



**RESEAU NATIONAL DE SURVEILLANCE
DES YERSINIA ENTEROPATHOGENES**

***Les alternatives au diagnostic bactériologique
des yersiniooses***

-

Apports et limites des techniques sérologiques

Fascicule N°13 – Octobre 2009



INSTITUT PASTEUR

RESEAU NATIONAL DE SURVEILLANCE DES YERSINIA ENTEROPATHOGENES

Fascicule N°13

Octobre 2009

Les alternatives au diagnostic bactériologique des yersiniooses – Apports et limites des techniques sérologiques

Le diagnostic bactériologique

- C'est le seul diagnostic fiable. Il permet d'obtenir un résultat positif dès le début des signes cliniques. Il repose sur l'isolement et l'identification de la bactérie.
- A partir des souches isolées, leur caractérisation (biotypage, sérotypage, lysotypage) permet de déterminer leur pathogénicité et de les subdiviser.
- Les souches isolées permettent également de déterminer leur profil de sensibilité aux antibiotiques et/ou d'effectuer leur typage moléculaire.
- Le diagnostic bactériologique atteint cependant ses limites dans différents cas :
 - ✓ Dans des échantillons polycontaminés comme les selles, l'isolement d'une *Yersinia* est souvent difficile.
 - ✓ Quand un traitement antibiotique a été administré avant le prélèvement destiné à l'analyse bactériologique, il devient quasi-impossible d'en isoler une souche.
 - ✓ Lors de l'apparition de complications secondaires à une infection (érythème noueux, arthrite réactionnelle), la bactérie a le plus souvent disparue.

Une alternative à l'analyse bactériologique est donc le diagnostic sérologique.

Le diagnostic sérologique

- Réponse humorale des patients atteints de yersiniose :
 - ✓ Lors d'une infection à *Yersinia*, le taux d'anticorps sériques s'élève lors de la première semaine. Les IgM apparaissent entre 2 et 7 jours après le début des signes cliniques, puis sont remplacées par les IgA et les IgG.
 - ✓ Un pic d'anticorps est généralement observé deux semaines après le début de l'infection et un retour au niveau basal se produit au bout de 3 à 6 mois. Chez certains patients, les anticorps peuvent rester détectables pendant plusieurs années.
 - ✓ Les IgA, qui peuvent persister jusqu'à 12 mois après l'infection, sont souvent élevées chez les patients souffrant d'arthrite réactionnelle ou d'érythème noueux.
 - ✓ La baisse du titre en anticorps sériques associée à une régression des phénomènes inflammatoires témoignent d'une évolution favorable de la maladie.

➤ Les différentes techniques de sérodiagnostic :

• La séroagglutination en tube:

✓ C'est la technique de sérodiagnostic la plus ancienne et encore la plus utilisée.

Elle cible la réponse anticorps dirigée contre les chaînes latérales du LPS (lipopolysaccharide), l'antigène O, qui constituent une bonne cible de la réponse humorale.

Chez *Y. enterocolitica*, il existe plus de 75 sérotypes O. Certains d'entre eux sont associés aux souches pathogènes. Ainsi, les sérotypes O:3, O:9 et O:5,27 sont trouvés chez plus de 95% des souches cliniques pathogènes reçues au CNR et plus de 90% de celles responsables d'infections en Europe.

Pour *Y. pseudotuberculosis*, 21 sérotypes et sous-sérotypes, tous pathogènes, ont été décrits. Cependant les plus fréquents en France et dans la plupart des pays d'Europe sont les sérotypes I à V. Le sérotype I est largement prédominant chez les souches reçues au CNR.

Principe :

✓ En pratique, des dilutions de 2 en 2 du sérum du patient sont mélangées avec différentes suspensions de bactéries tuées : *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes I à V et *Y. enterocolitica* des sérotypes O:3, O:9 et O:5,27.

✓ Les tubes sont incubés pendant 24h au minimum.

✓ Le seuil de positivité est déterminé par la dilution maximale permettant de voir une agglutination.

Résultats :

✓ Selon les auteurs, le seuil de positivité utilisé est la dilution du sérum du patient au 1/100, 1/160 ou au 1/200.

✓ La sensibilité de cette technique est faible et l'interprétation est difficile lorsque le titre en anticorps est proche du seuil de positivité.

✓ De plus, il existe de nombreuses réactions croisées, la plus fréquente étant celle entre le sérotype O:9 et *Brucella*. Le sérotype O:3 peut également posséder des épitopes communs avec les Rickettsies. Enfin, certains *Vibrio*, *Morganella*, *Salmonella*, *Francisella* et *Escherichia coli* O:157 peuvent donner des réactions croisées avec *Y. enterocolitica*.

Il existe aussi des réactions croisées entre *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes II et IV et les *Salmonella* des groupes B et D.

➔ La séroagglutination a l'avantage d'être une méthode simple d'utilisation mais sa sensibilité et spécificité sont médiocres. De plus elle ne permet pas de différencier des isotopes d'immunoglobulines (IgG, IgA et IgM). C'est aussi une méthode assez longue comparée aux techniques plus récentes.

En pratique :

✓ La séroagglutination est effectuée dans un certain nombre de laboratoires en France.

✓ Elle peut aussi être pratiquée au sein du LAM en utilisant des antisérums (O:3 et O:9 par exemple) distribués commercialement (notamment par Biorad).

- La microagglutination :

✓ Ce test est basé sur le même principe que la séroagglutination en tube. La différence réside dans le fait que la préparation des antigènes est légèrement différente et que le mélange des antigènes et des dilutions du sérum de patient se fait dans les puits d'une microplaque.

✓ La lecture se fait après une incubation d'une nuit à 37°C. L'agglutination est visualisée par une couleur violette au fond du puits.

✓ Le seuil de positivité, selon les auteurs, se situe autour d'une dilution du sérum de 1/80.

→ L'utilisation des mêmes antigènes que pour l'agglutination en tubes pose les mêmes problèmes de spécificité. La sensibilité est un peu améliorée mais le temps de réponse reste relativement long (1 nuit).

- Test de fixation du complément :

✓ C'est une technique sérologique indirecte, secondaire, utilisant comme révélateur les propriétés hémolytiques du complément.

Principe :

✓ L'antigène ciblé est, comme pour la séroagglutination, l'antigène O.

✓ Dans une micro-cupule, le sérum du patient et l'antigène recherché purifié sont ajoutés. Ensuite un extrait plasmatique (contenant les facteurs du C) et un couple hémolytique constitué d'un mélange d'hématies et d'anticorps anti-hématies sont incubés.

La formation de complexes antigène-anticorps provoque l'utilisation du C, et il n'en reste plus pour détruire les hématies (sédimentation des hématies: point rouge au fond de la cupule). L'absence d'anticorps sériques se traduit par une hémolyse (cupule rouge).

✓ Des dilutions de 2 en 2 du sérum du patient sont incubées avec les antigènes testés.

Résultats :

✓ Ce test permet de détecter les anticorps IgG et IgM spécifiques mais pas les IgA.

✓ L'antigène ciblé étant le LPS, les risques de réactions croisées sont les mêmes que pour l'agglutination.

✓ Ce test n'est pas très sensible.

- L'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) :

Principe :

✓ Cette technique repose sur la détection d'anticorps dirigés contre les *Yersinia* dans un format microplaque 96 puits. Les antigènes sont fixés au fond d'un puits, le sérum du patient est ajouté puis un anticorps secondaire conjugué à une enzyme vient se fixer sur les anticorps du patient immobilisés. Une réaction enzymatique colorée permet de détecter cette association.

✓ L'ELISA permet de distinguer les isotypes des immunoglobulines produites (IgM, IgG ou IgA). Leur présence et l'évolution de leur taux permettent de dater l'infection et de pronostiquer le devenir de la maladie.

✓ L'ELISA a également l'avantage d'être une technique automatisable et semi-quantitative.

✓ Les antigènes les plus souvent ciblés sont :

- l'antigène O du LPS.
- les Yops (*Yersinia* outer membrane proteins), protéines codées par le plasmide de virulence, purifiées ou recombinantes. Ce plasmide n'est présent que chez les *Yersinia* pathogènes.

Résultats :

✓ L'ELISA utilisant les Yops ne permet pas de différencier les espèces *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* ni les sérotypes mais permet de diagnostiquer les infections à *Yersinia* pathogènes.

✓ La sensibilité de l'ELISA est meilleure que celles des techniques d'agglutination.

✓ Le seuil de positivité varie d'un test ELISA à un autre mais il est plus bas que pour les techniques d'agglutination.

✓ L'utilisation des Yops comme antigène permet de limiter le risque de réactions croisées avec d'autres pathogènes comme avec le LPS. Le risque de croisement avec *Brucella*, qui est le plus fréquent, est ainsi éliminé.

→ La spécificité de l'ELISA utilisant les Yops est bien meilleure que celle des techniques utilisant le LPS comme antigène.

Il existe malgré tout un risque de réaction croisée entre les Yops et les antigènes de *Borrelia burgdorferi*.

En pratique :

✓ Le diagnostic sérologique des *Yersinia* par ELISA est effectué en France par le laboratoire Pasteur Cerba.

✓ Des tests ELISA commerciaux (Mikrogen, Euroimmun, etc.) sont également disponibles.

• Le Western-blot :

Principe :

✓ Les antigènes ciblés sont les mêmes que pour l'ELISA : Yops et/ou antigène O du LPS.

La différence par rapport à l'ELISA est que les antigènes purifiés sont soumis à une migration par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide puis sont transférés sur une membrane. Le sérum du patient est mis en contact avec la membrane et les anticorps fixés sont détectés à l'aide d'un anticorps conjugué à une enzyme. Une réaction colorimétrique permet de visualiser un test positif.

✓ Le Western blot permet aussi de distinguer les différents isotypes d'immunoglobulines produites.

Résultats :

✓ Comme pour l'ELISA, l'utilisation du LPS comme antigène présente un fort risque de réactions croisées avec d'autres pathogènes comme *Brucella* principalement.

✓ Comme l'ELISA, le Western blot utilisant les Yops permet de diagnostiquer les infections à *Yersinia* pathogènes en général.

✓ Selon un auteur, cette technique serait légèrement plus sensible et plus spécifique que l'ELISA.

✓ La technique n'est en revanche pas automatisable.

✓ Il existe également un risque de réactions croisées entre les Yops et des antigènes de *Borrelia burgdorferi*.

En pratique :

✓ Différents tests Western blot sont disponibles commercialement (Mikrogen, Euroimmun, etc.).

La séroprévalence

✓ Une des principales difficultés d'interprétation du sérodiagnostic est la séroprévalence élevée dans la population saine.

✓ La séroprévalence des *Yersinia* entéropathogènes est inconnue en France mais différentes études ont été menées à l'étranger :

- Une étude autrichienne de 2004 sur 750 personnes saines a montré, en utilisant le Western blot, que la séroprévalence était de l'ordre de 30%.

- Une autre étude a été menée en Finlande (94 personnes) et en Allemagne (100 personnes) en 1986. Deux techniques ont été utilisées : l'ELISA et le Western Blot. Avec ces 2 techniques, la séroprévalence a été estimée à 19% et 31% respectivement en Finlande et à 33% et 43% respectivement en Allemagne.

✓ Ces chiffres élevés contrastent avec le peu de cas rapportés. En effet, en Autriche environ 100 cas de yersiniose sont

rapportés par an. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce contraste :

- la majorité des infections passent inaperçue.
- le sérodiagnostic n'est pas spécifique.
- les bactéries ne sont pas isolées.
- les cas ne sont pas rapportés.

✓ En pratique, deux prélèvements effectués à 15 jours d'intervalle avec une augmentation du titre d'anticorps permettent de s'assurer que l'infection est récente.

Conclusion

✓ Les techniques sérologiques peuvent être un complément utile à l'isolement des souches, en particulier lorsque le tableau clinique est évocateur de yersiniose mais qu'aucune souche n'a pu être isolée pour différentes raisons (traitement antibiotique, isolement négatif, localisation profonde du germe, réactions immunologiques secondaires).

✓ Le sérodiagnostic a été amélioré en utilisant d'autres antigènes que l'antigène O :

- En effet les Yops sont plus spécifiques des *Yersinia* car il existe moins de réactions croisées avec d'autres pathogènes.

- Il a été montré que les anticorps dirigés contre les Yops persistent plus longtemps à des niveaux élevés dans les cas d'arthrite réactionnelle ou d'entérite chronique.

✓ Les techniques ELISA et Western Blot présentent globalement une meilleure sensibilité et spécificité que la séroagglutination et doivent être préférées à cette dernière.

Références

- Benoit, C., A. Guiyoule, and E. Carniel.** 1996. Sérodiagnostic des infections humaines à *Yersinia* pathogènes. *Presse Méd.* **25**:1627-1630.
- Bottone, E. J.** 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect.* **1**:323-333.
- Bottone, E. J.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:257-276.
- Chart, H., and T. Cheasty.** 2006. The serodiagnosis of human infections with *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **47**:391-397.
- Fredriksson-Ahomaa, M., and H. Korkeala.** 2003. Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:220-229.
- Maki-Ikola, O., J. Heesemann, A. Toivanen, and K. Granfors.** 1997. High frequency of *Yersinia* antibodies in healthy populations in Finland and Germany. *Rheumatol. Int.* **16**:227-229.
- Rawlins, M. L., C. Gerstner, H. R. Hill, and C. M. Litwin.** 2005. Evaluation of a Western blot method for the detection of *Yersinia* antibodies: Evidence of serological cross-reactivity between *Yersinia* outer membrane proteins and *Borrelia burgdorferi*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**:1269-1274.
- Savin, C., and E. Carniel.** 2008. Les diarrhées d'origine bactérienne: le cas de *Yersinia enterocolitica*. *Revue Francophone des Laboratoires* **400**:49-58.
- Tomaso, H., G. Mooseder, S. Al Dahouk, C. Bartling, H. C. Scholz, R. Strauss, T. M. Treu, and H. Neubauer.** 2006. Seroprevalence of anti-*Yersinia* antibodies in healthy Austrians. *Eur. J. Epidemiol.* **21**:77-81.
- Weynants V., C. Saegerman, P.A. Denoel, A. Tibor, J.N. Limet and J.J. Letesson.** 1994. Différenciation de la réponse sérologique induite par *Brucella* et *Yersinia enterocolitica* O:9 en utilisant les *Yersinia* Outer Proteins (YOPs). *Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales*. Ed. AUPELF-UREF. Johan Libbey Eurotext. Paris, p 113-124.



FASCICULES

Si vous souhaitez qu'un sujet en particulier soit traité dans un des fascicules à venir, n'hésitez pas à nous le faire savoir.

NOUVEAUX CORRESPONDANTS

DEPT(13) – HOPITAL SAINT JOSEPH, Laboratoire central (secteur bactériologie-mycologie), 26 boulevard Louvain, 13008 Marseille.

DEPT(30) – CHU CAREMEAU, Laboratoire de microbiologie, place du Pr Robert Debré, 30029 Nîmes cedex 9.

DEPT(56) – LABORATOIRE LE ROUX-BARRETEAU, 2 place de Toulouse, 56530 Queven.

DEPT(67) – HOPITAL SAINTE CATHERINE, Laboratoire de microbiologie, 19 côte de Saverne, 67703 Saverne cedex.

DEPT(83) – LABM LES MURIERS, avenue Pasteur, 83160 La-Valette-du-Var.

DANS LE PROCHAIN FASCICULE,

«LES ALTERNATIVES AU DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DES YERSINIOSES - APPORTS ET LIMITES DES TECHNIQUES MOLECULAIRES»



CENTRE NATIONAL DE REFERENCE DE LA PESTE ET AUTRES YERSINIOSES

INSTITUT PASTEUR

UNITE DES YERSINIA

28, RUE DU DOCTEUR ROUX

75724 PARIS CEDEX 15 (France)

☎ 01 40 61 37 67 📠 01 45 68 89 54

Site web : <http://www.pasteur.fr>

CONTACT: Cyril SAVIN. E-mail : cyril.savin@pasteur.fr