

65

LYSOTYPIC COMPLÉMENTAIRE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

par M. O. Santos-Ferreira, M. Darmon et J.-F. Vieu

Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, Lisbonne
et Institut Pasteur, Paris

SUMMARY

A COMPLEMENTARY PHAGE-TYPING SCHEME FOR « *P. AERUGINOSA* »

Twenty per cent of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Portugal are non typable with the phage-typing Lindberg system, but most of them may be typed with the aid of a new phage-typing method.

This complementary scheme of phage-typing is based on the use of 15 new phages from sewage; 39 phage-types were found among a group of the non-typable strains isolated in several hospitals in Lisbonne.

The relations between the serotypes, the pyocinotypes and the new lysotypes are investigated.

KEY-WORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, Phage typing; Serotyping, Epidemiology, Portugal.

L'utilisation de la lysotypie de *Pseudomonas aeruginosa* pour effectuer l'étude épidémiologique des infections hospitalières à bacille pyocyanique observées dans les hôpitaux de Lisbonne, a montré qu'une proportion assez élevée des souches portugaises (environ 20 %) n'était pas typable par le système de lysotypie de Lindberg [4] que nous avons utilisé comme système de base pour la lysotypie du bacille pyocyanique [6]. C'est pourquoi l'élaboration d'une lysotypie complémentaire a paru nécessaire pour permettre l'étude épidémiologique des infections déterminées par cette bactérie : cette lysotypie comporte l'utilisation de 15 nouveaux bactériophages.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Bactéries. — On a utilisé 84 souches hospitalières de *P. aeruginosa* d'origines diverses et provenant de plusieurs hôpitaux de Lisbonne, comme cultures détec-

V

trices pour isoler de nouveaux bactériophages. Elles sont insensibles aux 17 bactériophages de la lysotypie de Lindberg, et leurs sérotypes ont été déterminés par agglutination sur plaque (96 cavités en U, Milian-Genève, Suisse) à l'aide des 16 immunsérums (Institut Pasteur, Paris) du système de Habs [3] complété par Sandvick [5] et par Véron [8]. Le pyocinotype de ces souches a été étudié selon la méthode de Gillies et Govan [2].

Bactériophages. — Les 17 bactériophages de la série de Lindberg nous ont été envoyés par Mme Asheshov (Colindale) que nous remercions. Ces phages sont utilisés à la dilution de routine (RTD) et à la RTD \times 100.

L'isolement de nouveaux phages a été réalisé par une méthode d'enrichissement [9] à partir d'échantillons d'eaux usées de la ville de Lisbonne et en milieu ML additionnés de glucose (5 %). Plusieurs souches bactériennes insensibles ont été utilisées à cet effet. Après 24 h d'incubation à 37° C, centrifugation à froid et filtration du surnageant sur membrane (Millipore, 0,45 μ), la recherche des bactériophages actifs sur chaque souche indicatrice a été faite en milieu ML additionné de gélose (7 ‰), de MgCl₂ (2 mM) et de CaCl₂ (2 mM), selon la méthode de la double couche [1].

La multiplication de chaque phage et le titrage des lysats ont été faits dans les mêmes conditions et toutes les cultures bactériennes ont été incubées à 37°. Le titre des phages-stocks était de 1×10^6 à 1×10^{10} UFP/ml, et les RTD ont été choisies en fonction de la dimension des plages et du titre de chaque lysat.

Lysotypie. — Elle a été effectuée sur le milieu de base additionné de 12 ‰ de gélose. Le milieu d'épreuve est ensemencé par inondation avec une culture jeune de *P. aeruginosa* en bouillon nutritif. Après séchage, les nouveaux phages sont déposés à la surface du milieu à l'aide d'un dispositif semi-automatique.

Les boîtes de Petri sont incubées à 37° pendant 18 heures et la lecture est faite en transillumination oblique.

RÉSULTATS

A partir de plusieurs échantillons d'eaux usées de la ville de Lisbonne, nous avons isolé 28 bactériophages parmi lesquels 15 ont été retenus pour l'élaboration d'un schéma complémentaire de lysotypie. Ces 15 bactériophages, dénommés lis1, lis2, lis3, ..., lis15, se différencient entre eux par la morphologie de leurs plages de lyse et par l'étendue de leurs spectres d'action sur les souches de *P. aeruginosa* non typables. Leur étude a permis de définir 39 lysotypes parmi les 84 souches examinées : sept lysotypes sont définis par un seul bactériophage (lysotype n° 1, 11, 31, 33, 34, 37 et 39), sept par deux phages (lysotype n° 9, 27, 29, 30, 35, 36 et 38) et deux par trois phages (lysotype n° 25 et 26). Les autres lysotypes réunissent des souches sensibles à un nombre de phages qui varie de 4 (lysotype n° 12, 13, 20, 23, 28 et 32) à 12 (lysotype n° 2). Aucun lysotype ne réunit des souches sensibles à tous les bactériophages de la lysotypie complémentaire.

En ce qui concerne le spectre d'activité de chaque bactériophage, ceux qui sont le plus fréquemment actifs sont les phages lis 6, lis 9, lis 11, lis 14 et lis 15 auxquels 20 à 30 % des souches sont sensibles. Les phages les plus sélectifs sont les phages lis3, lis5 et lis7.

RTD = dilution de routine.

65

TABLEAU I. — Lysotypie complémentaire de « *P. aeruginosa* ».

Nouveaux lysotypes	Nouveaux phages														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	LC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	++++	++	-	++	-	LC	-	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC	LC
3	+++	-	-	++	-	LC	-	LC	LC	LC	LC	-	+++	LC	LC
4	-	++++	-	LC	LC	LC	-	LC	LC	LC	LC	LC	+++	LC	LC
5	-	+++	-	LC	±	LC	±	LC	LC	LC	LC	+++	+++	LC	LC
6	-	++++	-	±	-	LC	-	LC	LC	-	LC	-	LC	-	LC
7	-	+++	-	-	-	LC	-	LC	LC	-	-	-	-	LC	LC
8	-	++++	-	±	-	LC	-	LC	LC	LC	LC	-	±	-	LC
9	-	LC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	-
10	-	-	LC	-	-	LC	LC	LC	LC	-	LC	LC	LC	-	LC
11	-	-	LC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	LC	LC	LC	LC	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	LC	-	LC	-	LC	-	-	-	-	-	-	LC
14	-	-	-	LC	-	-	-	LC	-	LC	LC	-	-	LC	LC
15	-	-	-	-	-	LC	-	LC	LC	LC	LC	-	LC	LC	LC
16	-	±	±	-	-	LC	-	LC	LC	LC	LC	-	-	LC	LC
17	-	-	-	-	-	LC	-	LC	LC	-	LC	-	LC	LC	LC
18	-	-	-	-	-	LC	-	LC	LC	-	LC	-	-	LC	LC
19	-	±	-	-	-	LC	-	LC	LC	-	LC	-	-	-	LC
20	-	-	-	-	-	LC	-	LC	LC	-	-	-	-	-	LC
21	-	-	-	-	-	LC	-	-	LC	LC	-	-	-	LC	-
22	-	-	-	-	-	LC	-	-	LC	LC	-	-	-	LC	LC
23	-	-	-	-	-	LC	-	-	LC	LC	-	-	-	-	LC
24	-	-	-	-	-	LC	-	-	LC	-	LC	-	-	LC	LC
25	-	-	-	-	-	LC	-	-	LC	-	-	-	-	LC	-
26	-	-	-	-	-	LC	-	-	LC	-	-	-	-	-	LC
27	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	LC	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	-	LC	-	-	LC	LC
29	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	-	-	-	-	-	LC
30	-	-	-	-	-	-	-	LC	LC	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	-	LC	-	LC	-	LC
33	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	LC	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	LC
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC	LC	LC	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	LC

Les bactériophages sont utilisés à la RTD.
 LC = lyse confluente.
 +++++, +++++, +++, ++, ± = nombre décroissant d'UFP.

La stabilité *in vitro* des lysotypes a été étudiée après conservation des souches pendant plusieurs mois au laboratoire, en culot de gélose : les variations mineures observées ne modifiaient pas notablement l'image lysotypique initiale. L'existence de ces variations mineures confirme, dans le cas de ce nouveau système de lysotypie complémentaire, ce que l'on sait déjà de la conservation malaisée des lysotypes de *P. aeruginosa* au laboratoire.

L'application de ce schéma complémentaire de lysotypie à l'épidémiologie des infections hospitalières à Lisbonne a permis tout d'abord de réduire

la proportion des souches non typables à moins de 5 % du nombre total des souches de *P. aeruginosa* examinées. Les relations entre les sérotypes et les lysotypes définis par cette méthode complémentaire ont également pu être précisées. En effet, les 84 souches étudiées appartiennent à différents sérotypes : O:2 ; O:3 ; O:5 ; O:6 ; O:9 ; O:11 ; O:13 qui figurent parmi les 10 sérotypes le plus fréquemment rencontrés au Portugal [7]. L'association de cette lysotypie et de la sérologie s'est montrée d'un très grand intérêt en épidémiologie, et plusieurs sérotypes ont pu être subdivisés en différents lysotypes ; c'est le cas en particulier du sérotype O:11 dont les souches se distribuent parmi les lysotypes n° 6, 16, 22, 23, 26, 27 et 29, du sérotype O:6 (lysotypes n° 5, 16, 24, 32 et 36), du sérotype O:3 (lysotypes n° 4, 6, 7, 16, 23, 26 et 31) et du sérotype O:13 (lysotypes n° 34 et 38). Quant aux souches non agglutinables, qui n'étaient ni sérotypables, ni lysotypables, elles ont pu être classées dans plusieurs lysotypes de cette lysotypie complémentaire.

L'association de la pyocinotypie, utilisée comme marqueur épidémiologique secondaire, en même temps que la lysotypie, a permis de vérifier la stabilité *in vivo* de ces nouveaux lysotypes par l'étude des foyers épidémiques et aussi des malades contaminés durant plusieurs mois par une souche de *P. aeruginosa* dont la séro-pyo-lyso-type était caractéristique. C'est au cours de cette investigation utilisant ces trois marqueurs que la relative fréquence de certains types de *P. aeruginosa* a pu être observée chez des souches dont l'origine hospitalière était différente ; sans entrer dans le détail des résultats de la pyocinotypie qui seront exposés ailleurs, nous signalerons simplement deux exemples : celui d'une souche O:11, lysotype 23, pyocinotype 1a, et celui d'une autre souche, sérotype O:6, lysotype 24, pyocinotype 3. De telles souches caractérisées par une association stable de 3 marqueurs épidémiologiques ont déjà été observées par d'autres auteurs (*in* [9]).

CONCLUSION

L'utilisation du schéma de lysotypie de Lindberg dans de nombreux pays a conduit la plupart des microbiologistes à compléter ce schéma par plusieurs autres phages afin de réduire la proportion des souches non typables. L'intérêt de ces phages complémentaires est de permettre l'étude de l'épidémiologie locale des infections à bacille pyocyanique causées par ces souches non typables. Cependant, l'utilisation de quelques phages supplémentaires intégrés dans le schéma de lysotypie de base ou constituant, comme dans le cas présent, un système distinct et complémentaire de lysotypie, aboutit chaque fois à une augmentation considérable du nombre déjà très élevé des lysotypes de *P. aeruginosa*, ce qui est un des inconvénients majeurs de la méthode. L'application du système complémentaire de lysotypie élaboré et éprouvé à Lisbonne est un nouvel exemple de la nécessité d'associer sérotypie et lysotypie au cours des études épidémiologiques sur les contaminations et les infections hospitalières à bacille pyocyanique, et de la difficulté d'établir un schéma réellement international de lysotypie de *P. aeruginosa*.

65

RÉSUMÉ

Environ 20 % des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au Portugal ne sont pas typables par le système de lysotypie de Lindberg. Grâce à un système de lysotypie complémentaire comportant 15 nouveaux bactériophages, il a été possible de typer la majorité de ces souches.

MOTS-CLÉS : *Pseudomonas aeruginosa*, Lysotypie ; Sérotypie, Épidémiologie, Portugal.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mlles M.-M. Céu et A. Soto pour l'aide qu'elles nous ont apportée dans l'isolement des bactériophages.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADAMS, M. A., Bacteriophages. Intersciences Publishers, New York, 1959.
- [2] GOVAN, J. R. W. & GILLIES, R. R., Further studies in the pyocine-typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. med. Microbiol.*, 1969, 2, 17-31.
- [3] HABS, I., Untersuchungen über O antigen von *Pseudomonas aeruginosa*. *Z. Hyg. Infect.-Kr.*, 1957, 44, 218-225.
- [4] LINDBERG, R. B., LATTA, R. I., BRAME, R. E. & MONCRIEF, J. A., Definitive bacteriophage-typing-system for *Pseudomonas aeruginosa*. *Bact. Proc.*, 1964, 15, 81.
- [5] SANDVIK, O., Serological comparison between strains of *Pseudomonas aeruginosa* from human and animal sources. *Acta path. microbiol. scand.*, 1960, 48, 56-65.
- [6] SANTOS-FERREIRA, M. O., La lysotypie de *Pseudomonas aeruginosa* et son intérêt dans l'épidémiologie des infections hospitalières au Portugal. *Rev. port. Pharm.*, 1975, 25, 5-21.
- [7] TOUCAS, M., SANTOS-FERREIRA, M. O., VIEU, J.-F. & DELTEIL, M., Recherche d'anticorps antipyocyaniques chez la population normale en France et au Portugal. *Méd. Mal. infect.*, 1975, 5, 465-468.
- [8] VÉRON, M., Sur l'agglutination de *Pseudomonas aeruginosa*: subdivision des groupes antigéniques O:2 et O:5. *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, 101, 456-460.
- [9] VIEU, J.-F., La lysotypie et la pyocinotypie de *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Inst. Pasteur*, 1969, 67, 1231-1249.