

*Bull. Acad. Vét. de France*, 1995, 68, 373-378

## **Les différentes techniques de diagnostic de la tularémie. Étude critique**

par Mireille DUFRENE\* et Josée VAISSAIRE\*

---

### **RÉSUMÉ**

Une étude bibliographique tend à mettre en lumière les avantages respectifs des différentes méthodes de diagnostic de la tularémie.

La technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux semble actuellement offrir toutes les qualités tant scientifiques : spécificité et sensibilité, que techniques : facilité de réalisation, ou qu'humaines : sécurité.

### **SUMMARY**

#### **DIFFERENT DIAGNOSTIC METHODS OF TULAREMIA - CRITICAL STUDY**

A bibliographic study leads to bring to light respective advantages of the different diagnostic methods of tularemia.

The immunofluorescence technique with monoclonal antibodies actually seems to present all qualities as much scientific: specificity and sensitivity, as technique: easily done, or social: security.

### **INTRODUCTION**

La tularémie est une anthroponose limitée à l'hémisphère Nord et qui se présente généralement sous forme sporadique.

Elle affecte aussi bien les invertébrés, en particulier les insectes et les arachnides, que les vertébrés parmi lesquels les animaux les plus sensibles sont les rongeurs et les lagomorphes. En France, on la décrit surtout chez les lièvres.

Elle est transmise à l'homme le plus souvent par voie cutanée, piqûre de moustique, contact d'une peau abîmée avec du matériel contaminé; la lésion évolue en ulcération locale accompagnée d'adénopathie régionale. Elle peut aussi se transmettre par voie aérienne avec bronchopneumonie, plus rarement par voie digestive avec gastro-entérite.

L'agent étiologique de la tularémie est un petit coccobacille immobile à Gram négatif qui peut survivre plusieurs semaines dans l'environnement.

---

\* Ministère de l'Agriculture et de la Pêche - CNEVA Alfort - Laboratoire central de recherches vétérinaires - Service de Bactériologie, 22 rue Pierre Curie, 94700 Maisons-Alfort, France.

*Francisella tularensis* est un germe difficile à cultiver. La faible probabilité de son isolement à partir d'un prélèvement contaminé rend cette technique de diagnostic très peu fiable à moins de passer sur animal (souris) mais le germe étant très infectieux, cela entraîne un risque de contamination important.

Ainsi, les recherches se sont-elles particulièrement développées autour de techniques diverses qui permettraient, au vu des signes cliniques et des présomptions de contamination, une confirmation de la maladie.

Ces techniques peuvent être classées en 2 catégories : les techniques de mise en évidence des anticorps dirigés contre *Francisella tularensis* ou de l'immunité cellulaire, et les techniques de mise en évidence des antigènes spécifiques de *Francisella tularensis*.

### **I. Les techniques de mise en évidence des anticorps ou de recherche de l'immunité cellulaire**

Ces techniques sont essentiellement utilisées chez l'homme ou au cours des recherches expérimentales effectuées sur l'animal de laboratoire, l'animal sauvage, généralement le lièvre étant le plus souvent retrouvé mort.

#### **A. Mise en évidence des anticorps**

##### *a. Le test d'agglutination*

Le test sérologique le plus anciennement utilisé est le test d'agglutination de la bactérie par un sérum contenant des anticorps spécifiques [réaction de Widal (1)].

Ce test a été appliqué à la tularémie pour la première fois en 1926 par FRANCIS et EVANS (2) : agglutination en tube ; il a, par la suite, été amélioré par la coloration de l'antigène et sa distribution en microplaques : technique de microagglutination décrite par MASSEY et MANGIAFICO (3) en 1973 avec coloration de l'antigène à l'hématoxyline puis par BROWN et coll. (4) en 1980 avec coloration à la safranine.

L'amélioration consiste en un gain de temps, un gain de réactif et une plus grande facilité de lecture.

Cependant les tests d'agglutination mettent en évidence essentiellement les IgM, les IgG et les IgA étant peu agglutinogènes ; il a même été prouvé que ces dernières, lorsque les taux d'IgM étaient bas, pouvaient empêcher l'agglutination (5, 6, 7).

##### *b. Les tests ELISA (enzyme linked immunosorbant assay)*

Ainsi et parallèlement à leur utilisation dans le diagnostic sérologique d'autres maladies, les tests ELISA se sont-ils développés pour la détection des anticorps dirigés contre *Francisella tularensis*.

Ces tests ont, en outre, par rapport à la technique d'agglutination, l'avantage de révéler les anticorps spécifiques plus précocement à compter du début de la maladie.

En 1979, CARLSSON et coll. (8) décrivent une technique ELISA utilisant comme antigène le lipopolysaccharide de *Francisella tularensis* (L.P.S.), après son extraction par le phénol.

Ce test est très spécifique et, réalisé parallèlement au test d'agglutination, se révèle 10 fois plus sensible.

Il permet en outre de déterminer l'appartenance des anticorps à une classe donnée d'immunoglobulines et de réaliser une cinétique d'évolution de leur taux.

Cependant, étant donné les difficultés de culture de *Francisella tularensis* et la lourdeur de la technique d'extraction de son lipopolysaccharide, cet antigène n'est pas commercialisé (5).

En 1983, MATTI et coll. (5) décrivent un test ELISA utilisant un antigène obtenu par simple sonication d'une préparation bactérienne commercialisée. Leurs résultats montrent que cet antigène assure au test ELISA une spécificité au moins aussi bonne que le L.P.S.; les qualités de sensibilité et de détection rapide de la maladie sont conservées: la technique ELISA peut donc sans inconvénient bénéficier d'un allègement de sa réalisation: économie de temps et de travail.

En 1986, Hannu SYRJÄLÄ et coll. (9), à l'issue d'une étude comparative des tests ELISA et de microagglutination sur des sérums de malades atteints de tularémie, remettent en valeur ce dernier au vu de sa plus grande facilité de réalisation technique; arguant que sa fiabilité est presque équivalente à celle du test ELISA, ils proposent de n'utiliser ce dernier qu'en cas de doute pour confirmation ou infirmation de tularémie.

## B. Recherche de l'immunité à médiation cellulaire

### a. Le test d'hypersensibilité retardée: intradermoréaction

Déjà décrit en 1932 par FOSHAY (10), sa fiabilité a été confirmée en 1971 par BUCHANAN et coll. (11).

Sa qualité essentielle est de permettre une détection rapide de la maladie puisqu'il devient positif 4 jours seulement après le début de la maladie et que sa lecture se fait en 48 h (10, 11).

Cependant, son utilisation s'entache de deux inconvénients:

- l'antigène nécessaire à la réalisation du test n'est pas actuellement commercialisé (12) (cependant il peut être disponible en hôpital),
- aucune étude n'a été faite quant à sa possibilité d'induction d'anticorps ou d'immunité à médiation cellulaire (12).

### b. Le test de stimulation des lymphocytes

Il est réalisé soit sur sang total (12), soit sur mononucléaires seuls (13).

Dans le premier cas, chez un grand nombre de patients, le test devient positif à la fin de la première semaine suivant l'apparition des symptômes et chez presque tous, au début de la seconde semaine, au moment où les anticorps commencent à atteindre des taux significatifs. Cette technique permet donc dans de nombreux cas de confirmer le diagnostic plus précocement que la recherche d'anticorps seule.

Réalisée sur mononucléaires, la positivité apparaît 2 jours plus tôt mais cette modification rend le test plus laborieux et la distinction entre positifs et négatifs plus difficile à établir en raison de réactions non spécifiques (13).

Ajoutons que chez quelques patients atteints de tularémie et ne développant pas d'anticorps, l'infection peut être diagnostiquée par le test de stimulation des lymphocytes ou par l'intradermoréaction (11).

La recherche de l'immunité à médiation cellulaire est donc utile dans le diagnostic de la tularémie et complémentaire de la recherche d'anticorps.

## II. Les techniques de mise en évidence de l'antigène

Ces techniques peuvent s'appliquer chez l'animal retrouvé malade ou mort et chez l'homme, lorsqu'il y a suspicion de tularémie (signes cliniques, contexte épidémiologique).

### A. Bactériologie

L'isolement de *Francisella tularensis* se fait à partir de la lésion locale ou des expectorations chez l'homme, de la rate ou d'un os long, chez l'animal.

Les limites de cette technique ont déjà été évoquées : difficulté d'isolement surtout à partir d'un matériel contaminé.

On peut recourir au passage sur animal de laboratoire ; la souris, très sensible à la tularémie est l'animal de choix, mais cette technique est lourde, longue à aboutir et sa mise en œuvre s'accompagne de risque de contamination.

### B. Les techniques d'immunofluorescence

Décrites depuis la fin des "années cinquante" (14), ces techniques sont surtout utilisées en Suède où elles ont fait l'objet de travaux de recherche concernant leurs performances de fiabilité (15, 16, 17).

K.A. KARLSSON et coll. en 1970 (15) et en 1973 (16) décrivent la méthode d'immunofluorescence directe sur des coupes d'organes (foie, rate) fixées par la chaleur ; ils la comparent à d'autres outils de détection : test de pathogénicité chez le cobaye et la souris, test d'agglutination, examen histopathologique, culture.

Ils concluent à une bonne fiabilité des tests d'immunofluorescence. Ils sont rapides à réaliser, n'ont rien à pâtir d'une abondance de flore contaminante et permettent une visualisation directe de la bactérie dans les sites infectés. Le recours à ces tests permet en outre, par rapport à l'inoculation à la souris, de réduire les risques de contamination de laboratoire.

Torsten MÖRNER en 1981 décrit une amélioration de la technique par fixation par le formol du matériel à examiner, ce qui diminue encore les risques de contamination. Pour contrôler la spécificité de la méthode, il fait entrer dans ces tests différentes autres espèces bactériennes et l'agent de la toxoplasmose. Il n'y a pas de réaction croisée, sauf dans un cas, avec l'agent de la toxoplasmose que l'auteur attribue à une infection simultanée avec *Francisella tularensis* (17).

Il a également été rapporté des réactions croisées avec *Legionella pneumophila* (19).

En 1991, des chercheurs anglais, Mark FULOP et coll. décrivent la production d'anticorps monoclonaux par des cellules d'hybridomes réalisés chez des souris BALB/c. Ces anticorps monoclonaux, dirigés contre l'antigène O (carbohydrates du côté O de la chaîne) des lipopolysaccharides de surface de *Francisella tularensis*, sont beaucoup plus spécifiques du germe qu'un sérum polyclonal. En outre, ils ont la capacité de détecter les bactéries même quand elles sont en petit nombre.

Leur utilisation dans la méthode d'immunofluorescence devrait permettre d'en augmenter la spécificité et la sensibilité (18).

### C. Hybridation de sondes oligonucléotidiques complémentaires de séquences d'ARN ribosomal spécifiques (16SrRNA Hybridation)

A la fin des "années 80", l'analyse de séquence de la région 16 S de l'ARN ribosomal (16SrRNA) a été particulièrement utile à la recherche sur l'évolution et les interrelations de différentes formes de vie cellulaire (20) ; il s'agit d'une région variable de l'ARN ribosomal, qui est très spécifique.

Par la suite ont commencé à se développer des techniques de diagnostic basées sur l'hybridation de séquences du 16SrRNA avec des sondes oligonucléotidiques complémentaires et marquées (21, 22, 23, 24, 26).

En 1990, Mats FORSMAN et coll. (25), en Suède, décrivent une méthode d'identification de *Francisella tularensis* utilisant cette technique d'hybridation avec des oligonucléotides spécifiques qu'ils ont synthétisés et marqués par un isotope radioactif; l'hybridation est réalisée sur des surnageants d'homogénats de rate. Le signal radioactif est détecté par autoradiographie. Testées par rapport à un certain nombre d'autres germes, les sondes radioactives se sont montrées très spécifiques du genre *Francisella*; deux d'entre elles permettent même de faire une discrimination entre *F. tularensis* type A et *F. tularensis* type B (*F. tularensis* subsp. *paleartica*).

#### D. Microscopie électronique

En 1993, T.W. GEISBERT et coll., chercheurs américains, décrivent l'utilisation du microscope électronique pour la mise en évidence de *Francisella tularensis*.

Les auteurs utilisent la souche vaccinale vivante de *F. tularensis* et réalisent une réaction antigène-anticorps indirecte, le second anticorps étant marqué par des sphères d'or; ils décrivent trois techniques de révélation des complexes antigènes anticorps dont l'une permet d'établir un diagnostic 7 h après sa mise en œuvre.

Selon les auteurs, ces techniques sont couramment utilisées pour mettre *Francisella tularensis* en évidence dans les liquides organiques et les tissus (27).

### CONCLUSION

Les différentes techniques de diagnostic de la tularémie permettent une adaptation aux cas particuliers, tant en ce qui concerne l'urgence du diagnostic que les moyens matériels ou financiers dont dispose le laboratoire de diagnostic; on peut penser en particulier à l'utilisation du microscope électronique.

Les méthodes de diagnostic qui révèlent le plus précocement la maladie sont la recherche de l'hypersensibilité retardée par intradermoréaction, dont on a déjà évoqué la pratique uniquement hospitalière, et d'une manière générale la recherche de l'antigène, à l'exclusion de la bactériologie.

Parmi les différentes techniques de recherche de l'antigène, celle qui semble la plus facile à réaliser en laboratoire et aussi la moins onéreuse tout en gardant les qualités requises de spécificité, sensibilité et sécurité est celle de l'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux.

Cependant, dans un avenir peut-être proche, on pourrait voir se développer, comme c'est le cas pour d'autres bactéries, des techniques d'amplification en chaîne par polymérase (P.C.R.) qui rendraient plus performante la mise en évidence de l'antigène en augmentant la sensibilité des réactions d'hybridation (16SrRNA Hybridation).

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] WIDAL F. (1896). - Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde. Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris. 13: 561-566.
- [2] FRANCIS E. and EVANS A.C. (1926). - Agglutination, cross agglutination and agglutinin absorption in tularemia. U.S. Public Health Dept., 41: 1273-1295.
- [3] MASSEY E.D. and MANGIAFICO J.A. (1974). - Microagglutination test for detecting and measuring serum agglutinin of *Francisella tularensis* Appl. Microbiol., 27: 25-27.

- [4] BROWN S.L., MCKINNEY F.T., KLEIN G.C. and JONES W.L. (1980). - Evaluation of safranin -O- stained antigen microagglutination test for *Francisella tularensis* antibodies. J. Clin. Microbiol., 11: 146-148.
- [5] MATTI K., VILJANEN, T. NURMI and A. SALMINEN (1983). - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen for IgM, IgA and IgG antibodies to *Francisella tularensis*: Comparison with bacterial agglutination test and Elisa with lipopolysaccharide antigen. The Journal of Infectious Diseases, 148: 715-720.
- [6] ZINNEMAN H.H., GLENCHUR H., HALL W.H. (1959). - The nature of blocking antibodies in human brucellosis. J. Immunol., 83: 206-212.
- [7] WILKINSON P.C. (1966). - Immunoglobulin patterns of antibodies against Brucella in man and animals. J. Immunol., 96: 457-463.
- [8] H.E. CARLSSON, ALF A. LINDBERG, G. LINDBERG., B. HEDERSTEDT, K.A. KARLSSON and B. AGELL (1979). - Enzyme linked immunosorbent assay for immunological diagnosis of human tularemia. Journal of Clinical Microbiology, vol. 10, n° 5: 615-621.
- [9] H. SYRJÄLÄ, P. KOSKELA, T. RIPATTI, A. SALMINEN, E. HERVA (1986). - Agglutination and Elisa methods in the diagnosis of Tularemia in different clinical forms and severities of the disease. The Journal of Infectious Diseases, vol. 153, n° 1: 142-145.
- [10] FOSHAY L. (1932). - Tularemia - Accurate and earlier diagnosis by means of the intradermal reaction. J. Infect. Dis. 51: 286-291.
- [11] BUCHANAN T.M., BROOCKS G.F., BRACHMAN P.S. (1971). - The tularemia skin test - 325 skin tests in 210 persons: serologic correlation and review of the literature. Ann. Intern. Med., 74: 336-343.
- [12] H. SYRJÄLÄ, E. HERVA, J. ILOINEN, K. SAUKKONEN and A. SALMINEN (1984). - A whole-blood lymphocyte test for the diagnosis of human tularemia. The Journal of Infectious Diseases, vol. 150, n° 6: 912-915.
- [13] KOSKELA P., HERVA E. (1980). - Cell-mediated immunity against *Francisella tularensis* after natural infection. Scand. J. Infect. Dis., 12: 281-287.
- [14] WHITE S.D. and BLUNDELL G.P. (1958). - The use of the fluorescent antibody technique for demonstration of *Pasteurella tularensis* in formalin fixed tissues. Bact. Proc. Chicago.
- [15] KARLSSON K.A., DAHLSTRAND S., HANKO E. and SÖDERLIND O. (1970). - Demonstration of *Francisella tularensis* (Syn. *Pasteurella tularensis*) in sylvan animals with the aid of fluorescent antibodies. Acta Path. Microbiol. Scand., Section B, 78, 647-651.
- [16] KARLSSON K.A. and SÖDERLIND O. - Studies of the diagnosis of tularemia contributions to Microbiology and Immunology, vol. 2 *Yersinia, Pasteurella and Francisella*, p.p. 224-230 (Karger, Basel 1973).
- [17] T. MÖRNER (1981). - The use of FA-technique for detecting *Francisella tularensis* in formalin fixed material. A method useful in routine post mortem work. Acta. Vet. Scand. 22, 296-306.
- [18] M.J., FULOP, T. WEBBER, RICHARD J. MANCHEE and David C. KELLY (1991). - Production and characterization of monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of *Francisella tularensis*. Journal of Clinical Microbiology, July 1991: 1407-1412.
- [19] ROY T., FLEMING D. and ANDERSON W.H. (1989). - Tularemic pneumonia mimicking legionnaires's disease with false positive direct fluorescent antibody stains for *Legionella*. South. Med. J. 82: 1429-1431.
- [20] WOESE C.R. (1987). - Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.
- [21] GÖBEL U., GEISER A. and STANBRIDGE E.J. (1987). - Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* spp. J. Gen. Microbiol., 133: 1969-1974.
- [22] HAUN G. and GÖBEL U. (1987). - Oligonucleotide probes for genus, species and subspecies specific identification of representatives of the genus *Proteus*. FEMS Microbiol. Lett., 43: 187-193.
- [23] REHNSTAM A.S., NORQVIST A., WOLF-WATZ H. and HAGSTRÖM A. (1989). - Identification of *Vibrio anguillarum* in fish by using partial 16SrRNA sequences and a specific 16SrRNA oligonucleotide probe. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1907-1910.
- [24] ROMANIUK P.J. and TRUST T.J. (1987). - Identification for *Campylobacter* species by Southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16SrRNA genes. FEMS Microbiol. Lett., 43: 331-335.
- [25] M. FORSMAN, G. SANDSTRÖM and B. JAURIN (1990). - Identification of *Francisella* species and discrimination of type A and type B strains of *Francisella tularensis* by 16SrRNA analysis. Applied and Environmental Microbiology, Apr. 1990: 949-955.
- [26] E.F. DELONG, G.S. WICKHAM, N.R. PACE (1989). - Science vol. 243, mars 1989.
- [27] GEISBERT T.W., JAHRLING P.B. and EZZELL J.W. (1993). - Use of immunoelectron microscopy to demonstrate *Francisella tularensis*. Journal of Clinical Microbiology, vol. 31, n° 7, p. 1936-1939.