

# Surveillance des diarrhées associées à *Clostridium difficile* dans les hôpitaux belges : résultats de la surveillance nationale en 2012. Rapport du centre de référence.

M. Delmée, V. Avesani, E. Ngyuvula, L. Muytjens, 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](mailto:michel.delmee@uclouvain.be)

## Bref résumé des conclusions principales en 2012

Durant l'année 2012, une augmentation sensible du nombre d'hôpitaux participant au programme de surveillance ainsi que du nombre de souches reçues au centre de référence *Clostridium difficile* (NRC-CD) a été constatée.

Le ribotype 027 poursuit une lente diminution d'incidence alors que d'autres ribotypes comme les BR014, BR020, BR002 et le BR078 sont en augmentation sensible.

## Introduction

Le centre de référence *Clostridium difficile* (NRC-CD) a été institué officiellement en 2011 par l'ISP mais il travaille activement à la surveillance nationale depuis 2006. Il est hébergé à l'Université Catholique de Louvain sur le site de Woluwé-St-Lambert.

Depuis 2007, le programme de surveillance comprend obligatoirement pour chaque laboratoire médical hospitalier belge agréé un volet bactériologique. Il est demandé à chaque entité d'envoyer cinq souches de *C. difficile* isolées consécutivement durant un semestre de l'année en y adjoignant les renseignements tels que repris sur le site de l'ISP ([https://www.wiv-isp.be/Nsihweb/App\\_GUI/COMMON/Login.aspx](https://www.wiv-isp.be/Nsihweb/App_GUI/COMMON/Login.aspx)). De façon facultative chaque laboratoire peut adresser une seconde série de cinq souches durant le second semestre de l'année.

En cas de problème épidémique dans une unité d'hospitalisation ou un hôpital, les souches isolées peuvent également être adressées au centre de référence aux fins de typage.

Chaque souche reçue dans ce cadre est préalablement confirmée quant à son identification et typée. La méthode de typage utilisée est le ribotypage qui est actuellement la méthode utilisée dans la majorité des centres de références européens

## Ribotypage

La technique de ribotypage est basée sur l'existence chez les bactéries de plusieurs opérons de l'ARN ribosomal. Ceux-ci codent les gènes 16S-23S-5S. Les gènes 16S et 23S sont séparés par une région intergénique (non-codante) de taille variable. La technique du ribotypage consiste à amplifier par PCR ces régions intergéniques qui varient donc en nombre et en longueur. Les amorces choisies permettent une amplification depuis un segment du gène du 16S jusqu'à un autre du 23S. Les amplicons obtenus sont analysés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur. La figure 1 montre un exemple de profil ainsi obtenu. Un logiciel d'analyse des tracés et d'interprétation est utilisé pour classer les souches (GeneMapper).

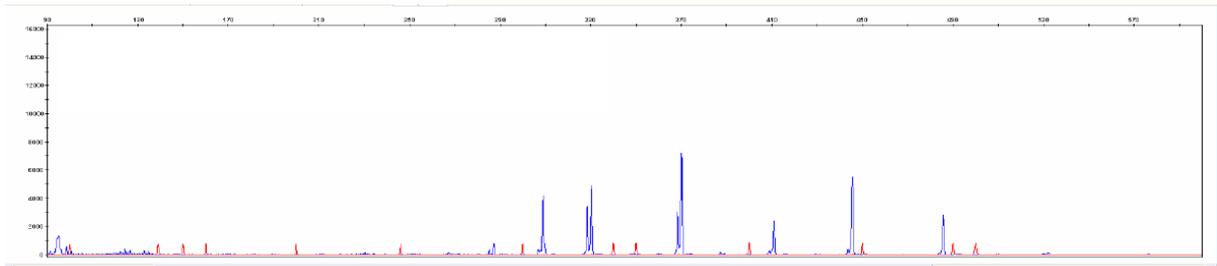


Figure 1. Exemple de tracé obtenu en électrophorèse capillaire pour le ribotypage.

Ribotype Nomenclature Européenne (Brazier)	Ribotype Nomenclature 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

Tableau 1 Correspondances entre la nomenclature européenne des ribotypes et celle du NRC-CD belge.

Il existe une collection de souches de référence européennes qui permet de classifier 21 ribotypes. Ceux-ci sont spécifiquement mentionnés dans les rapports. Le tableau 1 reprend la correspondance entre les 21 ribotypes de référence et la nomenclature interne que nous utilisons à l'échelle belge. Dans notre expérience cependant, près de cinq cents profils différents (n=485) ont déjà été identifiés.

Lorsque la nomenclature européenne est utilisée le ribotype est indiqué avec le préfixe « BR » tandis que les autres ribotypes ont le préfixe « UCL ».

## Les autres techniques de typage

Le NRC-CD a développé en 2012 une nouvelle technique de typage appelée MLVA (MultiLocus Variable number tandem repeat Analysis). Celle-ci permet une caractérisation différente des souches ce qui permet de distinguer des clones au sein d'un même ribotype.

La technique est basée sur l'existence sur le chromosome de *C. difficile* d'une série de séquences d'ADN répétées en tandem situées à de nombreux endroits différents dans le génome bactérien. Ces régions sont appelées loci. Plusieurs de ces loci, choisis pour leur pouvoir discriminant, sont amplifiés et les tailles des amplicons sont mesurées par électrophorèse capillaire.

Lorsque la longueur d'un élément répétitif est connue, on peut calculer le nombre de répétitions. Ceci peut se faire via un logiciel (BioNumerics) qui permet également d'analyser et de visualiser les données sous forme d'un dendrogramme ou sous forme de « Minimum Spanning Tree » (MST).

Comme le montre le tableau 2, un code numérique est obtenu pour chaque souche étudiée (Ex : 22-9-38-10-17-4-7); le premier chiffre se rapporte au nombre de répétitions observées pour le premier locus (marqueur), le deuxième chiffre correspond au nombre de répétitions obtenues pour le deuxième locus, etc... Dans le cas présent, 7 loci (A6, B7, C6, E7, G8, CDR5, CDR60) sont analysés.

L'exemple du Tableau 2 montre que, lors de deux épidémies impliquant le ribotype 027 à Liège et à Mol, toutes les souches d'un même établissement présentaient un profil MLVA identique mais différent d'un établissement à l'autre.

PROFIL MLVA*							
Réf. souche	Locus						
	A6	B7	C6	E7	G8	CDR5	CDR60
<b>RIBOTYPE BR027 Liège</b>							
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
<b>RIBOTYPE BR027 Mol</b>							
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

Tableau 2. Exemples de résultats obtenus par la technique de typage MLVA. Comparaison de souches ribotype 027 provenant d'épidémies dans deux sites différents (Liège et Mol)

## Résultats

En 2012, 111 sites hospitaliers ont participé au programme de surveillance annuel (Tableau 3) ce qui constitue une augmentation de 33% par rapport à 2011. Nonante-six laboratoires ont envoyé des souches au premier semestre, 68 au second semestre et 54 laboratoires ont participé aux deux semestres. Depuis 2011, les souches sont classées dans un millésime suivant leur date d'isolement et non plus suivant leur date de réception au laboratoire de référence.

<b>PARTICIPATIONS A LA SURVEILLANCE</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
<b>N hôpitaux (sites différents ) ayant envoyé des échantillons pour typage</b>	104	103	84	111
<b>N hôpitaux avec BR027 (UCL27)</b>	35	34	17	19
<b>% hôpitaux avec BR027 (UCL27)</b>	<b>33,6</b>	<b>33</b>	<b>20,2</b>	<b>17,12%</b>
<b>N hôpitaux avec BR014 (UCL16)</b>	35	34	32	45
<b>% hôpitaux avec BR014 (UCL16)</b>	<b>33,6</b>	<b>33</b>	<b>38</b>	<b>40,54%</b>
<b>N hôpitaux avec BR078 (UCL 3)</b>	11	26	20	35
<b>% hôpitaux avec BR078 (UCL 3)</b>	<b>10,6</b>	<b>25,3</b>	<b>23,8</b>	<b>31,53%</b>

Tableau 3. Participation à la surveillance (par site)

Au total, 767 souches isolées en 2012 ont été réceptionnées au NRC-CD. Parmi celles-ci, 34 souches n'ont pas été confirmées (autre espèce ou culture impossible). Certains laboratoires ayant dépassé le quota de cinq souches par semestre, seules les cinq premières sont entrées dans les calculs, ce qui a concerné au total 648 souches. Cela constitue une augmentation significative par rapport aux années précédentes (40% par rapport à 2011) comme indiqué dans le tableau 4. Le Tableau 5 explicite la répartition des laboratoires en fonction du nombre de souches (1 à 10) envoyées dans le cadre de la surveillance annuelle.

<b>ECHANTILLONS</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>
<b>N souches reçues et typables dans le cadre de la surveillance</b>	389	505	462	648
<b>N souches 027</b>	72	62	36	32
<b>% souches 027</b>	<b>18,5</b>	<b>12,3</b>	<b>7,8</b>	<b>4,9%</b>
<b>N souches (UCL 16)</b>	44	51	56	67
<b>% souches 014 (UCL 16)</b>	<b>11,3</b>	<b>10,1</b>	<b>12,1</b>	<b>10,3%</b>
<b>N Souches 078 (UCL 3)</b>	13	33	35	48
<b>% souches 078 (UCL 3)</b>	<b>3,3</b>	<b>6,5</b>	<b>7,6</b>	<b>7,4%</b>

Tableau 4. Nombres de souches incluses dans le programme de surveillance et statistique des principaux ribotypes.

nbr de souche envoyées en 2012	Nbr de labo
1	9
2	5
3	12
4	11
5	26
6	6
7	4
8	8
9	9
10	21
<b>Total</b>	<b>111</b>

Tableau 5. Comparaison du nombre de souches incluses dans le programme de surveillance et statistique des principaux ribotypes.

Au total 135 ribotypes différents ont été observés parmi les 648 souches incluses dans la surveillance 2012. Le Tableau 6 classe les principaux ribotypes en fonction de leur fréquence et compare les quatre dernières années. Le ribotype BR027 poursuit en 2012 une diminution de sa fréquence aussi bien en nombre de souches (32) qu'en nombre d'hôpitaux touchés (19). Le ribotype BR014 reste, comme en 2011, le ribotype le plus fréquemment isolé. Il augmente en nombre en 2012 mais pas en pourcentage. Les ribotypes BR020 et BR078 par contre poursuivent leur croissance.

Les Figures 2 et 3 présentent en graphiques les évolutions des principaux ribotypes en nombre et en pourcentage.

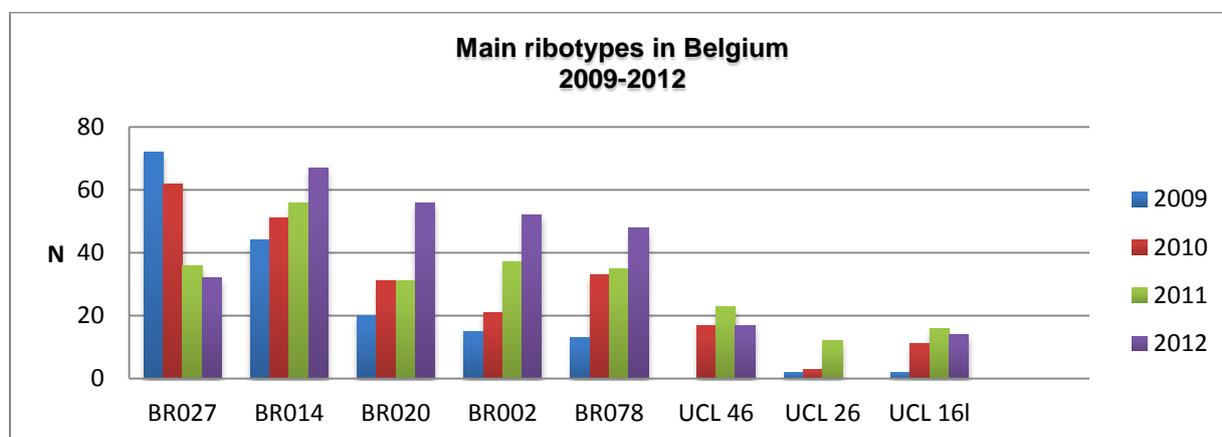


Figure 2. Evolution du nombre de souches appartenant aux principaux ribotypes entre 2009 et 2012.

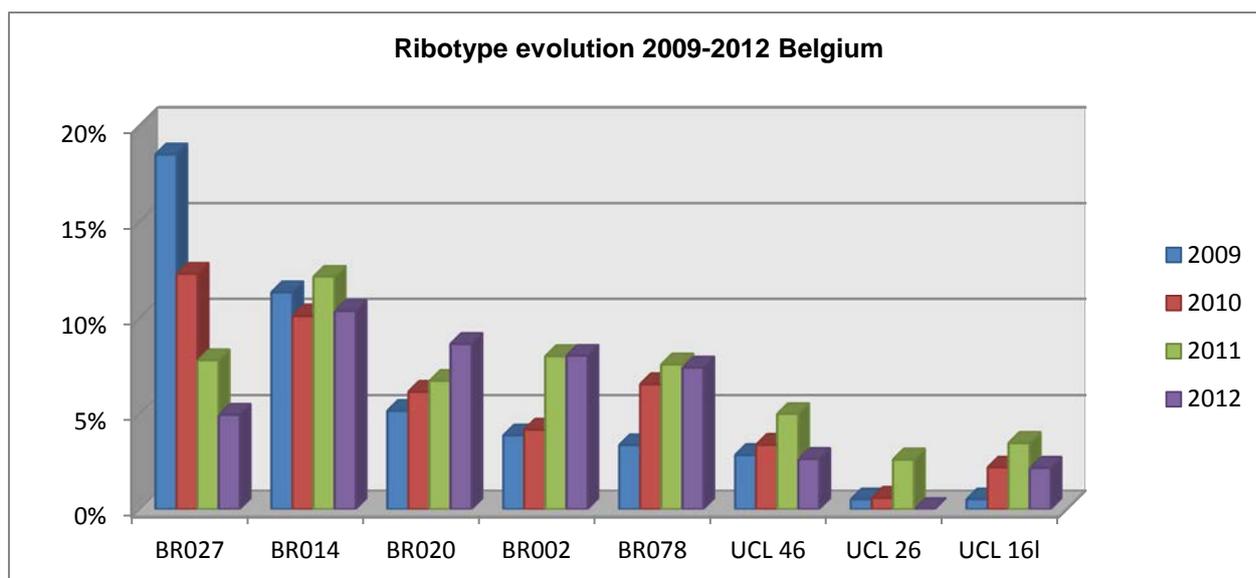


Figure 3. Evolution de la fréquence des principaux ribotypes (en pourcentage de l'ensemble des souches typées) entre 2009 et 2012.

2009			2010			2011			2012		
N=389			N=505			N=462			N=638		
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%

Tableau 6. Evolution de 2010 à 2012 des principaux ribotypes identifiés.

Durant l'année 2012, une augmentation sensible du nombre d'hôpitaux participant au programme de surveillance ainsi que du nombre de souches reçues au NRC-CD a été constatée.

Le ribotype 027 poursuit une lente diminution d'incidence alors que d'autres ribotypes comme les BR014, BR020, BR002 et le BR078 sont en augmentation sensible.