

SUSPICION D'ÉPIDÉMIE DANS UN HOPITAL SENÉGALAIS

J. J. DE PINA, P. COLBACHINI, J.C. CHAPALAIN, P. NICOLAS, M. MORILLON

Med Trop 2002; 62 : 607-610

RESUME • La compréhension d'une épidémie d'infections nosocomiales passe souvent par l'utilisation de la biologie moléculaire. Cet outil n'étant pas disponible partout, le recours à la méthode de calcul de distance euclidienne est une alternative fiable et rapide, parfaitement adaptée à une situation telle que celle connue par l'Hôpital Principal de Dakar. Du 01/10/98 au 31/04/99, soit sur 7 mois, 110 hémocultures sur les 1033 prélevées chez 2360 enfants hospitalisés dans les services de pédiatrie A et B de l'Hôpital Principal de Dakar ont été trouvées positives à *B. cepacia*. La question était de savoir s'il s'agissait d'une épidémie. L'hypothèse était d'autant plus probable que toutes les souches avaient le même antibiotype, et que leur analyse par électrophorèse en champ pulsé (CHEF Mapper, digestion par *SpeI*) plaiderait en faveur de l'origine clonale de ces bactéries. Ces résultats étaient tout à fait superposables à ceux obtenus par la méthode de calcul de distance euclidienne. On pouvait cependant mettre en doute une épidémie d'infections puisqu'il n'apparaissait pas de surmortalité chez les enfants concernés. L'enquête environnementale permettait de retrouver des souches identiques dans les respirateurs et sur les cathéters. L'hypothèse d'une contamination de l'environnement, source ensuite de la contamination cutanéomuqueuse des malades est fort probable, les flacons d'hémocultures pouvant être contaminés lors d'un prélèvement peu rigoureux.

MOTS-CLÉS • *Burkholderia cepacia* - Infections nosocomiales - Pseudo épidémie - Afrique - Distance euclidienne - Champs pulsés.

SUSPECTED EPIDEMIC IN A HOSPITAL IN SENEGAL

ABSTRACT • Most outbreaks of nosocomial infection are detected by means of molecular biological testing. However Euclidian distance is a rapid, reliable alternative if facilities for molecular biological testing are unavailable, as at the Principal Hospital in Dakar, Senegal. Over the 7 month period from 01/10/98 to 31/04/99, 110 of the 1033 blood cultures specimens collected in a group of 2360 children hospitalized in pediatric departments A and B of the Principal Hospital were found to be positive for *Burkholderia cepacia*. This high incidence suggested the possibility of an epidemic. This likelihood was further increased by evidence showing that all strains exhibited the same biotype and by results of pulsed-field electrophoresis (CHEF Mapper, *SpeI* digestion) indicating that bacteria was of clonal origin. These findings were entirely consistent with those obtained by Euclidian distance but excessive mortality was not observed in the children involved. Testing of environmental specimens demonstrated the presence of the same strains in respirators and catheters. The most feasible hypothesis to account for these findings is environmental contamination resulting in mucocutaneous contamination of patients. Hemoculture containers were probably contaminated during handling.

KEY WORDS • *Burkholderia cepacia* - Nosocomial Infection - Pseudo.

Burkholderia cepacia est un bacille gram négatif, aérobic strict. Il est de plus en plus fréquemment responsable d'infections nosocomiales. Ces infections sont d'autant plus graves, que cette bactérie est naturellement multirésistante aux antibiotiques (1). La confirmation de l'existence d'une véritable épidémie, la détection de transmissions croisées entre malades, la recherche d'une source d'infection environnementale, sont facilitées par l'utilisation de techniques de biologie moléculaire (2, 3). Mais ces outils restent coûteux, limi-

tant souvent leur utilisation aux pays industrialisés. Existe-t-il des alternatives pour l'exploration et la prise en charge rapide d'une épidémie d'infections nosocomiales ?

L'hôpital Principal de Dakar (Sénégal), hôpital des Forces Armées Sénégalaises, compte plus de 700 lits et accueille de nombreux patients, enfants et adultes. L'attention des pédiatres et des infectiologues a été attirée, dès la fin de l'année 1998 par un nombre anormalement élevé d'hémocultures positives et par la fréquence d'isolement d'une espèce inhabituelle : *Burkholderia cepacia*. Du 01/10/98 au 31/04/99, 2300 enfants ont été hospitalisés dans deux services de pédiatrie, situés à deux étages différents d'un même bâtiment. 1033 hémocultures ont été prélevées pendant cette période. 110 (11 %) étaient positives pour *Burkholderia cepacia*. Ce nombre était suffisamment important pour faire craindre une épidémie.

Les études bactériologiques des flacons d'hémocultures et des solutions d'antiseptiques, faites sur place se sont avérées toutes négatives. Par contre des études environne-

• Travail Laboratoire de Biologie Clinique (J.J.D.P., Spécialiste du SSA, M.M., Professeur agrégé, Chef de service) Hôpital d'Instruction des Armées A. Laveran, Marseille, du Laboratoire de Biologie (P.C., Spécialiste du SSA) Hôpital Principal, Dakar, Sénégal, du Laboratoire de Biologie Clinique (J.C.C., Spécialiste du SSA) Hôpital d'Instruction des Armées Clemont Tonnerre, Brest et de l'Unité du méningocoque (P.N., Spécialiste du SSA) Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, le Pharo, Marseille, France.

• Correspondance : M. MORILLON, Service de Biologie Clinique, HIA Laveran, 13998 Marseille Amées, France • E-mail : biologie.alave-ran@mageos.com •

• Article reçu le 26/01/2001, définitivement accepté le 29/01/2003.

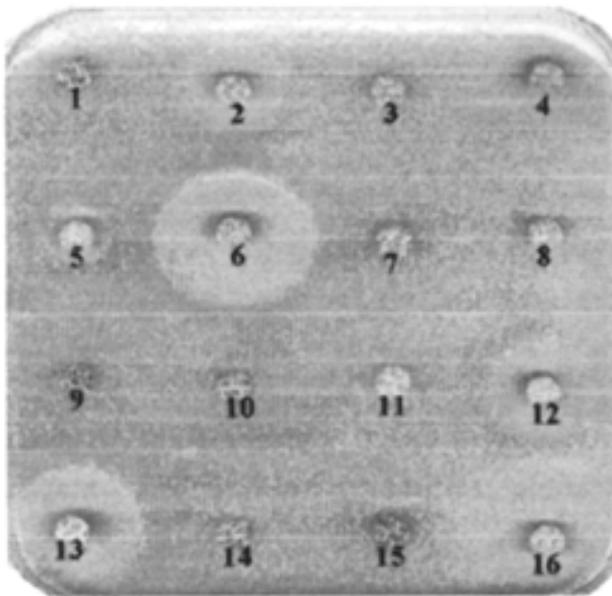
mentales ont permis de retrouver *Burkholderia cepacia* au niveau de cathéters, de respirateurs et de liquide de dialyse.

S'agissait-il d'une épidémie ou de la contamination des flacons d'hémocultures ?

L'absence de signes cliniques de gravité supplémentaires chez les enfants ayant une recherche positive par rapport aux enfants négatifs, et leur évolution clinique indépendante des traitements antibiotiques en cours n'étaient pas en faveur d'une épidémie de bactériémies.

MATERIELS ET METHODES

Afin de confirmer cette hypothèse, 35 souches identifiées sur place ont été adressées à l'H.I.A Lave ran à Marseille, sur tube de conservation de souches bactériennes (Sanofi Diagnostics Pasteur).



Ticarcilline (7) : R
TIC + Ac. Clavulanique (11) : R
Piperacilline (5) : R
Piper + Tazobactam (12) : I

Cefsulodine (3) : R
Cefoperazone (8) : R
Ceftazidime (6) : S
Aztreonam (13) : S

Imipenem (2) : I

Gentamicine (15) : R
Netilmicine (14) : R
Amikacine (10) : R
Tobtamidine (1) : R

Ciprofloxacine (16) : S

Rifampicine (4) : S

Fosfomicine (9) : R

Figure 1 - Antibiotypage des souches de *Burkholderia cepacia* isolées à l'Hôpital principal de Dakar.

Vingt-huit souches non itératives provenaient d'hémocultures, 3 souches de cathéters, 1 souche d'un respirateur (Fig. 1), 1 souche d'un pus superficiel, 1 souche d'un crachat et 1 souche d'un liquide de dialyse. Après culture sur gélose trypticase soja, différents examens ont été réalisés, incluant en plus deux souches de *Burkholderia cepacia* non épidémiologiquement reliées.

Un antibiogramme a été pratiqué selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. Chaque antibiogramme a été lu sur un lecteur automatique (Sirscan®, société I2A).

Tous les antibiogrammes ont été réalisés le même jour afin de pouvoir comparer les souches selon la méthode de calcul de distance euclidienne. Cette méthode statistique permet de regrouper les souches les plus semblables lorsque les diamètres mesurés autour des antibiotiques retenus présentent des similitudes de profils. La moyenne arithmétique de toutes les distances euclidiennes (méthode UPGMA) a permis la construction d'un dendrogramme. Le typage des souches par macrorestriction a été effectué par électrophorèse en champs pulsés. Après 12 heures de culture sur gélose trypticase soja, une suspension bactérienne de densité 0.5 MacFarland est réalisée. 1 ml de cette suspension est centrifugé (13000 tours pendant 15 minutes). Le culot est repris dans 100 µl de tampon (1M NaCl, 10mM Tris), puis mélangé à 100 µl d'agar à faible point de fusion (Incert-Agar, FMC) à 50°C. Le gel obtenu est ensuite incubé toute la nuit à 37°C. dans 1 ml de solution de lyse (6mM Tris, 1M NaCl, 100mM EDTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine). Celle-ci est remplacée par une solution contenant 1% de sodium lauryl sarcosine et 1 mg/ml de Protéinase K, pendant 48 heures à 50°C., en agitation (4). La digestion est faite par 30 UI/ml de SpeI (Boehringer), à 37°C., pendant toute une nuit. L'électrophorèse en champs pulsés utilise un gel d'agar à 1,2 % (SeaKem Gold), et le CHEF MAPER (Bio-Rad) avec les paramètres suivants: 220V, 120° d'angle et des «pulses» de 5 à 50 secondes pendant 24 heures.

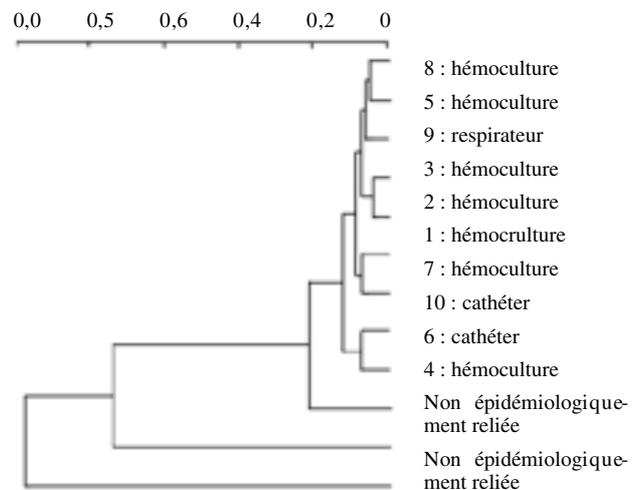


Figure 2 - Etude des distances euclidiennes (UPGMA) à partir de 15 antibiotiques réalisés sur les souches de *Burkholderia cepacia* isolées à l'Hôpital Principal de Dakar.

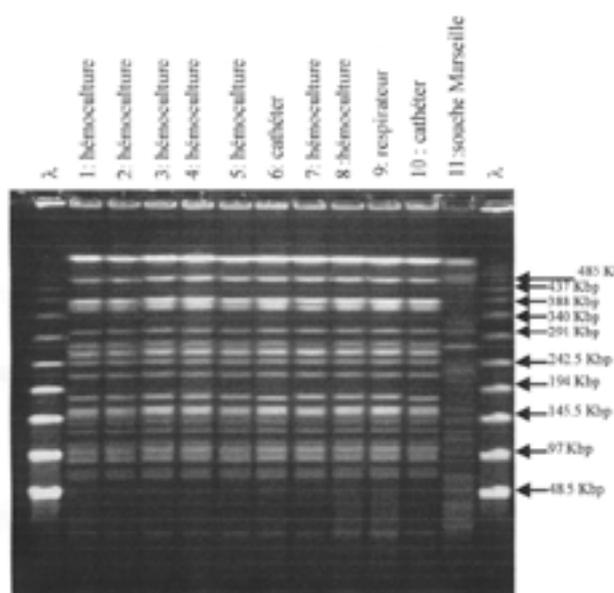


Figure 3 - Analyse par électrophorèse en champs pulsés après restriction par *SpeI* de l'ADN chromosomique de *Burkholderia cepacia*.

RESULTATS

Les antibiogrammes de toutes les souches montrent le même antibiotype (Figure 2). On retrouve les résistances naturelles aux aminosides, à la ticarcilline et à l'imipenem. On note une résistance à la pipéracilline et l'absence de restauration de l'activité des bêta-lactamines par l'acide clavulanique et le tazobactam. La ceftazidime et l'aztréonam restent néanmoins actifs. Les souches sont par ailleurs résistantes au cotrimoxazole, au chloramphénicol et à la doxycycline.

L'étude des distances euclidiennes (Figure 3) permet de regrouper toutes les souches de l'hôpital Principal de Dakar et de les considérer comme similaires. Elles sont par contre très éloignées des 2 souches non épidémiologiquement reliées.

Les pulsotypes obtenus par électrophorèse en champs pulsés, après digestion par *SpeI* sont tous identiques (Figure 4).

DISCUSSION

Burkholderia cepacia utilise des substrats nutritifs très variés, d'où son ancienne dénomination *Pseudomonas multivorans*. C'est avant tout une bactérie de l'environnement, qui peut survivre des mois dans la nature (sol, eau). Capable de produire des substances antifongiques et antibactériennes, de dégrader des déchets industriels ou des pesticides (5), elle intéresse l'industrie, mais pose aussi des problèmes de santé publique. En effet, cette capacité à survivre dans des conditions défavorables en fait une bactérie de l'environnement hospitalier. Elle est capable de coloniser les aérosols, les liquides d'irrigations, les tubulures humides (6), les nébulisateurs (7). De par sa résistance aux antiseptiques, elle peut survivre dans

des désinfectants tels que la polyvidone iodée (8), la chlorhexidine (9, 10). L'utilisation de ces matériels ou liquides contaminés sont responsables de plus en plus fréquemment d'infections nosocomiales. Chez l'homme, elle peut provoquer des pneumopathies graves, particulièrement bien connues chez les patients atteints de mucoviscidose (11, 12), mais aussi chez les patients atteints de granulomatose septique chronique (1). Des bactériémies ont été décrites chez les immunodéprimés et les enfants drépanocytaires (13). Les pseudobactériémies ne sont pas rares, après contamination de l'EDTA contenu dans les flacons d'hémocultures (14) ou par souillure de la polyvidone iodée servant à désinfecter les bouchons des flacons d'hémocultures (15). Lorsque les infections sont avérées, elles sont d'autant plus redoutées que cette bactérie est naturellement multirésistante aux antibiotiques.

Ces faits sont suffisamment graves pour que les pneumologues, au 9^e congrès européens de pneumologie à Madrid (9-13 octobre 1999), aient émis une mise en garde contre cette bactérie.

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire, telle que l'électrophorèse en champs pulsés, permet le typage des souches. Dans notre étude les souches sont génétiquement très proches, voire identiques, qu'il s'agisse de celles isolées des flacons d'hémocultures ou de l'environnement. Cette identité des souches peut laisser suspecter une transmission interhumaine (16), mais aussi une origine nosocomiale d'une épidémie telle qu'une contamination des réservoirs de nébulisateurs (17,18), non retrouvée dans notre étude.

L'étude des distances euclidiennes retrouve cette similarité des souches. Elle est un excellent compromis comme cela a été précédemment décrit (19). De réalisation plus facile et indépendante de l'équipement de biologie moléculaire, cette technique peut être réalisée sur place, ou à distance, à partir des résultats d'antibiogramme transmis par fax ou internet. Sa réalisation est très rapide et peu coûteuse.

Le caractère clonal de l'ensemble des isolats, l'évolution clinique sont en faveur d'une pseudo-épidémie due à une colonisation de l'environnement par cette bactérie.

Ces pseudobactériémies ont déjà été signalées. Nous n'avons pas retrouvé dans notre étude de contamination de l'EDTA contenu dans les flacons d'hémocultures, ni des solutions de désinfection cutanée ou des bouchons des flacons d'hémocultures. Il est donc probable que la contamination des flacons soit liée à cette colonisation de l'environnement, d'autant plus que les prélèvements s'effectuent dans un contexte de surcharge de travail où les procédures de désinfection et de prélèvements ne sont pas respectées. Le phénomène passerait alors par une étape de colonisation cutanée des enfants. Une étude épidémiologique cas-témoin pourrait confirmer cette hypothèse. On ne peut pas exclure non plus une colonisation des enfants par l'intermédiaire des respirateurs en nombre insuffisant qui transitent d'un service à un autre.

La colonisation des cathéters procède des mêmes mécanismes. Elle doit attirer l'attention puisqu'une étude multivariée réalisée lors d'une épidémie de bactériémie à *Burkholderia cepacia* faisait ressortir la présence de cathéters veineux centraux comme un facteur de risque majeur (20).

Burkholderia cepacia n'est pas inconnue au Sénégal puisque une précédente épidémie due à un seul clone était survenue en 1996 au CHU Fann de Dakar (21). Malgré un antibiotype différent (sensibilité au cotrimoxazole, au chloramphénicol), il serait intéressant de comparer les souches appartenant aux 2 clones.

La prise en charge des infections nosocomiales est une priorité pour tout établissement de soins, quelle que soit sa localisation géographique. La connaissance de l'importance des germes multirésistants dans ces structures est un prérequis indispensable à la lutte contre les infections hospitalières, de même qu'une coopération entre différentes structures pour comprendre et démanteler une épidémie. Si les techniques de biologie moléculaire sont d'excellents outils épidémiologiques, l'alternative que représente l'étude des distances euclidiennes apparaît plus adaptée aux pays en voie de développement. Celle-ci peut être envisagée, comme dans le cas présent, dans le cadre d'une coopération Nord-Sud. Elle permet de s'orienter très rapidement sur le caractère épidémique ou non d'une recrudescence d'infections. Ceci est important lorsque l'on est confronté à une bactérie telle que *Burkholderia cepacia*. En effet ce germe de l'environnement se comporte chez l'homme comme un germe opportuniste, et son rôle pathogène doit toujours être discuté en particulier lorsque se pose la question de l'indication thérapeutique.

REFERENCES

- MARTY N, SEGONDS C, CHABANON G - Infections à *Burkholderia cepacia* : épidémiologie et résistance aux antibiotiques. *La Lettre de l'Infectiologue* 1998; **5** : 203-207.
- VU-THIEN H, MOISSENET D, VALCIN M et Coll - Molecular epidemiology of *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* in a cystic fibrosis center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; **15** : 876-879.
- OUCHI K, ABE M, KARITA M et Coll - Analysis of strains of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* isolated in a nosocomial outbreak by biochemical and genomic typing. *J Clin Microbiol* 1995; **33** : 9-15.
- VALCIN M, MOISSENET D, SARDETA et Coll - *Burkholderia cepacia* in children with cystic fibrosis: epidemiological investigation by analysis of restriction fragment length polymorphism. *Pathol Biol* 1996; **44** : 442-446.
- LIPUMA JJ - *Burkholderia cepacia* epidemiology and pathogenesis: implication for infection control. *Curr Opin Pulm Med* 1998; **4** : 337-341.
- PRINCE A - *Pseudomonas cepacia* in cystic fibrosis patients. *Am Rev Respi Dis* 1986; **134** : 644-645.
- HUTCHINSON GR, PARKER S, PRYOR JA et Coll - Home-use nebulizers: a potential primary source of *Burkholderia cepacia* and other colistin-resistant, gram negative bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; **34** : 584-587.
- ANDERSON RL, VESS RW, PANLILIO AL, FAVERO MS - Prolonged survival of *Pseudomonas cepacia* in commercially manufactured povidone-iodine. *Appl Environ Microbiol* 1990; **56** : 598-360.
- SOBEL J, HASHMAN N, REINHERZ G, MERZBACH D - Nosocomial *Pseudomonas cepacia* infection associated with chlorhexidine contamination. *Am J Med* 1982; **73** : 183-186.
- KAITWATCHARACHAI C, SILPAPOJAKUL K, JITSURONG S, KALNAUWAKUL S - An outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia in hemodialysis patients: an epidemiologic and molecular study. *Am J Kidney Dis* 2000; **36** : 199-204.
- SEGONDS C, CHABANON G, COUETDIG G et Coll - The French Observatoire *Burkholderia cepacia* study group. Epidemiology of pulmonary colonization with *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; **15** : 841-842.
- ISLES A, MACLUSKI I, COREY M et Coll - *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *Pediatr* 1984; **104** : 206-210.
- BERRY MD, ASMAR BI - *Pseudomonas cepacia* bacteriemia in children with sickle cell hemoglobinopathies. *Pediatr Infect Dis* 1991; **10** : 696-699.
- DAVE J, SPRINGBETTER, PADMORE H - *Pseudomonas cepacia* pseudobacteremia. *J Hosp Infect* 1993; **23** : 72-73.
- PANLILIO AL, BECK SC, SIEGEL JD et Coll - Infections and pseudoinfections due to povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*. *Clin Infect Dis* 1992; **14** : 1078-1083.
- SEGONDS C, BINGEN E, COUETDIG G et Coll - Genotypic analysis of *Burkholderia cepacia* isolates from 13 French Cystic Fibrosis Centers. *J Clin Microbiol* 1996; **34** : 1610-1616.
- PEGUES CF, PEGUES DA, FORD DS et Coll - *Burkholderia cepacia* respiratory tract acquisition: epidemiology and molecular characterization of a large nosocomial outbreak. *Epidemiol Infect* 1996; **116** : 309-317.
- OKASAKI M, WATANABE T, MORITA K et Coll - Molecular epidemiological investigation using a randomly amplified polymorphic DNA assay of *Burkholderia cepacia* isolates from nosocomial outbreaks. *J Clin Microbiol* 1999; **31** : 293-298.
- BLANC DS, LUGEON C, WENGER A et Coll - Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1994; **32** : 2505-2509.
- MARTINO R, GOMEZ L, PERICAS R et Coll - Bacteriemia caused by non-glucose fermenting gram negative bacilli and *Aeromonas* species in patients with hematological malignancies and solid tumours. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19** : 320-323.
- CISSE MF, DIAN YD, SY OK et Coll - *Burkholderia cepacia* isolation and characterization from hospital infections. *Dakar Med* 1998; **43** : 144-146.