

## Apport de la lysotypie et de la ribotypie dans l'investigation d'une épidémie de fièvre typhoïde en Tunisie.

O. Bouallègue (1)\*, F. Grimont (2), Y. Ben Salem (1), A. Letaief (3) & R. Mzoughi (1)

(1) Laboratoire de microbiologie, immunologie. Hôpital Farhat Hached, Sousse, Tunisie.

\* Correspondance : Docteur Olfa Bouallègue, Rue Bulla Regia, Sahloul 1, 4054 Sousse, Tunisie. Tél/Fax : 00 216 3 367 937 e-mail : olfabouallegue@yahoo.fr

(2) Unité de biodiversité des bactéries pathogènes émergentes, Unité INSERM 389, Institut Pasteur, F-75724 Paris Cedex 15, France.

(3) Service de maladies infectieuses. Hôpital Farhat Hached, Sousse, Tunisie.

Courte note n° 2504. "Bactériologie". Reçue le 10 décembre 2002. Acceptée le 13 novembre 2003.

**Summary:** Contribution of phage typing and ribotyping in investigating a typhoid fever outbreak in Tunisia.

A study was carried out to investigate an outbreak of typhoid fever that occurred in Sousse city and in the vicinity of Sousse (Tunisia) during summer 1999. Twenty four isolates of *Salmonella enterica* sérotype Typhi were isolated in hospitalized patients with a typhoid fever in two hospitals (Farhat Hached Sousse and M'saken) and were studied with the help of two molecular typing methods: phage typing and automated ribotyping. Twenty one isolates with the Vi antigen had profile DVS (Degraded Vi Strain), one isolate with the Vi antigen belonged to phage type A and two isolates were non phage typable (no Vi antigen). The same ribotype was found in 22 out of 24 isolates. The results suggested that ribotyping is more discriminative than phage typing in this case in distinguishing strains and the strains shared the same source of the contamination.

Unfortunately, the precise source of the contamination could not be determined.

**Résumé:**

Une investigation a été menée sur une épidémie de fièvre typhoïde, survenue dans la région de Sousse (Tunisie) durant l'été 1999. Vingt-quatre souches de *Salmonella enterica* sérotype Typhi ont été isolées chez des patients hospitalisés pour une fièvre typhoïde dans deux hôpitaux (Farhat Hached à Sousse et M'saken) et ont été étudiées à l'aide de deux techniques de typage moléculaire, la lysotypie et la ribotypie. Vingt et une souches avaient l'antigène Vi et un profil DVS (Degraded Vi Strains), une souche avait l'antigène Vi et appartenait au lysotype A et deux souches étaient non lysotypables (pas d'antigène Vi). Le même profil de ribotypie a été retrouvé sur 22 souches parmi les 24. Les résultats suggèrent que la ribotypie s'est révélée plus discriminante que la lysotypie dans ce cas et que la source de contamination était commune.

Malheureusement, son origine précise n'a pu être déterminée.

outbreak  
typhoid fever  
phage typing  
ribotyping  
*Salmonella enterica* sérotype Typhi  
Sousse  
Tunisia  
Maghreb  
Northern Africa

épidémie  
fièvre typhoïde  
lysotypie  
ribotypie  
*Salmonella enterica* sérotype Typhi  
Sousse  
Tunisie  
Maghreb  
Afrique du Nord

## Introduction

La fièvre typhoïde pose encore un important problème de santé publique dans les pays en voie de développement, du fait des taux élevés de morbidité et de mortalité.

En Tunisie, cette maladie sévit encore à l'état endémique, surtout dans les régions rurales, avec une incidence faible d'environ 5 pour 100 000 habitants et avec de possibles pics épidémiques (1).

A la suite de l'isolement, durant l'été 1999, d'un nombre élevé et regroupé dans le temps de souches de *Salmonella enterica* sérotype Typhi et afin de confirmer une source unique de contamination à l'origine de cette épidémie, nous avons procédé à son exploration rétrospective par la comparaison des souches bactériennes isolées en utilisant deux techniques qui sont reconnues comme étant performantes : la lysotypie, méthode classique, et la ribotypie, technique permettant d'obtenir des

profils de restriction correspondant aux gènes codant les ARN ribosomaux (3).

## Matériels et méthodes

### Patients

Tous les patients ont été hospitalisés pour suspicion de fièvre typhoïde dans deux hôpitaux (Farhat Hached et M'saken, tous deux situés dans la ville de Sousse et de sa région, en Tunisie), durant la période de juillet à septembre 1999. L'âge moyen des patients est de 24,4 ans avec des extrêmes de 5 et 49 ans. Le sex-ratio des patients est de 1,4 en faveur des hommes.

### Souches bactériennes

Toutes les souches de *Salmonella enterica* sérotype Typhi proviennent de 24 patients dont le diagnostic de fièvre typhoïde a été suspecté cliniquement : vingt-trois souches proviennent

d'hémoculture et une seule de coproculture chez un malade dont l'hémoculture et le sérodiagnostic se sont révélés négatifs.

## Méthodes

L'isolement et l'identification ont été réalisés selon les méthodes conventionnelles. (galerie API 20E, BioMérieux, France) et complétée par la sérotypie réalisée selon le schéma de Kauffmann-White, avec des sérums anti-antigènes O, H et Vi (BIO-RAD).

### Lysotypie

La lysotypie a été effectuée sur des souches possédant l'antigène Vi avec le système de Craigie et Yen, standardisé et distribué par le Central Public Health Laboratory à Londres (Royaume Uni).

### Ribotypie

La ribotypie a été réalisée avec le RiboPrinter® (Dupont-Qualicon, Wilmington, DE, États-Unis et Oxoid, Dardilly, France), en utilisant l'endonucléase *Pst*I afin de comparer les ribotypes à ceux de la base de données de l'Unité de biodiversité des bactéries pathogènes émergentes.

L'analyse des profils sur ordinateur a été effectuée à l'aide du logiciel Taxotron (Institut Pasteur, Paris, France). Un dendrogramme a été réalisé par la méthode UPGMA (*Unweighted pair group method of averages*). Une tolérance de 6 % dans la taille des fragments a été acceptée.

## Résultats

Vingt-quatre souches de *Salmonella* Typhi, isolées pour la plupart en août et septembre 1999 (22 sur 24 souches), ont été étudiées.

La lysotypie a été réalisée uniquement sur les 22 souches possédant l'antigène Vi. Parmi elles, 21 avaient le profil DVS (Degraded Vi Strain) et une appartenait au lysotype A (souche N° 22) (figure 1).

Les profils de ribotypie, obtenus après digestion avec l'endonucléase *Pst*I et hybridation avec une sonde constituée de 5 oligonucléotides marqués à la digoxigénine, ont été analysés, puis schématisés (figure 1). Vingt-deux souches provenant d'hémoculture avaient un profil identique. Selon la base de données de ribotypie de l'Unité de biodiversité des bactéries pathogènes émergentes, elles appartenaient au ribotype TP 26a. Ce même profil a d'ailleurs été retrouvé chez d'autres souches isolées en France à la même période de malades ayant séjourné en Tunisie, et reçues au Centre national de référence des *Salmonella* (résultat non communiqué). La souche N° 17, provenant d'une hémoculture, présentait le ribotype TP 34. La souche N° 22, isolée de la coproculture réalisée à partir

des selles d'un patient atteint de fièvre typhoïde, était de ribotype TP 144 (figure 1).

## Discussion

Au cours de cette épidémie, aucune investigation bactériologique effectuée par le Service régional d'hygiène pendant et après l'épidémie n'a permis d'identifier le mode et la source de contamination.

Toutefois, la lysotypie et la ribotypie ont montré que, parmi les 24 souches de *S. Typhi* isolées, 22 avaient le même ribotype TP 26a et 21 avaient un profil DVS, ce qui est en faveur d'une source de contamination commune.

La lysotypie est restée peu discriminante car 21 souches avaient un profil DVS. Cette technique ne peut fournir d'informations épidémiologiques fiables que lorsque le profil lysotypique appartient à un type déjà connu. Son utilisation comme seul marqueur épidémiologique est donc insuffisante et l'emploi de nouvelles techniques de biologie moléculaire, telles que l'électrophorèse en champ pulsé ou la ribotypie, est désormais indispensable (2).

La ribotypie, technique que nous avons choisie, s'est révélée être très discriminante pour le sérotype Typhi et a permis d'établir une base de données pour le Centre national de référence des salmonelloses.

Ainsi, une même souche épidémique de ribotype 26a a été retrouvée parmi 22 souches durant une période de 2 mois. Selon la base de données de ribotypie de l'Unité de biodiversité des bactéries pathogènes émergentes, le ribotype 26a a été rencontré chez 6,9 % des souches.

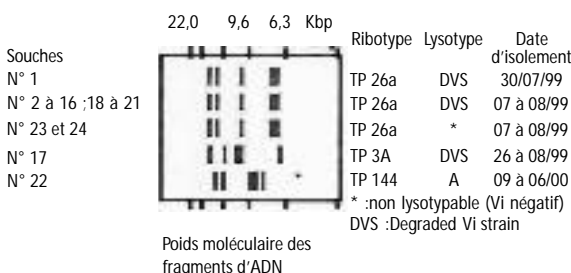
Des changements de sites de restriction au niveau des différentes copies du gène de l'ARN ribosomal peuvent être détectés par ribotypie, c'est le cas ici pour la souche N° 17 (4), ce qui expliquerait sa différence génotypique (ribotype TP 34) par rapport à la souche épidémique. Par ailleurs, pour la souche N° 22, isolée des selles d'un autre cas de fièvre typhoïde survenu huit mois après l'épidémie, le lysotype (A) et le ribotype (TP144) sont complètement différents: il s'agit donc d'un cas sporadique.

## Conclusion

Ainsi, bien que la lysotypie et surtout la ribotypie démontrent l'unicité de la souche contaminante de *Salmonella* Typhi, en révélant un même profil dominant, ces techniques ne permettent cependant pas de préciser la source de l'épidémie. Le laboratoire de bactériologie peut donc utiliser ces outils afin de contribuer à servir l'enquête épidémiologique de terrain et renforcer le travail de collaboration entre microbiologistes, épidémiologistes et cliniciens.

Figure 1.

Caractéristiques des 24 souches de *Salmonella enterica* sérotype Typhi (représentation schématique des ribotypes, lysotypes et date d'isolement).  
Characteristics of 24 isolates of *Salmonella enterica* sérotype Typhi (sketch of ribotypes and lysotypes, and isolation date).



## Références bibliographiques

- BOUZOUAIA N, BEN SALEM N & TIOURI H - La fièvre typhoïde en Tunisie : épidémiologie, traitement et prophylaxie. *Méd Hyg*, 1986, **44**, 577-584.
- CONNERTON P, WAIN J, HIEN TT, ALI T, PARRY C *et al.* - Epidemic typhoid in Vietnam: molecular typing of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhi from four outbreaks. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**, 895-897.
- GRIMONT F & GRIMONT PAD - Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur / Microbiol*, 1986, **137B**, 165-175.
- GRIMONT PAD, GRIMONT F & BOUVET PJM - *Salmonella*. In: FRENEY J, RENAUD F, HANSEN W, BOLLET C (Eds), *Précis de Bactériologie Clinique*, Editions ESKA 2000, Paris, 2000, pp 1137-1156.