

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de la fibrose kystique par différentes méthodes de typage**

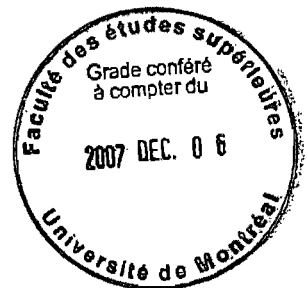
Par  
Anouar Hafiane

Département des Sciences Biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc)  
en Sciences biomédicales

Juillet, 2007

© Anouar Hafiane, 2007



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
« **Caractérisation des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de la fibrose kystique par différentes méthodes de typage** »

Présenté par :  
Anouar Hafiane

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

---

Dr Paul Bayardelle (Président-rapporteur)

---

Dr Madeleine Ravaoarino (Directrice de recherche)

---

Dr George Szatmari (Membre du jury)

## RÉSUMÉ

*Pseudomonas aeruginosa* est la bactérie la plus pathogène au cours des infections pulmonaires chez les personnes atteintes de fibrose kystique (PFK). Au fur et à mesure que l'infection se prolonge chez ces patients, cet organisme a l'opportunité de s'adapter à son environnement et de changer son phénotype sans altérer son génotype. Dans ces conditions, le typage de *P. aeruginosa* constitue un défi particulier pour les méthodes de typage conventionnelles. Plusieurs profils sont obtenus à partir de ces méthodes, le plus commun est celui des souches non sérotypables. Afin de faciliter le typage de 60 souches non répétitives de *P. aeruginosa* isolées des PFK, leur antibiotype, leur biotype et leur sérotype ont été d'abord caractérisés. Ensuite une méthode d'amplification arbitraire des fragments polymorphiques d'ADN (RAPD) a été mise au point, pour comparer les phénotypes des souches non sérotypables ( $n = 35$ ). L'analyse RAPD de ces souches a permis de démontrer la présence de 30 souches avec des génotypes uniques. Les génotypes similaires sont répartis sur deux petits groupes clonaux (6% et 8%) pour chaque amorce. Aucune corrélation significative n'a été observée entre les profils RAPD et les antibiogrammes, ni entre les antibiogrammes et les morphotypes. La RAPD-PCR est utile dans le typage de routine de ces souches. Les résultats montrent aussi que l'infection croisée entre les patients partageant les mêmes génotypes est possible.

### MOTS-CLÉS :

Antibiotype; Biotypage; Fibrose kystique; *Pseudomonas aeruginosa*; RAPD; Sérotypage.

## SUMMARY

*Pseudomonas aeruginosa* is the most pathogenic bacterium found during pulmonary infections in cystic fibrosis patients (CFP). As infection evolves in these patients, strains of this organism have ample opportunity to adapt to their environment and change their phenotype without altering their genetic background. Under such conditions, typing of *P. aeruginosa* strains is a particular challenge for conventional typing methods. Several profiles were obtained from these methods, most common is that of the non serotypable strains. In order to facilitate typing of 60 non repetitive strains of *P. aeruginosa* recovered from CFP; antibiotype, biotype and serotype were initially characterized. Then a random amplified polymorphic DNA (RAPD) was developed, to establish the relatedness between phenotype profiles of non serotypable strains ( $n = 35$ ). RAPD typing allowed us to establish 30 distinct genotypes. Similar genotypes were observed on two small clonal groups (6% and 8%), with each primer. Antibiotype differences were not associated with differences of RAPD profiles and no relation was found between antibiotype and biotype. RAPD-PCR is a useful tool in the routine typing of these strains. Our analysis also revealed that cross-infection might be possible among patients harbouring the same genotype.

## KEY WORDS:

Antibiotyping; Biotyping; Cystic fibrosis; *Pseudomonas aeruginosa*; RAPD; Serotyping.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>PAGE TITRE</b> .....	<b>i</b>
<b>IDENTIFICATION DES MEMBRES DE JURY</b> .....	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>iii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>x</b>
<b>DÉDICACE</b> .....	<b>xii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>xiii</b>
 <b>PREMIÈRE PARTIE:</b>	
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>2</b>
 <b>CHAPITRE I: ARTICLE 1</b>	
<b>MÉTHODES DE PHÉNOTYPAGE ET GÉNOTYPAGE DES SOUCHES DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ISOLÉES DES PATIENTS ATTEINTS DE FIBROSE KYSTIQUE</b> .....	<b>5</b>
1.1 RÉSUMÉ .....	7
1.2 INTRODUCTION .....	8
1.3 IDENTIFICATION DU PATHOGÈNE.....	10
1.3.1 Taxonomie .....	10
1.3.2 Caractéristiques.....	10
1.3.3 Rôle des facteurs de virulence dans le typage de <i>P. aeruginosa</i> .....	11
1.4 MÉTHODES DE PHÉNOTYPAGE .....	11
1.4.1 Biotypage .....	11
1.4.2 Sérotypage.....	12
1.4.3 Antibiotypage.....	13

1.4.4 Mécanismes de résistance chez <i>P. aeruginosa</i> .....	14
1.4.5 Lysotypie.....	15
1.4.6 Pyocinotypie.....	16
1.5 MÉTHODES DE GÉNOTYPAGE.....	17
1.5.1 Méthodes basées sur la non amplification de l'acide nucléique .....	18
1.5.1.1 PFGE .....	18
1.5.1.2 RFLP .....	19
1.5.1.3 Ribotypage .....	20
1.5.2 Méthodes basées sur l'amplification de l'acide nucléique.....	21
1.5.2.1 RAPD .....	21
1.5.2.2 Rep-PCR .....	23
1.5.2.3 MLST .....	24
1.6 CONCLUSION.....	25
1.7 RÉFÉRENCES.....	27
1.8 TABLEAUX .....	39

## **DEUXIÈME PARTIE:**

<b>MATÉRIELS, METHODES ET RÉSULTATS .....</b>	<b>41</b>
---	-----------

### **CHAPITRE II: ARTICLE 2**

#### **CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS ISOLATED FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS BY DIFFERENT**

<b>TYPING METHODS.....</b>	<b>42</b>
2.1 ABSTRACT.....	44
2.2 INTRODUCTION .....	45
2.3 MATERIALS AND METHODS.....	46
2.3.1 Bacterial strains and culture.....	46
2.3.2 Biotyping.....	46
2.3.3 Serotyping techniques .....	46
2.3.4 Antibiotic susceptibility tests with the VITEK 2 system.....	47
2.3.5 Isolation of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> genomic DNA.....	48

2.3.6 RAPD analysis .....	48
2.4 RESULTS .....	50
2.4.1 Colony morphology .....	50
2.4.2 Distribution of serotypes .....	50
2.4.3 Antimicrobial susceptibility testing .....	50
2.4.4 Genotype incidence .....	50
2.5 DISCUSSION .....	52
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS .....	56
2.7 REFERENCES .....	57
2.8 TABLES .....	61
2.9 FIGURES .....	63
<b>TROISIÈME PARTIE: DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>75</b>
<b>CHAPITRE III: DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....</b>	<b>76</b>
3.1 DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	77
3.2 PERSPECTIVES .....	81
<b>CHAPITRE IV: BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE .....</b>	<b>82</b>



**LISTE DES TABLEAUX****CHAPITRE I**

Tableau I. Résumé des caractéristiques des méthodes de phénotypage des souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées des PFK.....	39
Tableau II. Résumé des caractéristiques des méthodes de génotypage des souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées des PFK.....	40

**CHAPITRE II**

Table I. Phenotyping results of <i>P. aeruginosa</i> isolates from CFP .....	61
Table II. Phenotyping and genotyping results of <i>P. aeruginosa</i> isolates from CFP .....	62

**LISTE DES FIGURES****CHAPITRE II**

Fig 1. Reproducibility of RAPD-PCR fingerprinting of <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	64
Fig 2. Reproducibility tests of clinical strains.....	66
Fig 3. RAPD-PCR amplification patterns with primer 272 .....	68
Fig 4. RAPD-PCR amplification patterns with primer 208 .....	70
Fig 5. Similar RAPD-PCR profiles of <i>P. aeruginosa</i> strains with primer 272 .....	72
Fig 6. Similar RAPD-PCR profiles of <i>P. aeruginosa</i> strains with primer 208.....	74

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomale
Alg D	Alginate D
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATCC	"American Type Culture Collection"
CFP	Cystic Fibrosis Patients
CFU	"Colony forming units"
CMI	Concentration minimale inhibitrice
dNTP	Désoxynucléoside triphosphate
Da	Dalton
ERIC	"Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus"
Exo A	Exotoxine A
FK	Fibrose kystique
g	Gramme
h	Heure
L	Litre
kb	Kilobase
LPS	Lipopolysaccharide
MLST	"Multi locus sequence typing"
M	Muqueux
MRI	"Multi resistant isolates"
Mg	Milligramme
min	Minute
mM	Millimolaire
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
NCCLS	"National Committee for Clinical Laboratory Standards"
NA	Non agglutinable
ng	Nanogramme

PFK	Personnes atteintes de fibrose kystique
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> O1
PFGE	"Pulsed field gel electrophoresis"
PA	Polyagglutinable
PV	Pyoverdine
PC	Pyocianine
PLC	Phospholipase C
RAPD	"Random amplified polymorphism DNA"
RFLP	"Restriction fragment length polymorphism"
Rep-PCR	"Repetitive element based PCR"
R	Rugueux
Re	Red
S	Smooth
sec	Seconde
Si	Similaire
TBE	Tris Borate EDTA
UV	Ultra Violet
v/v	volume/volume
V	Volt
w/v	weight /volume
μl	Microlitre
μm	Micrometre
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage

## DÉDICACE

À la mémoire de mon père, Jilani Ben Saïd Hafiane.

## REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à remercier le Dr Madeleine Ravaoarinoro ma directrice de recherche, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour m'avoir initié à la recherche scientifique.

En second, je remercie les membres du département de microbiologie infectiologie du CHUM, Hôtel-Dieu de Montréal, Québec, Canada, pour leur accueil et leur gentillesse.

Mes remerciements vont aussi à mes amis à qui j'ai assailli des questions : Ridha Smati (laboratoire du Docteur Abdalla Belmaaza), Mohammadi Kaouass (laboratoire du Dr Danuta Baliki), Larbi Krimbou (laboratoire du Dr Genest).

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à tous les personnels du centre de documentation du CHUM et du service informatique du CHUM, pour leur soutien.

Enfin, je souhaite exprimer ma gratitude à mes frères et sœurs et mes parents qui m'ont encouragé dans mes efforts.

Merci pour vos encouragements, et soyez assuré de toute mon estime et de mon profond respect.

**PREMIÈRE PARTIE:**  
**INTRODUCTION GÉNÉRALE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



*Pseudomonas (P). aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste responsable de 90% de morbidité et mortalité chez les personnes atteintes de fibrose kystique (PFK) (Fink et *al.*, 1992). Au cours de l'évolution de l'infection chez les PFK, plusieurs souches de ce pathogène montrent des phénotypes de nature diverse. Cette diversité est le résultat de la synthèse de plusieurs phénotypes, notamment un LPS rugueux, la production d'un expolysaccharide muqueux et la perte de pigmentation (Penketh et *al.*, 1983; Hoiby et *al.*, 1980; Mahenthiralingham et *al.*, 1996). Dans ces conditions, *P. aeruginosa* a fréquemment tendance à perdre les réponses au typage par des phages, des pyocines, de l'antigène lipopolysaccharide (LPS) et à devenir souvent résistant à plusieurs antibiotiques (Ojeniyi et *al.*, 1994). Ceci rend impossible le typage d'un grand nombre de souches et entraîne la perte de ces marqueurs épidémiologiques habituellement utilisés. Le cas le plus souvent rapporté est celui des souches non sérotypables associées à la disparition de l'antigène LPS spécifique (Penketh et *al.*, 1983; Soler et *al.*, 2002). Ainsi, les méthodes de typage conventionnelles sont limitées par leur faible pouvoir discriminatoire et reproductibilité. Elles sont incapables de distinguer les souches possédant des phénotypes distincts mais de génotype unique. Les difficultés du typage relatif à ces méthodes ont été souvent rapportées chez les PFK.

Plusieurs méthodes hautement discriminatoires dérivées de la biologie moléculaire ont été proposées ces dernières années pour caractériser ces souches. Cependant, l'application de routine d'une méthode de typage moléculaire reste encore limitée. La plupart de ces méthodes ne sont généralement disponibles que dans des laboratoires spécialisés. De ce fait, le développement d'une méthode de typage moléculaire rapide et fiable pour le typage de ce pathogène est nécessaire (Elaichouni et *al.*, 1994; Speert, 2002; Syrmis et *al.*, 2004).

Dans la présente étude, nous avons mis au point une méthode d'amplification arbitraire de fragments polymorphes d'ADN (RAPD) afin de comparer le biotype, l'antibiogramme et le génotype des souches. Pour ce faire, soixante souches non répétitives de *P. aeruginosa* isolées chez des PFK de janvier à février 2005 au

laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Hôtel-Dieu du CHUM ont été retenues. Ces souches ont fait d'abord l'objet d'un phénotypage selon trois méthodes conventionnelles: le biotypage, le sérotypage et l'antibiotypage. Ensuite, les souches non sérotypables feront l'objet d'un typage par (RAPD-PCR).

Le présent travail vise à:

- 1- Déterminer les profils de chaque souche par chaque méthode de typage
- 2- Mettre en évidence les limites de chaque méthode de typage en évaluant la corrélation possible entre les phénotypes et les génotypes
- 3- Interpréter les génotypes similaires

Nous avons essayé également de discuter les risques d'infection croisée entre ces PFK. Les données générées par cette étude permettront également de conclure sur la possibilité d'implanter la RAPD-PCR ainsi développée dans un laboratoire de routine.

Ce mémoire présenté sous forme d'articles, comporte trois parties: la première partie présente une revue de littérature dans laquelle nous aborderons une brève présentation et discussion de diverses méthodes souvent utilisées pour le typage des souches de *P. aeruginosa* associées à la FK avec une attention particulière sur les nouvelles méthodes moléculaires. La deuxième partie présentera les résultats de typage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK par différentes méthodes. Enfin, une discussion générale pour une synthèse de l'étude est incluse dans la troisième partie.

**CHAPITRE I: ARTICLE 1**


**MÉTHODES DE PHÉNOTYPAGE ET GÉNOTYPAGE DES SOUCHES DE  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLÉES DES PATIENTS ATTEINTS DE  
FIBROSE KYSTIQUE**

**Méthodes de phénotypage et génotypage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de fibrose kystique**

Hafiane Anouar, Ravaoarino Madeleine

Département de Microbiologie et Infectiologie, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain, Montréal, Québec, H2W 1T8  
Canada

Adresse de correspondance: Madeleine Ravaoarino, Département de Microbiologie et infectiologie, CHUM-Hôtel-Dieu & Centre de recherche du CHUM, Montréal, Québec, H2W 1T8, Canada. Téléphone 514-890-8175, Fax 514-412-7240.

E-mail 

**Soumis à**

**Médecine et Maladies Infectieuses**

## 1.1 RÉSUMÉ

Les méthodes de typage sont essentielles pour comprendre l'épidémiologie des infections bactériennes. Le typage des souches est important pour détecter les voies et la source de l'infection, connaître les souches épidémiques et endémiques et prévenir la transmission de l'infection entre les patients. Pour les souches de *P. aeruginosa* isolées chez les PFK, le problème réside dans le fait que plusieurs souches sont non typables avec les méthodes conventionnelles. À cause de la nature diversifiée du phénotype de *P. aeruginosa*, ces méthodes ne sont pas suffisamment discriminatoires pour identifier les souches génétiquement similaires. À cet égard, les méthodes de typage moléculaires sont nécessaires. Les méthodes moléculaires développées depuis la dernière décennie, se distinguent par leur pouvoir discriminatoire élevé, et leur reproductibilité. L'application de ces méthodes a permis sans doute de mieux définir l'épidémiologie de ce pathogène et de concevoir des politiques plus rationnelles dans le contrôle de l'infection bactérienne chez les PFK. Cependant, elles sont coûteuses et laborieuses et leur application n'est plus souvent possible que dans des laboratoires spécialisés. En effet, ces méthodes devraient être adoptées surtout quand l'analyse des données du phénotypage devient ambiguë comme c'est le cas dans la fibrose kystique (FK). La comparaison entre les différentes méthodes moléculaires fréquemment appliquées dans le typage de *P. aeruginosa* associées à la FK pourra nous aider à faire le point sur les limites de chaque méthode. La connaissance des caractéristiques des différents méthodes pourra améliorer le choix du laboratoire non spécialisé en terme de simplicité, et fiabilité.

**Mots-clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, Fibrose kystique, Phénotypage, Génotypage

## 1.2 INTRODUCTION

L'infection récurrente et chronique des poumons par *P. aeruginosa* est la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les PFK [1]. Les souches de ce pathogène, isolées au niveau des voies respiratoires chez les PFK, ont souvent tendance à acquérir des phénotypes particuliers qui ne sont pas communs dans l'environnement. L'étude de ces souches par des méthodes de typage conventionnelles révèle fréquemment des souches non typables qui ont perdu les réponses spécifiques aux marqueurs phénotypiques classiques : l'antigène LPS, la sensibilité aux bactériophages et la production de la pyocine [2, 3]. En effet, au cours de l'évolution de l'infection chez les PFK, *P. aeruginosa* produit des phénotypes altérés qui affectent la stabilité du marqueur phénotypique appliqué et diminue son pouvoir discriminatoire [14, 19]. Malgré ces limites, le phénotypage aide à l'identification de l'espèce *P. aeruginosa* [4], et à la surveillance des souches résistantes ou celles possédant des phénotypes particuliers [5, 6]. Cependant, la distinction entre les souches nécessite l'application des méthodes basées sur l'ADN [7, 8]. En effet, l'approche du phénotypage continue à exister encore dans les laboratoires cliniques même après l'avènement des méthodes de typage moléculaires. Récemment, plusieurs méthodes moléculaires ont émergé dans le typage des souches *P. aeruginosa* isolées des PFK.

Ces méthodes sont basées sur l'analyse de l'ADN génomique, peuvent être divisées en deux groupes majeurs: le 1<sup>er</sup> groupe est basé sur la technologie d'amplification de l'acide nucléique par PCR (*polymerase chain reaction*) : RAPD (*random amplified polymorphism DNA*) [9], Rep-PCR (*repetitive element based PCR*) [10] et la MLST (*multilocus sequence typing*) [11]. Le 2<sup>ème</sup> groupe est basé sur la non amplification de l'acide nucléique: la méthode PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) [12], ribotypage [13] et la RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) [14]. Les méthodes basées sur l'ADN ainsi énumérées possèdent un pouvoir discriminatoire suffisant pour distinguer les isolats génétiquement semblables mais qui possèdent différents phénotypes. Cependant, ces méthodes ont tendance à être laborieuses et probablement non appropriées à la routine.

Cette revue propose de discuter diverses méthodes souvent utilisées pour le typage des souches de *P. aeruginosa* associées à la FK (Tableaux I, II). Considérant que, plusieurs méthodes de typage ont été employées, la discussion sera limitée aux méthodes largement appliquées.

## 1.3 IDENTIFICATION DU PATHOGENE

### 1.3.1 Taxonomie

L'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* du latin *aeruginosus* appartient au genre *Pseudomonas* dans la famille des *Pseudomonadaceae*. Cette espèce est aussi appelée bacille pyocyanique. La position phylogénétique de cette bactérie appartient aux eubactéries, à la classe des protéobactéries qui regroupe un grand nombre de bactéries à Gram négatif aérobies ou anaérobies facultatives [15]. Les techniques de PCR basées sur l'analyse des séquences ribosomales 16S de l'ADN (ADNr) [16], ont permis de classer d'autres genres renfermant des espèces autrefois placées dans le genre *Pseudomonas*, comme le transfert de *P. maltophilia* au genre *Stenotrophomonas* [17]. Bien que la taxonomie du genre *Pseudomonas* ait progressé de façon constante grâce aux techniques de biologie moléculaire, l'identification de l'espèce n'indique pas souvent sa phylogénie précise [18].

### 1.3.2 Caractéristiques

*P. aeruginosa*, un bacille gram négatif en forme de bâtonnet de 0.5 à 0.8 µm de diamètre sur 1 à 3 µm de long, mobile grâce à une flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules et possède une oxydase positive. Comme la majorité des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. C'est un germe doté d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. *P. aeruginosa* peut être isolé en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par l'addition d'inhibiteur tel le cétrimide. La température optimale de croissance est comprise entre 30°C et 37°C. L'incubation se fait en milieu aérobie strict. Aucune culture n'est obtenue à 4°C ou à 46°C [19]. Les cultures dégagent une odeur caractéristique, produisant le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine, à l'encontre des isolats objectivés chez les PFK qui montrent le plus souvent une perte de pigmentation [9, 20].



### 1.3.3 Rôle des facteurs de virulence dans le typage de *P. aeruginosa*

La pathogénicité de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de plusieurs facteurs de virulence, hautement induits dans l'infection [15]. Ainsi, basé sur la conservation des différents facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*, les gènes codant pour leur expression ont été utilisés dans le but d'évaluer et de développer des techniques de typage sensibles et spécifiques [21]. De telles techniques sont basées sur l'isolation de l'ADN, l'amplification de l'ADN par PCR et l'application des sondes d'ADN. Parmi ces méthodes on trouve l'analyse des plasmides [22], et la MLST [11], ou celles utilisant des gènes codant pour l'alginate, l'élastase [13], la piline [23], ou pour l'exotoxine A (*exoA*) [14]. Par ailleurs, d'autres méthodes de typage qui explorent différents facteurs de virulence à la surface bactérienne ont été utilisées. On trouve le plus souvent le typage basé sur l'antigène LPS [24], la production des pyocines [25] et la sensibilité aux phages [26]. L'ensemble de ces facteurs de virulence permet à la bactérie de déjouer les défenses de l'hôte, et le développement de l'infection.

## 1.4 Méthodes de phénotypage

Ce sont les premières méthodes de typage utilisées pour caractériser les isolats microbiens selon leur phénotype [27]. Le typage de *P. aeruginosa* est traditionnellement effectué selon la sérospécificité de l'antigène LPS, la sensibilité aux antibiotiques et aux phages, et les profils de production de pyocine [2, 24, 28, 29]. Ces méthodes ont prouvé leur utilité dans l'investigation de certaines infections causées par ce pathogène. Mais elles s'avèrent insatisfaisantes et présentent un certain nombre de limites dans le cas des souches isolées de la FK [2] (Tableau I). Cette approche commence à changer depuis les deux dernières décennies par le développement de nouvelles méthodes de typage basé sur l'ADN.

### 1.4.1 Biotypage

Le biotypage présente la pierre angulaire de la détection microbiologique des espèces bactériennes [30]. Il est souvent utilisé pour classer les souches selon des profils

biochimiques, morphologiques ou aux tolérances environnementales. Le phénotype des souches de *P. aeruginosa* au cours de la FK, n'a pas une nature stable. Différents profils biochimiques et morphologiques sont observés chez les souches partageant le même génotype [29, 46]. Le biotypage aide souvent à la détermination précise de l'espèce *P. aeruginosa*, basée sur des composantes dans différents milieux de croissance et de certaines réactions biochimiques [4]. L'utilisation de cette méthode dans le typage épidémiologique de *P. aeruginosa* est rarement utile en raison de son faible pouvoir discriminatoire et sa reproductibilité [31].

L'insuffisance de l'approche de biotypage a été rapportée aussi dans la détection précoce de l'infection chronique de *P. aeruginosa*, présentant un retard de 4.5 mois par rapport à celle de la détection moléculaire [30]. De plus, l'identification de *P. aeruginosa* sur des milieux sélectifs, pourra exclure la détection d'autres bactéries qui pourraient prédominer à certains stades de l'infection [32]. Par ailleurs, le processus de biotypage consomme du temps, et est potentiellement imprécis [20, 29]. À cet égard, l'utilisation des méthodes moléculaires pour la détection de *P. aeruginosa* est recommandée mais reste encore restreinte [20, 33]. Enfin, le biotypage est souvent plus utile pour des fins de taxonomie que pour des études épidémiologiques [19].

#### **1.4.2 Sérotypage**

La méthode de sérotypage utilise le marqueur phénotypique le plus courant de *P. aeruginosa*, qui est l'antigène LPS [19]. *P. aeruginosa* est sérologiquement hétérogène et au moins 17 sérotypes spécifiques d'antigènes LPS ont été décrits [24]. La détection de ces antigènes par agglutination sur lame forme la base de la plupart des méthodes de sérotypage.

Le sérotypage permet la caractérisation de la plupart des souches de *P. aeruginosa* possédant un LPS de forme lisse, mais montre une faible discrimination par rapport au LPS rugueux, typique des souches associées à la FK [34, 35]. L'état de l'infection prolongée chez les PFK rend la synthèse du LPS O des souches de *P. aeruginosa*

considérablement réduite. En effet, ces souches se caractérisent par une disparition de l'antigène LPS bande B et sont associées à la perte du caractère sérotypable [36]. 50 à 70% des isolats provenant des PFK se trouvent polyagglutinables ou non typables [35]. En conséquence, le sérotypage est d'une utilité limitée une fois appliqué aux souches de *P. aeruginosa* isolées de PFK. Par contre, cette méthode montre une haute typabilité et reproductibilité dans le typage des souches isolées chez des patients ayant d'autres pathologies [28]. De plus, le sérotypage a un pouvoir discriminatoire limité car il existe seulement 17 sérotypes potentiels pouvant être identifiés [19, 37].

Le sérotypage est généralement la méthode de phénotypage la plus appliquée dans le typage des souches de *P. aeruginosa* isolées de la fibrose kystique [14]. Malgré ces faiblesses, cette méthode a été employée pour répondre à des questions au sujet de l'épidémiologie de *P. aeruginosa*, comme la fréquence des infections croisées à travers les PFK [38].

#### **1.4.3 Antibiotypage**

L'utilisation de l'antibiogramme dans le typage épidémiologique des isolats de *P. aeruginosa* est basée sur l'évaluation *in vitro* des profils de sensibilité ou de résistance à des agents antimicrobiens. L'antibiogramme est exécuté selon différentes techniques dont la méthode de diffusion en disque sur gélose ou la méthode de microdilution qui apporte une mesure quantitative de la concentration minimale inhibitrice (CMI) [39].

Récemment, le test de la CMI peut être exécuté par système automatisé dans des cartes d'essai Vitek [40]. Cependant, les conditions de l'antibiogramme *in vitro* ne reflètent qu'imparfaitement les conditions réelles de l'infection FK *in vivo*, ce qui peut sous-estimer la résistance bactérienne [41]. La microdilution est considérée comme la méthode de référence, bien que ce ne soient pas tous les systèmes automatisés incorporants cette technique qui aient démontré leur exactitude pour examiner les souches de *P. aeruginosa* isolées chez les PFK [42, 43]. Des études

récentes recommandent plutôt l'utilisation du test de diffusion sur disque et ne suggèrent pas les systèmes commerciaux automatisés dans le test de sensibilité de ce pathogène en association avec la FK [44].

Au niveau du typage, l'antibiogramme révèle souvent des profils de multirésistance associés à la pression antibiotique dans les poumons [6]. Il révèle aussi, différents profils de sensibilité à partir d'un seul spécimen d'expectoration [45]. Dans ces conditions, le test de la CMI est laborieux, consomme du temps, coûteux et de faible pouvoir discriminatoire [46]. Dans les études épidémiologiques, l'antibiogramme a une faible utilité car les isolats possédant des génotypes distincts peuvent avoir les mêmes profils de sensibilité [47]. En effet, dans plusieurs situations, différentes méthodes moléculaires ont été utilisées pour aider à étudier la distribution de la résistance de *P. aeruginosa* dans l'environnement, à l'hôpital ou dans les centres spécialisés de FK [29, 48, 49].

#### **1.4.4 Mécanismes de résistance chez *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* développe plusieurs types de mécanismes de résistance aux antibiotiques, qui peuvent coexister et conjuguer leurs effets. La résistance naturelle de cette bactérie relève d'une mauvaise perméabilité de la membrane externe et de la production constante d'une bêtalactamase inductible associée à la résistance à certaines bêtalactamines (50).

L'acquisition de la résistance chez *P. aeruginosa* est le résultat de l'acquisition de gènes extérieurs à la bactérie. Les gènes sont de localisation chromosomique ou extra-chromosomique ayant pour support des éléments génétiques mobiles comme les plasmides, des transposons ou des intégrons.

A ce niveau, on peut citer la résistance par production d'enzymes qui inactivent les antibiotiques. En effet, l'hyperproduction de bêtalactamase est considérée comme un mécanisme de résistance majeure de *P. aeruginosa* au cours de l'infection chronique chez les PFK (51). Parmi ces bêtalactamases, on peut citer notamment

l'hyperproduction d'une céphalosporinase chromosomique suite aux mutations dans le gène promoteur Amp<sup>c</sup> (52), et la production de bêtalactamase à spectre élargi dont les gènes sont portés par des structures mobiles (plasmides, transposons) (50). Un autre mécanisme de résistance est la réduction des concentrations intracellulaires d'antibiotique. Ce phénomène peut être dû à des modifications dans la membrane externe, comme par exemple la résistance à l'imipénème par modification ou disparition de la porine OprD (53) et ou à un transport actif vers l'extérieure de la cellule via des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux (54).

L'efflux actif est considéré comme un mécanisme de résistance majeure chez *P. aeruginosa* (55). Ce phénotype est dû surtout à l'expression constitutive d'un système d'efflux MexAB-OprM (56), qui en cas d'hyperproduction, devient responsable de la résistance à plusieurs antibiotiques (57).

D'autres mutations au niveau du système d'efflux peuvent impliquer spécifiquement l'émergence de la résistance aux aminoglycosides comme celle affectant le système MexXY-OprM souvent observée dans les souches *P. aeruginosa* isolées des PFK (58). Par ailleurs, les souches de *P. aeruginosa* isolées de la FK peuvent développer de fréquentes mutations au cours de l'infection. Les études récentes rapportent que ces mutations touchent la capacité de réparation des mauvais appariements de l'ADN (59, 60). Enfin, ce mécanisme de résistance peut induire l'émergence des souches multirésistantes qui peuvent être sélectionnées durant le traitement (61).

#### **1.4.5 Lysotypie**

La lysotypie appelée aussi typage par phage, consiste à étudier les profils de sensibilité ou de résistance d'une bactérie à l'égard d'un large spectre de lyse par des bactériophages sélectionnés afin de déterminer un maximum de discrimination entre les souches d'une même espèce. Les bactériophages sont des virus capables de s'attacher à la membrane externe et provoquer la lyse bactérienne.

La plupart des souches de *P. aeruginosa* sont lysées par plus qu'un seul phage et sont donc identifiées par leurs profils de lyse [26]. La possibilité de différencier les souches de *P. aeruginosa* selon des profils de lyse est connue depuis les années 50 et depuis ce temps au moins 22 phages ont été introduits [19]. Les souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK ont tendance à perdre souvent les réponses aux bactériophages. La lysotypie de ces souches montre 40% de typabilité, comparé à 83% chez celles provenant d'autres sources autres que la FK [31]. Par ailleurs, des critiques ont été rapportées sur le critère de discrimination entre les isolats basé sur la différence de plus de deux fortes réactions au niveau des profils de lyse par le bactériophage. En effet, selon Ojeniyi [19] ce critère semble réduire la typabilité de cette technique car il est fastidieux et rend difficile la comparaison des profils de lyse, surtout lorsqu'il s'agit de plusieurs souches à étudier. De plus, les souches phagiques sont difficiles à obtenir, et demandent plus de travail dans le contrôle de l'identité de la collection des phages. De ce fait, cette méthode n'est utilisée que dans des laboratoires de référence.

Enfin, la lysotypie montre souvent une faible reproductibilité par rapport à d'autres méthodes de typage, en particulier, la pyocinotypie et le sérotypage [62]. Cette méthode est plus fiable avec les souches de *P. aeruginosa* provenant de sources autre que les PFK [2, 3, 31]. Malgré ces limites, la combinaison de la lysotypie au sérotypage a permis de montrer que l'infection croisée chez les PFK prend une place dans les centres spécialisés de FK [38], ce qui a été confirmé plus tard.

#### **1.4.6 Pyocinotypie**

La pyocinotypie est aussi appelée bactériocinotypie. La plupart des souches de *P. aeruginosa* produisent des bactériocines appelées pyocines dont la morphologie ressemble à la queue des bactériophages et sont considérées comme des phages défectifs [19]. Les pyocines, comme d'autres bactériocines, sont des protéines toxiques capables de tuer les organismes sensibles issus d'une même espèce tout en restant inactives sur la souche productrice. Comme les bactériophages, les pyocines

exercent leur activité inhibitrice létale, seulement après l'adsorption par des récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire [63]. Cette propriété létale de la pyocine est la base de la pyocinotypie. Le typage consiste le plus souvent à tester les spectres d'activité des pyocines produites par une souche inconnue sur des souches de référence [25].

La pyocinotypie étudie le spectre d'action des bactériocines sécrétées par chaque souche de *P. aeruginosa*, et permet de définir 105 types et 25 sous-types [15]. Plusieurs études s'accordent à dire que la pyocinotypie de *P. aeruginosa* est de faible reproductibilité [3]. Le phénotype mucoïde isolé des PFK est parmi les inconvénients qui affectent la fiabilité de la pyocinotypie, car l'exopolysaccharide entourant la cellule empêche la pyocine de diffuser dans le milieu. Pour contrer cette limite, Fyfe et *al.* [64] ont décrit une méthode plus discriminatoire dans le typage de ces souches. Par ailleurs, Pai et *al.* [65] ont utilisé le critère basé sur le poids moléculaire d'aeruginocine (haut ou faible) pour subdiviser des types des aeruginocines afin de rendre la méthode plus sensible que celle de Govan [25] appliquée en routine.

Cependant, la pyocinotypie peut apporter des informations utiles dans le typage épidémiologique des souches de *P. aeruginosa*, en association avec des méthodes plus discriminatoires, comme la PFGE [48]. Enfin, la pyocinotypie possède une faible reproductibilité, et elle peut être non convenable dans le typage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK, même si d'autres auteurs la trouvent fiable dans l'analyse épidémiologique de cet organisme [31, 62].

### **1.5 Méthodes de génotypage**

Les méthodes de typage moléculaires ont suscité une attention accrue ces dernières années en tant qu'outils utiles dans l'analyse de l'épidémiologie moléculaire des souches de *P. aeruginosa*, et dans le contrôle des infections. Ces méthodes se distinguent par un pouvoir discriminatoire suffisamment élevé pour examiner la vraie identité des isolats cliniques [27, 66]. Chez les PFK, différentes méthodes

moléculaires ont été proposées dans le typage de *P. aeruginosa* (Tableau II). Cependant, l'application de ces méthodes dans le typage de routine est encore restreinte, même si certaines méthodes ont été proposées comme la RAPD, ou la Rep-PCR. L'usage et les exceptions pour ces différentes méthodes de typage sont discutés ci-dessous.

### **1.5.1 Méthodes basées sur la non amplification de l'acide nucléique**

#### **1.5.1.1 PFGE**

Cette méthode est reconnue comme la méthode de référence pour le typage de l'ADN de *P. aeruginosa* [14, 21, 67], et celui de la plupart des bactéries nosocomiales [7]. Développée par Schwartz et Cantor [68], la PFGE est validée au moins pour 40 espèces pathogènes dont *P. aeruginosa* [7].

Dans l'électrophorèse conventionnelle sur gel d'agarose, les molécules d'ADN de taille de plus de 40 à 50 Kb ne peuvent pas migrer efficacement. En changeant la durée et la direction du champ électrique la PFGE a l'avantage de séparer les molécules d'ADN dont la taille peut dépasser 1 000 kb [7, 69]. Le typage par PFGE, appelé aussi macrorestriction permet d'atteindre un pouvoir discriminatoire le plus élevé dans le typage des souches de *P. aeruginosa* [12] par rapport à la plupart des méthodes moléculaires comme la RAPD [70], le ribotypage [71] et la RFLP avec l'*exoA* [21].

La PFGE a permis de mettre la lumière sur la propagation des souches épidémiques de *P. aeruginosa* [72], et de détecter les infections croisées entre les PFK [48, 73]. La différenciation entre les souches non liées de l'épidémie est facilitée par un meilleur choix de l'enzyme de restriction. En effet, l'analyse de macrorestriction par *SpeI* et *XbaI* est souvent rapportée dans la comparaison de ces souches [21]. L'automatisation de la méthode PFGE a permis d'ouvrir la voie à une standardisation possible. Cependant, quelques différences ont été observées dans les génotypes déterminés par certains modèles d'automates évalués [74]. Malgré ces avantages, il



est difficile parfois d'interpréter les profils de macrorestriction [7]. Des directives sous forme de critères d'interprétation plus fiables ont été proposées pour contrer cette limite [75].

En estimant le coût élevé du typage par PFGE pour les familles et les proches des malades, certains auteurs recommandent l'utilisation d'autres méthodes moins coûteuses que la PFGE, tel que la RAPD-PCR [70], ou la Rep-PCR [10]. Enfin, cette méthode est plus disponible dans les laboratoires spécialisés [37], à cause de sa complexité technique, son coût élevé et sa durée [8].

### 1.5.1.2 RFLP

La RFLP était la première méthode largement utilisée dans le typage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK [14]. Elle est adaptée à l'analyse moléculaire d'une séquence d'un locus donné de l'ADN génomique bactérien qui peut varier d'une souche à une autre au sein d'une même espèce. La procédure est basée sur le fait que les emplacements des sites de reconnaissance strictement définie de différentes enzymes de restriction sur un locus génétique d'intérêt particulier, peuvent être polymorphiques. Les résultats de la RFLP sont visualisés sur des bandes de gel obtenues avec une enzyme et une sonde donnée.

Pour adapter cette méthode avec *P. aeruginosa*, les chercheurs ont hybridé l'ADN chromosomique avec des gènes codant pour la production de toxine. En effet, des sondes génétiques spécifiques basées sur les facteurs de virulence ont été développées pour étudier la relation clonale entre les isolats de *P. aeruginosa* au cours de l'infection chez les PFK [19]. Une sonde du gène codant pour l'*exoA* a été développée par Vasil et al. [76], et utilisée comme marqueur épidémiologique pour *P. aeruginosa*. D'autres modèles d'hybridation relatifs aux sondes de gènes d'élastase et d'alginate D (*algD*) pour *P. aeruginosa* ont été utilisés par la RFLP [13]. Pour ces deux sondes, les études ont montré qu'elles ne sont pas utiles dans la différenciation entre les souches de *P. aeruginosa* car les profils d'hybridation relatifs ont été hautement conservés [13]. En effet, les sondes les plus discriminatoires sont celles

qui réagissent avec une portion hypervariable du génome bactérien. La sonde du gène de l'*exoA* est la plus utilisée dans la caractérisation de l'épidémiologie moléculaire de *P. aeruginosa* [21, 37]. L'analyse RFLP avec cette sonde est considérée comme la méthode de typage de choix pour les souches isolées des PFK.

La RFLP possède une reproductibilité significative et un haut pouvoir discriminatoire [67]. Cette méthode est techniquement complexe et peut être appliquée seulement dans quelques laboratoires de recherche [62]. Actuellement, la RFLP est largement remplacée par la PFGE ou la RAPD-PCR [77].

### 1.5.1.3 Ribotypage

Le ribotypage, est parmi les techniques proposées pour surmonter le problème du phénotype particulier des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK [13]. Il s'agit d'une analyse southern blot basée sur l'hybridation des fragments d'ADN avec l'opéron ribosomique codant pour l'ARNr 16S et 23S hautement conservé parmi les différentes espèces bactériennes [27].

Des fragments de restriction des régions ADNr du *P. aeruginosa* ont été évalués comme moyen de typage pour des fins épidémiologiques. Blanc et *al.* [77] trouvent que le ribotypage est reproductible et de haut pouvoir discriminatoire semblable à celui de la PFGE. La même trouvaille est confirmée par Bennekov et *al.* [78]. La comparaison entre la PFGE et le ribotypage montre un pouvoir discriminatoire variable selon l'enzyme de restriction choisie [79]. Pour *P. aeruginosa*, en raison des régions relativement limitées de l'ADN non codant dans les régions de l'ADNr et de la stabilité des gènes ribosomiaux eux mêmes, il semble que les mutations normales apparaissant pendant l'infection sont moins probables pour être détectées avec le ribotypage qu'avec l'analyse génomique par PFGE [78]. En principe, le ribotypage est plus approprié pour la différenciation des souches bactériennes ayant plusieurs opérons ribosomiaux. Cependant, pour les souches possédant peu d'opérons comme celles de *P. aeruginosa*, le ribotypage est d'une utilité limitée [27, 80]. Cet état, porte

peu d'espoir pour que le ribotypage soit validé comme une méthode utile pour les études épidémiologiques chez les PFK une fois utilisé tout seul [81]. Afin d'améliorer cette technique, des enzymes additionnelles ont pu être employées pour accroître la discrimination entre les isolats trouvés non distincts avec une seule enzyme [82], ou par la combinaison du ribotypage avec d'autres systèmes de typage comme celui de l'estérase [83].

En conclusion, certains obstacles doivent être surmontés avant que le ribotypage gagne de l'acceptation dans les laboratoires cliniques de microbiologie. On peut citer : le temps requis pour l'électrophorèse, le transfert de l'ADN sur membrane, et pour l'hybridation. De plus, le ribotypage est techniquement complexe même si l'automatisation a facilité son usage dans le typage des isolats appartenant à un large spectre bactérien [27, 84].

## **1.5.2 Méthodes basées sur l'amplification de l'acide nucléique**

### **1.5.2.1 RAPD**

La RAPD est largement appliquée dans l'analyse génomique des souches de *P. aeruginosa* associées aux PFK et à d'autres bactéries médicalement importantes [70, 85, 86]. La nature laborieuse du typage par macrorestriction a incité les chercheurs à trouver une alternative plus efficace surtout dans le typage de plusieurs souches de *P. aeruginosa*, et il semble que la RAPD-PCR comme système de typage répond à ce besoin.

La méthode RAPD est unique parce qu'elle utilise 9 à 10 bases d'amorce arbitraire identifiée spécifiquement par leur capacité à différencier les isolats de *P. aeruginosa*, sous des faibles températures d'hybridation [87]. L'analyse des séquences amplifiées n'exige pas la digestion ou le séquençage des fragments d'ADN. De plus, la procédure n'est pas radioactive et la détection des polymorphismes se fait par fluorescence sur gel d'électrophorèse, puis les profils sont analysés à l'œil nu ou par ordinateur [9, 85]. La méthode RAPD est considérée parmi les méthodes de typage

moléculaire les plus rapides et faciles à exécuter, parce que l'ADN matrice n'a pas besoin d'être hautement purifié ou de poids moléculaire élevé, seulement quelques nanogrammes d'ADN sont exigés [70, 87, 88].

Dans la pratique, plusieurs paramètres pouvant changer les profils RAPD-PCR doivent être étroitement optimisés afin d'achever des résultats reproductibles. À cet égard, de nombreux problèmes de reproductibilité sont rencontrés avec la RAPD, touchant surtout la qualité de l'ADN et le choix de l'amorce [70, 89, 90]. En effet, la RAPD est beaucoup plus sensible aux variations techniques que la PCR de routine utilisant des amorces dirigées contre des séquences connues. Les résultats sont différents selon le matériel utilisé, l'opérateur et les amorces arbitraires. Il s'ensuit que chaque RAPD possède ses propres états optimaux de réaction et réactifs. De plus, plusieurs événements génétiques peuvent être le résultat d'une hybridation non parfaite entre l'amorce et le site ciblé ou à des variations dans la température d'hybridation [89]. Par conséquent, l'interprétation des résultats est parfois difficile car la variation dans la RAPD-PCR peut ne pas être étroitement couplée aux événements génétiques spécifiques [7, 8].

À fin de maintenir la reproductibilité et la fiabilité de l'analyse RAPD, l'extraction et la quantification de l'ADN doivent être bien contrôlées [87]. Une fois que le protocole expérimental est validé, la RAPD donne des résultats reproductibles et hautement discriminatoires [9, 85, 92]. Les résultats de l'analyse RAPD montrent une grande concordance avec d'autres méthodes plus discriminatoires comme la PFGE [70, 88]. La comparaison de la RAPD à d'autres méthodes de typage indique qu'elle est plus discriminatoire que la RFLP et le ribotypage mais moins discriminatoire que la Rep-PCR [8, 27]. Par ailleurs, bien que plusieurs études démontrent un pouvoir discriminatoire élevé avec juste une seule amorce, il est possible d'augmenter le pouvoir discriminatoire de la RAPD-PCR en utilisant 2 amorces [87, 92]. De plus, des chercheurs sont mis d'accord que l'utilisation d'une amorce M13 *forward* (-47) dans le test RAPD permettra une certaine uniformisation de la procédure [93].

Enfin, la méthode RAPD est recommandée surtout dans le typage d'un grand nombre de souches de *P. aeruginosa* [71], dont les résultats peuvent être utilisés conjointement avec la méthode PFGE pour confirmer l'identité des souches étroitement liées une fois que des résultats ambigus sont obtenus [85].

#### 1.5.2.2 Rep-PCR

Il s'agit d'une méthode basée sur la PCR souvent utilisée pour identifier le génotype des procaryotes. Elle est analogue à la méthode RAPD avec l'exception que les amorces ciblent des séquences connues de l'ADN qui sont conservées et répétitives dans le génome bactérien [94].

La Rep-PCR permet d'examiner les profils des souches obtenues après amplification des éléments répétitifs de l'ADN génomique. En effet, deux groupes d'éléments répétitifs, l'ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) et les éléments BOX ont été utilisés avec succès comme des cibles dans le typage de l'ADN de plusieurs bactéries [8]. Récemment, deux amorces spécifiques basées sur les éléments ERIC et BOX de l'ADN génomique étaient décrites dans la comparaison des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK avec une haute reproductibilité et un haut pouvoir discriminatoire [10]. En outre, des études sur la REP-PCR ont montré un pouvoir discriminatoire supérieur à celui d'autres méthodes de typage, comme la RAPD-PCR et le ribotypage [8]. Ainsi, les résultats du typage par la cette méthode s'avèrent en corrélation avec ceux de la PFGE, mais avec un pouvoir discriminatoire légèrement faible [27].

La REP-PCR est non coûteuse, rapide et actuellement disponible en format automatisé [95]. Le typage Rep-PCR pourrait jouer un rôle important dans la surveillance épidémiologique de routine et dans l'identification et le suivi des voies de transmission de *P. aeruginosa* chez les PFK [10, 96]. Enfin, l'inconvénient principal de cette méthode, c'est que tout le polymorphisme génétique est limité à un lieu spécifique au génome bactérien ce qui peut diminuer le pouvoir discriminatoire.

### 1.5.2.3 MLST

Le typage par séquençage multiple de l'ADN (MLST), est une nouvelle technique de typage moléculaire qui vient d'être développée et acceptée dans la caractérisation des isolats de *P. aeruginosa* [11, 97]. Cette méthode est basée sur le séquençage de six à sept loci indépendants qui présentent des variations intra-spécifiques dans tous les isolats de certaines espèces bactériennes [7, 98].

La MLST est une technique simple, exigeant seulement la capacité d'amplifier des fragments d'ADN directement à partir des échantillons biologiques par PCR et le séquençage de ces fragments, manuellement ou à l'aide d'un séquenceur automatisé [98, 99]. Les résultats de séquençage ainsi obtenus sont transférés et comparés d'un laboratoire à un autre sous forme d'une base de données globales via l'Internet [71, 100].

Dans l'évaluation de la MLST, il est important de se rappeler, que cette méthode a été à l'origine, conçue pour évaluer les relations génétiques dans les populations bactériennes. En effet, la MLST s'est avérée supérieure aux méthodes telles que la PFGE et la RAPD, dans l'analyse des lignées clonales hypervirulentes, ou multirésistantes de *P. aeruginosa* et d'autres organismes [11, 101]. Cependant, selon Giske et al. [102] la MLST montre une sensibilité réduite dans l'étude de parenté entre les isolats de *P. aeruginosa* à l'égard de ces deux méthodes.

La MLST peut être utilisée comme méthode de typage, mais elle est laborieuse et exige un équipement technique sophistiqué [7, 99] qui est au-delà de la capacité de la plupart des laboratoires cliniques. Enfin, un schéma de typage MLST a récemment été développé pour *P. aeruginosa* [11], bien que les études épidémiologiques ultérieures ne soient pas encore publiées.

## 1.6 CONCLUSION

Chez les PFK, en particulier au cours de l'infection chronique, le phénotypage des souches de *P. aeruginosa* constitue une approche rarement fiable surtout dans les études épidémiologiques. En effet, comme déjà rapporté le phénotype altéré et très instable de ces souches, diminue la reproductibilité et le pouvoir discriminatoire des méthodes de phénotypage (Tableau I). Néanmoins, certaines méthodes sont encore utilisées dans l'identification de l'espèce *P. aeruginosa* [4], la détection des phénotypes particuliers liés à l'infection des PFK ou le choix de l'antibiothérapie [5, 103].

Les méthodes génétiques ont confirmé qu'une fois que les méthodes de phénotypage sont appliquées seules, elles peuvent mener à des fausses classifications des isolats de *P. aeruginosa* [7, 27, 41, 66]. Plusieurs auteurs suggèrent la combinaison du phénotypage et du génotypage pour atteindre un maximum de pouvoir discriminatoire, par l'association de la RAPD-PCR au sérotypage [104], le sérotypage à l'analyse par RFLP [62], ou la pyocinotypie à la PFGE [48]. Pour les méthodes moléculaires, l'objectif du typage est de subdiviser les isolats bactériens d'une même espèce à un certain nombre de types distincts ou idéalement selon différents clones. En effet, les méthodes d'ADN les plus réussies pour *P. aeruginosa* sont la RFLP avec la sonde *exoA* [62], la RAPD [66] et la PFGE [21]. D'après le tableau II, on pourra constater que toutes les méthodes de typage moléculaire ont certaines limites significatives. Récemment, des difficultés dans l'évaluation des souches épidémiques de *P. aeruginosa* en temps réel ont été rapportées en Angleterre [105].

On pourra finalement conclure qu'un système de typage idéal est un concept relatif, et loin d'être atteint. D'autre part, d'après les caractéristiques pertinentes récapitulées dans le tableau II et les paragraphes (1.5.2.1, p.21 et 1.5.2.2, p.23), l'analyse RAPD et Rep-PCR sont similaires dans leurs procédures et sont généralement les plus simples à implanter. Pour la PFGE même si elle est fastidieuse, il semble qu'il n'est pas difficile à implanter. Par contre, le séquençage de l'ADN exige un matériel sophistiqué qui est au-delà de la capacité de la plupart des laboratoires diagnostiques

et exige un niveau de compétence élevé. Par conséquent, cette technique sera difficile à implanter de façon fiable.

L'automatisation des méthodes de typage moléculaires est une approche d'avenir prometteuse, qui représente une plate-forme efficace pour l'épidémiologie moléculaire dans les laboratoires cliniques. L'important c'est que ces méthodes méritent une uniformisation additionnelle, un développement des directives pratiques et un équipement accessible. L'utilisation du typage basé sur l'approche de séquençage des nucléotides, peut offrir une piste prometteuse dans ce sens. Cette technique pourra initier des nouvelles méthodes de typage moléculaires du *P. aeruginosa* et d'autres pathogènes même si de nombreux défis existent. L'adoption d'une méthode de typage moléculaire de ce pathogène dans la routine est nécessaire et doit être évaluée.



## 1.7 RÉFÉRENCES

1. Hoiby N, Flensburg EW, Beck B, Friis B, Jacobsen SV, Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scan J Resp Dis* 1977 ; 58 : 65-79.
2. Ojeniyi B, Hoiby N. Comparison of different typing methods of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1991 ; 44 : 13-22.
3. Ojeniyi B, Wolz C, Doring G, Lam JS, Rosdahl VT, Hoiby N. Typing of polyagglutinable isolates from cystic fibrosis patients. *APMIS* 1990 ; 98 : 423-31.
4. Campbell ME, Farmer SW, Speert DP. New selective medium for *Pseudomonas aeruginosa* with phenanthroline and 9-chloro-9-[4-(diethylamino) phenyl]-9,10-dihydro-10-phenylacridine hydrochloride (C-390). *J Clin Microbiol* 1988 ; 26 : 1910-12.
5. Penketh A, Pitt T, Roberts D, Hodson ME, Batten JC. The relationship of phenotype change in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1983 ; 127 : 605-8.
6. Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, Van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 1996 ; 348 : 639-42.
7. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos M. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 2006 ; 19 : 512-30.
8. Michael Olive D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 1661-69.
9. Mahenthiralingham E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*

- isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 : 1129-35.
10. Syrnis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, Nissen MD. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. *J Med Microbiol* 2004 ; 53 : 1089-96.
  11. Curran B, Jonas D, Grundman H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 5644-49.
  12. Romling U, Tummeler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 464-5.
  13. Loutit JS, Tompkins LS. Restriction enzyme and southern hybridization analyses of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 2897-900.
  14. Olge JW, Janda JM, Woods DE, Vasil ML. Characterisation and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987 ; 155 : 119-26.
  15. Carpentier JP, Morillon M, Petrognani R, Cavallo JD. Infections à bacille pyocyanique. *Encycl Méd Chir* 2003 ; 8-025-B-50.
  16. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000 ; 50 : 1563-89.
  17. Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol*. 1993 ; 43 : 606-9.
  18. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk PJ. How close is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* 1992 ; 42 : 166-70.

19. Ojeniyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl 1994 ; 46 : 1-44.
20. Spikler T, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2004 ; 2074-79.
21. Grundman H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt T L. Discriminatory power of three DNA-based typing technique of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1995 ; 33 : 528-34.
22. Millesimo M, de Intinis G, Chirillo MG, Musso T, Savoia D. *Pseudomonas aeruginosa* : serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. Eur J Epidemiol 1996 ; 12 : 123-9.
23. Speert DP, Campbell ME, Farmer SW, Volpel K, Joffe AM, Paranchych W. Use of a pilin gene probe to study molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1989 ; 27 : 2589-93.
24. Liu PV, Matsumoto H, Bergan T. Survey of heat-stable major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Systematic Bacteriol 1983 ; 33 : 256-64.
25. Govan JRW. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. In : Bergan T, Norris JR, éd. Method in Microbiology. London and New York : Academic Press ; Vol 10, 1978. p. 61-91.
26. Gould JC, McLeod JW. A study of the use of agglutinating sera and phage lysis in the classification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Pathol Bacteriol 1960 ; 79 : 295-311.
27. Wu F, Della-Latta P. Molecular typing strategies. Seminar in Perinatology 2002 ; 26 : 357-66.
28. Pitt TL. State of the art : typing *Pseudomonas aeruginosa*. J Hosp Infect 1980 ; 1: 193-199.
29. Freitas AL, Barth AL. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients : a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. Braz J Med Biol Res 2004 ; 37 : 77-82.

30. Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2002 ; 20 : 3-21.
31. Pitt TL. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988 ; 7 : 238-47.
32. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995 ; 59 : 149-69.
33. Tramper-Stranders GA, Van Der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibrosis* 2005 ; 4 Suppl 2 : 37-43.
34. Pitt TL, MacDougall J, Penketh ARL, Cooke EM. Polyagglutinating and non-typable strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1986 ; 21 : 179-86.
35. Hancock RE, Mutharia M, Chan L, Darveau LP, Speert D, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, non typable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* 1983 ; 42 : 170-177.
36. Soler CP, Gidenne S, Saint-blanchard P, Kerleguer A, Gerome P. Recovery method of serotypable character in non serotypable *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pathol Biol (Paris)* 2004 ; 52 : 33-38.
37. Speert D. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Bioscience* 2002 ; 7 : 354-61.
38. Hoiby N, Rosendal K. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients treated at a cystic fibrosis center. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1980 ; 88 : 125-31.
39. National Committee for Clinical Laboratory Standard. (2000a). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th ed. Approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

40. Jones RN, Biedenbach DJ, Marshall SA, Pfaller MA, Doern GV. Evaluation of the Vitek system to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against cefepime. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998 ; 32 : 107-10.
41. Bellon G, Gilly R. Antibiothérapie dans la mucoviscidose : incertitudes et réalités. *Rev Mal Resp* 1990 ; 7 : 203-08
42. Saiman L, Burns JL, Whittier S, Krzewinski J, Erwin M, Marshall S, Jones RN. Evaluation of reference dilution test methods for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 2987-91.
43. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshall S, Jones RN. Comparaison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 1818-22.
44. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Krzewinski J, Liu Z, Larone D, Marshall SA, Jones RN. Comparison of two commercial systems (vitek and microscan-walkaway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001 ; 39 : 257-60.
45. Fegan M, Francis P, Hayward AC, Davis GHG, Fuerst JA. Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 1143-46.
46. Van Horn KG. Mixed-morphotype broth microdilution susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 458-59.
47. Mereghetti L, Marquet-van der Mee N, Loulergue J, Rolland JC, Audurier A. *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients : study using whole cell RAPD and antibiotic susceptibility. *Pathol Biol* 1998 ; 46 : 319-24.

48. Jones AM, Govan IR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* 2001 ; 358 : 557-8.
49. Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 ; 166 : 988-93.
50. Livermore DM. Betalactamases in laboratory and clinical resistance. *Microbiol Rev*. 1995; 8: 557-84.
51. Campbell JI, Ciofu O, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the ampC-ampR genetic region. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 ; 41 : 1380-4.
52. Giwercman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Høiby N. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother*. 1990 ; 26 : 247-59
53. Wang CX, Mi ZH. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-1 metallo-beta-lactamases and lacking the outer-membrane protein OprD. *J Med Microbiol*. 2006 ; 55 : 353-4.
54. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001; 45: 433-64.
55. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control*. 2006 ; 34 (5 Suppl 1) : S3-10 ; discussion S64-73.
56. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002 ; 34 : 634-40.
57. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing

- the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 ; 43 : 287-91.
58. Vogne C, Aires JR, Bailly C, Hocquet D, Plésiat P. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 ; 48 :1676-80.
58. Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, Govan JR. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology.* 2007 ; 153 : 1852-9.
60. Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 ; 49 : 3382-6
61. Olivier A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000 ; 288 : 1251-4.
62. The international *Pseudomonas aeruginosa* typing study group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. *J Infect Diseases* 1994 ; 169 : 134-42.
63. Ito S, Kageyama M. Relationship between pyocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Appl Microbiol* 1970 ; 16 : 231-40.
64. Fyfe J AM, Harris G, Govan JRW. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis. *Lancet* 1984 ; 20 : 47-50.
65. Pai SR, Joshi LM. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* on the basis of low and high molecular weight aeruginocins. *J Postgraduate Medicine* 1985 ; 31 : 52-6.
66. Sener B, Koseoglu O, Ozcelik U, Kocagoz T, Gunalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infectious in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol* 2001 ; 291 : 387-393.

67. Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, Helias JP. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med* 2001 ; 27 : 1263-68.
68. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984 ; 37 : 67-75.
69. Andrei A, Zervos MJ. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006 ; 130 : 662-8.
70. Kersulyte D, Struelens MJ, Deplano A, Berg DE. Comparaison of arbitrary primed PCR and macrorestriction (Pulsed-Field gel Electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2216-19.
71. Botes J, Williamson G, Sinickas V, Gurtler V. Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Ribotyping and PFGE : correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. *J Microbiol Methods* 2003 ; 55 : 231-40.
72. Fiona WS, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol* 2004 ; 53 : 609-15.
73. Kelly NM, Fitzgerald MX, Tempany E, O'Boyle C, Falkiner FR, Keane CT. Does pseudomonas cross-infection occur between cystic-fibrosis patients? *Lancet* 1982 ; 2 : 688-90.
74. Rementeria AL, Gallego L, Quindos G, Garaizar J. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect* 2001 ; 7 : 331-36.
75. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelson PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2233-9.



76. Vasil ML, Chamberlain C, Grant CCR. Molecular studies of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A gene. *Infect Immun* 1986 ; 52 : 538-48.
77. Blanc DS, Siegrist HH, Sahli R, Francioli P. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa* : discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J Clin Microbiol* 1993 ; 31 : 71-77.
78. Bennekov T, Colding H, Ojeniyi B, Bentzon MW, Hoiby N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1996 ; 34 : 202-4.
79. Botes J, Williamson G, Sinickas V, Gürtler V. Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Ribotyping and PFGE : correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. *J Microbiol Methods* 2003 ; 55 : 231-40.
80. Kristjansson M, Samore MH, Gerding DN. Comparaison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 1963-69.
81. Martin C, Ait Ichou M, Massicot P, Goudeau A, Quentin R. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 1461-66.
82. Grattard F, Pozzeto B, Ros A, Gaudin OG. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains by ribotyping : high discriminatory power by using a single restriction endonuclease. *J Med Microbiol* 1994 ; 40 : 275-81.
83. Denamur EB, Picard P, Goulet P, Bingen E, Lambert N, Elion J. Complexity of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis : combined results from esterase electrophoresis and rDNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Epidemiol Infect* 1991; 106 : 531-9.

84. Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ, Wenzel RP, Fritschel SJ, Neubauer JJ, Herwaldt LA. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996 ; 25 : 1-8.
85. Campbell M, Mahenthiralingam E, Speert DP. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *P. aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 4614-15.
86. Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994 ; 7 : 174-184.
87. Welsh J, McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990 ; 18 : 7213-18.
88. Renders N, Van Belkum A, Barth A, Goessens W, Mouton J, Verbrugh I. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis : phenotyping versus genotyping. *Clin Microbiol Infect* 1996 ; 1 : 261-5.
89. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Jhonson WM. Factors affecting reliability and reproductibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. (guest commentary). *J Clin Microbiol* 1997 ; 35 : 339-46.
90. Meunier JR, Grimont PAD. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* 1993 ; 144 : 373-79.
91. Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *P. aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 666-71.
92. Micheli MR, Bova R, Calissano P, D'Ambrosio E. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. *Bio Techniques* 1993 ; 15 : 338-90.

93. Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 1996 ; 44 : 482-89.
94. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991 ; 19 : 6823-31.
95. Healy M, Hough J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005 ; 43 : 199-207.
96. Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med* 1999 ; 123 : 1007-1010.
97. Vernez I, Hauser P, Bernasconi MV, Blanc DS. Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005 ; 43 : 29-35.
98. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang O, Zhou J, Zurth k, Caugnant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 3140-5.
99. Zaidi N, Konstantinou K, Zervos M. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med* 2003 ; 127 : 1098-105.
100. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 2005 ; 33 : 728-33.
101. Feil EJ, Enright MC. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2004 ; 7 : 308-13.
102. Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M, Kronvall G, Rossolini GM. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from

- four European countries by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 2006 ; 44 : 4309-15.
103. Giwercman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Hobby N. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother* 1990 ; 26 : 247-59.
104. Hernandez J, Ferrus MA, Hernandez M, Owen RJ. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997 ; 17 : 37-47.
105. Lewis DA, Jones A, Parkhill J, Speert DP, Govan JR, Lipuma JJ, Lory S, Webb AK, Mahenthiralingam E. Identification of DNA markers for a transmissible *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strain. *Am Jn Respir Cell Mol Biol* 2005 ; 33 : 56-64.

## 1.8 TABLEAUX

**Tableau I.** Résumé des caractéristiques des méthodes de phénotypage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK

Méthodes	Pouvoir Discriminatoire	Reproductibilité	Caractéristiques
Biotypage	Faible	Souvent faible <sup>87</sup>	Rarement utile dans les études épidémiologiques <sup>19, 31</sup> . Utile à l'identification des espèces <sup>4</sup>
Sérotypage	Limité <sup>34</sup>	Limitée	Simple, rapide et coût abordable. Efficace dans des situations autres que la FK <sup>19, 50</sup>
Antibiotypage	Faible	Faible	CMI: méthode de référence <sup>39,40</sup> Laborieuse, inutile aux études épidémiologiques <sup>46,47</sup>
Bactériophage	Faible	Faible <sup>21</sup>	Laborieuse, profils de lyse difficiles à interpréter <sup>8</sup>
Bactériocine	Bonne <sup>3</sup>	Faible <sup>21</sup>	Laborieuse <sup>3</sup>

Ce tableau est prévu pour donner une évaluation relative du pouvoir discriminatoire et de la reproductibilité des différentes méthodes de phénotypage mais pour des comparaisons plus précises, voir les références dans le texte.

Abréviations: PFK, patients atteints de fibrose kystique; CMI, concentration minimale inhibitrice.

**Tableau II.** Résumé des caractéristiques des méthodes de génotypage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK

Méthodes	Pouvoir Discriminatoire	Reproductibilité	Caractéristiques
ADN non amplifié			
PFGE	Élevé	Élevée	Méthode de référence <sup>21, 55</sup> , laborieuse <sup>37</sup> et coût modéré <sup>8</sup>
Ribotypage	Limité <sup>71</sup>	Élevée	Techniquement complexe et automatisation possible <sup>27, 72</sup>
RFLP sonde ( <i>exoA</i> )	Élevé <sup>14, 50</sup>	Élevée <sup>50</sup>	Complexe <sup>50</sup> et largement remplacée par la PFGE ou la RAPD <sup>37</sup>
Amplification de l'ADN			
RAPD	Élevé	Faible <sup>75, 77, 78</sup>	Rapide, simple et fiable <sup>79</sup>
Rep-PCR	Élevé	Élevée <sup>10</sup>	Rapide, simple et disponible en format automatisé <sup>10, 83</sup>
MLST	Élevé	Élevée	Laborieuse et données facile à normaliser <sup>88</sup>

Ce tableau est prévu pour donner une évaluation relative du pouvoir discriminatoire et de la reproductibilité des différentes méthodes de génotypage, pour des comparaisons plus précises, voir les références dans le texte.

Abréviations: PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; RFLP, Restriction fragment length polymorphism; RAPD, Random amplified polymorphic DNA; Rep-PCR, Repetitive element based PCR; MLST, Multilocus sequence typing; *exoA*, exotoxine A; PFK, patients atteints de fibrose kystique.

**DEUXIÈME PARTIE:**  
**MATÉRIEL, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

**CHAPITRE II: ARTICLE 2**

**CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS**

**ISOLATED FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS BY DIFFERENT**

**TYPING METHODS**



**CHARACTERIZATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS  
ISOLATED FROM CYSTIC FIBROSIS PATIENTS BY DIFFERENT  
TYPING METHODS**

Anouar Hafiane, Madeleine Ravaoarinoro\*

Departement of Microbiology and Infectiology, University of Montréal, and Centre  
hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, 3840 rue St-Urbain,  
Montréal, Québec, H2W 1T8, Canada


***Running head:*** CF *Pseudomonas aeruginosa* strains typing

**Submitted to**

**Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**

---

\*Corresponding author: Tel.: +514 890-8175; Fax: +514 412-7240

E-mail address 

## 2.1 ABSTRACT

*Pseudomonas (P.) aeruginosa* strains isolated from the sputum of cystic fibrosis patients (CFP) are frequently difficult to type by conventional typing methods. The purpose of this study was to develop a random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for the routine typing of these strains. 60 *P. aeruginosa* non-repetitive strains recovered from CFP in our hospital were typed. 35 non-serotyped strains were studied by RAPD-PCR analysis with primers 272 and 208. RAPD data were performed to establish the relatedness between biotype, antibiotic susceptibility and genotype. 55% of strains are multiresistant, and no relation was found between antibiotype and biotype. A possible correlation between various phenotypes belonging to a single genotype was observed. RAPD typing characterised 30 distinct genotypes, and two small clusters of strains were observed among isolates with each primer. Strains belonging to one cluster were present in 2 (6%) of the 35 strains. Strains belonging to the other cluster were present in 3 (8%) of the 35 strains. The occurrence of these clusters indicates that cross-infection may occur. The results indicate also that only the RAPD method can establish a clonal relation whereas the other methods may only reflect phenotypical differences, and thus are inadequate to type these strains.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Biotyping, Antibiotyping, Serotyping, RAPD-PCR

## 2.2 INTRODUCTION

*Pseudomonas (P.) aeruginosa* is the major opportunistic pathogen in lung disease that is associated with increased risk of morbidity and mortality in cystic fibrosis patients (CFP) (1). Typing of strains of this bacterium is important for specific characterisation of the species, the choice of antibiotic regimen, the detection of unusual phenotypic traits and for the recognition of a potential cluster of a single clone within patients (2, 3). Several molecular methods with high reproducibility and good discriminatory power have been developed to study *P. aeruginosa* strains isolated from CFP. However, these methods cannot be used in routine laboratories as sophisticated equipment and qualified personnel are needed (3). Conventional typing based on the presence of specific bacterial surface structures is therefore undertaken to differentiate strains. Unfortunately, if applied alone, these methods may sometimes lead to isolate misclassification. Phenotyping methods lack discriminatory power and reproducibility for the identification of *P. aeruginosa* strains in CF infection (4). The random amplified polymorphic DNA fingerprinting-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) recently emerged as a reliable means of typing several bacterial species, including *P. aeruginosa* (1, 5-7). In the present study, *P. aeruginosa* strains were characterized by 3 phenotyping methods: biotyping, antibiotyping and serotyping. Its aims were to evaluate their typing capacity in relation to various isolate profiles. The use of RAPD-PCR makes it possible to identify non-serotyped strains, and shows the necessity of this molecular typing technique for typing *P. aeruginosa* strains from patients with CF.

## **2.3 MATERIALS AND METHODS**

### **2.3.1 Bacterial strains and culture**

The present study investigated 60 non-repetitive, pure strains of *P. aeruginosa* selected from 183 strains isolated from CFP for the period January to February 2005. Patient age varied from 18 to 42 years, including 48% women and 52% men. The *P. aeruginosa* strains were isolated and identified from sputa specimens received at medical microbiology laboratory of Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Hôtel-Dieu, Montreal, Quebec, Canada.

The bacterial stocks selected for study and the reference strain PAO1 were cultivated on blood agar (Quélab, Montreal, Quebec) at 35-36°C under aerobic conditions. All strains were stored at -70°C in 10% glycerol (v/v) and subcultured on tryptic soy broth (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) before typing.

### **2.3.2 Biotyping**

Biotyping was performed by the observation of colony morphology on blood agar incubated for 24 h at 35-36°C. The isolates are divided into 2 groups according to  $\alpha$  or  $\beta$  hemolysis. Pigment production was determined in Mueller-Hinton medium (Quélab), incubated for 24 h at 35-36°C, and pigmented colonies were classified according to their color.

### **2.3.3 Serotyping techniques**

All *P. aeruginosa* isolates were serotyped by the slide agglutination technique according to the manufacturer's specifications (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Serotyping was performed with specific polyclonal antisera to 17 somatic O antigens based on the International Antigenic Typing Scheme purchased from Biorad. Briefly, the slide test was conducted with 4 individual polyvalent mixtures antisera, using living suspensions of the isolates as test antigens from fresh blood agar cultured for

18 to 24 h. If it was positive in one of the pools, we then proceeded with monovalent grouping serum. In a second step, if it was negative in all pools, the test was repeated with autoclaved cells (120°C for 30 min). A positive reaction would appear within 3 to 10 sec after mixing with O serum. The result was expressed by the degree of agglutination from 0 to 4: 4 = complete reaction; 3 = strong reaction; 1 to 2 = relatively weak reaction; - = no reaction (8). A control test with standard saline was included each time. All agglutinations were repeated twice to assess reproducibility. Each stock was tested for autoagglutination with normal rabbit serum as a negative control. Strains agglutinated by 3 or more O antisera were termed polyagglutinable (PA), and were non-agglutinated (NA) if they did not react with any of the O antisera.

#### **2.3.4 Antibiotic susceptibility tests with the VITEK 2 system**

Antibiotic susceptibility tests were determined by medical microbiology laboratory of Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Hôtel-Dieu, Montreal. VITEK 2 cards were used according to the manufacturer's specifications (BioMérieux, Vitek, Inc., Hazelwood, MO, USA). An inoculum of  $8 \times 10^6$  CFU/ml was prepared and the turbidity was adjusted to match that of a 0.5 McFarland standard. The suspension was used to charge the wells, then sealed and read. 6 antibiotics contained in the cards for *P. aeruginosa* were selected. The concentration ranges for each of the 6 antibiotics were as follows: piperacillin, 4, 16 and 64 µg/ml; ceftazidime, 1, 2, 8 and 32 µg/ml; imipenem, 2, 4 and 16 µg/ml; ciprofloxacin, 0.5, 2 and 4 µl/ml; gentamicin, 4, 16 and 32 µl/ml; tobramycin, 8, 16 and 64 µl/ml. Susceptibility tests against tazocin were determined by the agar diffusion disk method according to the guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (9).

The use of vitek 2 systems in our laboratory may produce inaccurate susceptibility patterns for some antibiotics such as tazocin and piperacillin particularly to *P. aeruginosa* isolates as also previously reported in other comparative studies (10). In this regard, tazocin was retested using the agar diffusion disk method as indicated

above. Furthermore, these two methods were evaluated and standardised in our laboratory for routine susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* isolates and *P. aeruginosa*.

The following strains are tested for quality control: *Escherichia coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. Strains were considered to be multiresistant when they displayed resistance to at least 2 antibiotics, and were termed multiresistant isolates (MRI).

### **2.3.5 Isolation of *P. aeruginosa* genomic DNA**

A total of 35 *P. aeruginosa* non typable strains by the O serogroup method were subjected to RAPD-PCR typing. A single colony was inoculated into 4 ml of Luria Broth (Invitrogen, Inc. Burlington, ON) and grown overnight at 35°C-36°C. Bacterial genomic DNA from the clinical strains as well as from reference strain *P. aeruginosa* PAO1 was extracted with DNeasy kits (Qiagen, Inc., Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions, and stored at -70°C before amplification. A negative control extract containing all reagents without bacterium and a positive control extract with strain PAO1 were included in this step. DNA extract purity was quantitated in an ultraviolet spectrophotometer, (Biospec-minis, Shimadzu, Tokyo, Japan) at A<sub>260</sub> and A<sub>280</sub>.

### **2.3.6 RAPD analysis**

After extraction, genomic DNA was amplified by RAPD-PCR according to the modified method of Mahenthiralingam *et al.* (1) using arbitrary sequences 272 and 208, purchased from Invitrogen. Primer 272 (5'-AGCGGGCCAA-3') primarily served to type *P. aeruginosa* CF isolates described in this study, and primer 208 (5'-ACGGCCGACC-3') was deployed for confirmation. 20 ng of control DNA isolated from *P. aeruginosa* PAO1 optimized the reaction parameters, particularly DNA genomic concentration, magnesium, primers, amplification cycles and hybridization

temperature. PCR was carried out in a volume of 25  $\mu$ l under optimal conditions for *P. aeruginosa* and contained 10x PCR buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM (each) deoxynucleoside triphosphate, 1U of *Taq* polymerase (Invitrogen), 37.5 pmol of oligonucleotide, 40 ng of genomic DNA and sterile distilled water. A negative control in which DNA was replaced by sterile, distilled water was also included. Each reaction mixture was amplified with a Perkin-Elmer Cetus DNA Thermal Cycler (Model 2400, Norwalk, CT, USA) as follows: DNA was initially denatured at 94°C for 2 min. The other conditions were: 35 cycles at 94°C for 30 sec (denaturation), at 35°C for 30 sec (annealing) and at 72°C for 2 min (DNA chain extension). A final elongation step was performed at 72°C for 10 min. Standard procedures were retained to eliminate contamination (11). RAPD products were then separated by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gels containing ethidium bromide (0.5 g/ml) with 1x TBE running buffer (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 120 V for 4 h. Molecular size standards were included on all gels (1 kb ladder, Invitrogen). The gels were then scanned on a Typhoon 8600 Variable Mode Imager (version 1.0, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Gel images were stored in Image Quantification for Windows NT, version 5.2. (Molecular Dynamics). RAPD patterns were analyzed visually with molecular size standards to correct gel-to-gel migration variation. Isolates showing 2 or more different major bands were considered as distinct. Profiles differing from one another by only 1 major band or by 1 or 2 weak bands were considered as minor variations representing the subtype of a common strain (12). Primers 272 and 208 were used initially to screen discriminatory polymorphisms in 20 ng of control genomic DNA isolated from *P. aeruginosa* PAO1.

## 2.4 RESULTS

In this study, 60 strains isolated from CFP were profiled by the following methods: biotyping, serotyping, antibiotyping and out of them 35 by RAPD-PCR typing.

### 2.4.1 Colony morphology

67% of strains showed a slow growth rate, and required 24 h or more than 48 h of incubation. Different morphotypes were seen in 3 colony forms: mucoid (43%), rough (27%), and smooth (30%). Pigment production was observed in 35 of the 60 strains and 37% of them produced a characteristic blue colour. Loss of pigmentation was noted in 42% of strains. 73% of isolates were haemolytic, of which 48% demonstrated  $\beta$  hemolysis (Tables I, II).

### 2.4.2 Distribution of serotypes

A total of 35 strains (58%) could not be assigned to any international serotype. 14 strains were identified as NA (40%) and 21 were PA (60%) (Table II). Of the most frequent serotypes found, 8 were serotyped O3 and 6 were serotyped O6. MRI were associated with 6 serotypes O3, and rarely with other serotypes (Table I).

### 2.4.3 Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing of *P. aeruginosa* strains against 7 antibiotics enabled us to identify 8 antibiotypes classified according to their multiresistance profiles. 48% of *P. aeruginosa* isolates were found to be MRI (Tables I, II).

### 2.4.4 Genotype incidence

Multiple experiments with DNA extracts were performed to check method reproducibility. The polymorphisms amplified from DNA extracted from 3



subcultures of *P. aeruginosa* PAO1 and 2 subcultures of 6 clinical strains from the same frozen vial on separate experiments are shown in figures 1 and 2.

Primer 272 amplified polymorphisms ranging from 3 to 16 bands, whereas primer 208 amplified polymorphisms ranging from 8 to 19 DNA fragments with sizes ranging from 3.0 to 0.5 kb (Figures 3, 4). The RAPD fingerprints obtained with primers 272 and 208 from the non-serotypable strains revealed band presence with different numbers, sizes and intensities for each different isolate. Each RAPD type designed with primer 272 was confirmed with primer 208. Although these fingerprints possessed some bands, which were preserved between types and some bands, which were discriminatory between types, different genotypes were obtained for each primer.

Analysis of the result displayed in Table II shows two small clusters of a common genotype, according to each primer. With primer 272, genotype 112Si belonging to one cluster was present in 2 (6%) of the 35 strains. Genotype 140Si belonging to the other cluster was present in 3 (8%) of the 35 strains (Figure 5). Similar observations were found with primer 208: genotypes 3Si (8%) and 155Si (6%) (Figure 6). Several phenotypes were observed among clusters. Group of patients belonging to clonal clusters 155Si, 140Si and 112Si did not possess an antibiotic multiresistance profile. For patients harbouring genotype 3Si, only two of them showed the same multiresistance profile, but had different colony morphologies. For patients with genotype 112Si, there was a perfect correlation between genotype 112Si and some phenotype. Similar observations were found with genotype 155Si (Table II).

## 2.5 DISCUSSION

*P. aeruginosa* continues to be the principal cause of morbidity and mortality among CFP. Approaches based on phenotypic observations evoke difficulties in typing this bacterium. Genotyping *P. aeruginosa* CF strains allows us to indicate the limits of each phenotyping method, and we propose the use of RAPD-PCR for typing CF *P. aeruginosa* strains at our university hospital.

Biotyping CF *P. aeruginosa* strains enabled us to classify several biotypes. In particular, some of these profiles were frequently observed, such as mucoid strains, or those associated with loss of pigmentation and hemolysis production. Biotyping did not show any significant correlation between the distinct biotypes (Table I), and has limited ability to differentiate between them and thus has poor discriminatory power.

Sero-testing fails to type 35 strains (58%) of which 21 (60%) were PA (Table II). In fact, isolates from CFP are often PA as multiple sera can agglutinate them, but are uncommon in other patients (13, 14). Several studies noted that, but with different proportions. Hoiby *et al.* (15) found 55% of CF strains are PA, however Ojienyi reported that in 60% (16). In this paper, we don't observe any significant association between colony morphology and loss or expression of O antigen-specific sera. The lack of correlation between colony morphology and LPS type was previously reported (17). In fact, the lack of O-antigen might be expected to result in nontypability by O-antigen-specific-sera with serotyping procedures. Hancock *et al.* (14), found that these strains was deficient in oligosaccharide O-specific side chains, and suggest that this method fails when the strains have a rough-LPS. Furthermore, serotyping is also of limited discriminatory power as there are no more than 17 potential serogroups which can be identified (13, 18). Serotyping is also of very limited value in typing isolates from CFP due to non-serotyped *P. aeruginosa* strains, rendering the typability very low (16). Some authors try to provide a new scheme for the classification of these strains. In a recent study using genotypic analysis of nontypable serotypes, three antigenic phenotypes are suggested to be new serotypes of *P. aeruginosa* (19).

Our results showed that, among 25 serotypable strains, strain O3 was the most prevalent (32%) and 6 of these strains were multiresistant (Table I). Previous studies reported that this serogroup was most associated with resistance to all antibiotics tested in patients at our hospital (9). Serotype O3 may be an epidemic clone circulating in the hospital environment of our CFP. In fact, clustering isolates in such serotypes should be investigated by the genetic typing method to determine if an outbreak was occurring. Therefore, association of serotyping with antibiotic resistance has been reported to be of more value in cases of *P. aeruginosa* strains from non-CF origin (20).

Typing according to antimicrobial susceptibility established 6 multiresistance profiles (b, d, e, f, g and h) (Tables I, II). The prevalence of multiresistance in 48% of all isolates studied indicated no association with the mucoid phenotype. According to our data, multiresistance profiles do not often guarantee the same mucoid phenotype, as non-mucoid isolates can also be resistant, as previously reported (21). We found that antimicrobial resistance profiling of *P. aeruginosa* is too variable to provide a marker for strain identity. Although we obtained 8 groups of susceptibility profiles, the heterogeneous distribution of the isolates between groups indicated the low discriminatory power of this method.

The RAPD method utilized in this study used 10-base primers, of high guanine-cytosine content (60-70%). Primers 272 and 208 used here were previously described for their reproducibility and discriminatory with *P. aeruginosa* (1). Our results show that RAPD-PCR with these primers is able to successfully type *P. aeruginosa* strains. However, Maslow et al. (22), found that with RAPD analysis, identification of a suitable primer that provides reproducible results is difficult and discriminatory power is uncertain.

Our RAPD typing data suggest that when primers were specifically identified and when DNA template is tightly controlled, RAPD can give strain-specific polymorphisms for *P. aeruginosa*.

Kersulyte et al. (6) found that RAPD analysis with 10-nucleotide primers lacked reproducibility, and did not recommend these primers for typing *P. aeruginosa*. In contrast, the reliability of 10-base primers in typing *P. aeruginosa* from CFP was frequently reported in recent studies (19, 23, 24). Furthermore, according to Giordano et al. (7) primer 208 failed to amplify bacterial DNA in several cases with CF strains, which would explain the limited use of this primer in *P. aeruginosa* typing. DNA extraction procedure was performed with a minipreparation kit, providing a high quality of genomic DNA which is an issue of much concern in reproducibility of this method (25).

On the other hand, antibiotyping was not useful since not all MRI of this study were included in the same genotype (Table II). The inadequacy of antibiotype to confirm a clonal relation among MRI has been reported (26). Analysis of the relationship between resistance pattern and genotype has revealed that high variability of the patterns does not always correspond to genotype variability. Limitations of using antibiograms as a method for typing CF *P. aeruginosa* strains have been reported (5, 27).

The RAPD characterization of non serotyped strains, underlines the discriminatory power of this method. Here we show that RAPD-PCR circumvents the problem of limitation of LPS serotyping encountered with CF *P. aeruginosa* in accordance to previous studies (2, 28, 29). There were no specific genotypes associated with 2 serological variants: NA and PA. Anomalies with this serotyping method are rather due to changes in LPS type (14).

The RAPD profiles of isolates revealed 2 small clonal groups (6% and 8%) sharing the same genotype respectively with each primer (Table II). Both genetic groups confirmed the evidence of some clusters with closely related strains among the members of CFP (30). The group of patients belonging to clonal clusters 155Si, 140Si and 112Si did not show a multiresistance profile. Increased exposure to antibiotics may raise the risk of potential emergence of resistant *P. aeruginosa*. A

correlation between the resistance of *P. aeruginosa* and antibiotic administration was observed by many investigators (31). For patients harbouring genotype 3Si, only two of them shared the same multiresistance profile, but had different colonial morphologies. Indeed, studies have reported that antibiotic resistance is bound to mechanisms such as variability of membrane permeability not directly related to the genotype (7, 21). Furthermore, the multiresistant antibiotic type observed in cluster 3Si, may constitute a risk of epidemic spread in hospital or in CFP environment. Molecular typing must be considered for epidemiological surveillance of such strains.

For patients carrying genotype 112Si, there was a perfect correlation between genotype 112Si and colony morphology, pyocyanin pigment, PA variant and susceptibility pattern. Same observation was found with genotype 155Si except for colony morphology and serologic variant (Table II). Phenotypic subdivision of strains that are similar according to genome fingerprinting may explain the possibility of cross-infection. In light of this data, cross-infection can happen among CFP attending our hospital. But this risk is limited due to the fact that similar strains are detected in small number of patients. Usually, patients harbour such similar genotypes, if personal contacts are frequent (32).

In the present study, it was not possible to draw a conclusive answer for the risk of cross-infection. Data on possible contact of these patients with the environment or other infected patients is needed. In fact, the mode of acquisition of these similar genotypes between patients is to be investigated. Furthermore, although the data obtained with conventional methods tested above may only reflect phenotypical differences, phenotypic data may provide useful supplementary information to support later genotypic epidemiological studies.

In conclusion we have demonstrated that due to diverse phenotypic nature of CF *P. aeruginosa*, phenotyping based methods, such as biotyping, serotyping and antibiogram, poorly discriminate strains. RAPD-PCR has a high degree of typeability and discriminatory power than conventional typing methods. RAPD-PCR is rapid and

the cost is low when compared with other genotyping methods. The combination of pertinent advantages mentioned above provides us with a technique that can be implemented in non-specialized laboratories (28, 33). We also showed that phenotypic data fails to show a relationship between *P. aeruginosa* strains, confirming that only randomly amplified polymorphic DNA method can establish a clonal relation.

Our typing data should enable further epidemiological studies at our hospital, and thereby enhance the effectiveness of CF infection control policies.

## **2.6 ACKNOWLEDGEMENT**

We are grateful to the following physicians for providing strains: Dr M. Poisson and Dr R. Morisset. We also thank Mr Ovid Da Silva for editing this manuscript.

## 2.7 REFERENCES

1. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1129-35.
2. Ojeniyi B, Hoiby N. Comparison of different typing methods of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1991; 44:13-22.
3. Speert D. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci* 2002; 7:54-61.
4. The International *Pseudomonas aeruginosa* Typing Study Group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with fibrosis. *J Infect Dis* 1994; 169; 134-42.
5. Mereghetti L, Marquet-van der Mee N, Loulergue J, Rolland JC, Audurier A. *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients: study using whole cell RAPD and antibiotic susceptibility. *Pathol Biol.* 1998; 46:319-24.
6. Kersulyte D, Struelens M J, Deplano A, Berg DE. Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2216-19.
7. Giordano A, Magni A, Graziani C, Sessa R, Quattrucci S, Cipriani P. AP-PCR typing of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Microbiologica* 2001; 24:157-63.
8. Ravaoarinoro M, Mohapatra S, Shore J, Rawal S, Omri A, Yaghi J, Oriol F. Serotyping clinical isolates site, antibiotic susceptibility and beta-lactamase production. *Int J Antimicrob Agents* 1996; 65-8.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA, USA.

10. Karlowsky JA, Weaver MK, Thomsberry C, Dowzicky MJ, Jones ME, Sahm DF. Comparison of four antimicrobial susceptibility testing methods to determine the in vitro activities of piperacillin and piperacillin-tazobactam against clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3339-43
11. Kowk S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339: 237-38.
12. Struelens MJ, Schwam V, Deplano A, Baran D. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 1993; 31:2320-26.
13. Pitt TL, MacDougall J, Penketh AR, Cooke EM. Polyagglutinating and non-typable strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. J Med Microbiol. 1986; 21:179-86.
14. Hancock REW, Speert D, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, non typable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. Infect Immun 1983; 42:170-77.
15. Hoiby N, Rosendal K. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients treated at a cystic fibrosis centre. Acta Pathol. Microbiol Scand Sect B. 1980; 88:125-31.
16. Ojeniyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. APMIS Suppl 1994; 4:1-44.
17. Martin DR. Mucoid variation in *Pseudomonas aeruginosa* induced by phage. J Med Microbiol. 1973; 6:111-8
18. Ojeniyi B, Wolz C, Doring G, Lam JS, Rosdahl VT, Hoiby N. Typing of polyagglutinable isolates from cystic fibrosis patients. APMIS. 1990; 98:423-31.
19. Shoumali L, Masoud H, Khlaif H, Migdadi H, Masoud S. Serologic and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Jordanian clinical isolates compared with the strains of International Antigenic Typing Scheme. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 15:1-6.



20. Patzer J, Dzierzanowska D. The resistance pattern and serotypes of *P. aeruginosa* strains isolated from children. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 44:13-22.
21. Shawar RM, MacLeod DL, Garber RL, Burns JL, Stapp JR, Clausen CR, Tanaka SK. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:2877-80.
22. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis.* 1993 ; 17 : 53-64.
23. Campbell M, Mahenthiralingam E, and Speert DP. Evaluation of random amplified polymorphism DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4614-15.
24. Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthiralingam E. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166:988-93.
25. Welsh J, and McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res.* 1990; 18:7213-7224.
26. Rodriguez B, Vasquez E, Sussmann O, Mattar S, Jaramillo CA. Antimicrobial susceptibility and serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Bogota, Columbia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19:152-4
27. Sener B, Koseoglu O, Ozcelik U, Kocagoz T, Gunalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infectious in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol* 2001; 291:387-93.
28. Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *Pseudomonas aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32:666-71.

29. Hernandez J, Ferrus MA, Hernandez M, Owen RJ. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. FEMS Immunol Med Microbiol. 1997; 17:37-47.
30. Curran B, Jonas D, Grundman H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 2004; 42:5644-49.
31. Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS, Hoiby N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF center. APMIS 1994; 102: 674-80.
32. Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, Van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. Lancet 1996; 348:639-42.
33. Michael Olive D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37:1661-69.

## 2.8 TABLES

**Table I.** Phenotyping results of *P. aeruginosa* isolates from CFP

Strains	Colony morphology	Pigment	Hemolysis	Serotype	Resistance pattern
1	R	PC	-	O6	b
2	R	PC	-	O3	b
121	S	-	β	O12	a
36	R	Re	A	O3	b
40	S	-	β	O6	a
54	R	-	β	O3	c
58	M	-	β	O2	c
65	S	PV	β	O11	e
67	R	-	β	O16	f
81	R	-	A	O10	e
93	M	PC	β	O11	c
97	S	PV	β	O3	a
104	M	-	β	O10	c
108	M	Re	A	O6	f
123	M	PV	A	O1	d
130	S	PV	β	O3	f
135	S	-	-	O3	b
143	M	PV	β	O6	a
144	R	-	A	O12	b
148	M	PC	β	O3	e
153	S	-	-	O5	a
160	M	PC	A	O6	a
178	R	PC	β	O9	a
180	S	-	β	O6	c
183	S	PC	A	O3	b

Antibiotic resistance pattern: a, Susceptible to all antibiotics tested; b, Resistant to all antibiotics tested; c, Resistant to 1 antibiotic; d, Resistant to 2 antibiotics; e, Resistant to 3 antibiotics; f, Resistant to 4 antibiotics; g, Resistant to 5 antibiotics; h, Resistant to 6 antibiotics.

Abbreviations: M, mucoid; R, rough; S, smooth; NA, non-agglutinable; PA, polyagglutinable; PV, pyoverdine; PC, pyocyanin; Re, red.

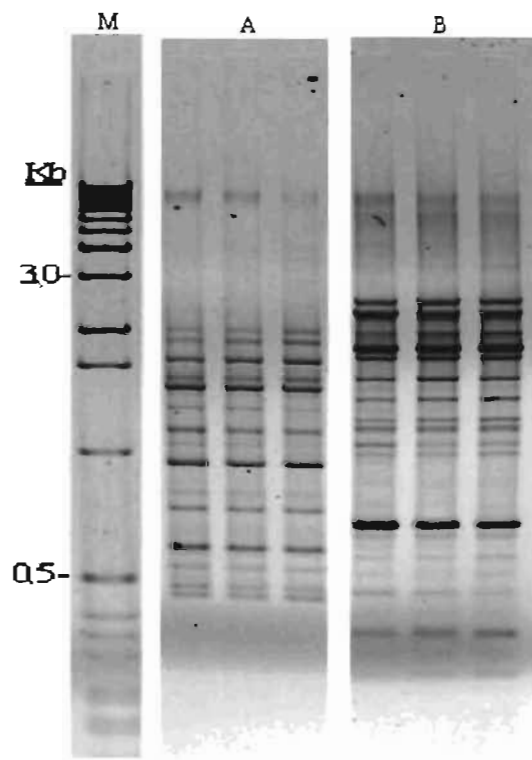
**Table II.** Phenotyping and genotyping results of *P. aeruginosa* isolates from CFP

Strains	Colony morphotype	Pigment	Hemolysis	O type reaction	Resistance pattern	RAPD profile <sup>272</sup>	RAPD profile <sup>208</sup>
3	M	PC	-	NA	C	3	<b>3Si</b>
8	M	-	$\beta$	NA	H	8	<b>3Si</b>
17	S	PV	-	PA	H	17	<b>3Si</b>
21	R	PC	$\alpha$	PA	C	21	21
22	R	-	$\alpha$	PA	G	22	22
23	M	-	$\alpha$	NA	B	23	23
30	M	PV	$\alpha$	NA	D	30	30
86	R	PV	$\beta$	PA	E	86	86
52	S	-	$\beta$	PA	G	52	52
55	S	-	-	PA	A	55	55
57	M	-	-	NA	A	57	57
77	S	PC	$\beta$	PA	E	77	77
128	S	PC	$\beta$	PA	A	128	128
127	M	-	-	NA	A	127	127
94	R	-	-	PA	C	94	94
100	M	PC	-	PA	C	100	100
102	M	PC	$\beta$	NA	A	102	102
105	M	PC	$\alpha$	PA	A	105	105
111	M	PC	-	PA	D	111	111
112	M	PC	-	PA	A	<b>112Si</b>	112
126	S	-	$\beta$	PA	E	126	126
129	M	PC	$\alpha$	PA	A	<b>112Si</b>	129
134	M	PC	$\beta$	PA	G	134	134
140	R	PV	$\beta$	NA	C	<b>140Si</b>	140
146	S	PC	$\beta$	PA	A	<b>140Si</b>	<b>155Si</b>
155	M	PC	-	NA	A	<b>140Si</b>	<b>155Si</b>
158	M	-	$\alpha$	NA	F	158	158
117	S	-	$\alpha$	NA	E	117	117
176	R	PV	$\beta$	NA	G	176	176
179	S	PV	$\beta$	PA	A	179	179
177	M	PC	-	NA	C	177	177
172	R	-	$\beta$	NA	H	172	172
149	R	-	$\beta$	PA	E	149	149
182	M	-	-	PA	a	182	182
103	M	PC	$\beta$	PA	a	103	103

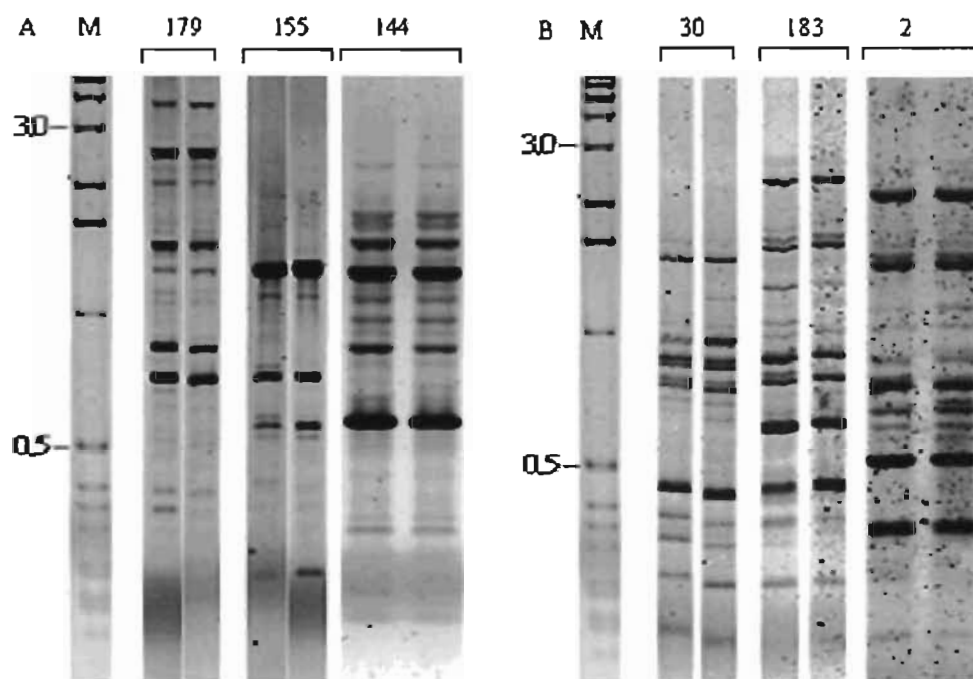
Antibiotic resistance pattern: a, Susceptible to all antibiotics tested; b, Resistant to all antibiotics tested; c, Resistant to 1 antibiotic; d, Resistant to 2 antibiotics; e, Resistant to 3 antibiotics; f, Resistant to 4 antibiotics; g, Resistant to 5 antibiotics; h, Resistant to 6 antibiotics.

Abbreviations: M, mucoid; R, rough; S, smooth; Si, similar profile; NA, non-agglutinable; PA, polyagglutinable; PV, pyoverdine; PC, pyocyanin; CFP, cystic fibrosis patients.

## 2.9 FIGURES

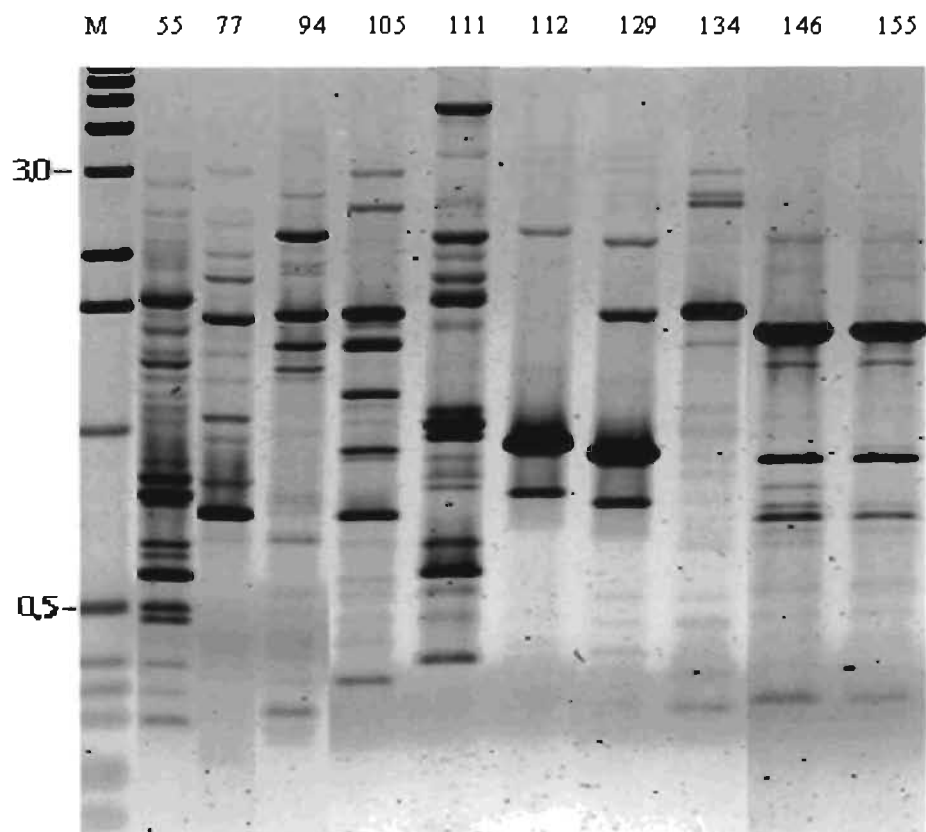


**Figure 1.** Reproducibility of RAPD-PCR fingerprinting of *P. aeruginosa* PAO1. Presented here are the results of triplicate tests using 20 ng of template DNA with primers 272 (A) and 208 (B). Size markers (M) are indicated on the left gel.

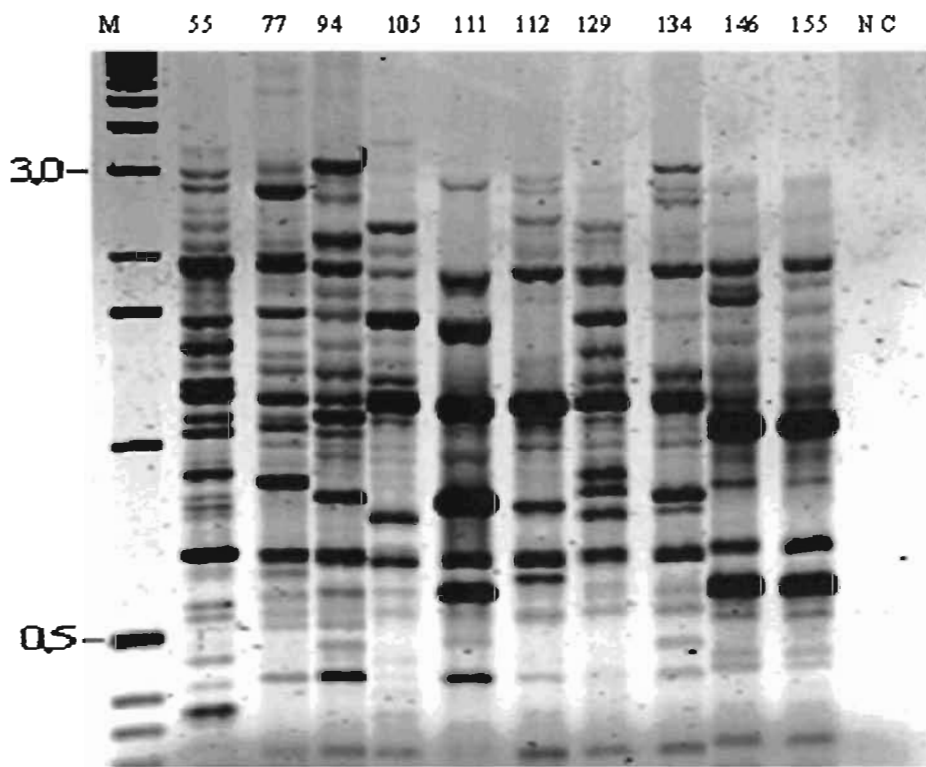


**Figure 2.** Reproducibility tests of clinical strains, using 40 ng of template DNA in duplicate from 2 different subcultures with primers 272 (A) and 208 (B). The molecular size markers were run in lane M, and their sizes (in kilobases) are indicated on the left of the gel.

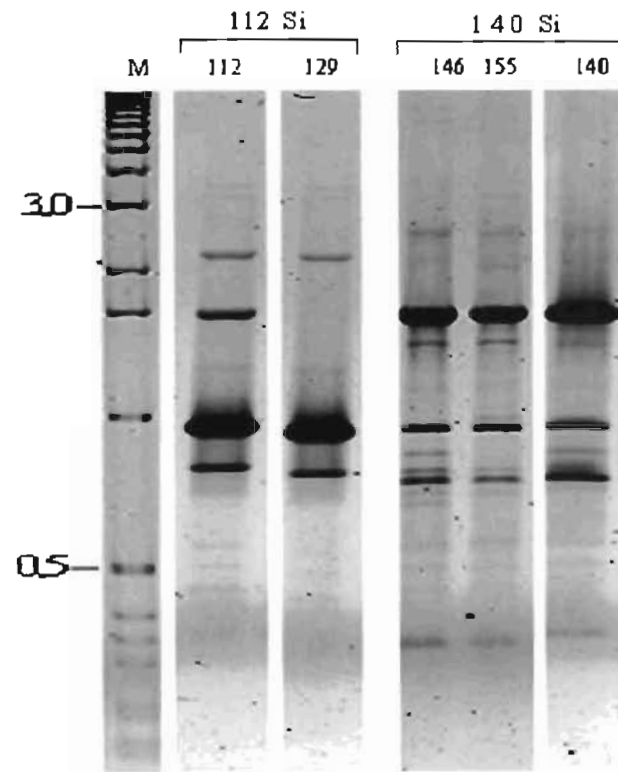




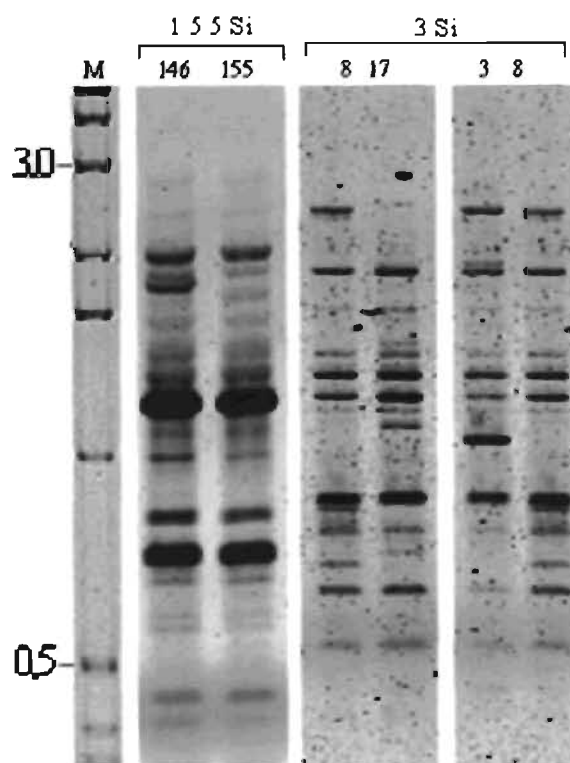
**Figure 3.** RAPD-PCR amplification patterns with primer 272. Genomic DNA was amplified using 40 ng of template DNA. Molecular size markers were run in lane M, and their sizes (in kilobases) are indicated on the left of the gel.



**Figure 4.** RAPD-PCR amplification patterns with primer 208. Genomic DNA was amplified using 40 ng of template DNA. Molecular size markers were run in lane M, and their sizes (in kilobases) are indicated on the left of the gel. NC, negative control.



**Figure 5.** Similar RAPD-PCR profiles of *P. aeruginosa* strains with primer 272. Molecular size markers were run in lane M, and their sizes (in kilobases) are indicated on the left of the gel.



**Figure 6.** Similar RAPD-PCR profiles of *P. aeruginosa* strains with primer 208. Molecular size markers was run in lane M, and their sizes (in kilobases) are indicated on the left of the gel.



**TROISIÈME PARTIE:**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

**CHAPITRE III:  
DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

### 3.1 DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le typage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK dans la présente étude a permis de révéler des phénotypes typiques de l'infection bactérienne des PFK avec une incidence importante pour des souches mucoïdes (43%), multirésistantes (48%), et non sérotypables (58%). L'analyse RAPD des souches a permis de classer ces phénotypes selon différents génotypes. Les résultats obtenus indiquent des génotypes uniques partageant certains phénotypes similaires 155Si et 112Si (Tableau II, p.63). On a trouvé aussi que les méthodes de phénotypage testées ne sont pas assez discriminatoires pour identifier des groupes génétiques uniques. Seule la RAPD est capable d'établir une relation clonale entre les isolats. La RAPD-PCR mise au point dans cette étude a permis de caractériser chaque souche, et faciliter le typage de *P. aeruginosa*.

Cependant, la RAPD, une fois exécutée, peut produire des résultats expérimentaux qui ne sont pas similaires dans différents laboratoires, ou dans le même laboratoire si ces études sont faites à différents moments. Cette méthode a toujours été identifiée comme un moyen rapide et fiable dans la distinction entre les souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK (Renders et al., 1996). Dans cette étude, la RAPD a été employée pour caractériser les profils génétiques des souches non sérotypables et pour pouvoir comparer leur biotype, leur génotype et leur antibiogramme. Il a été aussi observé que la combinaison de différentes techniques de typage peut apporter des données utiles sur ces souches. À cet égard, ces informations additionnelles ont pu être discutées par rapport à d'autres études récentes.

Nos données rapportent que la perte de pigmentation est plus fréquente chez les souches possédant un phénotype muqueux (13%) (Tableau I, II, p.62, 63). En effet, les souches non productrices du pigment sont particulièrement fréquentes parmi les souches muqueuses des PFK et sont rapportées dans 5 à 10% des cas dans la littérature (Carpentier et al., 2003; Spikler et al., 2004).

Les études *in vitro* montrent que la pyocyanine interfère avec de nombreuses fonctions cellulaires, son importance au cours de l'infection des PFK n'est pas encore

déterminée (Lau et *al.*, 2004). Ceci pourrait être expliqué en partie par la difficulté de définir la contribution de la pyocyanine dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* parmi plusieurs facteurs de virulence produits par ce pathogène. Les études cliniques rapportent par exemple qu'au cours de la période suivant la colonisation chronique des poumons, *P. aeruginosa* subit une altération notamment dans la sécrétion des pigments sidérophores (Mahenthiralingham et *al.*, 1996).

La pyoverdine comme pigment sidérophore est impliquée dans la genèse des lésions du tissu pulmonaire qui semble être limité à la période initiale de l'infection (Sermet-Gaudelus et *al.*, 2000). La pyocyanine joue un rôle important dans l'établissement de la prédominance de *P. aeruginosa* dans les voies aériennes des PFK, grâce à sa propriété létale permettant d'éliminer la compétition d'autres bactéries (Schaber et *al.*, 2004). Par ailleurs, plusieurs études *in vitro* suggèrent que cette toxine contribue directement à la persistance de *P. aeruginosa* dans les poumons des PFK (Kerr et *al.*, 1999; Kong et *al.*, 2006). De plus, selon une étude récente de Kong et al. 2006, la pyocyanine perturbe certains mécanismes cellulaires et contribue significativement à la pathogenèse de la FK chez les personnes infectées par *P. aeruginosa*. Enfin, la perte de la pigmentation n'apparaît pas toute au long de l'infection et il apparaît que la prévalence de ces souches non productrices du pigment, varie suivant le type d'infection (aigue ou chronique par exemple) (Sermet-Gaudelus et *al.*, 2000 ; Mahenthiralingham et *al.*, 1996). Cette variation est soumise à différents systèmes de régulation. Ainsi la bactérie s'adapte aux conditions physiologiques et biologiques de son environnement et aussi à sa propre population.

Au niveau du phénotypage, la production de pigment de pyocyanine est signalée chez deux groupes génétiques distincts ou clones le 112Si et le 155Si (Tableau II, p.63). De plus, aucune corrélation entre la production de pyoverdine et le caractère mucoïde des souches n'a été notée (Tableaux I, II, p.62, 63). À ce niveau, l'étude de De Vos et *al.*, 2001 ne supporte pas une corrélation possible entre la perte de pyoverdine et la mucosité, mais elle prouve plutôt une parfaite corrélation entre le type de pyoverdine

produit et un clone particulier prévalent dans l'environnement des PFK. Le clone C est plus fréquent.

Par l'observation des profils d'hémolyse, le biotypage n'a pas réussi à associer un type d'hémolyse à un phénotype ou génotype particulier parmi les souches isolées des PFK (Tableaux I, II, p.62, 63). 75% des souches de *P. aeruginosa* sont hémolytiques et 25% ne le sont pas. Ce faible pourcentage pourrait être expliqué par le fait que certaines souches sont probablement déficientes dans la production des toxines hémolytiques. Il est connu que les souches de *P. aeruginosa* liées à la FK produisent des quantités significatives des toxines possédant une activité hémolytique notamment la phospholipase C (PLC) (Granstrom et al., 1984). La PLC est un facteur de virulence qui constitue une composante critique dans la pathogénie de *P. aeruginosa* (Vasil et al., 1991).

Des études rapportent que *P. aeruginosa* peut produire au moins deux types de PLC avec des poids moléculaires semblables ( $\approx 78\ 000$  Da): l'une non hémolytique, la PLC-N et l'autre hémolytique, la PLC-H (Konig et al., 1997). Alors que la PLC-N n'a aucune activité pathogène démontrée, la forme hémolytique cause des dommages dans les poumons et les tissus chez les PFK (Konig et al., 1997; Catharina et al., 2002).

On a pu observer, chez la souche 2 (Tableau II, p.63), des phénotypes non communs à l'infection chronique de FK, à savoir rugueux, producteur de pyocyanine, sérotypable et non hémolytique sur gélose. Cependant, elle est résistante à tous les antibiotiques testés. A l'opposé, deux souches (57 et 127) possèdent quatre phénotypes caractéristiques de l'infection chronique. Elles sont muqueuses, non hémolytiques, ont une perte de pigmentation et sont du sérogroupe NA. Ces souches étaient sensibles à tous les antibiotiques testés.

Selon ces résultats, il apparaît que la résistance n'est pas nécessairement associée à un phénotype particulier. Des études précédentes ont montré que la résistance de *P. aeruginosa* au cours de la FK, n'est pas directement liée au génotype ni à un

phénotype particulier. Elle est plutôt due aux mécanismes de variation de la perméabilité membranaire (Shawar et *al.*, 1999; Giordano et *al.*, 2000) ou aux éléments génétiques mobiles par exemple les transposons et les plasmides (Ojeniyi et *al.*, 1994).

Finalement, l'étude des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK par différentes méthodes de typage nous a permis de montrer la nécessité du typage moléculaire et de proposer la PCR à amorce arbitraire 272, comme une méthode simple et fiable pour examiner de telles souches. La RAPD-PCR ainsi développée au cours du présent travail, nous apparaît fiable dans le typage de ces souches et pourrait être mise à la disposition des laboratoires de routine, et servir à des fins épidémiologiques. Les résultats de phénotypage rapportés dans cette étude pourraient guider les médecins dans le choix et l'évaluation des antibiotiques ainsi que la surveillance épidémiologique des souches de *P. aeruginosa*.

### 3.2 PERSPECTIVES

Les méthodes de typage moléculaire doivent être considérées dans le typage des souches de *P. aeruginosa* isolées des PFK. L'application d'une méthode moléculaire pour le typage de routine de ces souches améliorera sans doute les études épidémiologiques et augmentera de ce fait l'efficacité des stratégies de contrôle et de prévention de l'infection. La RAPD-PCR mérite d'être appliquée dans les laboratoires non spécialisés puisqu'elle a déjà prouvé sa simplicité et sa fiabilité dans le typage des souches de *P. aeruginosa* associées à la FK et de nombreuses autres bactéries médicalement importantes.

L'antibiothérapie est un composant fondamental de la prise en charge des PFK (Sermet-Gaudelus et al., 2000). Le choix des antibiotiques est fondé sur les phénotypes de résistance de souches et sur la gravité de l'infection. En effet, une antibiothérapie précoce et agressive de la colonisation intermittente de *P. aeruginosa* peut empêcher l'infection chronique chez la plupart des patients (Ramsey et al., 1999; Saiman et al., 2004; Doring et al., 2004). Le traitement ainsi amélioré réduit la morbidité des PFK et peut mener à leur survie prolongée (Ciofu et al., 1994; Frederiksen et al., 1997). Une fois que l'infection chronique de *P. aeruginosa* s'installe dans les poumons des PFK, les antibiotiques utilisés peuvent supprimer le pathogène mais sans l'éradiquer. C'est la raison pour laquelle la thérapie se solde par de nombreux échecs. De plus, cet échec thérapeutique peut avoir comme conséquence la sélection et la persistance des souches multirésistantes. Dans ces circonstances, le traitement et la prévention de l'infection des voies aériennes par *P. aeruginosa* constituent un défi majeur. La sévérité de la maladie et la résistance croissante aux antibiotiques au cours des infections à *P. aeruginosa* associées à la FK, soulignent le besoin d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques. Une voie thérapeutique possible est de cibler un des nombreux mécanismes pathogéniques dont *P. aeruginosa* est doté (Romling et al., 1997; Kipnis et al., 2006). Cependant, la plupart de ces alternatives sont en phase expérimentale et ne constituent pas une solution rapide aux problèmes de FK.

**CHAPITRE IV:**  
**BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**



Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 2005 ; 33 : 728-33.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 1995 ; 59 : 149-69.

Andrei A, Zervos MJ. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 ; 130 : 662-8.

Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000 ; 50 : 1563-89.

Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 1994 ; 7 : 174-184.

Bellon G, Gilly R. Antibiothérapie dans la mucoviscidose : incertitudes et réalités. *Rev Mal Resp.* 1990 ; 7 : 203-08.

Bennekov T, Colding H, Ojeniyi B, Bentzon MW, Hoiby N. Comparison of ribotyping and genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34 : 202-4.

Bertrand X, Thouverez M, Talon D, Boillot A, Capellier G, Floriot C, Helias JP. Endemicity, molecular diversity and colonisation routes of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Intensive Care Med.* 2001 ; 27 : 1263-68.

Blanc DS, Siegrist HH, Sahli R, Francioli P. Ribotyping of *Pseudomonas aeruginosa*: discriminatory power and usefulness as a tool for epidemiological studies. *J Clin Microbiol.* 1993 ; 31 : 71-77.

Botes J, Williamson G, Sinickas V, Gurtler V. Genomic typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates by comparison of Ribotyping and PFGE : correlation of experimental results with those predicted from the complete genome sequence of isolate PAO1. *J Microbiol Methods.* 2003 ; 55 : 231-40.

Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshall S, Jones RN. Comparaison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 1818-22.

Burns JL, Saiman L, Whittier S, Krzewinski J, Liu Z, Larone D, Marshall SA, Jones RN. Comparison of two commercial systems (vitek and microscan-walkaway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001 ; 39 : 257-60.

Campbell JI, Ciofu O, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the ampC-ampR genetic region. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 ; 41:1380-4.

Campbell M, Mahenthalingam E, Speert DP. Evaluation of random amplified polymorphic DNA typing of *P. aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. 2000 ; 38 : 4614-15.

Campbell ME, Farmer SW, Speert DP. New selective medium for *Pseudomonas aeruginosa* with phenanthroline and 9-chloro-9-[4-(diethylamino) phenyl]-9,10-dihydro-10-phenylacridine hydrochloride (C-390). *J Clin Microbiol*. 1988 ; 26 : 1910-12.

Catharina WW, Britta S, Giorgio S, Michael LV, Charles AD, Giamila F. Pulmonary Inflammation Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide, Phospholipase C, and Exotoxin A : Role of Interferon Regulatory Factor 1. *Infection and Immunity* 2002, p. 1352-1358, Vol. 70, No. 3.

Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, Van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 1996 ; 348 : 639-42.

Ciofu O, Giwercman B, Pedersen SS, Hoiby N. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF center. *APMIS* 1994 ; 102 : 674-80.

Curran B, Jonas D, Grundman H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 5644-49.

Carpentier JP, Morillon M, Petrognani R, Cavallo JD. Infections à bacille pyocyanique. *Encycl Méd Chir*. 2003 ; 8-025-B-50.

Denamur EB, Picard P, Gouillet P, Bingen E, Lambert N, Elion J. Complexity of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis : combined results

from esterase electrophoresis and rDNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Epidemiol Infect.* 1991 ; 106 : 531-9

De Vos D, De Chial M, Cochez C, Jansen S, Tummler B, Meyer JM, Cornelis P. Study of pyoverdine type and production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients : prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine-negative mutations. *Arch Microbiol.* 2001 ; 175 : 384-338.

Doring G, Hoiby N. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis : a European consensus. *J Cystic Fibrosis.* 2004 ; 3 : 67-91.

Elaichouni A, Verschraegen G, Claeys G, Devleeschouwer M, Godard C, Vaneechoutte M. *P. aeruginosa* serotype O12 outbreak studied by arbitrary primer PCR. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 666-71.

Fegan M, Francis P, Hayward AC, Davis GHG, Fuerst JA. Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1990 ; 28 : 1143-46.

Feil EJ, Enright MC. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2004 ; 7 : 308-13.

Fink JN, Kelly KJ. Immunological aspects of granulomatous and interstitial lung disease and of cystic fibrosis. *J AMA.* 1992; 268 : 2879-2881.

Fiona WS, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol* 2004 ; 53 : 609-15.

Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk PJ. How close is close : 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol.* 1992 ; 42 : 166-70.

Frederiksen B, Koch C, Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1997 ; 23: 330-335.

Freitas AL, Barth AL. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients : a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. *Braz J Med Biol Res.* 2004 ; 37 : 77-82.

Fyfe J AM, Harris G, Govan JRW. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis. *Lancet* 1984 ; 20 : 47-50.

Giordano A, Magni A, Graziani C, Sessa R, Quattrucci S, Cipriani P. AP-PCR typing of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Microbiologica* 2001 ; 24 : 157-63.

Giske CG, Libisch B, Colinon C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M, Kronvall G, Rossolini GM. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 4309-15.

Giwerzman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Hobby N. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother.* 1990 ; 26 : 247-59.

Gould JC, McLeod JW. A study of the use of agglutinating sera and phage lysis in the classification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pathol Bacteriol.* 1960 ; 79 : 295-311.

Govan JRW. Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*. In : Bergan T, Norris JR, éd. *Method in Microbiology*. London and New York : Academic Press ; Vol 10, 1978. p. 61-91.

Granstrom M, Ericsson A, Strandvik B, Wretling B, Pavlovskis OR, Berka R, Vasil ML. Relation between antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins and colonization/infection in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr Scand.* 1984;73: 772-777.

Grattard F, Pozzeto B, Ros A, Gaudin OG. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* strains by ribotyping : high discriminatory power by using a single restriction endonuclease. *J Med Microbiol.* 1994 ; 40 : 275-81.

Grundman H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt T L. Discriminatory power of three DNA-based typing technique of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1995 ; 33 : 528-34.

Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of

serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun.* 1983 ; 42 : 170-7

Healy M, Houg J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol.* 2005 ; 43 : 199-207.

Hernandez J, Ferrus MA, Hernandez M, Owen RJ. Arbitrary primed PCR fingerprinting and serotyping of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997 ; 17 : 37-47.

Hoiby N, Rosendal K. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients treated at a cystic fibrosis centre. *Acta Pathol. Microbiol Scand Sect B.* 1980 ; 88 : 125-31.

Hoiby N, Flensburg EW, Beck B, Friis B, Jacobsen SV, Jacobsen L. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scan J Resp Dis.* 1977 ; 58 : 65-79.

Ito S, Kageyama M. Relationship between pyocins and bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Appl Microbiol.* 1970 ; 16 : 231-40.

Jones AM, Govan IR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet* 2001 ; 358 : 557-8.

Jones RN, Biedenbach DJ, Marshall SA, Pfaller MA, Doern GV. Evaluation of the Vitek system to accurately test the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against cefepime. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998 ; 32 : 107-10.

Karlowsky JA, Weaver MK, Thomsberry C, Dowzicky MJ, Jones ME, Sahn DF. Comparison of four antimicrobial susceptibility testing methods to determine the in vitro activities of piperacillin and piperacillin-tazobactam against clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 3339-43

Kelly NM, Fitzgerald MX, Tempany E, O'Boyle C, Falkiner FR, Keane CT. Does pseudomonas cross-infection occur between cystic-fibrosis patients? *Lancet* 1982 ; 2 : 688-90.

Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, Govan JR. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology* 2007 ; 153: 1852-9.

Kerr JR, Taylor GW, Rutman A, Hoiby N, Cole PJ, Wilson R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol.* 1999 ; 52 : 385-7.

Kersulyte D, Struelens MJ, Deplano A, Berg DE. Comparaison of arbitrary primed PCR and macrorestriction (Pulsed-Field gel Electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 2216-19.

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targetting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Med Mal Infect.* 2006;36:79-91.

Konig B, Vasil ML, Konig W. Role of haemolytic and non-haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes. *J Med Microbiol.* 1997;46:471-478.

Kong F, Young L, Chen Y, Ran H, Meyers M, Joseph P, Cho YH, Hassett DJ, Lau GW. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol.* 2006 ; 8 : 1121-33.

Kowk S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989 ; 339 : 237-38.

Kristjansson M, Samore MH, Gerding DN. Comparaison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32 : 1963-69.

Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* 2004 ; 10 : 599-606.

Lewis DA, Jones A, Parkhill J, Speert DP, Govan JR, Lipuma JJ, Lory S, Webb AK, Mahenthiralingam E. Identification of DNA markers for a transmissible *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strain. *Am Jn Respir Cell Mol Biol.* 2005 ; 33 : 56-64.

Liu PV, Matsumoto H, Bergan T. Survey of heat-stable major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Systematic Bacteriol. 1983 ; 33 : 256-64.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. 2002 ; 34 : 634-40.

Livermore DM. Betalactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8: 557-84.

Loutit JS, Tompkins LS. Restriction enzyme and southern hybridization analyses of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1991 ; 29 : 2897-900.

Maciá MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. Antimicrob Agents Chemother. 2005 ; 49 : 3382-6.

Mahenthiralingham E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1129-35.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang O, Zhou J, Zurth k, Caugnant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing : a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 1998 ; 95 : 3140-5.

Martin C, Ait Ichou M, Massicot P, Goudeau A, Quentin R. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis revealed by restriction fragment length polymorphism of the rRNA gene region. J Clin Microbiol. 1995 ; 33 : 1461-66.

Martin DR. Mucoïd variation in *Pseudomonas aeruginosa* induced by phage. J Med Microbiol. 1973 ; 6 : 111-8.

Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin Infect Dis. 1993 ; 17: 53-64.

Mereghetti L, Marquet-van der Mee N, Loulergue J, Rolland JC, Audurier A. *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients: study using whole cell RAPD and antibiotic susceptibility. *Pathol Biol.* 1998;46:319-24.

Meunier JR, Grimont PAD. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol.* 1993 ; 144 : 373-79.

Michael Olive D, Bean P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1661-69.

Micheli MR, Bova R, Calissano P, D'Ambrosio E. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting using combinations of oligonucleotide primers. *Bio Techniques.* 1993 ; 15 : 338-90.

Millesimo M, de Intinis G, Chirillo MG, Musso T, Savoia D. *Pseudomonas aeruginosa* : serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. *Eur J Epidemiol.* 1996 ; 12 : 123-9.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1999). Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA, USA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000a). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 7th ed. Approved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

Ogle JW, Janda JM, Woods DE, Vasil ML. Characterisation and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 1987 ; 155 : 119-26.

Ojeniyi B. Polyagglutinable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. A survey. *APMIS Suppl.* 1994 ; 46 : 1-44.

Ojeniyi B, Hoiby N. Comparison of different typing methods of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother.* 1991 ; 44 : 13-22.

Ojeniyi B, Wolz C, Doring G, Lam JS, Rosdahl VT, Hoiby N. Typing of polyagglutinable isolates from cystic fibrosis patients. *APMIS* 1990 ; 98 : 423-31.



Olivier A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000 ; 288 : 1251-4.

Pai SR, Joshi LM. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* on the basis of low and high molecular weight aeruginocins. *J Postgraduate Medicine*. 1985 ; 31 : 52-6.

Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol*. 1993 ; 43 : 606-9.

Patzer J, Dzierzanowska D. The resistance pattern and serotypes of *P. aeruginosa* strains isolated from children. *J Antimicrob Chemother*. 1991 ; 44 : 13-22.

Penketh A, Pitt T, Roberts D, Hodson ME, Batten JC. The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis*. 1983 ; 127 : 605-608.

Pfaller MA. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 ; 123 : 1007-1010.

Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ, Wenzel RP, Fritschel SJ, Neubauer JJ, Herwaldt LA. Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1996 ; 25 : 1-8.

Pitt TL. State of the art : typing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*. 1980 ; 1: 193-199.

Pitt TL. Epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988 ; 7 : 238-47.

Pitt TL, MacDougall J, Penketh ARL, Cooke EM. Polyagglutinating and non-typable strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol*. 1986 ; 21 : 179-86.

Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001; 45: 433-64.

Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Smith AL. Intermittente administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic fibrosis inhaled tobramycin study group. *N Engl J Med*. 1999 ; 340 : 23-30.

Ravaoarino M, Mohapatra S, Shore J, Rawal S, Omri A, Yaghi J, Oriol F. Serotyping clinical isolates site, antibiotic susceptibility and beta-lactamase production. *Int J Antimicrob Agents*. 1996 ; 65-8.

Rementería AL, Gallego L, Quindos G, Garaizar J. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect*. 2001 ; 7 : 331-36.

Renders N, van Belkum A, Barth A, Goessens W, Mouton J, Verbrugh H. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis: phenotyping versus genotyping. *Clin Microbiol Infect*. 1996 ; 1 : 261-265.

Rodriguez B, Vasquez E, Sussmann O, Mattar S, Jaramillo CA. Antimicrobial susceptibility and serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in Bogota, Columbia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 ; 19 : 152-4.

Romling U, Schmidt KD, Tummler B. Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J Mol Biol*. 1997 ; 150 : 386-404.

Romling U, Tummler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2000 ; 38 : 464-5.

Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17:57-71.

Saiman L, Burns JL, Whittier S, Krzewinski J, Erwin M, Marshall S, Jones RN. Evaluation of reference dilution test methods for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 : 2987-91.

Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2004 Sep ; 53 (Pt 9) : 841-53

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. Cell 1984 ; 37 : 67-75.

Sener B, Koseoglu O, Ozcelik U, Kocagoz T, Gunalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infectious in cystic fibrosis. Int J Med Microbiol. 2001 ; 291 : 387-93.

Sermet-Gaudelus I, Ferroni A, Gaillard JL, Silly C, Chretiennot C, Lenoir G, Berche P. Antibiotic therapy in cystic fibrosis. II Antibiotic strategy. Arch Pediatr. 2000 ; 7 : 645-56.

Shawar R M, MacLeod D L, Garber R L, Burns J L, Stapp J R, Clausen C R, Tanaka S K. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Antimicrob Agents Chemother. 1999 ; 43 : 2877-2880.

Shoumali L, Masoud H, Khlaif H, Migdadi H, Masoud S. Serologic and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Jordanian clinical isolates compared with the strains of International Antigenic Typing Scheme. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007;15:1-6.

Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos M. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006 ; 19 : 512-30.

Soler CP, Gidenne S, Saint-blanchard P, Kerleguer A, Gerome P. Recovery method of serotypable character in non serotypable *Pseudomonas aeruginosa* strains. Pathol Biol (Paris). 2004 ; 52 : 33-38.

Speert D. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Bioscience. 2002 ; 7 : 354-61.

Speert DP, Campbell ME, Farmer SW, Volpel K, Joffe AM, Paranchych W. Use of a pilin gene probe to study molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 1989 ; 27 : 2589-93.

Speert DP, Campbell ME, Henry DA, Milner R, Taha F, Gravelle A, Davidson AG, Wong LT, Mahenthiralingam E. Epidemiology of

*Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis in British Columbia, Canada. Am J Respir Crit Care Med. 2002 ; 166 : 988-93.

Spikler T, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 2004 ; 2074-79.

Struelens MJ, Schwam V, Deplano A, Baran D. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 2320-26.

Syrmis MW, O'Carroll MR, Sloots TP, Coulter C, Wainwright CE, Bell SC, Nissen MD. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. J Medic Microbiol. 2004 ; 53 : 1089-96.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control. 2006 ; 34 (5 Suppl 1) : S3-10 ; discussion S64-73.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelson PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995 ; 33 : 2233-9.

The international *Pseudomonas aeruginosa* typing study group. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. J Infect Diseases. 1994 ; 169 : 134-42.

Tramper-Stranders GA, Van Der Ent CK, Wolfs TF. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibrosis. 2005 ; 4 Suppl 2 : 37-43.

Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Jhonson WM. Factors affecting reliability and reproductibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. (guest commentary). J Clin Microbiol. 1997 ; 35 : 339-46.

Van Horn KG. Mixed-morphotype broth microdilution susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 1993 ; 31 : 458-59.

Vasil ML, Chamberlain C, Grant CCR. Molecular studies of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A gene. *Infect Immun*. 1986 ; 52 : 538-48.

Vasil ML, Graham LM, Ostroff RM, Shortridge VD, Vasil AI. Phospholipase C: molecular biology and contribution to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother*. 1991 ; 44 : 34-47.

Vernez I, Hauser P, Bernasconi MV, Blanc DS. Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 ; 43 : 29-35.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*. 1991 ; 19 : 6823-31.

Vila J, Marcos MA, Jimenez de Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* 1996 ; 44 : 482-89.

Vogne C, Aires JR, Bailly C, Hocquet D, Plésiat P. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 ; 48 :1676-80.

Wang CX, Mi ZH. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP-1 metallo-beta-lactamases and lacking the outer-membrane protein OprD. *J Med Microbiol*. 2006 ; 55 : 353-4.

Welsh J, McClelland. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res*. 1990;18:7213-7224.

Wu F, Della-Latta P. Molecular typing strategies. *Seminar in Perinatology* 2002 ; 26 : 357-66.

Xu J, Moore JE, Murphy PG, Millar BC, Elborn JS. Early detection of *Pseudomonas aeruginosa* comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2002 ; 20 : 3-21.

Zaidi N, Konstantinou K, Zervos M. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 ; 127 : 1098-105.

Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 ; 43 : 287-91.