

RIDASCREEN[®] Verotoxin

Réf. : C2201



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, D-64297 Darmstadt, Allemagr

Téléphone : +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax : +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Application

Pour usage diagnostique *in vitro*. RIDASCREEN® Verotoxin est un test immunoenzymatique destiné à la détection qualitative des vérotoxines (syn. shigatoxines) dans un enrichissement de selles dans un bouillon caséine-soja modifié (*Modified Tryptone Soya Broth*, mTSB).

2. Résumé et explication du test

Les entérobactéries de type *Escherichia coli* (*E. coli*) type sont des composantes d'une flore intestinale saine chez l'homme, mais aussi chez des nombreux animaux de ferme. Par conséquent, on les considère aussi comme indicateurs de la contamination fécale des organismes présents dans l'eau et les aliments. Ce sont des bactéries à Gram négatif et facultativement anaérobies en forme de bâtonnet qui se déplacent par flagellation péritriche. À partir des antigènes O (LPS de la membrane externe) et des antigènes H (antigènes flagellaires), *E. coli* peut être subdivisée entre divers sérotypes. Il faut considérer *E. coli* comme facultativement pathogène en raison des divers facteurs de pathogénicité qui sont souvent codés par le plasmide ou transmis par des phages. Depuis 1977, on sait qu'*E. coli* produit deux cytotoxines, la vérotoxine 1 et la vérotoxine 2. Les gènes de ces vérotoxines (VT) se situent sur le chromosome de la région d'un prophage. On a isolé des *E. coli* composées des deux gènes ou d'un seul des deux. Étant donné la similitude des vérotoxines avec la shigatoxine issue de *Shigella dysenteriae*, on les appelle aussi toxines I et II de type Shiga (*shiga-like toxins I and II*, SLT-I et II). Une partie de ces *E. coli* vérotoxigènes (ECVT) peut provoquer des diarrhées sévères en formant d'autres facteurs de pathogénicité. Les symptômes cliniques déclenchés par les *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) s'étendent des diarrhées légères aux gastro-entérites sévères en passant par la colite hémorragique et surviennent dans env. 10 à 20 % des infections. Une complication post-infectieuse engageant le pronostic vital peut se intervenir dans 5 à 10 % des infections, en particulier chez le nourrisson et l'enfant en bas âge, mais également chez les patients âgés ou immunodéprimés: syndrome hémolytique et urémique (SHU) ou purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). La mortalité associée au SHU et au PTT est élevée, spécifiquement dans l'enfance (env. 10 à 15 %). Ils peuvent engendrer une insuffisance hépatique aiguë avec une dépendance temporaire à la dialyse ou une perte irréversible de la fonction rénale et une dépendance définitive à la dialyse en découlant. Certaines des anciennes méthodes permettant de diagnostiquer une infection à ECEH se sont avérées insuffisantes. Comme seulement 1 % env. des *E. coli* ne faisant pas partie du groupe des ECEH peut former une entérohémolysine, la détection des bactéries entérohémolytiques coliformes sur des boîtes de gélose au sang est certainement une importante indication d'ECEH. Mais il existe également des ECEH qui ont été isolées de patients présentant un SHU et n'expriment pas d'entérohémolysine. Le type O157 découvert initialement s'est aussi révélé n'être responsable que de 70 à 80 % des cas de SHU en Allemagne. D'autres sérotypes sont même prédominants dans les cas de gastro-entérite pure. Par conséquent, la simple détection du sérotype O157 ne suffit pas. La procédure diagnostique actuellement recommandée est la préconcentration du pathogène toute la nuit dans un milieu de type mTSB (avec ajout de 50 ng/ml de mitomycine C) suivie d'une isolation. Simul-

tanément, il faut tenter de déceler la vérotoxine comme facteur de pathogénicité le plus sûr à partir des surnageants de la culture. Cela est réalisable par test immunologique ELISA ou en démontrant l'effet cytopathique d'une culture de cellules Vero. Contrairement au test de cytotoxicité des cellules Vero, la technique ELISA offerte par le dosage immuno-enzymatique (*enzym immuno-assay*, EIA) RIDASCREEN® Verotoxin est une méthode simple qui peut être appliquée dans n'importe quel laboratoire. La préconcentration du germe est nécessaire pour les deux méthodes, étant donné que l'excrétion du germe et la teneur en toxine des selles peuvent être très faibles. L'excrétion peut aussi être complètement terminée, plus spécialement chez les patients atteints d'un SHU et d'un PTT. On peut essayer de procéder à la détection directe de la toxine dans l'échantillon de selles sans enrichissement préalable pour obtenir un résultat rapide dans un cas donné. Compte tenu du fait que cette procédure manque de sensibilité, un résultat négatif doit uniquement être considéré comme une indication préliminaire. Il faut attendre le résultat de l'enrichissement. Une chimiothérapie antibactérienne n'est généralement pas indiquée parce qu'elle prolongerait l'excrétion des bactéries et peut même stimuler la formation de toxines.

3. Principe du test

Le test RIDASCREEN® Verotoxin utilise des anticorps spécifiques en appliquant une méthode de type sandwich. La surface des puits de la microplaque est revêtue d'anticorps monoclonaux ciblant les vérotoxines 1 et 2. Une suspension de l'échantillon de selles à analyser ou le liquide surnageant d'un enrichissement d'une nuit de l'échantillon de selles dans un bouillon mTSB et les contrôles sont pipetés avec des anticorps anti-vérotoxine biotinylés (Conjugué 1) dans le puits correspondant de la microplaque à température ambiante (entre 20 et 25 °C). Après une étape de lavage, le conjugué polystreptavidine-peroxydase (Conjugué 2) est ajouté et de nouveau mis à incuber à température ambiante (entre 20 et 25 °C). En présence de vérotoxines dans l'échantillon, un complexe en sandwich se forme à partir des anticorps immobilisés, des vérotoxines et les anticorps anti-vérotoxines biotinylés avec le complexe polystreptavidine-peroxydase. Une autre étape de lavage élimine le conjugué polystreptavidine-peroxydase non fixé. Dans les échantillons positifs, l'ajout d'un substrat modifie l'enzyme liée dans la solution incolore qui vire au bleu. L'ajout d'un réactif d'arrêt fait virer la couleur du bleu au jaune. L'extinction est proportionnelle à la concentration des vérotoxines présentes dans l'échantillon.

4. Réactifs fournis

Les réactifs fournis dans la trousse permettent de faire 96 tests.

Plate	96 dét.	Microplaque, 12 barrettes à micropuits (sécables) sur le support ; revêtue d'anticorps monoclonaux anti-vérotoxine 1 et 2
Diluent 1	100 ml	Tampon de dilution d'échantillon, solution de NaCl tamponnée à la protéine, prêt à l'emploi, de couleur bleue

Wash	100 ml	Tampon de lavage, solution de NaCl tamponnée au phosphate (concentrée 10 fois) ; contient 0,1 % de thimérosal
Control +	2 ml	Contrôle positif ; culture de vérotoxines inactivées ; prêt à l'emploi
Control -	2 ml	Contrôle négatif (tampon de dilution d'échantillon), prêt à l'emploi
Conjugate 1	13 ml	Anticorps conjugués à la biotine anti-vérotoxine 1 et 2 dans une solution protéique stabilisée ; prêt à l'emploi, de couleur violette
Conjugate 2	13 ml	Conjugué polystreptavidine-peroxydase dans une solution protéique stabilisée, prêt à l'emploi, de couleur orange
Substrate	13 ml	Peroxyde d'hydrogène/TMB, prêt à l'emploi
Stop	12 ml	Réactif d'arrêt, acide sulfurique 1 N, prêt à l'emploi

5. Les réactifs et leur stockage

Tous les réactifs doivent être entreposés entre 2 et 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Le tampon de lavage dilué doit être conservé entre 2 et 8 °C pendant 4 semaines maximum. La contamination microbienne doit être évitée. Après la date de péremption, la qualité n'est plus garantie. Le sachet en aluminium doit être ouvert à l'aide de ciseaux sans déchirer le joint d'étanchéité. Les barrettes de microtitrage qui ne sont pas nécessaires doivent être remises dans le sachet en aluminium et conservées entre 2 et 8 °C. Le substrat incolore doit également être protégé de la lumière directe pour éviter qu'il ne se décompose ou ne bleuisse sous l'effet d'une auto-oxydation. Lorsque le substrat est bleu, il ne doit pas être utilisé.

6. Autres réactifs et matériels nécessaires

6.1. Réactifs

- Eau distillée ou désionisée

6.2. Accessoires

- Bouillon d'enrichissement RIDA[®] (réf. Z1000)
- Pipettes jetables (réf. : Z0001)
- Agitateur-mélangeur vortex (facultatif, voir rubrique 9.3.)
- Micropipette pour volumes de 50 à 100 µl et 1 ml
- Éprouvette graduée (1 000 ml)
- Chronomètre

- Appareil de lavage pour microplaques ou pipettes multicanaux (300 µl)
- Photomètre pour microplaques (450 nm et filtre de référence à 620-650 nm)
- Papier filtre (serviettes de laboratoire)
- Conteneur de déchets avec une solution d'hypochlorite à 0,5 %

7. Précautions à prendre par l'utilisateur

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être réalisé que par un personnel de laboratoire formé. Il convient de respecter les directives de travail dans les laboratoires médicaux. Les instructions d'exécution du test doivent être respectées à la lettre.

La trousse comprend un contrôle positif qui contient la vérotoxine inactivée. Il doit être traité comme du matériel potentiellement infectieux et manipulé conformément aux règlements de sécurité nationaux, de la même manière que les échantillons de patients.

Les échantillons ou réactifs ne doivent pas être pipetés à la bouche et tout contact avec une peau ou des membranes muqueuses lésées doit être évité. Porter des gants jetables pour manipuler les échantillons et se laver les mains une fois le test terminé. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs de test sont utilisés.

Le tampon de lavage contient du thimérosal à 0,1 % en tant que conservateur. Cette substance ne doit pas entrer en contact avec la peau ou les membranes muqueuses.

Le peroxyde d'urée peut provoquer des brûlures chimiques. Le manipuler avec prudence.

Le réactif d'arrêt contient de l'acide sulfurique 1 N. Éviter tout contact avec la peau et les vêtements. Si la peau est contaminée par le réactif, la rincer à l'eau.

Tous les réactifs et matériaux entrant en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants adaptés ou passés en autoclave à 121°C pendant au moins 1 heure. MISE EN GARDE : Pour éviter que des gaz toxiques ne se forment, tout déchet liquide contenant du réactif d'arrêt doit être neutralisé avant d'ajouter la solution d'hypochlorite.

8. Prélèvement et conservation des échantillons

S'ils ne sont pas utilisés quand ils sont récents, les échantillons de selles à analyser pour les vérotoxines peuvent être stockés comme suit :

- jusqu'à 24 heures à température ambiante ou entre 2 et 8 °C
- jusqu'à 72 heures entre 2 et 8 °C

Nous ne recommandons pas de congeler les échantillons parce que l'état des bactéries d'ECEH peut se détériorer et elles ne seront pas capables de se multiplier aussi bien, voire de se multiplier du tout, dans la culture d'enrichissement.

Les échantillons de selles doivent être recueillis dans des récipients propres sans additifs et conservés entre 2 et 8 °C avant le début du test.

Les échantillons de selles et les frottis rectaux ne doivent pas être recueillis dans des conteneurs de transport renfermant un milieu de transport et des conservateurs, du sérum animal, des ions métalliques, des agents oxydants ou des détergents, car ces substances peuvent interférer avec le test RIDASCREEN® Verotoxin.

Lorsque des frottis rectaux sont utilisés, il faut veiller à disposer d'une quantité nécessaire de selles pour effectuer le test (env. 100 mg).

La recherche des contacts doit inclure des échantillons de selles provenant des personnes ayant été en contact qui ne présentent pas de symptômes cliniques, afin d'identifier des porteurs asymptomatiques.

9. Réalisation du test

9.1. Informations générales

Tous les réactifs et la microplaque **Plate** doivent être ramenés à température ambiante (20-25 °C) avant utilisation. Les barrettes à micropuits ne doivent pas être retirées du sachet en aluminium avant d'avoir atteint la température ambiante. Les réactifs doivent être bien mélangés immédiatement avant leur utilisation. Après utilisation, les barrettes à micropuits (placées dans des sachets fermés hermétiquement) et les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Une fois utilisées, les barrettes à micropuits ne doivent pas être réutilisées. Les réactifs et les barrettes à micropuits ne doivent pas être utilisés si l'emballage est endommagé ou si les flacons fuient. Pour éviter toute contamination croisée, les échantillons ne doivent pas entrer en contact direct avec les composants de la trousse. Le test ne doit pas être réalisé à la lumière directe du soleil. Nous recommandons de couvrir la microplaque ou de placer un film plastique dessus pour éviter toute perte par évaporation.

9.2. Préparation du tampon de lavage

Mélanger 1 volume de concentré de tampon de lavage **Wash** avec 9 volumes d'eau distillée. Les cristaux éventuellement présents dans le concentré doivent être dissouts au préalable, en les réchauffant dans un bain d'eau à 37 °C.

9.3. Préparation des échantillons

Un test de détection direct des toxines peut être réalisé à partir de l'échantillon de selles pour obtenir un résultat initial. Comme la concentration en toxines des selles peut être faible, un résultat négatif ne doit pas être considéré comme un résultat négatif aux ECEH. En général, la détection des toxines doit reposer sur la culture d'enrichissement, même si les résultats des selles sont négatifs, pour parvenir à une sensibilité supérieure. En Allemagne, la recommandation actuelle consiste à procéder à un enrichissement d'une nuit dans une culture agitée à 37 °C dans un milieu mTSB avec ajout de mitomycine C (50 ng/ml). Les autres milieux d'enrichissement tels que le bouillon à Gram négatif (GN) ne s'est pas avéré avoir d'influence négative (effets matriciels) dans le cadre du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA ; mais ce n'est pas le milieu d'enrichissement que les associations professionnelles recommandent.

9.3.1. Examen d'échantillons de selles récents ou congelés

Diluer l'échantillon de selles selon un rapport de 1:11 (v/v) avec du tampon de dilution de l'échantillon de vérotoxine. Prélever 1 ml de selles liquides avec une pipette jetable (réf. : Z0001) et les mélanger à 4 ml de tampon dans un tube à essai marqué. Prélever un volume correspondant de selles liquides avec une anse de prélèvement jetable. Homogénéiser la suspension de selles par aspiration, puis éjection avec une pipette à usage unique ou par mélange dans un agitateur-mélangeur vortex. Laisser le lot reposer pendant une courte période (10 min, en clarifiant par sédimentation), 100 µl du liquide surnageant la suspension est directement utilisé pour le test. Si la procédure de test est effectuée dans un automate ELISA, ce liquide surnageant doit être dépourvu de particules. Dans ce cas, une centrifugation à 2500 G pendant 5 minutes est recommandée.

Important : en raison de sa faible sensibilité, on peut seulement considérer la détection de l'échantillon de selles non enrichi comme un prédépistage rapide en cas d'urgence anamnestique. Un résultat négatif n'est pas valable. Attendre plutôt le résultat des tests de l'échantillon enrichi.

9.3.2. Examen des échantillons de la culture d'enrichissement

La procédure décrite dans ce document est conforme aux recommandations de l'Institut Robert Koch (*Robert Koch-Institut*, RKI) et de l'Institut fédéral d'évaluation des risques (*Bundesinstitut für Risikobewertung*, BfR). Il convient de respecter les instructions applicables aux analyses pour le bouillon d'enrichissement RIDA® (réf. Z1000). Le liquide surnageant d'une culture d'enrichissement (bouillon d'enrichissement RIDA®) peut être exploité directement pour le test sans dilution supplémentaire après une brève centrifugation.

Important : veiller à ce que les températures du bouillon et du contrôle négatif (les deux doivent être amenés à température ambiante [entre 20 et 25 °C] au début du test) soient les mêmes. Des températures de bouillon élevées peuvent engendrer des valeurs DO fausses positives.

Tout d'abord, transférer 100 µl de selles liquides ou une quantité équivalente (50 à 100 mg) d'un échantillon de selles solides dans 4 ml de mTSB avec mitomycine C (p. ex. bouillon d'enrichissement RIDA®, réf. Z1000) et incuber avec un apport suffisant en oxygène (bouchon vissé à moitié) en position inclinée à 37 °C pendant 18 à 24 heures maximum. Après l'incubation, centrifuger tout l'échantillon pendant 5 min à 2 500 x g. On utilise 100 µl du liquide surnageant transparent pour le test ELISA.

Conserver les sédiments et les échantillons originaux pour confirmation ultérieure. Dans l'idéal, prélever le sédiment avec un écouvillon et le transférer dans un milieu de transport adapté (Amies, Stuart ou Cary-Blair), puis le conserver entre 2 et 8 °C jusqu'à son expédition.

9.4. Première incubation

Après avoir inséré une quantité suffisante de puits dans le support, pipeter 100 µl du contrôle positif **Control | +**, du contrôle négatif **Control | -**, de la culture d'enrichissement (ou facultativement, de la suspension de l'échantillon de selles) dans les puits. Ajouter ensuite 100 µl de l'anticorps conjugué à la biotine **Conjugate | 1** et mélanger (en tapotant légèrement sur le côté de la plaque), puis incuber pendant 60 minutes à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

9.5. Lavage

Il est important de réaliser le lavage soigneusement pour obtenir des résultats corrects et donc, de respecter les instructions à la lettre. La substance incubée dans les puits doit être déversée dans un conteneur de déchets et mise au rebut conformément aux réglementations officielles. Tapoter ensuite la plaque sur du papier absorbant pour éliminer l'humidité résiduelle. Laver ensuite la plaque cinq fois systématiquement avec 300 µl de tampon de lavage. S'assurer que les puits sont complètement vidés en les tapotant sur un morceau de papier absorbant encore sec et inutilisé après chaque lavage.

En cas d'utilisation d'un laveur de microplaques ou d'un système ELISA entièrement automatisé, veiller à ce que l'appareil soit correctement réglé ou demander, au besoin, au fabricant de vous en fournir les réglages. Les appareils fournis par R-Biopharm sont déjà programmés avec des réglages et des protocoles de travail validés. Pour éviter d'obstruer les aiguilles de lavage, il convient de n'utiliser que des suspensions de selles dépourvues de particules (voir paragraphe 9.3, Préparation des échantillons). S'assurer également que tout le liquide est aspiré à chaque étape de lavage.

9.6. Seconde incubation

Utiliser une pipette pour remplir les puits de 100 µl de conjugué **Conjugate | 2** polystreptavidine-peroxidase 2, puis incuber pendant 30 minutes à température ambiante (entre 20 et 25 °C).

9.7. Lavage

Laver en suivant les instructions de la rubrique 9.5.

9.8. Troisième incubation

Ajouter 100 µl de substrat **Substrate**. Ensuite, incuber la plaque à température ambiante (entre 20 et 25 °C), dans le noir, pendant 15 minutes. Remplir ensuite tous les puits avec 50 µl de réactif d'arrêt **Stop** afin d'arrêter la réaction. Après un mélange soigneux en tapotant légèrement le côté de la plaque, mesurer l'extinction à 450 nm (en variante : à 450/620 nm). Le réglage de la valeur nulle doit s'effectuer dans l'air, et donc sans la microplaque.

Remarque :

Des échantillons de patients fortement positifs peuvent entraîner des précipités noirâtres

du substrat.

10. Contrôle qualité – signes de réactif périmé

À des fins de contrôle qualité, chaque fois qu'un test est effectué, il est nécessaire d'utiliser des contrôles positif et négatif, pour vérifier la réalisation correcte du test et la stabilité des réactifs. Le test s'est déroulé correctement lorsque la valeur d'extinction (DO) du contrôle négatif à 450 nm est inférieure à 0,2 (inférieure à 0,160 à 450/620 nm) et lorsque la valeur mesurée du contrôle positif est supérieure à 0,8 à 450 nm ou à 450/620 nm. Une valeur supérieure à 0,2 (0,160) pour le contrôle négatif pourrait indiquer que le lavage n'a pas été suffisant. Tout écart par rapport aux valeurs requises, par exemple la présence de turbidité ou d'une coloration bleue du substrat incolore avant le remplissage des puits, pourrait indiquer une dénaturation des réactifs. En cas d'écart par rapport aux valeurs indiquées, les points suivants doivent être contrôlés avant de recommencer le test :

- Date de péremption des réactifs utilisés
- Capacité de fonctionnement de l'équipement utilisé (p. ex. étalonnage)
- Procédure de test correcte
- Inspection visuelle des composants de la trousse à la recherche d'une contamination ou de fuites ; une solution de substrat devenue bleue ne doit pas être utilisée.

Si les conditions ne sont toujours pas satisfaites après avoir recommencé le test, consulter le fabricant ou un distributeur R-Biopharm local.

11. Évaluation et interprétation

11.1. Calcul de la valeur seuil

L'évaluation du test repose sur le même calcul de la valeur seuil pour les deux types de matériau de test (le liquide surnageant de la culture d'enrichissement et l'échantillon de selles natives).

$$\text{valeur seuil} = \text{valeur d'extinction du contrôle négatif} + 0,150$$

11.2. Résultats du test

Un échantillon est considéré comme **positif** si sa valeur d'extinction est supérieure de plus de 10 % à la valeur seuil calculée.

Un échantillon est considéré comme **limite** si sa valeur d'extinction se situe dans une plage de -10 % à +10 % de la valeur seuil. Si un nouvel examen utilisant un nouvel échantillon de selles obtient une valeur comprise dans cette même plage d'ombre, l'échantillon est considéré comme étant négatif.

Des échantillons ayant des valeurs inférieures à -10 % de la valeur seuil calculée doivent être considérés comme étant **négatifs**.

12. Limites de la méthode

Le test RIDASCREEN® Verotoxin détecte les vérotoxines 1 et 2 des *E. coli* vérotoxigènes dans les échantillons de selles ou les cultures d'enrichissement. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre le niveau d'une valeur d'extinction déterminée et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. **Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés conjointement aux signes et symptômes cliniques. Un résultat positif aux toxines et une identification simultanée du germe constituent la méthode la plus fiable pour détecter des ECEH.**

Un résultat **positif** n'exclut pas la présence d'autres agents pathogènes infectieux.

Un résultat **négatif** n'exclut pas une éventuelle infection due à des *E. coli* vérotoxigènes. Un tel résultat peut être causé par l'élimination temporaire de l'agent pathogène ou par une quantité trop faible d'antigène dans l'échantillon. Si l'anamnèse est en faveur d'une suspicion d'infection par des *E. coli* vérotoxigènes, un autre prélèvement de selles doit être examiné.

Certaines souches d'ECEH ne produisent que de faibles quantités de vérotoxine. Compte tenu de la teneur souvent faible en toxines d'un échantillon de selles, la détection directe des toxines à partir d'un échantillon comme unique méthode n'est pas suffisamment sensible.

Un résultat positif à partir des selles indique rapidement une éventuelle infection à ECEH. Mais une infection à ECEH ne peut pas être exclue si le résultat est négatif.

Un résultat **limite** peut être causé par une répartition non homogène des bactéries dans l'échantillon de selles. Dans un tel cas, l'examen doit être répété avec une deuxième suspension provenant du même échantillon ou il convient de demander un autre prélèvement de selles à examiner.

Si la détection de toxines est positive, il faut la suivre en isolant *E. coli*. Seules l'identification et la caractérisation de l'agent pathogène permettent d'établir un lien entre la toxine décelée et les symptômes cliniques.

La détection de toxines à partir d'une culture d'enrichissement peut être négative malgré l'existence d'une infection à ECEH. Un enrichissement peut être suboptimal selon les conditions de la culture. Malgré la réussite de la culture d'*E. coli*, la teneur en toxines du milieu de culture peut être si faible qu'un test dédié s'avère négatif. Cela peut s'expliquer par le faible pourcentage d'ECEH dans la flore physiologique de *E. coli* (parfois, juste une ECEH pour 200 à 300 *E. coli*) ou la suspension de la production et de l'excrétion des toxines dans certaines conditions de croissance. Par conséquent, il est possible que la détection des toxines directement à partir des selles soit (faiblement) positive tandis que la détection à partir de la culture est négative.

Étant donné le réglage très sensible du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, un résultat limite ou faiblement positif lors de l'examen de selles natives peut également être dû à des effets matriciels imprécis. Un lavage complet est donc impératif pour l'examen direct des selles.

Quand des symptômes post-infectieux tels que le SUH ou le PTT se développent, la quantité

d'agents pathogènes dans les selles peut avoir chuté à un niveau auquel le germe ne peut plus être isolé. Dans ce cas, le test Verotoxin ELISA sera également négatif. Par conséquent, il est important que les échantillons de selles soient examinés dès que possible au cours de la phase entérique.

Consulter sinon le plan en plusieurs étapes pour les diagnostics des ECEH recommandé par le centre national de référence du RKI (réf. 15).

13. Performances

13.1. Qualité du test

Une étude de validation par RIDASCREEN® Verotoxin ELISA a donné lieu à l'examen de 94 échantillons. Il s'agissait d'échantillons de selles enrichis dans un bouillon mTSB par un laboratoire allemand de routine qui les a congelés et conservés pour une utilisation ultérieure après un examen de routine pour la validation du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA au sein de leur laboratoire. Après décongélation, les échantillons ont subi un examen comparatif avec le test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA et deux autres tests ELISA disponibles dans le commerce. Les résultats de l'étude sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 : Corrélations entre le test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA et les deux autres tests ELISA disponibles dans le commerce

		ELISA 1		ELISA 2	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif
RIDASCREEN® Verotoxin	Positif	35	4	34	5
	Négatif	0	55	0	55

Correspondance positive : 94,6 % 93,2 %

Correspondance négative : 96,5 % 95,7 %

13.2. Réactivité croisée

Divers organismes pathogènes ont été analysés avec RIDASCREEN® Verotoxin ELISA et n'ont affiché aucune réactivité croisée, sauf pour *S. aureus*. Ces études ont été réalisées avec des suspensions de bactéries dont les concentrations étaient de 10^6 à 10^9 organismes par ml. Les surnageants de la culture de virus sont également indiqués.

S. aureus a été introduite à une concentration de $\sim 6,3 \times 10^7$ ufc/ml dans le test qui a donné des résultats positifs faibles pour 2 répétitions sur 3. Les résultats de cette étude sont indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2 : Réactivité croisée avec des micro-organismes pathogènes

Organisme	Origine	Valeur moyenne [DO 450/620]
Adénovirus	Surnageant de culture cellulaire	-0.006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Culture	0.043
Astrovirus	Surnageant de culture cellulaire	0.000
<i>Bacillus cereus</i>	Culture	-0.001
<i>Bacteroides fragilis</i>	Culture	0.002
<i>Campylobacter coli</i>	Culture	0.021
<i>Campylobacter jejuni</i>	Culture	0.028
<i>Candida albicans</i>	Culture	0.006
<i>Citrobacter freundii</i>	Culture	-0.005
<i>Clostridium difficile</i>	Culture	-0.004
<i>Clostridium perfringens</i>	Culture	-0.001
<i>Clostridium sordellii</i>	Culture	0.056
<i>Cryptosporidium muris</i>	Culture	-0.001
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Culture	-0.001
<i>Entamoeba histolytica</i>	Culture	0.003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Culture	0.003
<i>Enterococcus faecalis</i>	Culture	0.005
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.007
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.001
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.006
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.005
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.002
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.006
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.002
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.002
<i>Escherichia coli</i>	Culture	-0.006
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	Culture	-0.006
<i>Escherichia coli</i> (O6)	Culture	-0.002
<i>Giardia lamblia</i>	Selles	-0,001
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Culture	0,003
<i>Proteus vulgaris</i>	Culture	0,004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Culture	-0,004
Rotavirus	Surnageant de culture cellulaire	0,001
<i>Salmonella enteritidis</i>	Culture	-0,005
<i>Salmonella typhimurium</i>	Culture	0,001
<i>Serratia liquefaciens</i>	Culture	0,002
<i>Shigella dysenteriae</i>	Culture	0,004
<i>Shigella flexneri</i>	Culture	-0,002
<i>Shigella sonnei</i>	Culture	-0,005
<i>Staphylococcus aureus</i>	Culture	0,126
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Culture	-0,003
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Culture	-0,003
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Culture	-0,005

13.3. Précision

La reproductibilité du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA a été étudiée avec six références qui couvrent l'ensemble de la plage de mesure des valeurs faiblement à fortement positives. Afin de déterminer la reproductibilité intra-test, 40 répétitions de ces références ont été mesurées, couvrant l'ensemble de la plage de mesure des valeurs négatives à fortement positives.

Les valeurs moyennes et les coefficients de variation (CV) ont été déterminés pour 3 lots. Pour ce qui est de la reproductibilité intra-test, les références de 10 jours de travail différents ont été mesurées en double, avec 2 passages par jour. Les mesures ont été effectuées en 3 lots par 2 techniciens. La reproductibilité inter-lots a été déterminée pour les 3 lots. Les résultats sont indiqués dans le tableau 3.

Tableau 3 : Résultats relatifs à la reproductibilité/précision du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

Référence Valeur moyenne/CV		Intra-test			Inter-tests			Inter-lots
		Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lot de la trousse 1	Lot de la trousse 2	Lot de la trousse 3	Lots des trousses 1 à 3
1	VM	2,387	2,021	2,374	2,371	2,098	2,448	2,306
	CV (%)	5,01%	5,91%	7,61%	9,01%	7,56%	8,76%	11,58%
2	VM	1,497	1,402	1,753	1,706	1,518	1,779	1,668
	CV (%)	5,01%	5,21%	7,40%	15,59%	8,69%	10,20%	12,67%
3	VM	0,808	0,711	0,835	0,850	0,784	0,949	0,861
	CV (%)	8,60%	10,94%	9,32%	10,85%	10,08%	12,81%	14,85%
4	VM	0,310	0,280	0,379	0,386	0,371	0,452	0,403
	CV (%)	9,15%	9,39%	13,49%	15,33%	11,71%	14,98%	17,63%
5	VM	0,200	0,190	0,302	0,224	0,223	0,278	0,242
	CV (%)	12,23%	13,40%	7,94%	21,67%	17,17%	18,22%	22,74%
6	VM	-0,003	0,002	-0,002	0,010	0,004	0,012	0,009
	CV (%)	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o	s/o

13.4. Sensibilité analytique

Afin de déterminer la sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, la limite du blanc (LB) a été déterminée avec 90 tests d'échantillons négatifs (bouillon d'enrichissement) et

la limite de détection (LD) a été analysée dans 72 tests des deux toxines. Les résultats de ces mesures sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats relatifs à la sensibilité analytique du test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

	VM [DO 450/620]	pg/ml
LB	0,022	-
LD de la vérotoxine 1	-	12,5
LD de la vérotoxine 2	-	25,0

13.5. Substances interférentes

Les substances mentionnées ci-dessous n'ont pas présenté d'effet sur les résultats du test lorsqu'elles ont été mélangées dans les surnageants des échantillons de selles positifs et négatifs pour vérotoxine dans les concentrations indiquées : Mucine (5 % v/v), sang humain (5 % v/v), sulfate de baryum (18,5 % v/v), lopéramide (0,02 % p/v), peptobismol (6,6 % v/v), acide stéarique/palmitique (40 % v/v), métronidazole (3% w/v), diclofénac (0,1 % p/v), mélange cyclamate/saccharine (1.3 % v/v).

La mucine et le sulfate de baryum ont également affiché une réduction dose-dépendante des valeurs DO quand ils étaient utilisés en étant plus dilués que les concentrations mentionnées ci-dessus.

Annexe

Symboles spécifiques au test :

Plate	Microplaque
Diluent 1	Tampon de dilution d'échantillon
Wash	Tampon de lavage
Control +	Contrôle positif
Control -	Contrôle négatif
Conjugate 1	Conjugué 1
Conjugate 2	Conjugué 2
Substrate	Substrat
Stop	Réactif d'arrêt

Bibliographie

1. Beutin, L. et al.: Zur Epidemiologie von Infektionen durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 1993. Bundesgesundhbl. 10, 410 - 414 (1994)
2. Beutin, L.: Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundhbl. 11, 426 - 429 (1996)
3. Bockemühl, J. et al.: Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). Bundesgesundhbl. 8, 290 - 296 (1996)
4. Bockemühl, J. et al.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundhbl. 6, 194 - 197 (1997)
5. Bülte, M.: Enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC) - Aktuell in der Bundesrepublik Deutschland? 1. Pathogenitätspotential von EHEC-Stämmen - Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger. (Literaturübersicht) Fleisch-wirtschaft 75, 1430 - 1432 (1995)
6. Bülte, M. et al.: Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) - aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? 2. Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs Fleischwirtschaft 76, 88 - 91 (1996)
7. Donohue-Rolfe, A. et al.: Purification of Shiga Toxin and Shiga-Like Toxins I and II by Receptor Analog Affinity Chromatography with Immobilized P1 Glycoprotein and Production of Cross-Reactive Monoclonal Antibodies. Infection and Immunity, Dec., 3888 - 3893 (1989)
8. Karch, H. et al.: Clonal Structure and Pathogenicity of Shiga-Like Toxin-Producing, Sorbitol-Fermenting *Escherichia coli* 0157:H⁻. Journal of Clinical Microbiology 5, 1.200 - 1.205 (1993)
9. Kuntze, U. et al.: Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen in Rohmilch und Rohmilchkäse. Archiv f. Lebensmittelhygiene 47, 141 - 144 (1996)
10. Ritchie, M. et al.: Comparison of a Direct Fecal Shiga-Like Toxin Assay and Sorbitol-McConkey Agar Culture for Laboratory Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection. J. of Clin. Microbiol., Feb., 461 - 464 (1992)
11. Strockbine, N. A. et al.: Characterization of Monoclonal Antibodies against Shiga-Like Toxin from *Escherichia coli*. Infection and Immunity, Dec., 695 - 700 (1985)
12. Takeda, Y. et al.: Vero Toxins (Shiga-Like Toxins) Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (Verocytotoxin-Producing *E. coli*). Microbiol. Immunol., 37 (8), 591 - 599 (1993)
13. Walterspiel, J. N. et al.: Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Extracellular Shiga-like Toxin I. Infection 20, No. 1, 25 - 29 (1992)
14. Gerritzen, A. et al.: Flüssige Vorkultur von Stuhlproben verbessert den EHEC-Toxinnachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest. J. Lab. Med. 22 (2), 097 - 101 (1998)
15. Fruth, A. et al.: Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohemorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 43, 310-317 (2000)