



ENTEROTOXEMIE

Test ELISA de détection de *Clostridium perfringens*
et des toxines Alpha, Bêta et Epsilon

Test sandwich pour surnageants de culture et fluides biologiques

Test diagnostique pour toutes espèces

I - INTRODUCTION

L'entérotoxémie est une pathologie le plus fréquemment aiguë, voire suraiguë, caractérisée par la résorption dans la circulation sanguine de toxines élaborées dans l'intestin. Leur production fait suite à une prolifération dans l'intestin, dans des circonstances souvent mal connues, de la bactérie qui en est à l'origine, *Clostridium perfringens*. Cette dernière est une bactérie Gram positive, en forme de bâtonnet, anaérobie, sporulée. Elle est responsable d'un grand nombre de pathologies à la fois chez l'homme et chez l'animal. Cette espèce bactérienne cosmopolite se trouve dans le tube digestif de toutes les espèces animales et de l'homme ainsi que dans le sol, l'eau et l'air. La virulence de *Clostridium perfringens* est associée à la production de différentes exotoxines. Quatre d'entre elles, Alpha, Bêta, Epsilon et Iota sont appelées les toxines létales majeures, car elles entraînent la mort de la souris après injection par voie intraveineuse ou intrapéritonéale. Les souches de *Clostridium perfringens* sont ainsi classées en 5 toxinotypes (A, B, C, D, E) suivant la combinaison des toxines létales majeures produites.

Le diagnostic bactériologique d'entérotoxémie ne peut se contenter de l'isolement de la bactérie, mais doit s'accompagner d'une analyse quantitative et d'un typage des souches bactériennes isolées pour rechercher les toxines. La trousse ELISA entérotoxémie de Bio-X permet de réaliser un toxinotypage phénotypique par dosage des toxines Alpha, Bêta et Epsilon. La trousse permet également une évaluation semi-quantitative de la croissance de *Clostridium perfringens* par dosage d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie. La trousse peut être utilisée avec des cultures de *Clostridium perfringens* ou directement à partir d'échantillons biologiques (liquides péricardique ou péritonéal prélevés sur des cadavres, liquide intestinal).

II - PRINCIPE DU TEST

Les lignes A, C, E et G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par des anticorps spécifiques des toxines Alpha Bêta, Epsilon de *Clostridium perfringens* et par un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie. Ces anticorps assurent la capture des toxines à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve (milieu de culture, contenu intestinal, liquide cavitair, ...). Les autres lignes de ces microplaques (lignes B, D, F et H) ont été sensibilisées avec des anticorps non spécifiques. On dispose de la sorte de témoins négatifs véritables qui permettent de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque. L'utilisation de tels témoins permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs. Les échantillons biologiques sont dilués dans le tampon de dilution, les surnageants de culture sont utilisés purs et incubés durant une heure sur la microplaque. Après incubation et

lavage de la préparation, on ajoute les conjugués, des anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques des toxines Alpha, Bêta, Epsilon couplés à la peroxydase ou un anticorps monoclonal spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par la bactérie couplé également à la peroxydase. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB mono-composant). Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérogène. En cas de présence d'une ou de plusieurs toxines dans l'échantillon, le ou les conjugués restent fixés sur la ou les cupules correspondantes et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en toxine de l'échantillon. Si l'échantillon contient une quantité importante de bactéries, le puits spécifique d'un déterminant antigénique exprimé par *Clostridium perfringens* donne également un signal positif.

Les signaux enregistrés sur les cupules négatives sensibilisées avec les anticorps témoins sont retranchés des signaux des cupules correspondantes positives sensibilisées par les anticorps spécifiques. Un antigène de contrôle est fourni avec la trousse de façon à pouvoir établir la validité des résultats obtenus.

TOXINOTYPES

Toxinotypes	Alpha	Bêta	Epsilon	Iota
A	++	-	-	-
B	+	++	+	-
C	+	++	-	-
D	+	-	++	-
E	+	-	-	++

III - COMPOSITION DE LA TROUSSE

- **2 microplaques de 96 puits.** La répartition des anticorps de capture est représentée sur le schéma suivant.

Ligne A : anti toxine Alpha
 Ligne B : témoin négatif toxine Alpha
 Ligne C : anti toxine Bêta
 Ligne D : témoin négatif toxine Bêta
 Ligne E : anti toxine Epsilon
 Ligne F : témoin négatif toxine Epsilon
 Ligne G : anti- *Clostridium perfringens*
 Ligne H : témoin négatif *Clostridium perfringens*

- **Solution de lavage :** 1 flacon de 100 ml de solution de lavage concentrée 20 fois. La solution cristallise spontanément à froid. En cas d'utilisation partielle de la solution, amener le flacon à 21°C +/- 3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire. Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.
- **Tampon de dilution :** 1 flacon de 50 ml de tampon de dilution coloré, concentré 5 fois. En cas d'utilisation partielle, bien mélanger et en prélever le volume nécessaire. Diluer 5 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée. En cas d'apparition d'un dépôt dans le fond du récipient, filtrer la solution sur un filtre en papier de type Whatman.
- **Conjugués :** 4 flacons de 6 ml de conjugués. A chaque valence correspond une couleur anti-toxine Alpha (rouge), anti- toxine Bêta (jaune), anti-toxine Epsilon (bleu) et anti-*Clostridium perfringens* (vert). La spécificité des conjugués est indiquée sur les flacons. Les conjugués sont prêts à l'emploi.
- **Antigène de contrôle :** 1 flacon de 4 ml de contrôle positif. Le réactif est prêt à l'emploi.
- **Solution de TMB mono-composant:** 1 flacon de 25 ml de chromogène TMB (tétraméthylbenzidine). Ce réactif se conserve entre + 2°C et + 8°C à l'abri de la lumière. Il est prêt à l'emploi.
- **Solution d'arrêt :** 1 flacon de 15 ml de solution d'arrêt contenant de l'acide phosphorique 1 M.

	BIO K 270/2
Microplaques	2
Solution de lavage	1 X 100 ml (20 X)
Tampon de dilution (coloré)	1 X 50 ml (5 X)
Conjugués	4 X 6 ml (1 X)
Antigène de contrôle	1 X 4 ml (1 X)
Solution TMB mono-composant	1 X 25 ml (1 X)
Solution d'arrêt	1 X 15 ml (1 X)

IV- MATERIEL SUPPLEMENTAIRE ET EQUIPEMENTS REQUIS

Eau distillée, cylindres gradués, Bêchers, tubes en plastic, portoir pour tubes, pointes, réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux, couvercle, adhésif pour microplaques, pipettes automatiques graduées (mono et multicanaux), lecteur de microplaque, laveur et agitateur de microplaques (optionnel).

V - PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce test ne peut être utilisé que pour un diagnostic "in vitro" et il est à usage strictement vétérinaire.
- Les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C. Les réactifs ne peuvent être garantis si leur date de péremption est dépassée et/ou s'ils n'ont pas été conservés dans les conditions décrites dans cette notice.
- La solution de lavage et le tampon de dilution concentrés peuvent être stockés à température ambiante. Après dilution, ces solutions ont une stabilité de 6 semaines entre +2°C et +8°C.
- Les barrettes non utilisées doivent être stockées immédiatement dans l'enveloppe d'aluminium en veillant à conserver le dessicant bien sec et en fermant hermétiquement l'enveloppe. Si ces précautions sont scrupuleusement respectées, il est possible de préserver l'activité des barrettes jusqu'à la date de péremption de la trousse.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres trousses.
- Il est important de veiller à la qualité de l'eau utilisée pour préparer les diverses solutions de la trousse. Ainsi, il ne faut pas utiliser d'eau susceptible de contenir des agents oxydants (hypochlorite de soude) ou des sels de métaux lourds car ils pourraient réagir avec le chromogène.
- Ecarter les solutions contaminées par des bactéries ou des champignons.
- La solution d'arrêt contient de l'acide phosphorique 1 M. Manipuler ce produit avec prudence.
- Le matériel utilisé qui a été en contact avec les échantillons doit être considéré comme potentiellement infectieux et être éliminé en respectant la législation en vigueur du pays.
- Pour garantir la fiabilité des résultats, il importe de respecter parfaitement le protocole. On veillera particulièrement à respecter les temps et les températures d'incubation ainsi que la précision des volumes et des dilutions.

VI – MODE OPERATOIRE

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- 2- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Diluer au demi les échantillons biologiques dans le tampon de dilution (tube à essai). Si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, on peut ajouter dans le récipient des billes de verre et déliter le contenu intestinal en agitant vigoureusement l'ensemble. Les surnageants de culture sont utilisés non dilués. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des cultures réalisées en milieu TGY en condition anaérobie (culture en tube sans agitation) à 37°C. L'optimum de temps de culture pour la toxine Alpha est de 4 heures ou tout au moins jusqu'à la production maximale de gaz. Pour les toxines Bêta et Epsilon, on réalise une culture de minimum 8 heures voire overnight. Lorsqu'on ne dispose d'aucune information concernant la souche, il est préférable de l'incuber 8 heures à 37°C sans agitation.

Composition du milieu de culture liquide TGY:

- | | |
|---|------|
| - Trypticase (peptone tryptique de caséine) | 30 g |
| - Extrait de levure | 20 g |
| - Glucose | 1 g |
| - L-cystéine | 1 g |

Dissoudre le trypticase et l'extrait de levure dans 950 ml d'eau et autoclaver. Dissoudre le glucose et la L-cystéine dans 50 ml d'eau et filtrer stérilement. Lorsque les 950 ml de milieu sont refroidis, ajouter les 50 ml de glucose et de L-cystéine.

- 4- Distribuer les échantillons biologiques dilués et les surnageants de culture non dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante échantillon 1 puits A1 à H1; échantillon 2: puits A2-H2, etc... Distribuer l'antigène de contrôle sur une colonne complète (exemple : puits A3-H3).
- 5- Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure.
- 6- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies au chapitre "composition de la trousse". Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant vigoureusement au-dessus d'un récipient contenant un agent inactivant. Egoutter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. Ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus du récipient de confinement. Répéter deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules. A l'issue de ces 3 lavages, passer au point suivant.
- 7- Distribuer les conjugués à raison de 100 µl par puits en respectant la répartition suivante

anti-toxine Alpha:	lignes A et B
anti-toxine Bêta:	lignes C et D
anti-toxine Epsilon:	lignes E et F
anti- <i>C. perfringens</i> :	lignes G et H

Couvrir et incuber la plaque 1 heure à 21°C +/- 3°C.

- 8- Laver la plaque comme décrit au point 6.
- 9- Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution de révélateur doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la microplaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette.
Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité. Ce temps n'est donné qu'à titre indicatif car dans certaines circonstances, il pourra être utile de l'allonger ou de le raccourcir.
- 10- Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.
- 11- Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm. Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

VII – INTERPRETATION DES RESULTATS

Soustraire de chaque valeur enregistrée sur les lignes impaires (A, C, E et G) le signal des puits témoins négatifs correspondants (B, D, F et H) et noter le résultat obtenu (calcul des delta D.O.). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives. Procéder de même pour le contrôle positif. Le test ne peut être validé que si la référence positive fournit des différences de densité optique en dix minutes supérieures aux valeurs indiquées sur le contrôle de qualité annexé à la notice.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le contrôle positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} * 100}{\text{Delta DO pos}}$$

En utilisant le premier tableau repris dans le contrôle de qualité, déterminer le statut des échantillons (positif ou négatif).

VIII – POUR COMMANDER

Multiscreen AgELISA ENTEROTOXEMIE:

2 X 12 tests

BIO K 270/2

