

RIDA[®] QUICK Verotoxin/O157 Combi

Art. No.: N2203



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Anwendungsbereich

Für die *in vitro* Diagnostik. Der RIDA[®]QUICK Verotoxin/O157 Combi Test ist ein immunchromatografischer Schnelltest zum qualitativen Nachweis von Verotoxinen (syn. Shigatoxine) und/oder des E.coli Serovars O157 aus einer Stuhlanreicherung in mTSB-Bouillon.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Shigatoxine (Stx) sind die bedeutendsten Virulenzfaktoren von enterohämorrhagischen Escherichia coli (EHEC). Sie verursachen Durchfälle und das lebensbedrohliche hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), eine Hauptursache des akuten Nierenversagens in der Kindheit. Die Serogruppe O157 ist an allen EHEC Infektionen zu ca. 70-90 % beteiligt. Der schnelle Nachweis dieses Pathogens ist obligatorisch zur Entscheidung einer adäquaten Therapie. Der RIDA[®]QUICK Verotoxin/O157 Combi Test detektiert sowohl die Shigatoxine als auch die Serogruppe O157 gleichzeitig aus dem Überstand einer mTSB-haltigen Stuhlanreicherungsbouillon innerhalb nur eines Tages.

3. Testprinzip

Der vorliegende Schnelltest ist ein einstufiger immunchromatografischer Lateral-Flow Test, bei dem jeweils gegen die beiden Zielantigene gerichtete spezifische Antikörper an rote (Shigatoxin-spezifisch) oder an grüne (O157-spezifisch) Latexpartikel gekoppelt sind. Weitere spezifische Antikörper gegen die beiden Antigene sind fest auf der Membran gebunden. Die zu untersuchende Stuhlprobe wird zunächst in einer Anreicherungsbouillon (mTSB + Mitomycin C) für ca. 18-24 h bei 37°C zur Vermehrung des Erregers und der Shigatoxinbildung angereichert. Nach Zentrifugation der Bouillon wird mit einem Aliquot des Überstandes eine 1:2-Verdünnung mit dem Test-spezifischen Probenpuffer hergestellt und im Test eingesetzt. Bei Zugabe der so hergestellten Probenverdünnung in die runde Öffnung der Testkassette binden dann an farbige Latexpartikel gekoppelte spezifische Antikörper an die in der Probe befindlichen Antigene und fließen über die Membran bis zu den spezifischen Fängerbanden, an denen sie wiederum spezifisch gebunden werden. Je nach vorhandenem Antigen in der Probe wird dann eine grüne und / oder rote Bande sichtbar. Daneben muss immer auch die blaue Kontrollbande erscheinen zur Bestätigung eines validen Testergebnisses.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 20 Bestimmungen

Cassette	20 Best.	20 einzeln verpackte Testkassetten
Diluent	18 ml	Extraktionspuffer, gebrauchsfertig; enthält 0,1 % Natriumazid
Pipet	25 Stck.	Beutel mit 25 Einwegpipetten

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Packung kann bei 2 - 30 °C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden. Ebenso kann eine Verwendungsfähigkeit von Kassetten dann nicht mehr gewährleistet werden, wenn die Umverpackung der einzelnen Kassetten beschädigt ist.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

- Probenröhrchen für Stuhlsuspension
- Vortexmischer (optional)
- Mikropipette (200 µl - 1000 µl)
- Abfallbehälter mit einer 0,5 %igen Natrium-Hypochloritlösung
- Anreicherungsbouillon (mTSB + Mitomycin C ; z.B. RIDA® Anreicherungsbouillon : Z 1003)
- Zentrifuge

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in vitro* Diagnostik.

Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten. Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.

Der Probenverdünnungspuffer enthält als Konservierungsmittel Natriumazid. Eine Berührung mit der Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.

Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren, Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Während des Umgangs mit Proben Einmal-Handschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen. In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.

Sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen, müssen genau wie diese vor ihrer Entsorgung mit geeigneten Desinfektionsmitteln (z.B. Natrium-Hypochlorit) behandelt oder mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklaviert werden.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Die auf Shigatoxin bzw. E.coli O157 zu prüfenden Stuhlproben können vor ihrem Einsatz in der Anreicherungsbouillon, sofern sie nicht frisch eingesetzt werden, wie folgt gelagert werden:

- bis 24 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 2 - 8 °C
- bis 72 Stunden bei 2 - 8 °C

Das Einfrieren der Proben ist nicht zu empfehlen, da die EHEC-Bakterien darunter leiden und in der Anreicherungskultur dann nicht mehr gut oder gar nicht mehr vermehrungsfähig sind.

Stuhlproben sind in sauberen Behältern ohne irgendwelche Zusätze zu sammeln und vor Test-

beginn bei 2 - 8 °C zu lagern.

Wenn rektale Abstriche eingesetzt werden sollen, ist darauf zu achten, dass genügend Stuhlmaterial (ca. 100 mg) zur Testdurchführung vorhanden ist.

Bei Umgebungsuntersuchungen sollten auch Stuhlproben von klinisch unauffälligen Kontaktpersonen genommen werden, um asymptomatische Träger zu identifizieren.

9. Testdurchführung

9.1. Allgemeines

Vor Verwendung sind die Proben, der Extraktionspuffer sowie die Testkassetten auf Raumtemperatur (20 - 25 °C) zu bringen. Die Testkassetten sollten erst kurz vor Verwendung durch Aufreißen der Umverpackung entnommen werden. Einmal benutzte Kassetten dürfen nicht wiederverwendet werden. Direkte Sonneneinstrahlung während der Testdurchführung ist zu vermeiden.

9.2. Vorbereitung der Proben

Zunächst werden 100 µl flüssiger Stuhl oder eine äquivalente Menge (50 – 100 mg) einer festen Stuhlprobe in 4 ml mTSB mit Mitomycin C (z. B. RIDA® Anreicherungsbouillon, Art. Nr. Z 1003) übertragen und unter Schütteln (ca. 120 - 160 rpm) und ausreichender Sauerstoffzufuhr bei 37 °C für 18 bis maximal 24 Stunden inkubiert. Zum Schütteln eignen sich Horizontalschüttler oder Rotationsmischer. Nach der Inkubation wird die gesamte Probe bei 2500 g für 5 min zentrifugiert. Vom klaren Überstand wird eine 1:2 Verdünnung mit dem spezifischen Extraktionspuffer hergestellt und in ein sauberes Röhrchen oder ein unbeschichtetes Mikrotiterwell überführt.

9.3. Proben-Testung

Die der Umverpackung entnommene Testkassette **Cassette** wird auf eine ebene Unterlage gelegt. Anschließend werden von der hergestellten Probensuspension 200 µl mittels Mikropipette oder 4 Tropfen mit der Einwegpipette **Pipet** in die runde Öffnung der Testkassette pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass die Flüssigkeit ungehindert durch die Membran läuft. Eventuell mitpipettierte Partikel, die dies behindern können, sind vorher zu entfernen. Nach **15 Minuten** kann das Testergebnis abgelesen werden.

10. Qualitätskontrolle – Anzeichen für Reagenzienverfall

Der Test ist nur auszuwerten, wenn die Testkassette **vor** dem Einpipettieren der Probensuspension unversehrt ist und keine farbigen Veränderungen oder Banden auf der Membran zu sehen sind. Ferner muss **nach** der Testinkubation mindestens die blaue Kontrollbande sichtbar sein. Erscheint diese nicht, ist vor einer Testwiederholung folgendes zu prüfen:

- Haltbarkeit der Testkassetten und des verwendeten Extraktionspuffers
- Korrekte Testdurchführung
- Kontamination des Extraktionspuffers

Ist danach bei Wiederholung des Tests mit einer neuen Testkassette die Kontrollbande wiederum nicht sichtbar, wenden Sie sich bitte an den Hersteller oder Ihren lokalen R-Biopharm Distributeur.

11. Auswertung und Interpretation

Es dürfen maximal drei Banden erscheinen, von der Probenaufnahmestelle gesehen in folgender Reihenfolge: Eine grüne (T_1 = Testbande 1), eine rote (T_2 = Testbande 2) und eine blaue (C = Kontrollbande) Bande. **Fehlt die blaue Kontrollbande ist der Test nicht auswertbar und ungültig!**

Folgende Interpretationen sind möglich:

- **O157 positiv** : grüne und blaue Banden sind sichtbar.
- **Shigatoxin positiv** : rote und blaue Banden sind sichtbar.
- **O157 und Shigatoxin positiv** : grüne, rote und blaue Banden sind sichtbar.
- **Negativ** : nur blaue Bande ist sichtbar.
- **Ungültig** : keine Bande ist sichtbar oder eine andere Konstellation als oben beschrieben sowie andere Verfärbungen der Banden. Ebenso sind Banden-Verfärbungen, die später als 15 Minuten auftreten ohne diagnostischen Wert und nicht zu beurteilen.

12. Grenzen der Methode

Der RIDA[®]QUICK Verotoxin/O157 Combi weist Antigen von O157 und / oder Shigatoxine in angereicherten Stuhlproben nach. Ein Zusammenhang zwischen der Intensität der sichtbaren spezifischen Banden und dem Auftreten oder der Schwere klinischer Symptome kann hieraus nicht abgeleitet werden. Die erzielten Ergebnisse sind immer in Verbindung mit dem klinischen Bild zu interpretieren.

Ein **positives** Ergebnis schließt die Anwesenheit anderer infektiöser Erreger nicht aus.

Ein **negatives** Ergebnis schließt eine mögliche EHEC Infektion oder das Vorhandensein von Shigatoxinen nicht aus. Es kann durch eine zu geringe Antigenmenge in der Probe verursacht sein. Besteht anamnestisch der begründete Verdacht auf eine Infektion mit den gesuchten Erregern, sollte eine weitere Stuhlprobe des Patienten untersucht werden.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Testqualität

Die Testvalidierung wurde im Konsiliarlabor für HUS im Hygieneinstitut der Uni Münster mit insgesamt 159 Proben durchgeführt. Darunter befanden sich 51 EHEC Referenzstämme, die ein breites Spektrum von 38 verschiedenen Serotypen repräsentierten. Bis auf den tierpathogenen Subtyp Stx 2g waren alle sonstigen humanpathogenen Shigatoxin-Typen vertreten. Ferner wurden 96 Stuhlproben und 8 Isolate daraus sowie 4 Isolate aus Tieren untersucht. Die Resultate wurden verglichen mit Stx – und O157 - spezifischen PCR-Methoden des Instituts. Zur Verifizie-

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab 1:

Vergleich des RIDA®QUICK Verotoxin/O157 Combi Schnelltests mit spezifischen PCR- Methoden zum Nachweis der Stx-codierenden Gene sowie der für den Serotyp 0157-spezifischen sfpA Gene.

		RIDA® QUICK Verotoxin/O157 Combi			
		Stx1 / Stx 2		O157	
		+	-	+	-
PCR	+	68	13	20	2
	-	1	78	2	136

Sensitivität :	85,0 %	90,9 %
Spezifität :	98,7 %	98,5 %
pos. prädiktiver Wert :	98,6 %	90,9 %
neg. prädiktiver Wert :	86,7 %	98,5 %
Genauigkeit :	91,8 %	97,5 %

13.2. Analytische Sensitivität

Zur Feststellung der Nachweisgrenze für beide Shigatoxine wurden beide Toxine seriell verdünnt und im RIDA®QUICK Verotoxin/O157 Combi Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tab 2 : Nachweisgrenze für Stx 1 und Stx 2

Stx 1 ng/ml	RIDA®QUICK Verotoxin / O157	Stx 2 ng/ml	RIDA®QUICK Verotoxin / O157
50	++++	50	++++
40	++++	40	++++
30	+++	30	++++
20	+++	20	++++

10	++	10	++++
8	++	8	+++
6	++	5	+++
4	+	4	++
2 *	(+)	2	++
1	-	1	+
0,5	-	0,5 *	(+)
0,1	-	0,1	-

* Nachweisgrenze

13.3 Spezifität

Der RIDA[®]QUICK Verotoxin/O157 Combi zeigte keine Kreuzreaktivität zu anderen E.coli Serotypen und auch nicht zu anderen Enterobacteriaceen außer zu Salmonellen der Gruppe N, die ebenfalls das O157 Antigen auf ihrer Oberfläche besitzen . Dieses Oberflächenantigen wird gelegentlich auch bei einigen Stämmen der Spezies Citrobacter gefunden, sodass bei alleiniger Reaktion der O157-Bande eine Identifizierung nach Anzucht ratsam ist. Andererseits sind O157-Isolate, die die Fähigkeit zur Shigatoxin-Bildung verloren haben (Phagenverlust) sehr selten.

Literatur

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. et al.: Comparative evaluation of the RIDASCREEN® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of shigatoxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. J. of Appl. Microbiol. 102, 630-639 (2007)
3. Beutin, L.: Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundhbl. 11, 426 - 429 (1996)
4. Bockemühl, J. et al.: Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). Bundesgesundhbl. 8, 290 - 296 (1996)
5. Bockemühl, J. et al.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundhbl. 6, 194 - 197 (1997)
6. 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)
7. Karch, H. et al.: Clonal Structure and Pathogenicity of Shiga-Like Toxin-Producing, Sorbitol-Fermenting *Escherichia coli* O157:H⁻. Journal of Clinical Microbiology 5, 1.200 - 1.205 (1993)
8. Kuntze, U. et al.: Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen in Rohmilch und Rohmilchkäse. Archiv f. Lebensmittelhygiene 47, 141 - 144 (1996)
9. 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)
10. Strockbine, N. A. et al.: Characterization of Monoclonal Antibodies against Shiga-Like Toxin from *Escherichia coli*. Infection and Immunity, Dec., 695 - 700 (1985)
11. 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)
12. Walterspiel, J. N. et al.: Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Extracellular Shiga-like Toxin I. Infection 20, No. 1, 25 - 29 (1992)
13. Gerritzen, A. et al.: Flüssige Vorkultur von Stuhlproben verbessert den EHEC-Toxinnachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest. J. Lab. Med. 22 (2), 097 - 101 (1998)
14. Fruth, A. et al.: Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohemorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl.- Gesundheits-Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 43, 310-317 (2000)