



Information



Formation



Recherche



Coopération
Internationale

CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* AU QUÉBEC EN 2005

IMPACT SUR L'INCIDENCE ET LA FRÉQUENCE DES COMPLICATIONS DES DIARRHÉES ASSOCIÉES AU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC

CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* AU QUÉBEC EN 2005

IMPACT SUR L'INCIDENCE ET LA FRÉQUENCE DES COMPLICATIONS
DES DIARRHÉES ASSOCIÉES AU *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

DIRECTION RISQUES BIOLOGIQUES, ENVIRONNEMENTAUX ET OCCUPATIONNELS
LABORATOIRE DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC

DÉCEMBRE 2006

AUTEURS

Bruno Hubert, Direction Risques biologiques, environnementaux et occupationnels
Institut national de santé publique du Québec

Vivian Loo

Hôpital général de Montréal, Centre universitaire de santé McGill

Anne-Marie Bourgault, Laboratoire de santé publique du Québec,

Hôpital Saint-Luc, Centre hospitalier de l'Université de Montréal

Institut national de santé publique du Québec

Élise Fortin, Direction Risques biologiques, environnementaux et occupationnels

Institut national de santé publique du Québec

André Dascal

Hôpital général juif

Marc Dionne, Direction Risques biologiques, environnementaux et occupationnels

Institut national de santé publique du Québec

Manon Lorange, Laboratoire de santé publique du Québec

Institut national de santé publique du Québec

Louise Poirier

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

REMERCIEMENTS

Isabelle Rocher, Laboratoire de santé publique du Québec,

Direction Risques biologiques, environnementaux et occupationnels

Institut national de santé publique du Québec

Rodica Gilca, Direction Risques biologiques, environnementaux et occupationnels

Institut national de santé publique du Québec

Susan Fenn

Hôpital général de Montréal, Centre universitaire de santé McGill

Milena Crosato

Hôpital général juif

Yury Monczak

Hôpital général juif

Au ministère de la Santé et des Services sociaux qui a rendu cette étude possible grâce au budget confié à l'Institut national de santé publique du Québec pour le dossier des infections nosocomiales.

François Lamothe (Hôpital Maisonneuve-Rosemont), Claire Béliveau (Hôpital Saint-Luc), Marie Gourdeau (Comité sur les infections nosocomiales du Québec), Jean Joly (Laboratoire de santé publique du Québec) et à l'ensemble des laboratoires et des équipes de prévention des infections qui ont contribué à cette étude.

Ce rapport a fait l'objet d'une publication : Hubert B, Loo VG, Bourgault AM, Poirier L, Fortin E, Dascal A, Dionne M, Lorange M.A *Portrait of the geographic dissemination of the Clostridium difficile NAP1 strain and the epidemiology of Clostridium difficile-associated disease in Québec*. Clin Infect Dis 2007;44.

Mise à jour de cette publication : avril 2007

Ce document est disponible intégralement en format électronique (PDF) sur le site Web de l'Institut national de santé publique du Québec au : <http://www.inspq.qc.ca>.

Les reproductions à des fins d'étude privée ou de recherche sont autorisées en vertu de l'article 29 de la Loi sur le droit d'auteur. Toute autre utilisation doit faire l'objet d'une autorisation du gouvernement du Québec qui détient les droits exclusifs de propriété intellectuelle sur ce document. Cette autorisation peut être obtenue en formulant une demande au guichet central du Service de la gestion des droits d'auteur des Publications du Québec à l'aide d'un formulaire en ligne accessible à l'adresse suivante : <http://www.droitauteur.gouv.qc.ca/autorisation.php>, ou en écrivant un courriel à : droit.auteur@cspq.gouv.qc.ca.

Les données contenues dans le document peuvent être citées, à condition d'en mentionner la source.

CONCEPTION GRAPHIQUE

MARIE PIER ROY

DÉPÔT LÉGAL – 3^E TRIMESTRE 2006

BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES NATIONALES DU QUÉBEC

BIBLIOTHÈQUE ET ARCHIVES CANADA

ISBN-13 : 978-2-550-47817-1 (VERSION IMPRIMÉE)

ISBN-10 : 2-550-47817-7 (VERSION IMPRIMÉE)

ISBN-13 : 978-2-550-47818-8 (PDF)

ISBN-10 : 2-550-47818-5 (PDF)

©Gouvernement du Québec (2006)

RÉSUMÉ

Contexte

L'augmentation des diarrhées associées au *Clostridium difficile* (DACD) observée dans plusieurs centres hospitaliers (CH) de Montréal et de ses régions environnantes a été associée à la prédominance d'un génotype nommé NAP1. Ce génotype possède une toxine additionnelle appelée « toxine binaire » (codée par les gènes *cdtA* et *cdtB*) et une délétion partielle du gène *tcdC* qui assurerait une régulation négative de la production des toxines A et B. NAP1 est également résistant à la clarithromycine et aux fluoroquinolones. En 2005, la surveillance provinciale des DACD au Québec a montré une hétérogénéité géographique des taux d'incidence et des taux de létalité des DACD. Afin d'interpréter ces résultats, nous avons étudié la répartition des différents génotypes de *C. difficile* dans les CH québécois, l'impact sur l'incidence des DACD ainsi que le risque de forme sévère lié aux caractéristiques des souches responsables d'infection.

Méthodes

L'étude a porté sur 478 souches de *C. difficile* d'acquisition nosocomiale isolées au début de l'année 2005 dans les CH québécois. Les souches de chaque patient ont fait l'objet d'un génotypage par électrophorèse en champ pulsé, d'une analyse du profil de sensibilité aux antibiotiques et de l'étude des gènes *tcdC*, *cdtA* et *cdtB*. Des informations individuelles ont été recueillies sur l'âge des patients et la survenue de complications.

Résultats

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé réalisée sur 478 souches de *C. difficile* a permis d'identifier 61 profils électrophorétiques. Les génotypes A (57 %), B (10 %) et B1 (8 %) étaient prédominants. Au total, 64 % des souches, majoritairement du génotype A, ont à la fois une délétion partielle de *tcdC* et des gènes de toxine binaire.

Le profil électrophorétique A est identique à celui de NAP1. Il présente 67 % de similarité avec 15 autres génotypes parmi lesquels 11 possèdent également des gènes de toxine binaire et une délétion partielle de *tcdC*, mais avec des profils variés de sensibilité aux antibiotiques. Le génotype A est résistant à la clarithromycine et aux fluoroquinolones et sensible à la clindamycine.

Les génotypes B et B1 ne possèdent ni gènes de toxine binaire, ni délétion partielle de *tcdC*. Ils sont résistants aux macrolides, aux fluoroquinolones et à la clindamycine. Ils sont identiques à NAP2, génotype antérieurement responsable d'éclosions en Amérique du Nord et au Royaume-Uni.

Le génotype A prédomine dans les régions voisines de Montréal et les génotypes B et B1 dans les régions de Québec et de Chaudière-Appalaches. Les taux d'incidence de DACD sont respectivement 2 fois et 1,3 fois plus élevés dans les CH ayant une prédominance clonale du génotype A et des génotypes B-B1 que dans les CH sans situation clonale.

Les formes sévères (décès directement ou indirectement lié à la DACD ou colectomie ou transfert en USI en raison de la DACD) sont 2,4 fois plus fréquentes chez les personnes âgées de 75 ans et plus et 2,1 fois plus fréquentes en présence d'une délétion de *tcdC* et de gènes de toxine binaire ($p = 0,055$).

Conclusion

Cette étude permet de mesurer l'impact majeur de la diffusion de la souche NAP1 sur l'incidence et la sévérité des DACD au Québec en 2005.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES FIGURES.....	VII
1 INTRODUCTION	1
2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	3
3 MÉTHODES	5
3.1 Prélèvements.....	5
3.2 Culture, épreuve de sensibilité, géotypie et étude des gènes <i>tcdC</i> , <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	5
3.3 Données cliniques	6
3.4 Méthodes d'analyses statistiques.....	7
4 RÉSULTATS	9
4.1 Participation – nombre de souches et de questionnaires.....	9
4.2 Analyse des souches.....	10
4.2.1 Géotypage.....	10
4.2.2 Étude de la délétion partielle de <i>tcdC</i> et des gènes de toxine binaire.....	13
4.2.3 Profils de sensibilité aux antibiotiques	13
4.2.4 Résumé des caractéristiques des souches.....	16
4.3 Incidence et géotypes.....	20
4.3.1 Répartition des géotypes par région (cas d'origine nosocomiale).....	20
4.3.2 Situations clonales dans les CH.....	22
4.3.3 Impact des situations clonales sur l'incidence des DACD.....	23
4.4 Répartition des géotypes selon l'âge des cas	26
4.5 Complications selon les caractéristiques des souches de <i>C. difficile</i>	26
4.5.1 Létalité à 30 jours	27
4.5.2 Formes sévères	28
5 DISCUSSION.....	29
5.1 Géotypes	29
5.2 Sévérité des DACD	30
5.3 Sensibilité aux antibiotiques	31
5.4 Limites de l'étude.....	32
6 CONCLUSION.....	33
7 RÉFÉRENCES	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Nombre de CH participants selon la taille du CH et le percentile d'incidence de DACD.....	9
Tableau 2 :	Répartition des cas de DACD selon l'origine de l'acquisition	9
Tableau 3 :	Représentation (N) des 61 génotypes parmi les 477 souches génotypables	11
Tableau 4 :	Fréquence des gènes de toxine binaire et de la délétion de <i>tcdC</i>	13
Tableau 5 :	Moyenne géométrique, médiane (CMI ₅₀) et 90 ^e percentile (CMI ₉₀) des CMI (en mg/L) pour chaque antibiotique testé selon les génotypes de <i>C. difficile</i>	14
Tableau 6 :	Répartition régionale des génotypes et des CH selon leur situation clonale	21
Tableau 7 :	Incidence des DACD nosocomiales /10 000 personnes-jours (janvier à mars 2005) et rapport de taux bruts et ajustés (régression de Poisson) selon les caractéristiques des CH	24
Tableau 8 :	Taux brut de létalité à 30 jours selon l'âge, le génotype, la présence ou non d'une délétion du gène <i>tcdC</i> et du gène de toxine binaire.....	27
Tableau 9 :	Taux de létalité lié directement ou indirectement à la DACD selon l'âge et la présence d'une délétion de <i>tcdC</i> et de gènes de toxine binaire	28
Tableau 10 :	Risque brut et ajusté de décès lié directement ou indirectement à la DACD selon l'âge et la présence d'une délétion de <i>tcdC</i> et de gènes de toxine binaire	28
Tableau 11 :	Fréquence des formes sévères selon le génotype, l'âge et la présence d'une délétion de <i>tcdC</i> et de gènes de toxine binaire	28

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Récapitulatif des questionnaires et des prélèvements	10
Figure 2 :	Dendrogramme des 61 différents géotypes retrouvés au cours de l'étude	12
Figure 3 :	Sensibilité au métronidazole des souches de <i>C. difficile</i> selon le géotype.....	15
Figure 4 :	Distribution des CMI de l'ensemble des 477 souches de <i>C. difficile</i> pour 6 antibiotiques testés	16
Figure 5 :	Compilation des caractéristiques des souches : géotype, gènes de toxine et résistance à la clindamycine, clarithromycine et gatifloxacine.....	19
Figure 6 :	Répartition géographique des 40 CH avec l'indication d'une situation clonale	22
Figure 7 :	Répartition des géotypes dans les 40 CH classés par taux d'incidence de DACD croissant (janvier-avril 2005)	25
Figure 8 :	Répartition relative des géotypes dans chaque tranche d'âge des cas.....	26

1 INTRODUCTION

Une augmentation des diarrhées associées au *Clostridium difficile* (DACD) a été observée dans plusieurs centres hospitaliers (CH) des régions de Montréal, Laval, Montérégie et l'Estrie depuis le début de l'année 2003. Cette augmentation était associée à une sévérité accrue de la maladie et à une fréquence plus importante des rechutes^{1, 2, 3}. L'hypothèse de la diffusion d'une souche plus virulente est étayée par la prédominance dans ces CH d'une souche clonale dénommée NAP1 (North American Pulsovar 1). Ce génotype présente une toxine additionnelle appelée « toxine binaire » (codée par les gènes *cdtA* et *cdtB*) et une délétion partielle du gène *tcdC* qui assure une régulation négative de la production des toxines A et B^{4, 5}. Ce génotype est également associé à une production de toxines A et B respectivement 16 à 23 fois plus élevée que des souches d'autres génotypes⁶.

Une surveillance provinciale des DACD, mise en place en août 2004, montrait une hétérogénéité géographique des taux d'incidence et des taux de létalité des DACD⁷. Afin d'interpréter ces résultats, il s'est avéré nécessaire de mieux connaître la répartition des différents génotypes de *C. difficile* dans les CH québécois ainsi que les facteurs de risque de complications liées aux caractéristiques de la souche responsable de l'infection.

La présente étude porte sur près de 500 cas de DACD d'origine nosocomiale survenus au début de l'année 2005 dans les CH québécois. Les souches de chaque patient ont fait l'objet d'un génotypage par électrophorèse en champ pulsé, d'une analyse du profil de sensibilité aux antibiotiques et de l'étude des gènes *tcdC*, *cdtA* et *cdtB*. Des informations individuelles ont été recueillies sur l'âge des patients et la survenue de complications.

2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

- Identifier la diversité génétique des souches de *C. difficile* isolées dans les CH québécois, et en préciser la répartition géographique;
- Mesurer l'impact de la prédominance d'un génotype sur l'incidence des DACD;
- Étudier les variations de la fréquence des complications selon l'âge et les caractéristiques des souches;
- Préciser les profils de sensibilité aux antibiotiques selon les génotypes.

3 MÉTHODES

3.1 PRÉLÈVEMENTS

L'INSPQ a demandé aux 88 centres hospitaliers participant à la surveillance d'envoyer une portion aliquote de selles provenant des 15 premiers malades présentant une DACD d'origine nosocomiale à compter du 6 février 2005 (début de la période 12).

Les modalités de conservation et d'envoi des prélèvements étaient les suivantes :

- Pour chaque cas suspect de DACD d'origine nosocomiale, un échantillon de selles devait être conservé à 4°C lors de la recherche de toxine de *C. difficile* à visée diagnostique.
- Après confirmation du diagnostic, cet échantillon était congelé à -20°C.
- Les prélèvements étaient ensuite adressés au LSPQ dans de la glace sèche sur une base hebdomadaire.
- Le LSPQ a réalisé une sélection des prélèvements à étudier (caractère nosocomial et nombre de souches par CH) et a ensuite distribué les échantillons de selles de chacun de ces centres, en quantité égale, aux laboratoires de microbiologie de l'Hôpital St-Luc du CHUM et de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont où ont été effectués l'isolement, l'identification et les épreuves de sensibilité aux antibiotiques des souches de *C. difficile*.

3.2 CULTURE, ÉPREUVE DE SENSIBILITÉ, GÉNOTYPIE ET ÉTUDE DES GÈNES TCDC, CDTA ET CDTB

- L'isolement des souches de *C. difficile* a été réalisé par la méthode du « choc à l'alcool » à partir des échantillons de selles conservés à -20°C⁸. Cette méthode a permis un taux de recouvrement d'environ 95 % à partir des spécimens soumis dans le cadre de cette étude. Les souches isolées ont été congelées à -70°C en attente des analyses de sensibilité et de biologie moléculaire.
- Les épreuves de sensibilité ont été réalisées par la méthode de dilution en gélose conformément aux recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) pour les bactéries anaérobies. Les antibiotiques suivants ont été testés : métronidazole, vancomycine, clindamycine, clarithromycine, ciprofloxacine, gatifloxacine, lévofloxacine, ceftriaxone, méropénèm, pipéracilline-tazobactam. Les concentrations finales s'échelonnaient de 0.06 à 128 mg/L. Toutes les solutions d'antibiotiques et les milieux gélifiés ont été préparés par le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital St-Luc. Par ailleurs, dans chacun des deux laboratoires ayant effectué les épreuves de sensibilité, la même technicienne a effectué l'ensemble des lectures permettant de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des isolats testés. Les souches *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 et *Eubacterium lentum* ATCC 43055 ont été utilisées comme contrôle de qualité.
- La génotypie a été réalisée au CUSM-Hôpital Général de Montréal. Les génotypes ont été caractérisés par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) en utilisant la méthode proposée par Fawley et Wilcox⁹.

La désignation des génotypes a été effectuée de la façon suivante : chaque lettre indique un profil distinct unique (de A à Z puis, après épuisement de l'alphabet, de AA à KK). Le chiffre accompagnant éventuellement une lettre indique la différence du nombre de bandes avec le profil de référence. Par exemple, le génotype A1 présente une différence d'une bande par rapport au génotype A; A1-1 présente également une différence d'une bande avec A mais cette bande est elle-même différente de celle de A1.

La relation entre les souches a été déterminée selon les critères de Tenover et al.¹⁰. Une différence d'une bande indique que la souche est non distincte du profil de référence. Une différence de 2 à 3 bandes indique une relation étroite et une différence de 4-6 bandes indique une relation possible avec le profil de référence.

Le coefficient de Dice a été utilisé pour mesurer la similarité entre chaque génotype (avec une tolérance de 1,25 % dans la comparaison des bandes) à l'aide du logiciel Molecular Analyst[®] (Bio-Rad). La matrice des coefficients de similitude a été utilisée pour construire un dendrogramme selon la méthode UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean).

- L'étude des gènes de la toxine binaire (*cdtA* et *cdtB*) et de la délétion partielle du gène *tcdC* a été réalisée à l'Hôpital Général Juif de Montréal. Les méthodes d'extraction de l'ADN et les PCR ont été déjà décrites⁴. Deux souches de référence ont été utilisées comme témoins : souche CIP 107932 de la collection de l'Institut Pasteur (présence de toxine binaire et délétion de 18 paires de base du gène *tcdC*) et souche ATCC 43255 (absence de toxine binaire et de délétion du gène *tcdC*). Pour des raisons de faisabilité, un nombre limité de souches de génotype A (8 souches), B (10 souches) et B1 (7 souches) a été analysé. Les résultats sont identiques pour toutes les souches testées à l'intérieur de chacun de ces génotypes. Nous avons donc considéré que ces résultats étaient applicables à l'ensemble des souches de chacun de ces trois génotypes. L'ensemble des autres souches a été étudié.

A l'issue des premières analyses, un contrôle de validité a été réalisé en comparant les résultats du génotypage et les profils de résistance aux antibiotiques. Pour un même génotype, les souches ayant une CMI à un antibiotique avec ≥ 2 concentrations de différence par rapport à la médiane ont été testées de nouveau selon la règle suivante : si une différence était constatée sur un seul antibiotique, seule la sensibilité à cet antibiotique a été vérifiée; si des différences étaient observées pour plusieurs antibiotiques, le profil électrophorétique (PFGE) a été vérifié de nouveau.

3.3 DONNÉES CLINIQUES

Les équipes chargées de la prévention des infections nosocomiales ont été sollicitées pour fournir pour chacun des cas les informations recueillies en routine dans le cadre de la surveillance provinciale des DACD. Ces informations portaient sur l'âge du patient, l'origine de l'acquisition de l'infection, la date de prélèvement et les complications survenues durant les 30 jours suivant le diagnostic de l'infection :

- Admission en soins intensifs pour DACD; colectomie pour DACD;

- Décès en précisant la date et le lien avec la DACD (cause principale, cause contributive, cause non reliée, selon les définitions indiquées dans le système de surveillance).

3.4 MÉTHODES D'ANALYSES STATISTIQUES

Répartition provinciale des génotypes. Pour l'analyse de la proportion du génotype, les différences de fractions de sondage selon les CH ont été prises en compte. Une pondération a été réalisée en rapportant, pour chacun des CH ayant envoyé des prélèvements, le nombre de souches testées au nombre de cas d'origine nosocomiale pendant les 4 périodes situées entre le 9 janvier 2005 et le 30 avril 2005 (périodes administratives 11 de 2004-2005 à 1 de 2005-2006).

Analyse des situations clonales par CH. Cette analyse n'a été réalisée que pour les 40 CH pour lesquels un génotypage a pu être effectué sur un minimum de 6 souches d'origine nosocomiale acquises dans le CH déclarant. Une « situation clonale » a été définie comme une situation où au moins 50 % des souches d'un CH appartenaient à un même génotype (A, B ou autre génotype).

Relation entre le taux d'incidence et les situations clonales. Nous avons utilisé comme mesure d'incidence le taux de DACD d'origine nosocomiale liée au CH pendant les 4 périodes comprises dans l'étude (du 9 janvier au 30 avril 2005).

Pour étudier les variations d'incidence des DACD selon les caractéristiques des CH, ceux-ci ont été stratifiés selon les caractéristiques suivantes (utilisées dans la surveillance) :

- La taille de l'établissement (en nombre de lits de soins physiques et de gériatrie en 2004);
- La proportion de personnes âgées ≥ 65 ans dans la clientèle hospitalisée au cours de l'année 2003-4;
- L'indicateur de situation clonale.

Des rapports de taux ajustés ont été estimés par une analyse multivariée (régression de Poisson) pour mesurer le rôle propre de chaque caractéristique des CH indépendamment des autres.

Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques

Les profils de sensibilité à chaque antibiotique ont été présentés par génotypes.

Les critères d'interprétation des CMI recommandés par le CLSI correspondent à une probabilité de succès ou d'échec thérapeutique dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée pour l'antibiotique considéré. Ces critères tiennent ainsi compte des concentrations humorales et tissulaires de l'antibiotique. Ils ne sont donc probablement pas adaptés aux antibiotiques étudiés en tant que facteurs de risque de colonisation digestive. Nous avons donc examiné pour chaque antibiotique la distribution des CMI de l'ensemble des souches et, pour les distributions bimodales, nous avons identifié les valeurs qui permettaient de séparer deux sous-populations distinctes.

Étude des complications dans les 30 jours suivant le diagnostic

L'ensemble des cas (qu'ils soient ou non d'origine nosocomiale) a été utilisé pour l'analyse. Les indicateurs de complications utilisés ont été les suivants :

- Taux de létalité selon la responsabilité de la DACD dans le décès à 30 jours;
- Critère de sévérité comportant au moins un des trois événements suivants : décès directement ou indirectement lié à la DACD, colectomie ou transfert en unité de soins intensifs (USI) en raison de la DACD.

Les facteurs de risque étudiés ont été la présence ou l'absence des gènes régulateurs de la production de toxine et l'âge du patient pour lequel nous avons utilisé un seuil à 75 ans, proche de la médiane de distribution. Les rapports de cotes ajustés ont été estimés par une régression logistique.

Nombre de sujets nécessaires pour l'étude : l'objectif était de montrer que le génotype A (ou mieux, que les souches présentant des gènes de toxine binaire et une délétion partielle du gène *tcdC*) entraînait une mortalité attribuable à l'infection plus importante que les autres souches. En émettant les hypothèses que le génotype A représentait 60 % des souches responsables d'infection dans les CH du Québec, que la mortalité associée au génotype A était de 8 % et que la mortalité associée aux autres souches était de 2 %, il a été jugé *a priori* nécessaire d'inclure dans l'étude 475 cas de DACD.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS (version 9.1, SAS Institute) et avec Epi Info (version 3.3.2, CDCP, Atlanta).

4 RÉSULTATS

4.1 PARTICIPATION – NOMBRE DE SOUCHES ET DE QUESTIONNAIRES

Parmi les 88 CH participant à la surveillance provinciale des DACD, 8 CH n'ont pas été contactés car ils ne possédaient pas de laboratoire; 22 autres CH n'ont envoyé aucun prélèvement. Les échantillons provenaient donc de 58 (66 %) des 88 CH. On observe une plus forte représentation des CH ayant une taille importante et des CH ayant les taux d'incidence les plus élevés (tableau 1). Ces CH représentent 84 % des hospitalisations et 92 % des cas de DACD.

Tableau 1 : Nombre de CH participants selon la taille du CH et le percentile d'incidence de DACD

	Nombre total de CH	CH participants	
		N	%
Taille du CH			
< 100 lits	27	11	41
100 - 249 lits	34	21	62
≥ 250 lits	27	26	96
Percentiles d'incidence			
< 25 ^e	22	8	36
25 – 49 ^e	22	14	64
50 – 74 ^e	22	16	73
≥ 75 ^e	22	20	91
Total	88	58	66

Un questionnaire clinique a été reçu pour 677 cas, mais les informations sur les complications n'étaient pas disponibles pour 6 dossiers. Les prélèvements provenaient majoritairement de cas survenus au cours de la période 12 (59 %); 97 % des cas sont survenus au cours des périodes 11/2004-5 à 1/2005-6.

Parmi les 677 questionnaires, 92 % correspondaient à des cas d'origine nosocomiale liée au CH (tableau 2).

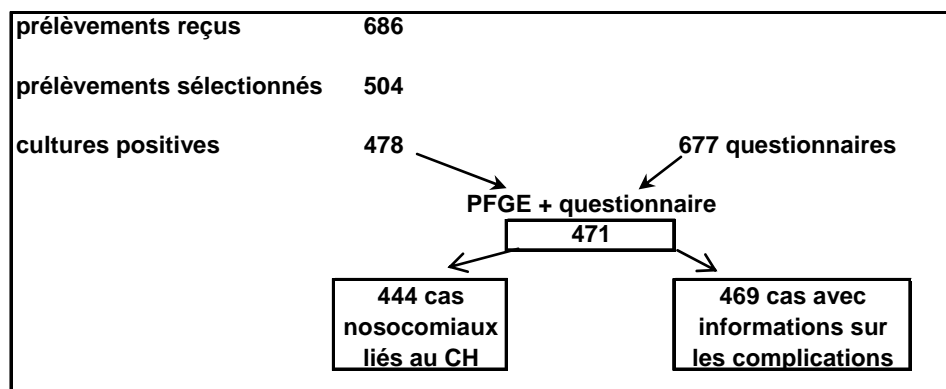
Tableau 2 : Répartition des cas de DACD selon l'origine de l'acquisition

Catégorie	Origine de l'acquisition	N	%
I	Nosocomiale liée au CH déclarant	622	92
II a	Nosocomiale liée à une autre installation	16	2
II b	Nosocomiale liée à des soins ambulatoires	8	1
III, IIc, ou II d	Communautaire ou inconnue	31	5
Total général		677	100

Parmi les 686 prélèvements envoyés par les laboratoires au LSPQ, ce dernier en a acheminé 504 aux laboratoires effectuant la culture; 478 (96 %) prélèvements ont donné lieu à un isolement de *C. difficile* (figure 1).

Le nombre d'échantillons analysés par CH variait de 1 à 18. Parmi les 58 CH, 35 ont eu au moins 9 prélèvements analysés et 41 CH au moins 6 prélèvements (40 si on ne considère que les cas d'origine nosocomiale liée au CH).

Figure 1 : Récapitulatif des questionnaires et des prélèvements



4.2 ANALYSE DES SOUCHES

4.2.1 Génotypage

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé réalisée sur 478 souches de *C. difficile* a permis d'identifier 61 profils électrophorétiques (tableau 3). Une souche était non génotypable.

Trois souches ne présentaient que trois bandes d'ADN; cependant, elles appartenait au même hôpital, présentaient un profil identique de sensibilité aux antibiotiques et les mêmes caractéristiques de gènes *cdtA*, *cdtB* et *tcdC*. Elles ont donc été considérées comme représentant un génotype unique (KK).

Parmi les 478 souches analysées, les génotypes A (57 %), B (10 %) et B1 (8 %) étaient prédominants.

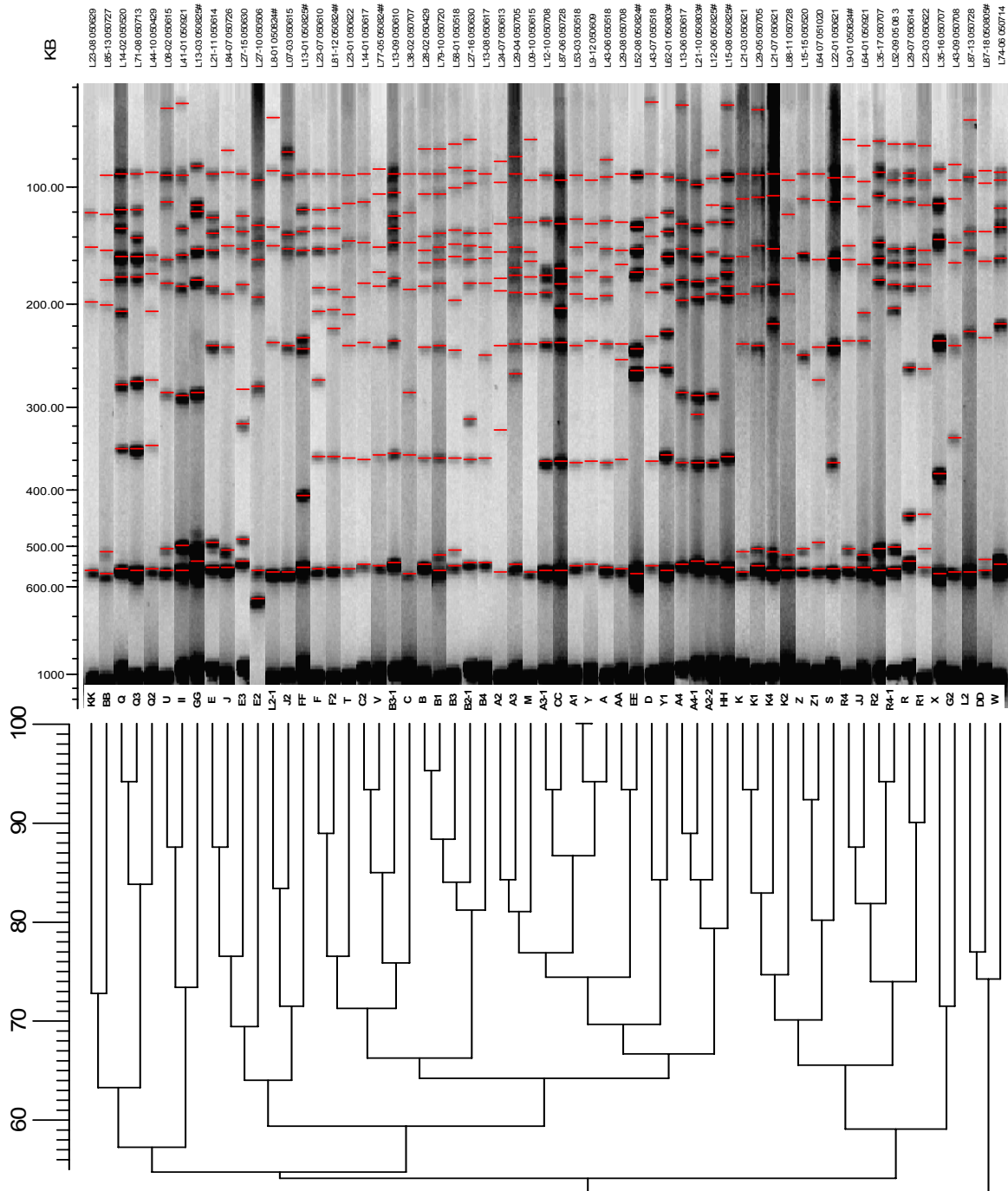
Trente cinq génotypes sont représentés par une souche unique et 26 génotypes par un nombre de souches variant de 2 à 274 (tableau 3). En dehors des trois génotypes dominants (A, B et B1), ceux identifiés plusieurs fois dans un même CH sont les suivants : W (6 souches dans le même CH), R et KK (3 souches dans le même CH), J2 (2 souches respectivement dans chacun de 2 CH), puis A1, M, K et R1 (chacun de ces génotypes ayant deux souches dans un même CH).

Tableau 3 : Représentation (N) des 61 génotypes parmi les 477 souches génotypables

Génotype	N	Génotype	N	Génotype	N	Génotype	N
A	274	D	1	M	3	Y	4
A1	7	E	3	Q	3	Y1	1
A2	1	E2	2	Q2	1	Z	1
A2-2	1	E3	1	Q3	2	Z1	1
A3	3	F	1	R	3	AA	1
A3-1	3	F2	1	R1	4	BB	1
A4	3	G2	1	R2	1	CC	1
A4-1	1	J	1	R4	1	DD	1
B	49	J2	6	R4-1	1	EE	1
B1	37	K	4	S	1	FF	1
B2-1	1	K1	2	T	1	GG	1
B3	1	K2	1	U	4	HH	1
B3-1	1	K4	2	V	4	II	1
B4	2	L2	1	W	6	JJ	1
C	5	L2-1	1	X	1	KK	3
C2	4						

Les 61 génotypes ont un coefficient de similitude de 53 % entre eux. Il existe une bonne correspondance entre le classement visuel des profils électrophorétiques et un coefficient de similitude > 90 % (figure 2). Seul, le génotype Y qui est considéré comme identique à A1 dans le dendrogramme est en fait visuellement différent.

Figure 2 : Dendrogramme des 61 différents génotypes retrouvés au cours de l'étude



4.2.2 Étude de la délétion partielle de *tcdC* et des gènes de toxine binaire

Les gènes *cdtA* et *cdtB* sont retrouvés simultanément chez 309 (65 %) souches. Une délétion partielle du gène *tcdC* est observée chez 311 (65 %) souches. La majorité de ces souches (304/311) ont une délétion de 18 paires de base (pb) avec une PCR identique à la souche de référence CIP107932 et 7 souches (4 génotypes) ont une délétion de taille plus importante.

Au total, 64 % des souches ont à la fois une délétion partielle de *tcdC* et des gènes de toxine binaire; 34 % n'ont aucune de ces caractéristiques et 2,5 % une seule de ces caractéristiques (tableau 4).

Tableau 4 : Fréquence des gènes de toxine binaire et de la délétion de *tcdC*

Présence de <i>cdtA</i> et <i>cdtB</i>	Délétion du gène <i>tcdC</i>	Nombre de génotypes	Nombre de souches	%
+	+	15	304	63,6
-	+	2	7	1,5
+	-	2	5	1,0
-	-	42	162	33,9
	Total	61	478	100,0

4.2.3 Profils de sensibilité aux antibiotiques

Les génotypes B et B1 ont été regroupés (B-B1) en raison de la similitude à 95 % de leur profil électrophorétique (PFGE) et de la similitude de leur profil de sensibilité aux antibiotiques. Dans le cas des génotypes A et A1, seules 2 des 7 souches de génotype A1 présentent des profils de sensibilité aux antibiotiques identiques au génotype A. C'est pourquoi nous avons choisi de ne pas les regrouper.

Parmi les génotypes autres que A et B-B1, les profils de sensibilité sont hétérogènes : 31 sur 117 souches ont une CMI > 128 mg/L à au moins un antibiotique, ce qui explique que les CMI₉₀ sont élevées de façon disproportionnée par rapport aux CMI₅₀ (tableau 5).

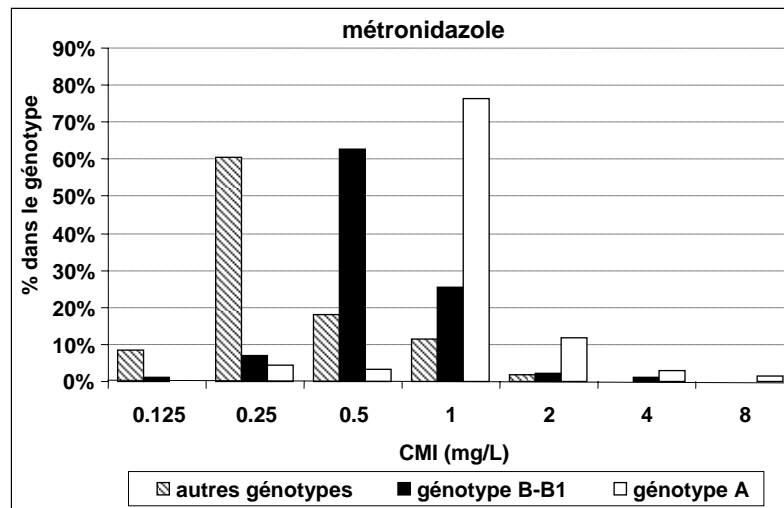
Tableau 5 : Moyenne géométrique, médiane (CMI₅₀) et 90^e percentile (CMI₉₀) des CMI (en mg/L) pour chaque antibiotique testé selon les géotypes de *C. difficile*

Antibiotique	Géotypes								
	A n = 274			B-B1 n = 86			Autres n = 117		
	moy	CMI ₅₀	CMI ₉₀	moy	CMI ₅₀	CMI ₉₀	moy	CMI ₅₀	CMI ₉₀
Métronidazole	1	1	2	0.6	0.5	1	0.3	0.25	1
Vancomycine	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Méropénèm	3	4	4	1	1	2	1	1	4
Pipéracilline-tazobactam	10	8	16	6	8	8	8	8	16
Ceftriaxone	62	64	64	126	128	>128	32	32	64
Clindamycine	4	4	8	199	>128	>128	8	4	>128
Clarithromycine	148	128	>128	91	128	>128	2	1	128
Ciprofloxacine	255	>128	>128	146	>128	>128	26	32	>128
Lévofloxacine	254	>128	>128	198	>128	>128	14	8	>128
Gatifloxacine	91	128	>128	52	64	>128	4	2	64

* moy = moyenne géométrique (pour le calcul, les CMI > 128 mg/L ont été considérées comme égales à 256 mg/L).

- Pour les antibiotiques suivants : **vancomycine, méropénèm et pipéracilline-tazobactam**, les CMI sont basses et ne diffèrent pas entre les géotypes.
- Par opposition aux géotypes A et B-B1, les autres géotypes ont des CMI₅₀ plus basses pour la **ceftriaxone, la clarithromycine et les 3 fluoroquinolones** testées.
- Les géotypes B et B1 diffèrent du A par une CMI₅₀ très élevée à la **clindamycine** (> 128 mg/L vs 4mg/L). Parmi les autres géotypes, 20 souches (17 %) ont une CMI > 128 mg/L.
- Les CMI moyennes pour les **3 fluoroquinolones** testées sont plus élevées pour le géotype A que pour les géotypes B et B1 (comparaison de moyennes géométriques, p < 0.001).
- Les géotypes autres que A, B et B1 ont des CMI médianes différentes pour chaque **fluoroquinolone**, passant de 2 mg/L pour la gatifloxacine à 32 mg/L pour la ciprofloxacine.
- Pour la **ceftriaxone**, les CMI moyennes sont significativement plus élevées pour les géotypes B et B1 que pour le géotype A.
- Pour le **métronidazole**, les CMI sont basses mais une différence est observée entre les géotypes A (CMI₅₀ = 1 mg/L), B et B1 (CMI₅₀ = 0.5 mg/L) et les autres géotypes (CMI₅₀ = 0.25 mg/L) (comparaison des moyennes géométriques, p < 0.001) (figure 3).

Figure 3 : Sensibilité au métronidazole des souches de *C. difficile* selon le génotype

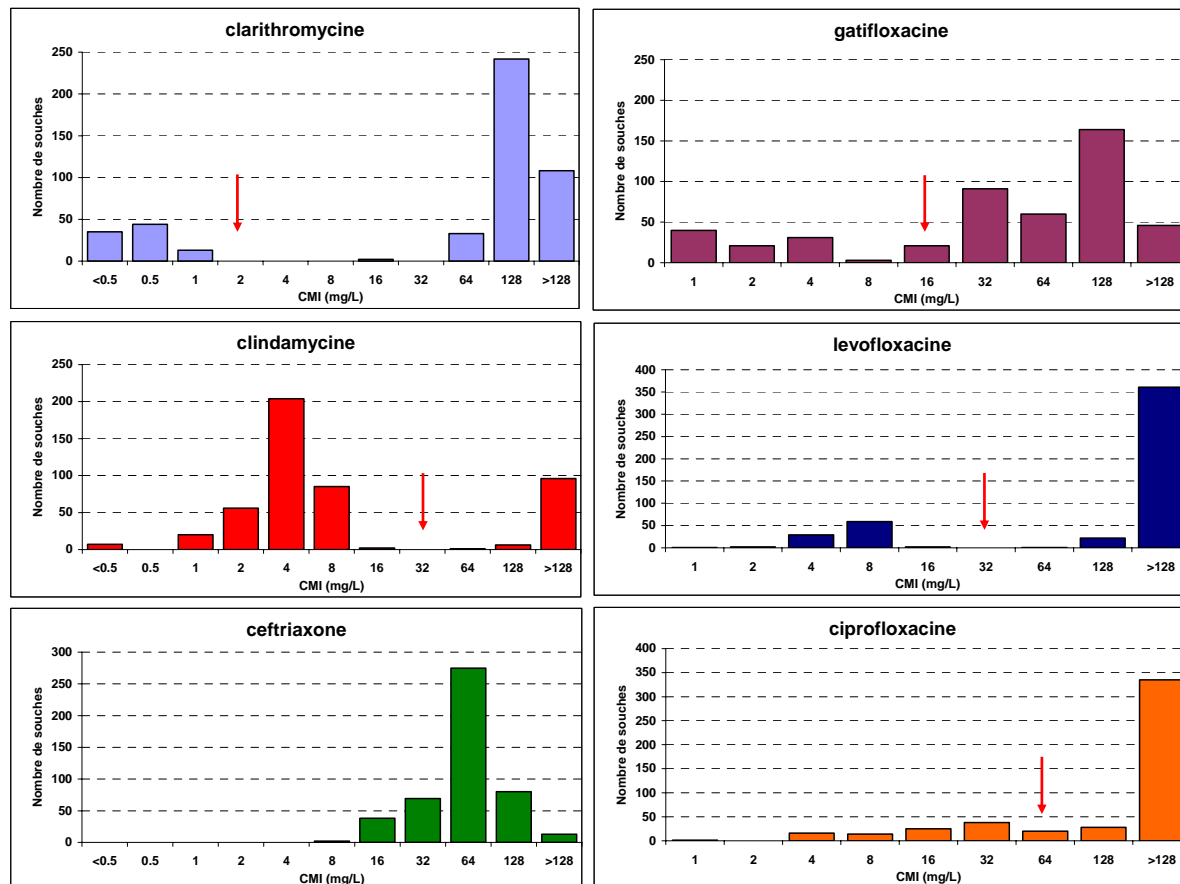


L'examen de la distribution des CMI sur l'ensemble des souches (figure 4) montre deux sous-populations bien distinctes pour la clindamycine (22 % des souches avec une CMI ≥ 32 mg/L) et pour la clarithromycine (81 % des souches avec une CMI ≥ 2 mg/L).

Les distributions des CMI aux fluoroquinolones sont également bimodales, avec une séparation plus marquée pour la lévofloxacine. Si on fixe un seuil de résistance de CMI ≥ 16 mg/L pour la gatifloxacine, ≥ 32 mg/L pour la lévofloxacine et ≥ 64 mg/L pour la ciprofloxacine, 79 % des souches sont résistantes à l'ensemble de ces trois fluoroquinolones et 19 % sont sensibles; seulement 1 % des souches ont des classements de résistance discordants entre ces trois molécules (figure 4).

Les valeurs des CMI pour la ceftriaxone suivent une distribution normale, ce qui ne permet pas de définir un seuil séparant deux sous-populations distinctes.

Figure 4 : Distribution des CMI de l'ensemble des 477 souches de *C. difficile* pour 6 antibiotiques testés



Symbole ↓ : valeur-seuil de CMI séparant deux sous-populations distinctes.

4.2.4 Résumé des caractéristiques des souches

La figure 5 présente les génotypes classés selon leur pourcentage de similitude, et décrit pour chacun d'entre eux la présence ou l'absence d'une toxine binaire et d'une délétion partielle de *tcdC* ainsi que le profil de sensibilité à la clindamycine, la clarithromycine et la gatifloxacine selon les seuils définis précédemment.

En se basant 1) sur la présence des gènes *cdtA*, *cdtB* et la délétion de *tcdC* et 2) sur le profil de sensibilité à la clindamycine, nous avons identifié quatre regroupements particuliers de génotypes, nommés agrégats I à IV. La majorité des génotypes (303/304) possédant à la fois des gènes de toxine binaire et une délétion de *tcdC* se retrouvent dans deux agrégats (I et II); d'autre part, 91 % des souches résistantes à la clindamycine (≥ 32 mg/L) se répartissent entre deux autres agrégats (III et IV).

Les principales caractéristiques des 4 agrégats sont les suivantes :

Agrégat I

- Il contient 64 % de l'ensemble des souches et regroupe 16 profils ayant un pourcentage de similitude de 67 % entre eux.
- Le génotype A représente à lui seul 90 % des souches de cet agrégat; il est résistant à la clarithromycine et à la gatifloxacine et sensible à la clindamycine.
- Le profil électrophorétique A1 présente une similitude de 94 % avec le profil A mais en diffère par la sensibilité de 5 de ses 7 souches à la clarithromycine et à la gatifloxacine.
- Tous les génotypes sauf 4 (Y, Y1, EE et HH) possèdent à la fois un gène de toxine binaire et une délétion partielle de *tcdC*.
- Il existe une variabilité des profils de sensibilité aux antibiotiques entre les génotypes. Le profil de sensibilité particulier au génotype A est retrouvé chez les génotypes A2 et A3, 2 des 7 souches du génotype A1 et 2 des 3 souches de A4.
- Enfin le génotype Y, dont le profil électrophorétique est indissociable de A1, est atypique avec une absence de délétion de *tcdC* et une sensibilité à la clindamycine, la clarithromycine et la gatifloxacine.

Agrégat II

- Il est unique en raison de la présence de gènes de toxine binaire et d'une délétion de *tcdC* d'une taille supérieure à 18 pb.
- Il ne regroupe que 4 souches appartenant à 2 génotypes montrant 73 % de similitude entre eux. Ces souches sont sensibles aux quinolones.

Agrégat III

- Il contient 19 % de l'ensemble des souches et regroupe 5 profils ayant un pourcentage de similitude de 81 % entre eux.
- Les profils B et B1 représentent 96 % des souches de cet agrégat.
- À l'exception du génotype B2-1, on observe, pour tous les autres génotypes, l'absence des gènes de toxine binaire, l'absence de délétion du gène *tcdC* et une résistance à la clindamycine, la clarithromycine et la gatifloxacine.
- Les génotypes B et B1 ont une similitude de 95 % et un même profil de sensibilité aux antibiotiques; ils ont été regroupés pour la suite de l'étude.

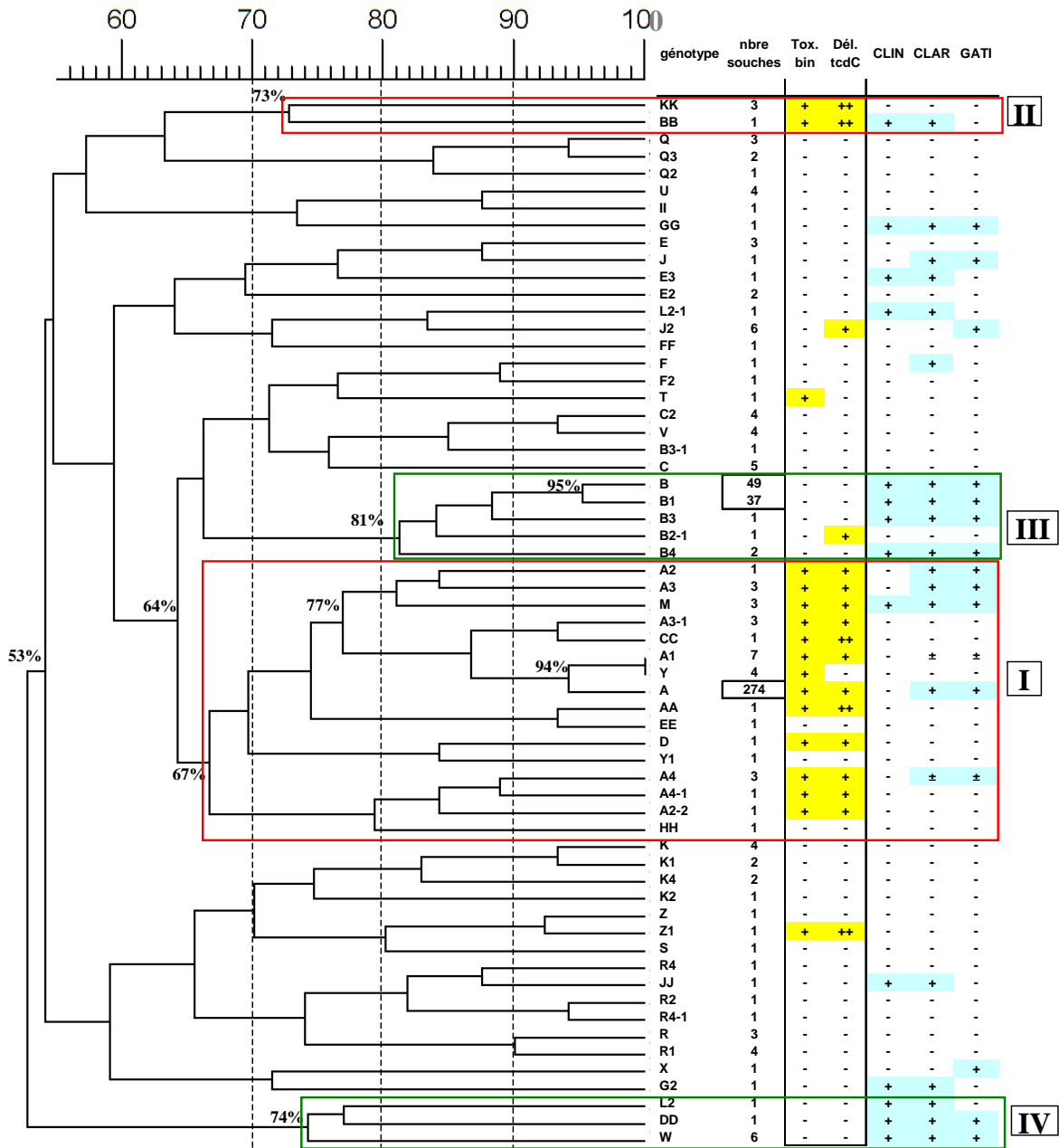
Agrégat IV

- Il est unique en raison des caractéristiques de résistance à la clindamycine et à la clarithromycine.
- Il ne regroupe que 8 souches appartenant à 3 génotypes montrant 74 % de similitude entre eux.
- Aucun de ces génotypes ne possède de gènes de toxine binaire ni de délétion partielle de *tcdC*.

- Malgré des caractéristiques identiques à l'agrégat III, son profil électrophorétique est très différent (53 % de similitude).

En dehors de ces 4 agrégats, on retrouve 68 souches (14 %) représentant 34 génotypes. Elles sont caractérisées par peu de résistance aux antibiotiques et seulement 3 génotypes présentent des gènes de toxine binaire et/ou une délétion de *tcdC*.

Figure 5 : Compilation des caractéristiques des souches : génotype, gènes de toxine et résistance à la clindamycine, clarithromycine et gatifloxacine



Délétion de *tcdC* - : absence de délétion, + : délétion de 18 pb, ++ : délétion > 18 pb

Sensibilité aux antibiotiques: + : résistante ± : hétérogénéité des profils de sensibilité à l'intérieur d'un génotype : clindamycine (R ≥ 32 mg/L), clarithromycine (R ≥ 2 mg/L), gatifloxacine (R ≥ 16 mg/L)

4.3 INCIDENCE ET GÉNOTYPES

4.3.1 Répartition des génotypes par région (cas d'origine nosocomiale)

Au niveau provincial, la proportion brute des cas d'origine nosocomiale appartenant au génotype A est de 57 % des souches testées; cette proportion est de 64 % après prise en compte d'une pondération (en fonction du nombre de souches testées par rapport au nombre de cas dans chaque CH).

Trois régions (08, 09, 11) ont un nombre de souches trop faible pour être interprétable (tableau 6). Parmi les 11 autres régions, 3 régions présentent une prédominance de génotype B-B1 (Capitale-Nationale, Chaudière-Appalaches, et dans une moindre mesure l'Outaouais). L'Estrie a une prédominance d'autres génotypes. Le génotype A prédomine dans les autres régions.

Tableau 6 : Répartition régionale des génotypes et des CH selon leur situation clonale

RSS	Nb de souches	Répartition des génotypes (%)			Nombre de CH selon leur situation clonale*			
		A	B-B1	Autres génotypes	A	B-B1	W	Non clonale
Saguenay-Lac-Saint-Jean (02)	14	50	0	50	1	0	0	0
Capitale-Nationale (03)	62	3	76	21	0	5	0	1
Mauricie et Centre-du-Québec (04)	30	67	13	20	3	0	0	0
Estrie (05)	20	40	10	50	1	0	0	1
Montréal (06)	147	78	1	20	12	0	0	1
Outaouais (07)	21	29	38	33	0	1	0	1
Abitbi-Témiscamingue (08)	6	83	0	17	-	-	-	-
Côte-Nord (09)	1	-	-	-	-	-	-	-
Gaspésie-Îles-de-la-Madeleine (11)	3	0	33	67	-	-	-	-
Chaudière-Appalaches (12)	18	0	67	33	0	2	0	0
Laval (13)	10	90	10	0	1	0	0	0
Lanaudière(14)	19	58	0	42	1	0	1	0
Laurentides (15)	32	72	19	9	2	0	0	0
Montérégie (16)	61	75	3	21	4	0	0	2
Total	444	57	19	24	25	8	1	6

* Situation clonale : un génotype représente ≥ 50 % des souches d'un même CH.

4.3.2 Situations clonales dans les CH

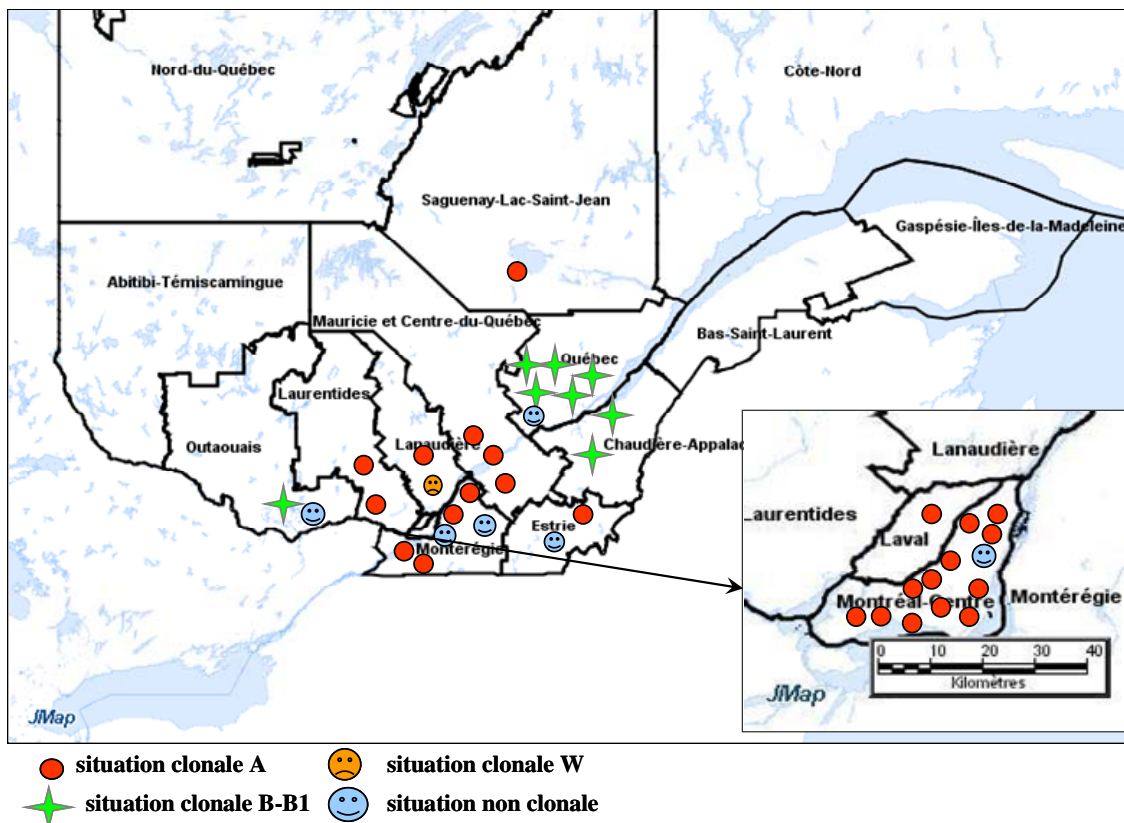
Parmi les 40 CH pour lesquels au moins 6 souches d'origine nosocomiale acquise dans leur propre établissement ont été génotypées :

- 33 (83 %) avaient au moins une souche de génotype A et 25 (63 %) étaient en situation clonale A;
- 20 (50 %) avaient au moins une souche de génotype B ou B1 et 8 (20 %) étaient en situation clonale B-B1;
- 1 CH était en situation clonale W (ce génotype n'étant retrouvé dans aucun autre CH).

La probabilité pour un génotype, lorsqu'il est présent dans un CH, d'entraîner une situation clonale est 1,9 (IC_{95 %} = 1,1 - 3,4) fois plus élevée pour le génotype A que pour les génotypes B et B1.

L'étude de la répartition géographique des CH selon leur situation clonale (tableau 6 et figure 6) montre une prédominance du génotype A dans la majorité des CH à Montréal et les régions adjacentes (24/29) et des génotypes B-B1 dans les régions de Capitale-Nationale et Chaudière-Appalaches (7/8).

Figure 6 : Répartition géographique des 40 CH avec l'indication d'une situation clonale



Note : La localisation géographique des CH à l'intérieur de leur région est approximative.

4.3.3 Impact des situations clonales sur l'incidence des DACD

Les taux d'incidence au cours des 4 mois d'étude sont respectivement 2 fois et 1,3 fois plus élevés dans les CH ayant une prédominance clonale du génotype A et du génotype B-B1 que dans les CH sans situation clonale. Une proportion importante de personnes âgées dans l'établissement est également un facteur de risque de taux d'incidence élevé (tableau 7).

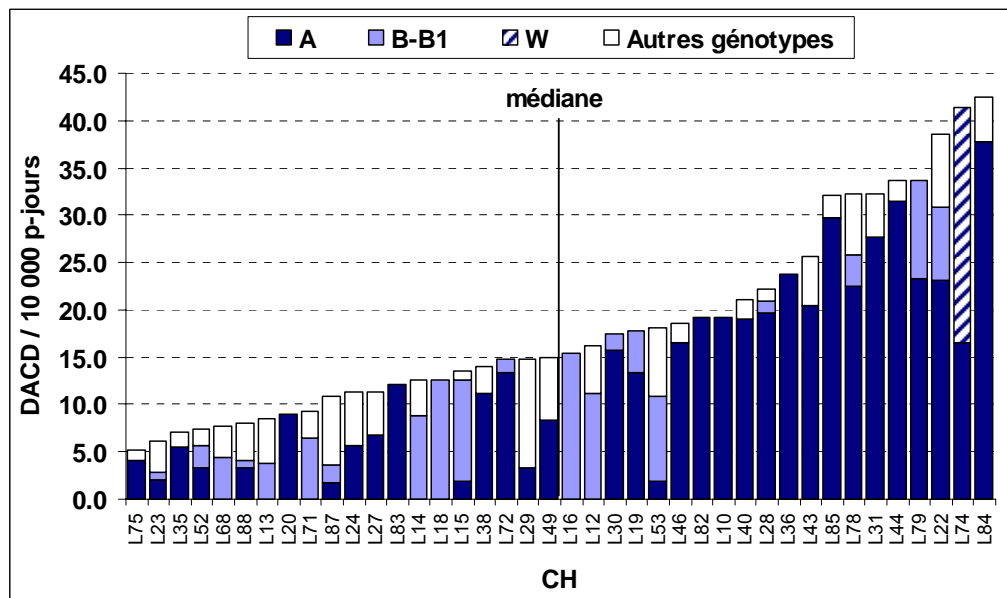
Tableau 7 : Incidence des DACD nosocomiales /10 000 personnes-jours (janvier à mars 2005) et rapport de taux bruts et ajustés (régression de Poisson) selon les caractéristiques des CH*

Caractéristiques des CH	Nombre de CH	Nombre de cas de DACD	Taux de DACD /10 000 personnes-jours	Rapport de taux brut	Rapport de taux ajusté
Situation clonale*					
Clonale A	25	1 572	21,2	2,35 [1,98 – 2,79]	2,00 [1,66 – 2,4]
Clonale B-B1	8	297	13,6	1,51 [1,24 – 1,84]	1,29 [1,05 – 1,6]
Situation non clonale	6	143	9,0	1	1
Proportion de personnes âgées (≥ 65 ans)					
< 35 %	13	497	13,2	1	1
≥ 35 %	26	1 515	20,4	1,54 [1,39 – 1,70]	1,27 [1,14 – 1,4]
Nombre de lits					
< 250 lits	15	501	16,9	1	-
≥ 250 lits	24	1 511	18,4	1,09 [0,99 – 1,21]	-
Total	39	2 012	18,0	-	-

* Un CH n'a pas été inclus dans l'analyse car il était en situation clonale W.

La proportion de CH en situation clonale A est significativement plus élevée parmi les CH situés au dessus (85 %) qu'en dessous (45 %) de la médiane de la distribution des taux d'incidence (Figure 7).

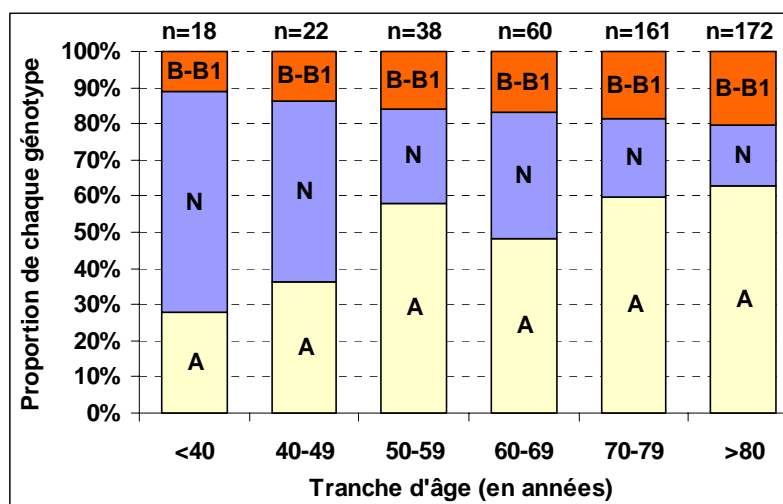
Figure 7 : Répartition des génotypes dans les 40 CH classés par taux d'incidence de DACD croissant (janvier-avril 2005)



4.4 RÉPARTITION DES GÉNOTYPES SELON L'ÂGE DES CAS

Sur l'ensemble des cas, 78 % étaient âgés d'au moins 65 ans. L'âge moyen était de 72 ans et l'âge médian de 76 ans. La répartition relative des génotypes diffère significativement selon la tranche d'âge avec une diminution progressive de la proportion de génotypes autres que A ou B-B1 avec l'âge (test de tendance, $p < 0,001$) (figure 8). La proportion de souches présentant des gènes de toxine binaire et une délétion de *tcdC* est de 49 % chez les personnes âgées de moins de 75 ans et de 58 % chez les personnes plus âgées ($p < 0,05$).

Figure 8 : Répartition relative des génotypes dans chaque tranche d'âge des cas



4.5 COMPLICATIONS SELON LES CARACTÉRISTIQUES DES SOUCHES DE *C. DIFFICILE*

Parmi les 469 cas inclus dans l'étude des complications, ont été observés :

- 5 (1 %) colectomies,
- 15 (3 %) transferts en unité de soins intensifs (USI) pour DACD,
- 68 (14,5 %) décès.

Quarante-deux cas (9 %) ont eu une forme sévère de DACD (colectomie, transfert en USI ou décès directement ou indirectement causé par la DACD).

4.5.1 Létalité à 30 jours

Les taux de létalité à 30 jours en fonction d'un rôle causal de la DACD sont détaillés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Taux brut de létalité à 30 jours selon l'âge, le génotype, la présence ou non d'une délétion du gène *tcdC* et du gène de toxine binaire

	Responsabilité de la DACD dans les décès								
	Nombre de cas	Cause principale		Cause contributive		Cause non reliée		Ensemble des décès	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Âge									
< 75 ans	213	3	1,4	3	1,4	14	6,6	32	9,4
≥ 75 ans	256	9	3,5	18	7,0	21	8,2	62	18,8
Génotype									
A	267	6	2,2	15	5,6	24	9,0	47	16,9
B-B1	86	0	0,0	4	4,7	5	5,8	9	10,5
Autres génotypes	116	6	5,2	2	1,7	6	5,2	12	12,1
Gènes de toxine binaire et délétion partielle de <i>tcdC</i>									
Non	172	3	1,7	5	2,9	11	6,4	19	11,0
Oui	297	9	3,0	16	5,4	24	8,1	49	16,6
Total	469	12	2,6	21	4,5	35	7,5	68	14,5

Le taux de létalité directement ou indirectement lié à la DACD varie de 0 % à 11 % en fonction de l'âge et de la virulence de la souche (tableau 9). Les cas de DACD âgés de 75 ans et plus ont un risque 4 fois plus élevé de décès directement ou indirectement lié à la DACD ($p < 0.01$) (tableau 10). L'augmentation du risque de décès lié à la présence de gènes de toxine binaire et d'une délétion de *tcdC* est de 1,7 et n'atteint pas une signification statistique.

Tableau 9 : Taux de létalité lié directement ou indirectement à la DACD selon l'âge et la présence d'une délétion de *tcdC* et de gènes de toxine binaire

Âge	Gènes de toxine binaire et délétion de <i>tcdC</i>	
	Non	Oui
< 75 ans	0,0 % [0,0 - 4,1]	4,8 % [1,8 - 10,2]
≥ 75 ans	9,5 % [4,2 - 17,9]	11,0 % [6,8 - 16,7]

Tableau 10 : Risque brut et ajusté de décès lié directement ou indirectement à la DACD selon l'âge et la présence d'une délétion de *tcdC* et de gènes de toxine binaire

Caractéristiques	OR (IC95 %)	OR ajusté
Âge ≥ 75 ans	4,0 [1,6 – 9,6]	3,9 [1,6 – 9,7]
Gènes de toxine binaire et délétion de <i>tcdC</i>	1,9 [0,8 – 4,2]	1,7 [0,7 – 3,9]

4.5.2 Formes sévères

Les formes sévères (décès directement ou indirectement lié à la DACD ou colectomie ou transfert en USI en raison de la DACD) sont 2,4 plus fréquentes chez les personnes âgées de 75 ans et plus et 2,1 fois plus élevées en présence d'une délétion de *tcdC* et de gènes de toxine binaire (tableau 11).

Tableau 11 : Fréquence des formes sévères* selon le génotype, l'âge et la présence d'une délétion de *tcdC* et de gènes de toxine binaire

	Nombre de cas	Nombre de cas avec forme sévère	%	OR brut	OR ajusté
Génotype					
A	267	28	10,5	1,4 [0,6 – 3,2]	
B-B1	86	5	5,8	0,8 [0,2 – 2,6]	
Autres	116	9	7,8	1	
Âge					
< 75 ans	213	11	5,2	1	1
≥ 75 ans	256	31	12,1	2,5 [1,2 - 5,2]	2,4 [1,2 - 4,9]
Gènes de toxine binaire et délétion de <i>tcdC</i>					
Non	172	9	5,2	1	1
Oui	297	33	11,1	2,3 [1,0 - 5,1]	2,1 [1,0 - 4,6]

* Forme sévère : décès directement ou indirectement lié à la DACD ou colectomie ou transfert en USI en raison de la DACD.

5 DISCUSSION

Cette étude permet d'apporter un nouvel éclairage sur la situation épidémiologique récente des DACD dans la province de Québec. Elle vient compléter les données de surveillance des DACD⁷ et les résultats d'une étude réalisée dans douze hôpitaux en 2003⁴. En 2005, on observe une prédominance importante d'un génotype A qui représente près des 2/3 des souches isolées dans 58 centres hospitaliers du Québec. Ce génotype prédomine dans les régions où une augmentation d'incidence des DACD a été initialement identifiée. Par contraste, les régions de Québec et de Chaudière-Appalaches se distinguent par une prédominance des génotypes B et B1.

5.1 GÉNOTYPES

Les souches des génotypes A et A1 possèdent des profils électrophorétiques respectivement identiques aux souches actuelles (NAP1a) et historiques (NAP1b) du génotype NAP1 dont les caractéristiques ont récemment été décrites dans des études menées à Montréal⁴, aux USA⁵ et au Royaume-Uni⁶. Le génotype NAP1 correspond également au ribotype 027 et au groupe BI (analyse de restriction par endonucléase (REA)). Les génotypes A (profil de 9 bandes) et A1 (profil de 8 bandes) montrent un pourcentage de similitude (94 %) identique à celui observé par Warny et al.⁶ pour les génotypes NAP1a et NAP1b et par McDonald et al.⁵ pour les souches actuelles et historiques de NAP1. Tout comme les souches courantes NAP1a, les souches du génotype A sont résistantes à la gatifloxacine. Également, 5 des 7 souches appartenant au génotype A1 sont sensibles à la gatifloxacine, comme les souches historiques NAP1b.

Le génotype A se situe dans un groupe de 16 génotypes ayant une similitude de 67 % entre eux et parmi lesquels 12 génotypes présentent à la fois des gènes de toxine binaire et une délétion partielle de *tcdC*. La diversité génétique des souches hypervirulentes (67 %) au Québec pourrait ainsi se révéler plus importante que celle des souches NAP1 aux États-Unis (similitude supérieure à 80 %). Il est difficile, à partir d'une étude ponctuelle, de faire la distinction entre des variantes du génotype A préexistantes à l'épidémie, dont très probablement le génotype A1 (NAP1b), et des variantes plus récentes, apparues pendant l'épidémie. Une observation intéressante réside dans la variabilité des profils de sensibilité aux antibiotiques dans cet agrégat. McDonald a émis l'hypothèse que l'acquisition récente par NAP1a d'une résistance aux fluoroquinolones avait favorisé sa diffusion. Cependant, l'existence d'autres génotypes (A2, A3, A4 et M) ayant les mêmes caractéristiques de résistance que le génotype A soulève des interrogations sur la possibilité d'autres facteurs expliquant l'émergence clonale de NAP1a, en particulier une plus grande aptitude à la sporulation¹¹.

Le potentiel épidémique du génotype A est important puisqu'il présente une aptitude plus importante que les génotypes B et B1 à devenir clonal dans un CH et, dans ce cas, il est responsable des taux d'incidence de DACD les plus élevés. Du fait de la présence de gènes codant pour une toxine binaire et d'une délétion partielle du gène *tcdC*, il est associé à une sévérité accrue des infections. Il est plus fréquemment retrouvé chez les cas de DACD les

plus âgés, ce qui est cohérent avec les observations d'une augmentation récente de l'incidence des DACD plus importante dans ce groupe de population^{2, 12}.

Les souches des génotypes B et B1 correspondent aux souches NAP2 (ribotype 001 ou encore groupe J typé par REA) qui ont été antérieurement décrites dans des éclosons aux États-Unis¹³ et étaient dominantes en Grande-Bretagne¹⁴. Ces génotypes ne possèdent ni gènes de toxine binaire, ni délétion partielle de *tcdC*. Ils sont résistants aux macrolides, aux fluoroquinolones et surtout à la clindamycine, une des principales caractéristiques des souches NAP2. Les génotypes B et B1 (équivalent à J19, Gerding com. pers.) sont responsables d'un taux d'incidence de DACD intermédiaire entre le génotype A et les autres génotypes. Présents dans 20 des 40 CH, ils ne sont toutefois dominants que dans 20 % d'entre eux. Ils ne sont pas associés à une augmentation de la sévérité de la maladie. On peut en rapprocher le génotype W qui présente les mêmes caractéristiques de sensibilité aux antibiotiques que le génotype B mais un profil électrophorétique très différent; il est dominant dans un CH ayant un taux d'incidence très élevé.

Les autres génotypes présentent, à quelques exceptions près, des CMI basses aux antibiotiques testés et une absence de gènes de toxine binaire et de délétion partielle de *tcdC*. Ils ont rarement été isolés plus d'une fois dans un même CH et ne semblent donc pas présenter de risque d'entraîner des éclosons hospitalières.

5.2 SÉVÉRITÉ DES DACD

Les présences de gènes de toxine binaire et d'une délétion partielle de *tcdC* sont étroitement associées, ce qui ne permet pas d'étudier indépendamment leur impact sur la sévérité de la maladie. Le rôle de la toxine binaire n'est pas encore très bien défini et pourrait agir principalement comme cofacteur des autres toxines¹⁵. La délétion partielle de *tcdC* pourrait être responsable de l'hyperproduction des toxines A et B observée *in vitro* chez les souche du génotype NAP1⁶. Ces deux caractéristiques, les plus étudiées, ne sont peut-être pas les seules responsables d'une virulence accrue et leur présence ne pourrait être que le témoin de la plasticité du génome de *C. difficile*¹⁶, justifiant l'exploration de d'autres facteurs potentiels de virulence. Devant ces incertitudes, nous avons choisi d'utiliser, comme caractéristique de virulence de la souche, l'association des gènes de toxine binaire et de la délétion partielle de *tcdC*.

L'analyse de l'impact sur la mortalité a souffert d'un défaut de puissance statistique lié au fait que les différences de létalité observées dans l'étude étaient plus faibles que les hypothèses initiales. Afin de conclure à une augmentation significative de la létalité, il aurait fallu inclure dans l'étude 3 fois plus de cas. Il est très probable que la subjectivité relative de l'appréciation de la cause de décès ait entraîné un biais de classification, contribuant ainsi à réduire les différences observées de létalité entre les génotypes.

L'indicateur de sévérité a été plus efficace pour mettre en évidence les conséquences cliniques de la virulence des souches. Jusqu'à présent, la sévérité de la maladie associée aux souches du génotype NAP1 a été déterminée sur des critères indirects d'évolution historique de la mortalité² ou encore sur des études portant sur un nombre trop limité de

cas^{4, 17}. Il s'agit donc de la première étude qui montre un risque deux fois plus élevé de développer une forme sévère de DACD associée à une souche hypervirulente. À cette sévérité liée à la souche, s'ajoute une augmentation de l'âge des cas, ce qui a pu amplifier l'augmentation de la létalité entre la période pré-épidémique et la période épidémique.

5.3 SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques, en particulier la clindamycine, les céphalosporines et les fluoroquinolones, sont à considérer comme des facteurs de risque de colonisation de *C. difficile* par inhibition de la flore digestive de barrière¹⁸. La vulnérabilité à la colonisation par *C. difficile* induite par ces antibiotiques dépend de facteurs complexes, parmi lesquels on peut citer leur spectre d'activité, leurs caractéristiques pharmacocinétiques et leur biodisponibilité. Il paraît raisonnable de considérer que des souches de *C. difficile* résistantes à un antibiotique puissent avoir un avantage de colonisation pendant un traitement par ce même antibiotique¹⁹. Cet avantage a été clairement démontré pour la clindamycine¹³, a été suggéré pour les fluoroquinolones²⁰ et n'a pas été prouvé pour la ceftriaxone^{13,21}.

Il faut également souligner la difficulté d'interprétation des CMI en l'absence de seuils de résistance adéquats, déterminés à partir des concentrations des antibiotiques dans la lumière intestinale. Par exemple, les fluoroquinolones ont des concentrations dans les selles 100 à 1 000 fois supérieures aux concentrations plasmatiques²². Les concentrations digestives de la clindamycine sont également très élevées et prolongées dans le temps²³; elles sont très faibles, voire nulles, pour le métronidazole. Pour les quinolones, quelques auteurs ont utilisé des seuils différents de ceux proposés par le CLSI : Muto a utilisé un seuil de résistance à 32 mg/L pour la lévofloxacine²⁴, et Ackermann un seuil de 16 mg/L pour la moxifloxacine²⁰. Dans cette dernière étude, une CMI supérieure ou égale à ce seuil concordait avec la présence d'une mutation du gène *gyrA* codant pour la DNAgyrase, une des cibles des fluoroquinolones²⁵.

Plusieurs études ont maintenant confirmé que l'exposition aux fluoroquinolones était un facteur de risque d'infection par le génotype NAP1^{4, 24, 26, 27}, ce qui a été très rarement le cas pour NAP2, alors que des CMI élevées aux fluoroquinolones sont observées chez ces deux génotypes. Cependant, nous avons observé des différences entre les CMI moyennes de ces deux génotypes qui justifient d'explorer plus en profondeur les mécanismes génétiques de résistance chez ces souches.

Enfin, les différences de prédominance des génotypes entre les régions de Montréal (NAP1) et de Québec (NAP2) sont particulièrement intéressantes. En dehors d'un cloisonnement extrême des circuits de soins entre ces deux régions, d'autres hypothèses devraient être considérées. En particulier, il serait nécessaire de rechercher des différences entre les CH de ces régions sur l'utilisation des classes d'antibiotiques qui pourraient jouer un rôle favorisant ou limitant l'implantation d'un génotype.

5.4 LIMITES DE L'ÉTUDE

Cette étude présente un certain nombre de limites liées à la conception de l'étude qui se voulait la plus simple possible pour assurer une large participation des CH. Les données utilisées dans la présente étude proviennent du système de surveillance et comportent donc des informations cliniques limitées et une grande hétérogénéité dans le codage, en particulier des causes de décès. Les CH de petite taille ou à faible taux d'incidence n'ont pas eu suffisamment de cas de DACD pour être représentés dans l'étude, ce qui a probablement conduit à une surestimation de la proportion de CH en situation clonale. Enfin, cette étude a été réalisée après la diffusion de recommandations sur la prévention et la prise en charge des cas de DACD. Ces mesures ont été suivies d'une diminution du taux d'incidence, principalement dans les CH à incidence élevée comme l'ont démontré Loo et al. et la surveillance provinciale^{4, 28}.

6 CONCLUSION

Cette étude permet de mesurer l'impact majeur de la diffusion de la souche NAP1 sur la situation épidémiologique des DACD en 2005 au Québec. La diminution de l'incidence des DACD de l'ordre de 40 % observée au niveau provincial est très encourageante. Cependant, si le retour à un niveau d'incidence pré-épidémique est un objectif primordial, la sévérité des infections peut rester problématique si NAP1 reste le génotype prédominant. Le renouvellement de l'étude en 2006 va permettre de suivre l'évolution de la proportion de NAP1 et les modifications éventuelles de la répartition des différentes variétés de NAP1.

7 RÉFÉRENCES

1. Loo VG, Libman MD, Miller MA, et al. *Clostridium difficile*: a formidable foe. *Cmaj* 2004;**171**(1):47-8.
2. Pépin J, Valiquette L, Alary M-E, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Québec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ* 2004;**171**(5):466-72.
3. Pepin J, Alary ME, Valiquette L, et al. Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis* 2005;**40**(11):1591-7.
4. Loo VG, Poirier L, Miller MA, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *N Engl J Med* 2005;**353**(23):2442-9.
5. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 2005;**353**(23):2433-41.
6. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 2005;**366**(9491):1079-84.
7. Hubert B, Fortin É, Frenette C, Gourdeau M. Surveillance des diarrhées associées à *Clostridium difficile* au Québec. Québec: INSPQ, 2005: 1-23.
8. Allen SD, Emery CL, Lyerly DM. Clostridium. In: Murray PR, Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A., Tenover, R.H., ed, ed. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. ed. Washington: American Society of Microbiology Press, 2003: 835-56.
9. Fawley WN, Wilcox MH. Pulsed-field gel electrophoresis can yield DNA fingerprints of degradation-susceptible *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol* 2002;**40**(9):3546-7; author reply 3547.
10. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;**33**(9):2233-9.
11. Underwood S, Stephenson K, Fawley WN. Effects of hospital cleaning agents on spore formation by N. American and UK outbreak *Clostridium difficile* strains (abstr). Program and abstracts of the 45th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy 2005, Washington, DC.
12. McDonald C, M. O, D.B. J. *Clostridium difficile* Infection in Patients Discharged from US Short-Stay Hospitals, 1996-2003. *Emerging infectious Diseases* 2006;**12**(3):409-415.

13. Johnson S, Samore MH, Farrow KA, et al. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *N Engl J Med* 1999;**341**(22):1645-51.
14. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(2):461-3.
15. Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary Toxin-Producing, Large Clostridial Toxin-Negative *Clostridium difficile* Strains Are Enterotoxic but Do Not Cause Disease in Hamsters. *J Infect Dis* 2006;**193**(8):1143-50.
16. Spigaglia P, Mastrantonio P. Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2002;**40**(9):3470-5.
17. 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**(2):265-72.
18. Sullivan A, Edlund C, Nord CE. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis* 2001;**1**(2):101-14.
19. Gerding DN. Clindamycin, cephalosporins, fluoroquinolones, and *Clostridium difficile*-associated diarrhea: this is an antimicrobial resistance problem. *Clin Infect Dis* 2004;**38**(5):646-8.
20. Ackermann G, Tang-Feldman YJ, Schaumann R, et al. Antecedent use of fluoroquinolones is associated with resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2003;**9**(6):526-30.
21. Samore MH, Venkataraman L, DeGirolami PC, et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* correlated with previous antibiotic exposure. *Microb Drug Resist* 2006;**12**(1):23-8.
22. Hooper DC. Quinolones. In: Mandell GL, Douglas, R.G. and Bennet, J.E. ed, ed. Principles and practice of infectious diseases. 6th ed. New York, N.Y.: Churchill Livingstone, 2005: 451-473.
23. Kager L, Liljeqvist L, Malmborg AS, Nord CE. Effect of clindamycin prophylaxis on the colonic microflora in patients undergoing colorectal surgery. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;**20**(6):736-40.

24. Muto CA, Pokrywka M, Shutt K, et al. 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**(3):273-80.
25. Ackermann G, Tang YJ, Kueper R, et al. Resistance to Moxifloxacin in Toxigenic *Clostridium difficile* Isolates is Associated with Mutations in gyrA. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;**45**(8):2348-53.
26. Pepin J, Saheb N, Coulombe MA, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec. *Clin Infect Dis* 2005;**41**(9):1254-60.
27. Gaynes R, Rimland D, Killum E, et al. Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use. *Clin Infect Dis* 2004;**38**(5):640-5.
28. Gilca R, Fortin É, Hubert B, Frenette C, Gourdeau M. Surveillance des diarrhées associées à *Clostridium difficile* au Québec. Bilan du 21 août 2005 au 10 décembre 2005. Québec: INSPQ, 2006: 1-31.

