clostridium difficile* in de Belgische ziekenhuizen: resultaten van de nationale surveillance in 2012.

Rapport van het referentiecentrum.

M. Delmée, V. Avesani, E. Ngyuvula, L. Muyltjens, J. Van Broeck

Contact:

Prof. M Delmée

UZ St Luc 5490 – Microbiologie

54 Av Hippocrate - 1200 Bruxelles

Tel 02/764 54 90

michel.delmee@uclouvain.be

Korte samenvatting van de voornaamste bevindingen 2012

In 2012 is het aantal ziekenhuizen deelnemend aan het surveillanceprogramma evenals het aantal ontvangen stammen in het referentiecentrum voor *Clostridium difficile* (NRC-CD) aanzienlijk toegenomen.

Ribotype BR027 zet de langzame daling van zijn incidentie voort terwijl andere ribotypes zoals BR014, BR020, BR002 en BR078 in grote mate toenemen.

Inleiding

Het referentiecentrum voor *Clostridium difficile* (NRC-CD) werd in 2011 officieel erkend door het WIV-ISP maar werkt al sinds 2006 actief mee aan de nationale surveillance. Het is ondergebracht in een vestiging van de Université Catholique de Louvain op de campus te Sint-Lambrechts-Woluwe.

Sinds 2007 omvat het surveillanceprogramma voor elk erkend medisch ziekenhuislaboratorium in België ook een verplicht bacteriologisch onderdeel. Aan elke eenheid wordt gevraagd om 5 stammen van *C. difficile* te bezorgen. Deze moeten consecutief binnen één semester van het jaar worden geïsoleerd en samen met de nodige informatie worden opgestuurd, zoals beschreven op de website van het WIV-ISP (https://www.wiv-isp.be/Nsihweb/App_GUI/COMMON/Login.aspx). De laboratoria mogen ook in het tweede semester van het jaar een reeks van 5 stammen opsturen.

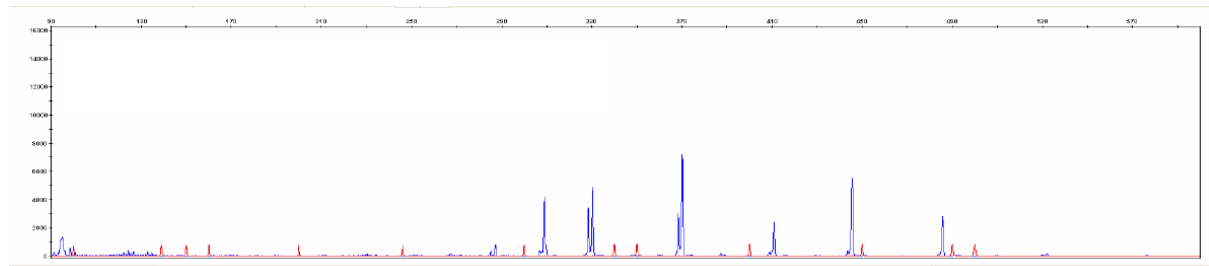
In geval van een epidemisch probleem in een ziekenhuis of op een afdeling ervan, kunnen de geïsoleerde stammen voor typering naar het referentiecentrum worden gestuurd.

De identificatie van elke stam die in dit kader wordt ontvangen, wordt op voorhand bevestigd en elke stam wordt getypeerd. De methode die hiertoe wordt gebruikt en tegenwoordig in de meerderheid van de Europese referentiecentra wordt toegepast, is de ribotypering.

Ribotypering

De techniek van de ribotypering is gebaseerd op het bestaan van meerdere operons van het ribosomaal RNA in de bacteriën. Deze coderen voor de genen 16S-23S-5S. De genen 16S en 23S worden gescheiden door een intergenische regio (niet-coderend) met verschillende afmetingen. De ribotyperingstechniek bestaat er in die intergenische regio's die in aantal en lengte variëren via PCR te amplificeren. De gekozen primers amplificeren een regio van het 16S gen fragment tot het 23S gen fragment. De verkregen amplicons worden door capillaire elektroforese met een sequencer

geanalyseerd. Figuur 1 geeft een voorbeeld van een profiel dat op die manier is verkregen. Om de stammen in te delen, wordt gebruik gemaakt van een software (GeneMapper) voor de analyse van de bandenpatronen alsook voor de interpretatie van deze patronen.



Figuur 1. Voorbeeld van een bandenpatroon verkregen met capillaire elektroforese voor de ribotypering

Ribotype Europese nomenclatuur (Brazier)	Ribotype Nomenclatuur UCL
001	23e
002	32*
003	49
012	44
014	16
015	23
017	14
020	16a*
023	4
027	027
029	28
053	395
056	55a
070	47
075	141
078	3
081	33
087	24
095	21d
106	48d
131	48c

Tabel 1 Overeenstemming tussen de Europese nomenclatuur van de ribotypes en die van het Belgische NRC-CD

Er bestaat een collectie van Europese referentiestammen die het mogelijk maakt om 21 ribotypes te classificeren. Deze worden specifiek vermeld in de rapporten. Tabel 1 vermeldt de overeenstemming tussen de 21 referentieribotypes en de interne nomenclatuur die wij op nationale schaal gebruiken. Uit onze ervaring blijkt echter dat al bijna vijfhonderd verschillende profielen (n=485) zijn geïdentificeerd.

Als gebruik wordt gemaakt van de Europese nomenclatuur, dan wordt het ribotype met de prefix 'BR' aangeduid terwijl de andere ribotypes de prefix 'UCL' krijgen.

De andere typeringstechnieken

Het NRC-CD heeft in 2012 een nieuwe typeringstechniek ontwikkeld die MLVA (Multi Locus Variable number tandem repeat Analysis) wordt genoemd. Deze maakt een andere karakterisering van de stammen mogelijk waardoor verschillende klonen binnen hetzelfde ribotype kunnen worden geïdentificeerd.

De techniek is gebaseerd op het bestaan, op de chromosoom van *C. difficile*, van een reeks herhaalde DNA-tandemsequenties op verschillende locaties in het chromosomaal genoom van *C. difficile*. Die locaties worden loci genoemd. Meerdere van deze loci, gekozen om hun discriminerende eigenschappen, worden geamplificeerd en de afmetingen van de amplimeren worden met behulp van capillaire elektroforese gemeten.

Wanneer de lengte van een repetitief element bekend is, kan het aantal herhalingen worden geteld. Dit kan via software (BioNumerics) die het ook mogelijk maakt om de gegevens te analyseren en te visualiseren onder de vorm van een dendrogram of een Minimum Spanning Tree (MST).

Zoals aangegeven in tabel 2 wordt voor elke bestudeerde stam een numerieke code verkregen (bv. 22-9-38-10-17-4-7): het eerste cijfer heeft betrekking op het aantal waargenomen herhalingen voor de eerste locus (marker), het tweede cijfer stemt overeen met het aantal verkregen herhalingen voor de tweede locus, enz. In dit geval zijn 7 loci (A6, B7, C6, E7, G8, CDR5, CDR60) geanalyseerd.

Het voorbeeld in tabel 2 toont dat bij twee epidemieën met ribotype 027, in Luik en Mol, alle stammen van dezelfde site een identiek MLVA-profiel vertoonden terwijl dit profiel tussen de sites verschillend bleek.

Ref. stam	MLVA profiel *						
	A6	B7	C6	Locus			CDR60
RIBOTYPE BR027 Liège							
CL8385	22	9	38	10	17,5	3,9	7,2
CL8386	23	9	38	10	17,5	3,9	7,2
CL8387	22	9	37	10	17,5	3,9	7,2
CL8389	23	9	40	10	17,5	3,9	7,1
CL8390	22	9	38	10	17,5	3,9	7,2
CL8392	22	9	38	10	17,5	3,9	7,2
CL8393	22	9	39	10	17,5	3,9	7,2
CL8394	22	9	38	10	17,5	3,9	7,2
CL8395	22	9	38	10	17,5	3,9	7,2
RIBOTYPE BR027 Mol							
CL6257	35,8	21,1	38	8	14,6	3,9	7,2
CL7304	34,8	21,1	39	9	14,6	3,9	7,2
CL7619	34,8	21,1	39	9	15,6	3,8	7,2
CL7631	33,8	21,1	40	9	15,6	3,9	7,2

Tabel 2. Voorbeelden van resultaten verkregen door de MLVA typeringstechniek. Vergelijking van stammen met ribotype 027 afkomstig van epidemieën op twee verschillende plaatsen (Luik en Mol)

Resultaten

In 2012 hebben 111 ziekenhuis sites aan het jaarlijkse surveillanceprogramma deelgenomen (tabel 3), dit is een toename van 33% in vergelijking met 2011. In het eerste semester hebben 96 laboratoria stammen verstuurd, in het tweede semester 68 en in beide semesters 54 laboratoria. Sinds 2011 worden de stammen ingedeeld in functie van de isolatiedatum en niet meer in functie van de ontvangstdatum van de stammen in het referentiecentrum.

Deelname aan de surveillance	2009	2010	2011	2012
N ziekenhuizen (verschillende plaatsen) die stalen voor typering hebben opgestuurd	104	103	84	111
N ziekenhuizen met BR027 (UCL27)	35	34	17	19
% ziekenhuizen met BR027 (UCL27)	33,6	33	20,2	17,12%
N ziekenhuizen met BR014 (UCL16)	35	34	32	45
% ziekenhuizen met BR014 (UCL16)	33,6	33	38	40,54%
N hôpitaux avec BR078 (UCL 3)	11	26	20	35
% hôpitaux avec BR078 (UCL 3)	10,6	25,3	23,8	31,53%

Tabel 3. Deelname aan de surveillance (per site)

Het NRC-CD heeft in totaal 767 stammen ontvangen die in 2012 zijn geïsoleerd. Hiervan zijn er 34 stammen niet bevestigd (andere species of kweek onmogelijk). Van bepaalde laboratoria, die het quotum van vijf stammen per semester overschreden, zijn alleen de eerste vijf voor de berekeningen gebruikt. Dit resulteerde in een totaal van 648 stammen. In vergelijking met voorgaande jaren houdt dit een significante toename in (40% in vergelijking met 2011), zoals vermeld in tabel 4.

Tabel 5 expliciteert de verdeling van de laboratoria in functie van het aantal stammen (1 à 10) verstuurd in het kader van de jaarlijkse surveillance.

STALEN	2009	2010	2011	2012
N stammen ontvangen en typeerbaar in het kader van de surveillance	389	505	462	648
N stammen 027	72	62	36	32
% stammen 027	18,5	12,3	7,8	4,9%
N stammen (UCL 16)	44	51	56	67
% stammen 014 (UCL 16)	11,3	10,1	12,1	10,3%
N stammen 078 (UCL 3)	13	33	35	48
% stammen 078 (UCL 3)	3,3	6,5	7,6	7,4%

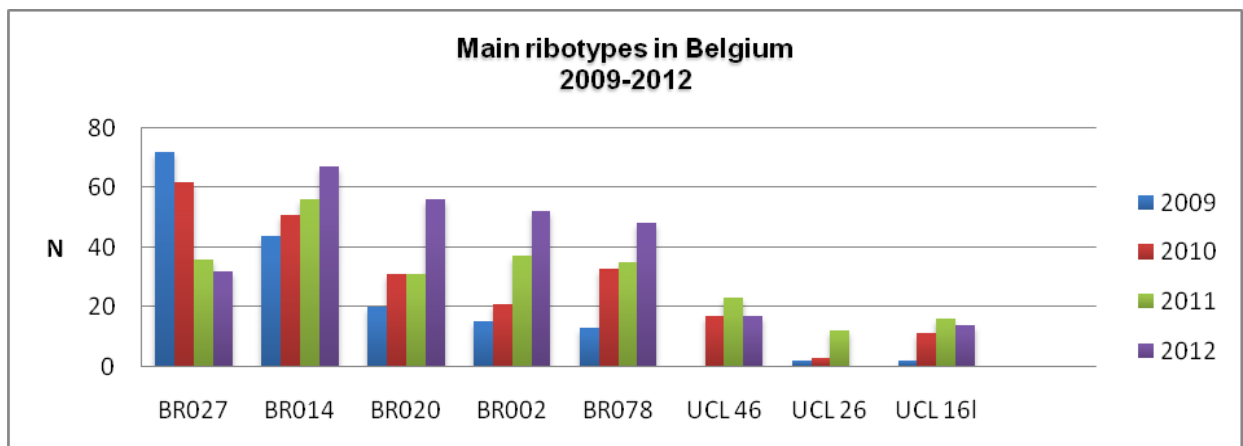
Tabel 4. Aantal stammen opgenomen in het surveillanceprogramma en statistiek van de voornaamste ribotypes

Aantal stammen verstuurd in 2012	Aantal laboratoria
1	9
2	5
3	12
4	11
5	26
6	6
7	4
8	8
9	9
10	21
Total	111

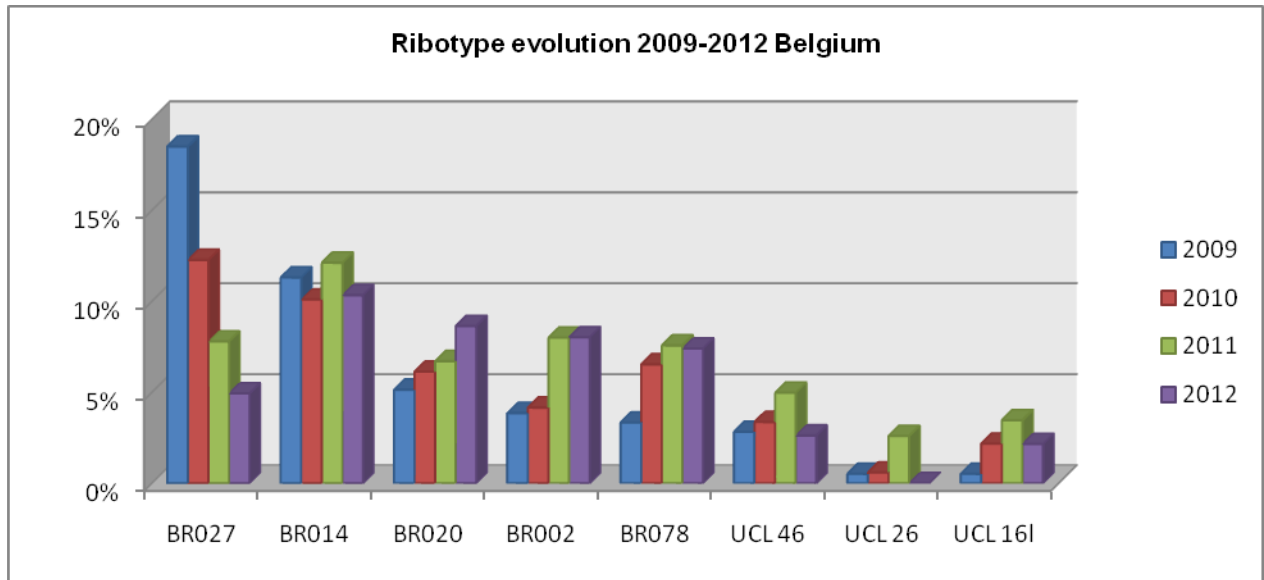
Tabel 5. Vergelijking van het aantal stammen opgenomen in het surveillanceprogramma en statistiek van de voornaamste ribotypes

Onder de 648 stammen die zijn opgenomen in de surveillance van 2012 werden in totaal zijn 135 verschillende ribotypes waargenomen. Tabel 6 klasseert de voornaamste ribotypes in functie van hun frequentie en vergelijkt de laatste vier jaren met elkaar. De frequentie van ribotype BR027 daalt ook in 2012, zowel wat het aantal stammen betreft (32), als wat het aantal getroffen ziekenhuizen betreft (19). Ribotype BR014 blijft, net zoals in 2011, het frequentst geïsoleerde ribotype. In 2012 neemt het toe in aantal maar niet in percentage. De ribotypes BR020 en BR078 zetten hun groei wel voort.

Figuur 2 en 3 geven onder de vorm van grafieken de evolutie weer van de voornaamste ribotypes, in aantal en percentage.



Figuur 2. Evolutie van het aantal stammen behorend tot de voornaamste ribotypes tussen 2009 en 2012



Figuur 3. Evolutie van de frequentie van de voornaamste ribotypes (percentage van alle getypeerde stammen) tussen 2009 en 2012

2009			2010			2011			2012		
N=389			N=505			N=462			N=638		
Ribotype	Nbr strains	% strains	Ribotype	Nbr strains	% strains	Ribotype	Nbr strains	% strains	Ribotype	Nbr strains	% strains
BR027	72	18,50	BR027	62	12,2	BR014	56	12,1	BR014	67	10,5%
BR014	44	11,30	BR014	51	10,1	BR002	37	8	BR020	56	8,8%
BR020	20	5,10	BR078	33	6,5	BR027	36	7,8	BR002	52	8,2%
BR001	16	4,10	BR020	31	6,1	BR078	35	7,6	BR078	48	7,5%
BR002	15	3,80	BR001	24	4,7	BR020	31	6,7	BR027	32	5,0%
BR015	14	3,60	BR002	21	4,1	UCL 46	23	4,7	UCL 46	17	2,7%
BR078	13	3,30	UCL 46	17	3,36	UCL 16I	16	3,3	UCL 16b	15	2,4%
UCL 46	11	2,80	BR023	16	3,10	UCL 26	12	2,6	BR023	15	2,4%
UCL 16b	10	2,60	UCL 16b	12	2,40	BR001	10	2,1	UCL 16L	14	2,2%
UCL 49	10	2,60	BR012	12	2,40	BR023	10	2,1	BR001	14	2,2%
UCL 20a	7	1,90	UCL 16I	11	2,10	UCL 23f	9	2	UCL 33	13	2,0%
BR012	6	1,50	UCL 5a	10	2,00	BR012	9	2	UCL 23f	12	1,9%
UCL 5a	6	1,50	BR015	9	1,80	UCL 16b	8	1,7	UCL 44	11	1,7%
BR023	4	1,00	UCL 20a	6	1,10	BR015	4	0,87	UCL 5a	11	1,7%
UCL 26	2	0,50	UCL 49	5	0,90	UCL 5a	4	0,87	UCL 47	10	1,6%
UCL 16I	2	0,50	UCL 26	3	0,60	UCL 20a	4	0,87	UCL 32*	8	1,3%
UCL 23f	0	0,00	UCL 23f	0	0,00	UCL 49	2	0,43	UCL 16r	7	1,1%
									UCL 20a	7	1,1%
									BR015	7	1,1%
									UCL 48d	7	1,1%
									UCL 49	7	1,1%
									UCL 118	6	0,9%
									UCL 22	6	0,9%
									UCL 36	6	0,9%

Tabel 6. Evolutie van de voornaamste ribotypes geïdentificeerd van 2010 tot 2012