



**RESEAU NATIONAL DE SURVEILLANCE
DES *YERSINIA* ENTEROPATHOGENES**

***DIAGNOSTIC RAPIDE DES YERSINIA
ENTEROPATHOGENES DANS LES SELLES***

Fascicule N° 20 – Février 2016

Introduction

- Les *Yersinia* entéropathogènes représentent la troisième cause de diarrhées d'origine bactérienne en Europe.
- Les espèces pathogènes pour l'homme sont *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*.
- Dans les laboratoires de biologie médicale (LBM) :
 - ✓ Le diagnostic d'une yersiniose entérique se fait à partir d'une coproculture. L'isolement peut être effectué directement sur un milieu semi-sélectif comme le CIN, ou après un enrichissement préalable.
 - ✓ La croissance lente des *Yersinia* rend l'isolement des colonies difficile parmi la flore commensale.
 - ✓ De plus, la croissance de certaines souches de *Y. pseudotuberculosis* est inhibée par ces techniques d'isolement.
 - ✓ Après l'isolement, l'identification de l'espèce est effectuée avec des galeries d'identification (type API20E, ID32E ou VITEK) ou avec le MALDI-TOF.
- Le diagnostic d'espèce n'est pas toujours fiable avec ces techniques.
- ✓ La détermination du biotype des souches de *Y. enterocolitica* est rarement effectuée alors que la connaissance de ce caractère est important pour définir la pathogénicité des isolats. En effet les souches des biotypes 1B, 2, 3, 4 et 5 sont pathogènes alors que celles du biotype 1A ne le sont pas.
- ✓ Au total, l'isolement des *Yersinia* à partir d'un échantillon polycontaminé comme les selles est souvent difficile, le diagnostic d'espèce est parfois incorrect et le caractère

pathogène des souches de *Y. enterocolitica* n'est pas déterminé.

→ De nouvelles méthodes de diagnostic, plus rapides, efficaces et indicatrices du caractère pathogène sont donc nécessaires.

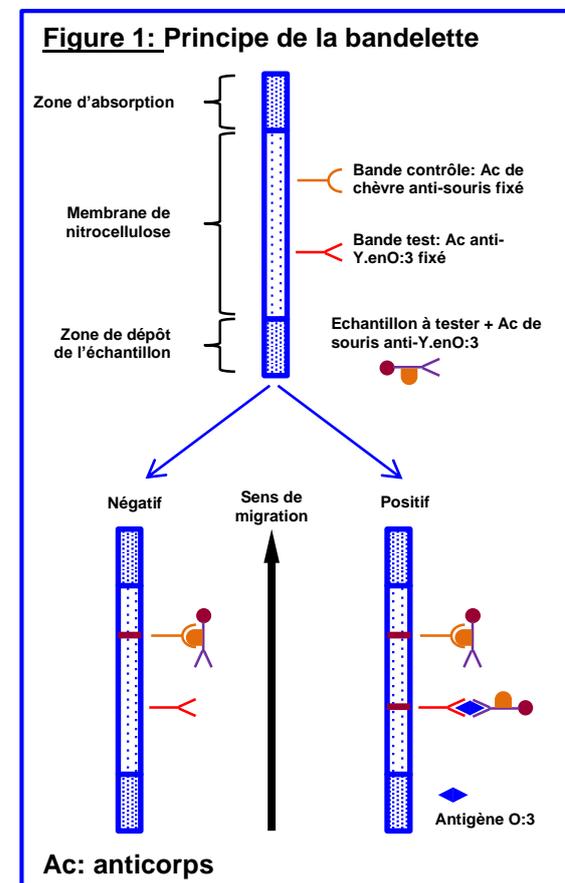
- Une collaboration entre le CNR et le CEA de Saclay a permis de développer et valider un test rapide sur bandelette pour la détection de *Yersinia* entéropathogènes dans les selles.

→ 3 cibles ont été choisies : 1 détectant les *Y. pseudotuberculosis* (*Y.pst*) tous sérotypes confondus, et 2 autres pour *Y. enterocolitica* (*Y.en*) des biosérotypes 4/O:3 et 2/O:9.

→ Ces cibles couvrent >98% des souches pathogènes reçues au CNR.

Principe de la bandelette

- Le principe de la bandelette développée est présenté dans la figure 1.

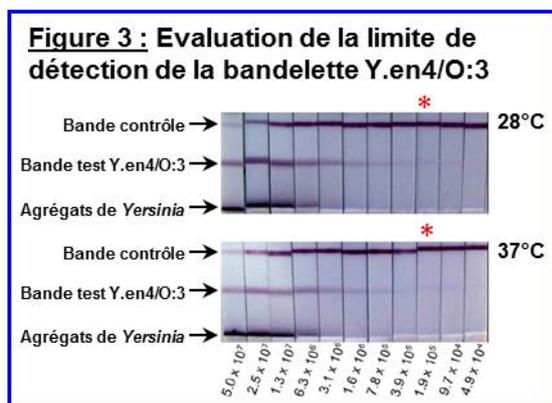


- Un échantillon de selle est incubé pendant 10 minutes à température ambiante avec un (ou un mélange) anticorps marqué à l'or colloïdal.
- La bandelette est ensuite plongée dans ce mélange pendant environ 30 minutes jusqu'à migration complète du liquide.
- L'observation de la bande contrôle indique que le test est conforme.
- L'observation d'une bande test indique un résultat positif alors que l'absence de bande test indique un résultat négatif.

Sensibilité des bandelettes

- La limite de détection des 3 bandelettes a été évaluée sur différentes dilutions de bactéries après croissance à 28°C et à 37°C.

✓ Exemple pour la bandelette Y.en4/O:3 :



→ La limite de détection se situe à 10^5 ufc/ml pour les 2 températures d'incubation (ufc = unité formant colonie).

→ Pour les concentrations les plus élevées, des agrégats bactériens spécifiques sont également observés dans la partie inférieure de la bandelette.

✓ Résultats de la détermination de la sensibilité des différentes bandelettes :

Bandelette	Souches testées	Limite de détection (ufc/ml)	
		28°C	37°C
Y.en4/O:3	Y.en 4/O:3	10^5	10^5
Y.en2/O:9	Y.en 2/O:9	5×10^5	5×10^5
Y.pst	Y.pst I	10^5	10^5
	Y.pst II	10^6	10^6
	Y.pst III	5×10^5	5×10^5
	Y.pst IV	5×10^5	5×10^5
	Y.pst V	10^6	10^6

→ Pour les 3 bandelettes, il n'y a pas de différence de sensibilité liée à la température de croissance des bactéries.

→ La limite de détection de la bandelette Y.en2/O:9 est légèrement plus élevée que celle de la bandelette Y.en4/O:3 et s'établit à 5×10^5 ufc/ml.

→ Pour la bandelette Y.pst, la limite de détection varie de 10^5 à 10^6 ufc/ml en fonction des souches testées.

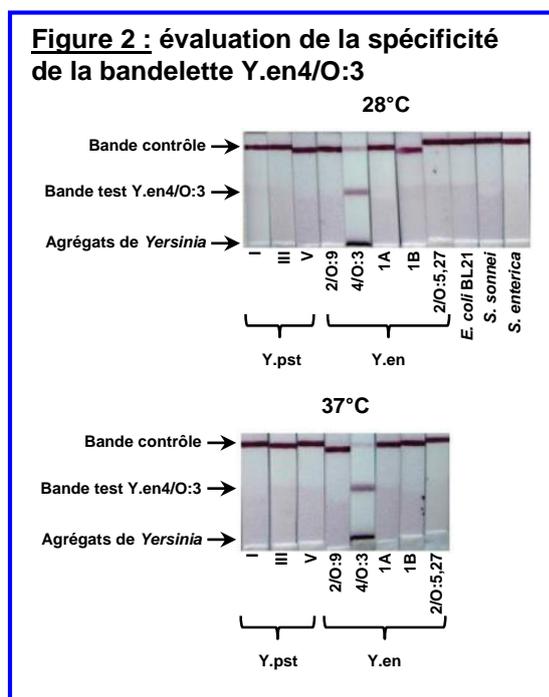
La limite de détection est meilleure pour la souche de sérotype I, le plus fréquent en France.

Spécificité des bandelettes

- 2 températures de croissance (28°C et 37°C) des bactéries ont été utilisées pour évaluer la spécificité des 3 bandelettes (Y.en4/O:3, Y.en2/O:9 et Y.pst) en utilisant d'autres *Yersinia* et entérobactéries (*Brucella*, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* et *Erwinia*).

✓ Les bandelettes ont été testées avec des concentrations de bactéries de 5.10^7 ufc/ml.

✓ Un exemple des résultats de l'évaluation de la spécificité de la bandelette Y.en4/O:3 est présenté dans la figure 2.



→ Une bande spécifique a été observée avec une suspension bactérienne de *Y. enterocolitica* 4/O:3.

→ Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence vis-à-vis des autres biotypes de *Y. enterocolitica* ou autres entérobactéries aux 2 températures de croissance.

→ Les mêmes résultats ont été obtenus avec les bandelettes Y.en2/O:9 et Y.pst.

→ Les 3 bandelettes testées montrent une bonne spécificité pour les *Yersinia* pathogènes ciblées aux 2 températures testées.

- Une validation de la détection sur un grand nombre de souches a été effectuée pour les 3 bandelettes.

✓ Pour ce test, les bactéries ont été incubées à 37°C.

✓ Les bandelettes ont été testées avec des concentrations de bactéries égales à 10 fois la limite de détection calculée précédemment.

✓ Validation des bandelettes Y.en4/O:3 et Y.en2/O:9:

Espèce	Biotype/Sérotype	Y.en4/O:3 (nb+/nb souches)	Y.en2/O:9 (nb+/nb souches)
Y.en	4/O:3	14/14	13/13
	2/O:9	0/13	0/14
	2/O:5	0/2	0/2
	1B	0/1	0/1
	1A	1/11	0/11
Y.pst	I, II and III	0/3	0/3
<i>E. coli</i>		0/4	0/4
<i>Shigella</i>		0/2	0/2
<i>Salmonella</i>		0/4	0/4
<i>Erwinia</i>		0/1	0/1
<i>Brucella</i>		0/3	0/3

→ Concernant la bandelette Y.en4/O:3 :

- Les 14 souches de *Y. enterocolitica* 4/O:3 testées ont donné un résultat positif.

- Parmi les 30 autres souches de *Yersinia* testées, une seule a été positive en bandelette.

Cette souche est du biotype 1A, mais est associée au sérotype O:3.

Comme l'anticorps de détection est à priori dirigé contre l'antigène O:3, il n'est pas surprenant que cette souche donne un résultat positif.

Toutefois, l'association biotype 1A/O:3 est très rare puisque sur les 2722 souches de biotype 1A du CNR, seules 4 souches ont le sérotype O:3.

- Il n'y a pas eu de réactions croisées avec d'autres entérobactéries.

→ Concernant la bandelette Y.en2/O:9 :

- Les 13 souches de *Y. enterocolitica* 2/O:9 testées ont donné un résultat positif.

- Parmi les 31 autres souches de *Yersinia* testées, il n'y a pas eu de faux résultat positif.

- Il n'y a pas eu de réactions croisées avec d'autres entérobactéries.

✓ Evaluation de la bandelette Y.pst :

Espèce	Sérotype	Résultat (nb+/nb souches)
Y.pst	I	20+/32
	II	10+/10
	III	11+/11
	IV	10+/10
	V	11+/11
<i>Y. similis</i>	divers	0+/5
<i>Y. wautersii</i>	divers	0+/5
Y.en	divers	0+/5
<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Brucella</i>		0+/14

→ Parmi les 32 souches de sérotype I testées, seules 20 ont donné un résultat positif.

Cela représente une sensibilité de 62,5% pour les souches de sérotype I les plus fréquemment isolées en France.

→ En revanche, les 42 souches des sérotypes II, III, IV et V ont toutes donné un résultat positif.

→ Parmi les 15 autres souches de *Yersinia* testées, il n'y a pas eu de faux résultat positif.

→ Il n'y a pas eu de réactions croisées avec d'autres entérobactéries.

→ Les 3 bandelettes n'ont pas donné de réactions croisées avec d'autres entérobactéries.

→ Les 2 bandelettes Y.en4/O:3 et Y.en2/O:9 ont permis la détection de toutes les souches cibles testées.

→ La bandelette Y.pst présente un défaut de sensibilité pour les souches de sérotype I.

Validation sur selles contaminées

• Afin de se mettre dans les conditions proches de la réalité d'un laboratoire de biologie médicale, la sensibilité des 3 bandelettes a été testée sur un échantillon de selle artificiellement contaminée.

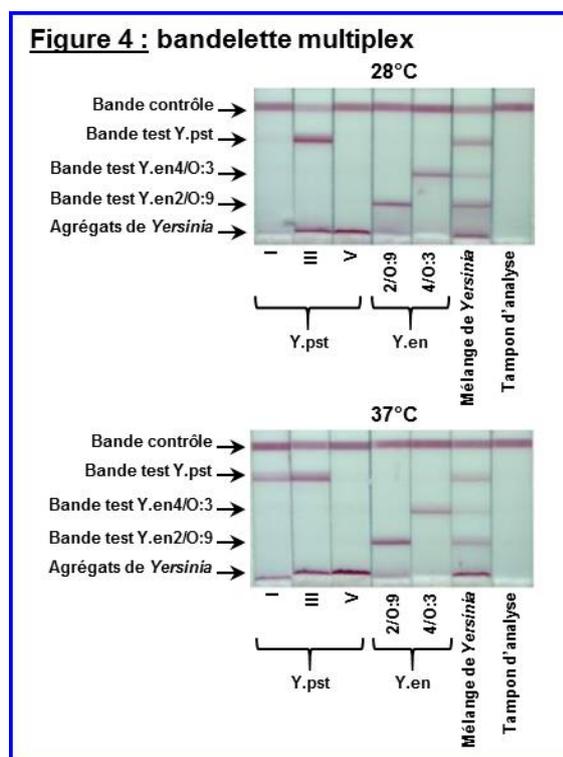
Bandelette	Souches testées	Limite de détection (ufc/ml)	
		Dilution dans le tampon	Dilution dans la selle
Y.en2/O:9	Y.en 2/O:9	5x10 ⁵	5x10 ⁵
Y.en4/O:3	Y.en 4/O:3	10 ⁵	5x10 ⁵
Y.pst	Y.pst I	10 ⁵	10 ⁵
	Y.pst III	5x10 ⁵	5x10 ⁵
	Y.pst V	10 ⁶	10 ⁶

→ La sensibilité des 3 bandelettes dans une selle artificiellement contaminée est similaire à celle obtenue quand les bactéries sont diluées dans le tampon d'analyse.

→ Il n'y a pas d'effet inhibiteur de la selle sur la détection des *Yersinia*.

Bandelette multiplex

- Une bandelette multiplex avec les 3 cibles testées indépendamment jusqu'à présent a été développée (Figure 4).
- La sensibilité a été évaluée avec chaque souche cible après croissance à 28°C et à 37°C.



→ La sensibilité obtenue avec la bandelette multiplex a été similaire à celle obtenue avec chaque bandelette individuelle.

Conclusion

- Le test bandelette développé est utilisable pour la détection des *Yersinia* entéropathogènes dans les selles.

- Ce test présente les avantages suivants :
 - ✓ Il donne un résultat rapide (moins de 45 minutes).
 - ✓ Il est facile à utiliser, ne requiert pas de préparation complexe de l'échantillon ni d'appareillage.
 - ✓ Il n'y a pas de réactions croisées avec d'autres entérobactéries.
 - ✓ Il apporte une aide pour le diagnostic comme test de première intention dans les laboratoires de biologie médicale.

- Ce test présente quelques points à améliorer car :
 - ✓ Toutes les souches de *Y. pseudotuberculosis* de sérotype I ne sont pas détectées.
 - ✓ La sensibilité est bonne (10^5 à 10^6 ufc/ml) mais ne permet pas de détecter les charges bactériennes modérées. En effet, il a été montré que la concentration de *Y. enterocolitica* dans des selles de patients infectés variait de 10^4 à 10^7 ufc/ml.
 - ✓ Il existe de rares réactions croisées avec des souches non pathogènes.

→ Malgré quelques imperfections, ces bandelettes peuvent être d'une aide précieuse dans les LBM.

→ Toutefois ce test ne doit pas remplacer l'isolement des souches du fait de son seuil de sensibilité élevé, de l'absence de détection de certaines souches de *Y.pst* et de la nécessité de pouvoir évaluer la résistance aux antibiotiques des souches et éventuellement effectuer leur typage en cas d'épidémie.

→ Le test bandelette ne se substitue donc pas à l'isolement des souches mais en cas de positivité, il permettra de savoir rapidement que l'échantillon contient une

souche pathogène et justifiera une recherche poussée de colonies positives parmi la flore commensale.

→ L'étape suivant sera de valider les performances de ces bandelettes dans les conditions de routine dans les LBM. Nous engageons les laboratoires qui seraient prêts à participer à la validation de ces bandelettes en parallèle à la coproculture à nous contacter.

Références

Laporte, J., Savin, C., Lamourette, P., Devilliers, K., Volland, H., Carniel, E., Créminon, C., Simon, S., 2015. Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays. J. Clin. Microbiol. 53(1),146-59. doi: 10.1128/JCM.02137-14.

Zheng, H., Sun, Y., Lin, S., Mao, Z., Jiang, B. 2008. *Yersinia enterocolitica* infection in diarrheal patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 27(8):741-52. doi: 10.1007/s10096-008-0562-y.



NOUVEAU SITE WEB

Un nouveau site internet a été mis en place depuis décembre 2014 et est à votre disposition à l'adresse suivante :

<http://www.pasteur.fr/fr/sante/centres-nationaux-reference/les-cnr/peste-et-autres-yersiniose>

N'oubliez pas de nous transmettre la fiche de renseignement clinique en accompagnement des souches que vous nous envoyez. Merci !

DANS LE PROCHAIN FASCICULE,

***« LES YERSINIOSES EN FRANCE :
VUE D'ENSEMBLE ET POTENTIELLES SOURCES D'INFECTION »***



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