

BACTÉRIOLOGIE

Intérêt de l'antibiotypie et de la bactériocinotypie pour différencier les souches de *Shigella* isolées en Argentine.

L. A. Merino, G. E. Hreñuk, J. M. Alonso & M. C. Ronconi

Departamento de Bacteriología del Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste, Avenida Las Heras 727, 3500 Resistencia, Provincia del Chaco, Argentina.
Tel/Fax: 054 3722 422793. E-mail: lmerino@bib.unne.edu.ar

Manuscrit n°2166. "Bactériologie". Reçu le 1er mars 2000. Accepté le 26 septembre 2000.

Summary: Usefulness of antibiotype and bacteriocinotype for differentiating *Shigella* strains isolated in Argentina.

The aim of the present work was to analyse the phenotypical characteristics of *Shigella* strains in order to evaluate their possible utilisation as epidemiological markers.

For one year, we studied 95 strains of *Shigella* obtained from stool specimens of patients with dysentery. Bacteria came from various health care centres in the states of Chaco and Corrientes (Argentina).

Bacteria were identified by using classical biochemical methods. All strains were serotyped and susceptibility patterns were determined using thirteen antibiotics. Bacteriocin typing was determined by the sensitivity to piocins of *Pseudomonas aeruginosa* and to marcescins of *Serratia marcescens*. Colicin production in *S. sonnei* was also studied. Among all the strains examined, the most prevalent was *Shigella flexneri* (82%) followed by *Shigella sonnei* (18%). The most frequent serotype among *S. flexneri* was 2 (93%), followed by serotypes 6 (4%), 1 (1.5%), and 3 (1.5%).

S. sonnei strains were classified in 7 antibiotypes, 6 piocin types, 3 marcescin types, and 4 colicin types. Strains of *S. flexneri* type 2 were divided among 14 antibiotypes, 4 piocin types and 2 marcescin types. SIMPSON'S index of diversity was applied to evaluate the discriminatory power of studied typing methods, both alone and combined. Our results indicate that when taken independently, none of the evaluated typing methods had discriminative power, but when taken together, they may be successfully used for the epidemiological typing of *Shigella* strains.

Resumen : Utilidad del antibiograma y del bacteriocinograma para diferenciar cepas de *Shigella* aisladas en Argentina.

Se estudiaron diferentes características fenotípicas de cepas de *Shigella* a fin de evaluar su posible utilización como marcadores epidemiológicos.

Se estudiaron 95 cepas de *Shigella* obtenidas de materia fecal de pacientes con diarrea, procedentes de distintos centros asistenciales de las provincias del Chaco y Corrientes (Argentina).

Las bacterias fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas clásicas. Todas las cepas fueron serotipificadas y se determinaron los perfiles de susceptibilidad frente a trece antimicrobianos por la técnica de difusión con discos. La tipificación en bacteriocinogramas se realizó mediante la técnica de estrias cruzadas; evaluando la sensibilidad frente a bacteriocinas de *Pseudomonas aeruginosa* (piocinas), de *Serratia marcescens* (marcescinas) y en el caso de cepas de *S. sonnei* también se evaluó la producción de colicinas.

Del total de cepas estudiadas, el 82% correspondió a *Shigella flexneri* y el 18% a *Shigella sonnei*. El serotipo más frecuente de *S. flexneri* fue el 2 (93%), seguido de los serotipos 6 (4%), 1 (1,5%) y 3 (1,5%).

Las cepas de *S. sonnei* pudieron clasificarse en 7 perfiles de susceptibilidad antibiótica, 6 piocinogramas, 3 marcescinogramas y 4 colicinogramas. Las cepas de *S. flexneri* pudieron dividirse en 14 antibiogramas, 4 piocinogramas y 2 marcescinogramas. Con el objeto de determinar el poder discriminatorio de los marcadores estudiados, solos y combinados, se aplicó el índice de diversidad de SIMPSON.

Los resultados indican que ninguna de las características evaluadas tuvo valor discriminativo en forma aislada, pero la suma de todas ellas constituye una buena herramienta para iniciar el tipado epidemiológico de cepas de *Shigella*.

Résumé :

Divers caractères phénotypiques de différentes souches de *Shigella* ont été étudiés pour évaluer leur utilité comme marqueurs épidémiologiques.

Sur une période d'un an, 95 souches de *Shigella* isolées de selles de malades atteints de diarrhée ont été étudiées. Les bactéries ont été collectées à partir de divers centres de santé des provinces du Chaco et de Corrientes (Argentine).

L'identification bactérienne a été pratiquée à l'aide de procédés classiques. Toutes les souches ont été sérotypées et les profils de sensibilité aux antibiotiques ont été étudiés pour 13 antibiotiques. La bactériocinotypie a été réalisée en ayant recours à l'étude de la sensibilité aux pyocines de *Pseudomonas aeruginosa* et aux marcescines de *Serratia marcescens*. La production de colicines chez *S. sonnei* a été aussi étudiée.

Parmi toutes les souches étudiées, *Shigella flexneri* a été la plus fréquente (82 %) suivie de *Shigella sonnei* (18 %). Chez *S. flexneri* le sérotype 2 a été le plus fréquent (93 %), suivi des sérotypes 6 (4 %), 1 (1,5 %) et 3 (1,5 %).

Shigella flexneri
Shigella sonnei
antimicrobial resistance
serotype
antibiotype
bacteriocin typing
Chaco
Corrientes
Argentina
South America

Shigella flexneri
Shigella sonnei
resistencia antimicrobiana
antibiograma
serotipo
bacteriocinograma
Chaco
Corrientes
Argentina
America del Sur

Shigella flexneri
Shigella sonnei
résistance bactérienne
antibiotypie
sérotypie
bactériocinotypie
Chaco
Corrientes
Argentine
Amérique du Sud

Les souches de *S. sonnei* ont été divisées en 7 profils de résistance aux antibiotiques, 6 piocinotypes, 3 marcescintypes et 4 colicinotypes. Les souches de *S. flexneri* ont été divisées en 14 antibiotypes, 4 piocinotypes et 2 marcescintypes. L'index de SIMPSON a été appliqué pour déterminer le pouvoir de discrimination parmi les différents marqueurs évalués, seuls ou combinés.

Les résultats montrent qu'aucun des caractères évalués n'a à lui seul de valeur pour obtenir une discrimination entre les souches, mais pris dans leur ensemble, ils peuvent être utilisés pour initier le typage épidémiologique des souches du genre *Shigella*.

Introduction

Même si les infections dues à *Shigella* ont une distribution planétaire (6), leur incidence est plus grande dans les pays en voie de développement que dans les pays riches. En effet, leur transmission est favorisée par des conditions d'hygiène précaire et par le manque d'accès à l'eau potable.

En Argentine, la shigellose est une des premières causes de morbi-mortalité chez l'enfant au-dessous de 5 ans, chez les sous-alimentés, chez les personnes âgées ou les patients présentant une immunodéficience immunologique (3).

La nécessité d'étudier les souches isolées de différents malades a conduit à développer des schémas de typage épidémiologique en ayant recours à des caractères phénotypiques et génotypiques. Si ces derniers ont un pouvoir discriminatoire important, ils sont encore peu accessibles dans les pays en voie de développement (7).

Le but de cette étude est d'analyser les caractères phénotypiques des souches de *Shigella* pour évaluer leur intérêt en tant que marqueurs épidémiologiques.

Matériel et méthodes

Souches

Quatre-vingt-quinze souches de *Shigella* spp. isolées d'échantillons de selles diarrhéiques ont été étudiées. Elles provenaient de divers centres de santé des provinces du Chaco et de Corrientes (Argentine).

Identification et sérotypie

L'identification bactérienne a été réalisée à l'aide de tests métaboliques et biochimiques classiques (17) et les sérogroupes A, B, C et D ont été déterminés à l'aide de sérums monovalents de Sanofi Diagnostics Pasteur.

Toutes les souches ont été envoyées à l'Institut national de maladies infectieuses Dr Carlos G. MALBRÁN de Buenos Aires (Argentine) pour la confirmation des sérogroupes et la détermination des sérotypes des souches de *S. flexneri*.

Antibiotypie

La sensibilité des souches a été étudiée vis-à-vis de 13 antibiotiques en ayant recours au milieu de MUELLER-HINTON et à la méthode des disques d'antibiotiques des Laboratoires Britania. L'interprétation des résultats a respecté les normes établies par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (21). Les antibiotiques testés sont les suivants : ampicilline (AMP), ampicilline/sulbactam (AMS), céfalotine (CEF), tétracycline (TET), chloramphénicol (CMP), nitrofuranes (FUR), néomycine (NEO), triméthoprime + sulfaméthoxazole (TMS), acide nalidixique (NAL), ciprofloxacine (CIP), colistine (COL), gentamycine (GEN) et fosfomycine (FOS). À la lecture des résultats, différents antibiotiques ont été retenus comme marqueurs épidémiologiques.

Sensibilité aux bactériocines et production de colicines

Sur 20 souches de *S. flexneri* type 2 choisies de manière aléatoire et sur la totalité des souches de *S. sonnei*, la sensibilité aux bactériocines, produites par *Pseudomonas aeruginosa* (pyocines) et par *Serratia marcescens* (marcescines) a été étudiée. Pour cette étude, on a eu recours à la technique décrite par WAHBA (2). Pour toutes les souches de *S. sonnei*, la production des colicines a été étudiée à l'aide de la méthode de GILLIES et GOVAN (2). Les souches productrices et les souches sensibles appartenaient à la collection des auteurs (15).

Pouvoir de discrimination

L'index de SIMPSON a été appliqué pour évaluer le pouvoir de discrimination des marqueurs pris isolément et combinés [16].

Résultats

Identification et sérotypie

Sur les 95 souches étudiées, 78 (82 %) ont été identifiées comme étant des *Shigella flexneri* et 17 (18 %) comme des *Shigella sonnei*. Aucune souche de *Shigella* n'appartenait aux espèces *S. dysenteriae* ou *S. boydii*. Au sein de *S. flexneri*, le sérotype le plus fréquent est le type 2 (93 %), suivi par les types 6 (4 %), 1 (1,4 %) et 3 (1,4 %).

Antibiotypie

Ont été choisis comme marqueurs épidémiologiques pour *S. sonnei*, les antibiotiques suivants: AMP, AMS, TET, CMP, TMS et CEF et, pour *S. flexneri* de type 2, ont été choisis les antibiotiques GEN, NEO, COL, FUR, TMS et CEF. Les souches de *S. sonnei* ont été divisées en 7 profils de sensibilité et les souches de *S. flexneri* type 2 ont été classées en 14 profils (tableau I).

Tableau I.

Profils de sensibilité aux antibiotiques dans les souches étudiées.
Sensitivity profiles to antibiotics in surveyed strains.

sérogroupe et sérotype	antibiotype (ATB)	résistance aux antibiotiques	nb. de souches
<i>S. sonnei</i>	1s	-	1
	2s	TET CMP TMS	1
	3s	AMS CMP CEF	1
	4s	AMS TET CEF	1
	5s	AMS TET CMP CEF	4
	6s	AMP AMS TET CMP CEF	7
	7s	AMP AMS TET CMP TMS CEF	2
<i>S. flexneri</i>	1f	TMS	1
	2f	NEO COL	1
	3f	NEO COL TMS	1
	4f	NEO COL TMS CEF	1
	5f	NEO COL FUR	1
	6f	NEO COL FUR CEF	4
	7f	GEN TMS	1
	8f	GEN NEO FUR TMS CEF	1
	9f	GEN NEO COL	1
	10f	GEN NEO COL CEF	4
	11f	GEN NEO COL TMS CEF	1
	12f	GEN NEO COL FUR	10
	13f	GEN NEO COL FUR CEF	36
	14f	GEN NEO COL FUR TMS CEF	15

Sensibilité aux bactériocines

Sur la base de la sensibilité aux pyocines, 6 pyocinotypes (PCT) ont été établis pour *S. sonnei* et 3 pour *S. flexneri* type 2. En accord avec la sensibilité aux marcescines, 3 marcescino-types (MCT) ont été reconnus pour *S. sonnei* et 2 pour *S. flexneri* type 2. Les souches de *S. sonnei* ont été divisées en 4 colicinotypes (CCT) différents.

Les tableaux II et III montrent la répartition des souches de *S. sonnei* et de *S. flexneri* selon les différents marqueurs épidémiologiques étudiés.

Tableau II.

Répartition des souches de *S. sonnei* selon les marqueurs utilisés.
Distribution of *S. sonnei* strains according to markers used.

antibiotype (ATB)	pyocinotype (PCT)	marcescino-type (MCT)	colicinotype (CCT)	nb de souches
1s	E	B	IV	1
2s	D	A	III	1
3s	G	A	II	1
4s	H	B	IV	1
5s	D, E, G	A, B	I, II, IV	4
6s	D, E, F, G, I	A, B	II, IV	7
7s	G	B, C	I, II	2

Tableau III.

Répartition des souches de *S. flexneri* type 2 selon les marqueurs utilisés.
Distribution of *S. flexneri* type 2 strains according to markers used.

antibiotype	pyocinotype	marcescino-type	nb de souches
1f	M	J	1
2f	M	K	1
5f	M	K	1
6f	O	K	1
12f	M, P	K, L	3
13f	M, N, O	J, K	8
14f	M, O	J, K	5

Pouvoir de discrimination

Les résultats obtenus grâce à l'index de discrimination de Simpson (ID) appliqué aux marqueurs retenus sont regroupés dans le tableau IV.

Tableau IV.

Application de l'index de SIMPSON pour les marqueurs étudiés.
Application of SIMPSON's index to markers used.

espèce	marqueur	ID
<i>Shigella</i> spp (N =95)	sérotype	0,297
<i>Shigellasonnei</i> (N =17)	ATB +MCT +CCT +PCT	0,989
	MCT +PCT +CCT	0,978
	MCT +CCT	0,978
	ATB +PCT +MCT	0,967
	ATB +PCT +CCT	0,967
	ATB +MCT +CCT	0,956
	MCT +PCT	0,945
	ATB +PCT	0,945
	PCT +CCT	0,890
	ATB +CCT	0,890
	ATB +MCT	0,879
	PCT	0,824
	ATB	0,794
	CCT	0,791
MCT	0,604	
<i>Shigella flexneri</i> 2 (N =20)	ATB +MCT +PCT	0,971
	ATB +PCT	0,889
	ATB +MCT	0,883
	MCT +PCT	0,795
	ATB	0,736
	PCT	0,626
MCT	0,351	

ATB : antibiotype ; MCT : marcescino-type ; PCT : pyocinotype ; CCT : colicinotype
ID : index de discrimination

Discussion

La fréquence des *Shigella* et la distribution des espèces changent selon les conditions sanitaires de chaque pays. En Argentine, prédominent *S. flexneri* (75 %), suivie de *S. sonnei* (24%) ; *S. dysenteriae* et de *S. boydii* (1 %) sont rarement isolés [3]. Des fréquences semblables ont été rapportées au Mexique où l'espèce la plus fréquente est *S. flexneri* (61,3 %), suivie de *S. sonnei* (26 %), de *S. dysenteriae* (6,4%) et *S. boydii* (6,2 %) (9). Au Brésil, à Fortaleza, la fréquence relative des isollements montre la prédominance de *S. flexneri* (73%), précédant *S. sonnei* (16 %), *S. boydii* (7 %) et *S. dysenteriae* (4 %) (19). En Espagne, prédomine *S. sonnei* (86,1%), suivie de *S. boydii* (7,3 %), de *S. flexneri* (5,9 %) et de *S. dysenteriae* (0,7 %) (4) comme au Canada, en Ontario (12) et en Suède à Malmö (11). La répartition relative des différentes espèces de *Shigella* est dans notre série comparable aux données globales retrouvées en Argentine et correspond à celle d'un pays en développement.

La shigellose peut se présenter sous forme de cas isolés ou dans un contexte épidémique éventuellement à partir d'une même source (18, 20). Cette affirmation nécessite le recours à des marqueurs avant d'affirmer qu'il y a une certaine similarité entre les souches impliquées. Comme marqueurs, on a recours à l'étude des caractères phénotypiques et génotypiques des bactéries, en explorant de manière séquentielle tout d'abord les marqueurs phénotypiques, puis génotypiques afin de différencier entre elles ces souches présentant d'importantes similitudes phénotypiques.

Dans ce travail, la majorité des souches étudiées ont été *S. flexneri* de type 2; cette espèce et ce type arrivent en tête des isolats obtenus au niveau national en Argentine (3); ceci justifie le recours à différents marqueurs pour distinguer les souches entre elles au sein de cette espèce et de ce sérotype.

Le profil de résistance aux antibiotiques a été employé par divers auteurs en tant que marqueur épidémiologique pour étudier les souches de *Shigella*, mais les antibiotiques considérés comme discriminants changent selon les études (5, 13). Dans la présente étude, nous avons sélectionné différents antibiotiques pour typer les souches de *S. flexneri* et de *S. sonnei* en accord avec divers schémas de susceptibilité trouvés pour les deux espèces. Mais si les antibiotypes ont permis de sous-diviser les souches étudiées en plusieurs groupes, elle est apparue insuffisante (6s, 13f, 14f, 12f). Aussi, a-t-on eu recours au typage par les bactériocines pour compléter la distinction entre les souches. Différents auteurs ont utilisé celles-ci comme marqueurs dans des études épidémiologiques (10, 14, 22, 24). Dans le présent travail, l'application de la bactériocinotypie, en combinaison avec l'antibiotype, a permis une bonne discrimination au sein des souches d'un même sérotype et d'un même profil de résistance aux antibiotiques. Il est nécessaire de connaître l'index de discrimination pour chaque marqueur afin de pouvoir définir la combinaison de marqueurs la plus utile pour distinguer les souches non reliées entre elles.

Conclusion

Les résultats obtenus indiquent qu'aucune des méthodes de typage n'est à elle seule suffisamment discriminante, ce n'est qu'à la faveur de combinaisons de marqueurs que l'on peut obtenir une bonne discrimination des souches au sein du genre *Shigella*.

Références bibliographiques

1. ABER RC & MACKEL DC - Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. *Am J Med*, 1981, **70**, 899-905.
2. BRANSON D - Tipificación con bacteriocinas. En: *Métodos en Bacteriología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, 1974, 89-96.
3. CAFFER MI, BRUNO S, ALCAIN A, PANAGOPULO M, ROYER A *et al.* - Evolución de Salmonella y Shigella en el período 1995-1997. Resumen C-23. VII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, 1998.
4. CASTILLO FJ, CARRANZA E, CLAVEL A, RUBIO MC & GÓMEZ LUS R - Epidemiología de la shigelosis y colicín tipia de *Shigella sonnei*. Un estudio de 14 años. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1991, **9**, 530-536.
5. COSTABELLA C, MUÑOZ V, BOGDANOV P, ALBESA I & CARABAJAL L - Estudio de bacteriocinas, hemolisinas y resistencia antibiótica en *Shigella spp.* aisladas del Hospital de Niños de Córdoba, Argentina. Resumen A-47. VII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina, 1998.
6. DUPONT HL - Especies de *Shigella* (Disentería bacilar). En: MANDRELL GL, BENNETT JE & DOLIN R (Eds), *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1997, pp. 2276-2283.
7. EISENSTEIN BI - New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis*, 1990, **161**, 595-602.
8. GARCÍA QUINTANA H - Mecanismos de la actividad antibiótica de las bacteriocinas. *Rev Med Chil*, 1992, **120**, 439-444.
9. GUTIERREZ COGCO L, GONZALEZ BONILLA C & FIGUEROA ARREDONDO P - Análisis de 1185 cepas de *Shigella* aisladas en México desde 1982 a 1993. *Rev Latinoam Microbiol*, 1994, **36**, 227-230.
10. HALTALIN KC, WOODMAN E & NELSON JD - Colicin types of *Shigella sonnei* in relation to antibiotic resistance. *J Infect Dis*, 1975, **132**, 307-315.
11. HANSSON HB, WALDER M & JUHLIN I - Susceptibility of shigellae to mecillinam, nalidixic acid, trimethoprim, and five other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1981, **19**, 271-273.
12. HARNETT N - High level resistance to trimethoprim, cotrimoxazole and other antimicrobial agents among clinical isolates of *Shigella* species in Ontario, Canada - an update. *Epidemiol Infect*, 1992, **109**, 463-472.
13. HELGASON S & OLD DC - Comparison of four methods of differential typing of isolates of *Shigella sonnei*. *J Hyg (Lond)*, 1984, **87**, 339-355.
14. HORAK V - Seventy colicin types of *Shigella sonnei* and an indicator system for their determination. *Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis*, 1994, **281**, 24-29.
15. HREŇUK GE, MERINO LA, ALONSO JM & RONCONI MC - Obtención de una colección de cepas para tipado epidemiológico por bacteriocinas. *Comunic Cientif Technolog (EUDENE)*, 1998, **11**, 155-158.
16. HUNTER PR & GASTON MA - Numerical index of the discriminatory ability of typing systems. An application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 1988, **26**, 2465-2466.
17. KONEMAN EW, ALLEN SD, DOWELL VR, JANDA WM, SOMMERS HM & WINN WC. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 1992, pp. 268-316.
18. LEVY DA, BENS MS, CRAUN GF, CALDERON RL & HERWALDT BL - Surveillance for waterborne-disease outbreaks. United States, 1995-1996. *Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ*, 1998, **47**, 1-94.
19. LIMA AA, LIMA NL, PINHO MC, BARROS JUNIOR EA, TEIXEIRA MJ *et al.* - High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, **39**, 256-259.
20. MORERA MA, ESPEJO E, COLL P, SIMÓ M, URIZ MS *et al.* - Brote epidémico de shigelosis por ingesta de agua. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1995, **13**, 160-165.
21. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 8 ed. NCCLS document M2A6. 1998. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
22. PITT TL & GASTON MA - Bacteriocin typing. *Meth Mol Biol*, 1995, **46**, 5-14.
23. TOMPKINS LS - The use of molecular methods in infectious disease. *New Engl J Med*, 1992, **29**, 1290-1297.
24. VLAJINAC H & KRAJINOVIC S - Colicine production as an epidemiological marker for *Shigella sonnei*. *J Hyg (Lond)*, 1983, **91**, 273-276.