

RIDA[®] QUICK Verotoxin / O157 Combi

Art. n°.: N 2203



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



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. Este test rápido RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi es un ensayo inmunocromatográfico para la identificación cualitativa de verotoxinas (sinónimo: toxinas Shiga) y/o de E. coli serotipo O157 en un cultivo de heces obtenido con el caldo de enriquecimiento mTSB.

2. Resumen y explicación del test

Las toxinas Shiga (Stx) son los factores de virulencia más importantes de la Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC). Ellas provocan diarreas y también el síndrome urémico hemolítico (SUH) con peligro para la vida, que a su vez, es una de las causas principales de la insuficiencia renal aguda en la infancia. El serotipo O157 está presente en cerca del 70-90% de todas las infecciones que ocurren por EHEC. La identificación rápida de este patógeno es un requisito obligatorio para poder decidir la terapia adecuada a seguir. El test RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi detecta al mismo tiempo y solamente en el plazo de un día tanto las toxinas Shiga, como también el serotipo O157 en el sobrenadante de un caldo de enriquecimiento basado en mTSB.

3. Fundamento del test

El presente test rápido es un ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral de un solo paso, en la cual los anticuerpos específicos dirigidos contra cada uno de los antígenos diana están absorbidos en partículas de látex rojas (específico para las toxinas Shiga) o en partículas de látex verdes (específico para el serotipo O157). Otros anticuerpos específicos contra ambos antígenos se encuentran fijados fuertemente sobre la membrana. La muestra de heces que se debe analizar se cultiva primeramente en un caldo de enriquecimiento (mTSB + mitomicina C) durante aprox. 18-24 horas a 37 °C con el fin de lograr la multiplicación del patógeno y la producción de las toxinas Shiga. Tras la centrifugación del caldo se toma una parte alícuota del sobrenadante, se diluye en relación 1:2 con el buffer de muestras específico para el test y se somete al análisis. Cuando se vierte esta solución diluida de la muestra a través del orificio circular del casete del test se produce la aglutinación de los anticuerpos específicos fijados a las partículas coloreadas de látex con los antígenos que se encuentran en la muestra, fluyen entonces a través de la membrana hasta las bandas específicas de captura y se unen a ellas de forma específica. Según el antígeno presente en la muestra se observará una banda verde y/o una banda roja. Junto a ellas debe aparecer siempre una banda azul de control que sirve como confirmación de la validez del resultado del ensayo realizado.

4. Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 20 determinaciones

Cassette

20 determ.

20 casetes envasados individualmente

Diluent	18 ml	Buffer de extracción, listo para el uso; contiene azida de sodio al 0,1 %
Pipet	25 piezas	Bolsa con 25 pipetas desechables

5. Reactivos y su almacenamiento

El envase se puede conservar entre 2 – 30 °C y se puede usar hasta la fecha de vencimiento impresa en la etiqueta. Después de la fecha de vencimiento no se asumen garantías de calidad. Del mismo modo tampoco se puede garantizar la capacidad de uso de casetes cuyo envase exterior individual haya sido dañado.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

- Tubitos de muestras para las suspensiones de heces
- Agitador Vortex (opcional)
- Micropipetas (200 µl-1000 µl)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%
- Caldo de enriquecimiento (mTSB + mitomicina C; por ej. RIDA[®] Anreicherungsbouillon, (Z1003)
- Centrífuga

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

El buffer de dilución de muestras contiene azida de sodio como agente conservante. Se debe evitar, por tanto, el contacto con la piel o mucosas.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras no está permitido fumar, comer o beber.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que antes de su eliminación sean tratados, al igual que las muestras, con agentes desinfectantes adecuados (por ej. hipoclorito de sodio) o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C.

8. Recolección y conservación de las muestras

Las muestras de heces en las cuales se desean detectar las toxinas Shiga y la E. coli O157 pueden conservarse como se describe a continuación, en caso de que no se introduzcan de inmediato en el caldo de enriquecimiento:

- si es hasta 24 horas, a temperatura ambiente o entre 2 – 8 °C
- si es hasta 72 horas, entre 2 – 8 °C

La congelación de las muestras no es recomendable, ya que las bacterias EHEC se afectan y no se multiplican bien o en lo absoluto en el cultivo de enriquecimiento.

Las muestras de heces se deben coleccionar en recipientes limpios sin ningún tipo de aditivo y conservar entre 2 – 8 °C antes del comienzo del test.

Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 100 mg) para la realización del test.

En los estudios de contactos se deben incluir también muestras de heces de personas sin signos clínicos aparentes para identificar también a los portadores asintomáticos.

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Las muestras, el buffer de extracción y los casetes de prueba deben adaptarse a la temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de proceder a utilizarlos. Los casetes para el test sólo deben extraerse de su envoltura exterior poco antes de su uso. Los casetes de ensayo que se hayan usado una vez no se deben volver a utilizar. Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test.

9.2. Preparación de las muestras

Primeramente se mezclan 100 µl de muestra de heces en forma líquida o una cantidad equivalente (50 – 100 mg) de una muestra de heces sólidas con 4 ml de medio de cultivo mTSB conteniendo mitomicina C (por ej. RIDA® Anreicherungsbouillon, Art. n° Z 1003) y se incuban bajo agitación (aprox. 120 - 160 rpm) y con suficiente suministro de oxígeno a 37 °C durante 18 y 24 horas como máximo. Para el mezclado son adecuados un agitador oscilante horizontal o un mezclador rotativo. Después de la incubación se aplica una centrifugación a toda la muestra a 2500 g unos 5 minutos. Se realiza una dilución 1: 2 del sobrenadante claro con ayuda del buffer de extracción específico y se transfiere a un tubo limpio o igualmente a un pocillo no recubierto de la placa de microtitulación.

9.3. Análisis de las muestras

Se retira la envoltura exterior del casete para el test **Cassette** y se coloca éste sobre una superficie plana. Acto seguido se aspiran de la suspensión de heces preparada 200 µl con la micropipeta o 4 gotas con la pipeta desechable **Pipet** y se transfieren al casete a través del orificio circular de entrada. Se debe prestar atención a que el líquido fluya sin impedimento a través de la membrana. Se eliminarán antes las partículas que eventualmente se hayan

aspirado con la pipeta y pudieran impedir el movimiento del líquido. Después de **15 minutos** se puede leer el resultado.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

El test sólo debe evaluarse si el casete para el test está intacto **antes** de pipetear la suspensión de la muestra y no se perciben en la membrana cambios de coloración o bandas. Además es imprescindible que **después** de la incubación del test esté visible por lo menos la banda azul de control. Si ésta no aparece, se deben hacer las siguientes comprobaciones antes de repetir el test:

- Durabilidad de los casetes de ensayo y del buffer de extracción utilizado
- Ejecución correcta del test
- Contaminación del buffer de extracción

Dado el caso que al repetir el test con un nuevo casete tampoco sea visible la banda de control, usted debe dirigirse al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

Como máximo pueden aparecer solamente tres bandas, vistas desde el punto de absorción de la muestra y en el siguiente orden: Una banda verde (T_1 = banda 1 del test), una roja (T_2 = banda 2 del test), y una azul (C = banda de control). **¡Si no aparece la banda azul de control, el test no es evaluable y por tanto inválido!**

Las siguientes interpretaciones son posibles:

- **Serotipo O157 positivo:** Una banda **verde** y una banda **azul** son visibles.
- **Toxina Shiga positiva:** Una banda **roja** y una banda **azul** son visibles.
- **Serotipo O157 y toxina Shiga positivos:** Una banda **verde**, una banda **roja** y una banda **azul** son visibles.
- **Negativo:** Solamente la banda **azul** es visible.
- **Inválido:** NO hay bandas visibles o existe otra situación diferente a la descrita más arriba, así como otras coloraciones de las bandas. Igualmente si hay coloraciones de bandas que aparecen después de 15 minutos, éstas se deben evaluar como carentes de valor diagnóstico.

12. Limitaciones del método

El test RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi detecta antígenos del serotipo O157 y/o toxinas Shiga en muestras de heces enriquecidas mediante cultivo. No es posible establecer una relación entre la intensidad de la banda específica visible y la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico.

Un resultado **positivo** no excluye la presencia de otros agentes infecciosos.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección por EHEC o la presencia de toxinas Shiga. La causa de ello puede tener su origen en una cantidad demasiado baja de antígeno en la muestra. Si existe la sospecha anamnésica fundada de una infección con los agentes patógenos analizados, se debe repetir el análisis a otra muestra de heces del paciente.

13. Características de rendimiento

13.1. Calidad del test

La validación del test se llevó a cabo en el Laboratorio de Referencia de SUH del Instituto de Higiene de la Universidad de Münster donde se analizaron un total de 159 muestras. Entre ellas se encontraban 51 cepas de referencia para EHEC, las cuales representaban un amplio espectro de 38 serotipos diferentes. A excepción del patógeno animal subtipo Stx 2g, todos los otros tipos de toxinas Shiga considerados patógenos humanos estaban representados. De igual modo se examinaron 96 muestras de heces y 8 aislamientos de ellas, así como 4 aislamientos de procedencia animal. Los resultados se compararon con métodos PCR específicos para Stx y O157 del Instituto. Para verificar la producción de Stx se efectuó además un ensayo de citotoxicidad con células Vero. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1:

Comparación del ensayo rápido RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi con métodos PCR específicos para la identificación de los genes codificadores de Stx, así como de los genes *sfpA* específicos del serotipo O157.

		RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi			
		Stx 1 / Stx 2		O157	
		+	-	+	-
PCR	+	68	12	20	2
	-	1	78	2	135

Sensibilidad:	85,0 %	90,9 %
Especificidad:	98,7 %	98,5 %
Valor predictivo positivo:	98,6 %	90,9 %
Valor predictivo negativo:	86,7 %	98,5 %
Exactitud:	91,8 %	97,5 %

13.2. Sensibilidad analítica

Para la determinación del límite de detección de ambas toxinas Shiga se realizó una dilución seriada para cada una y se sometieron al ensayo RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Límite de detección para Stx 1 y Stx 2

Stx 1 pura Ng/ml	RIDAQuick Stx / O157	Stx 2 pura ng/ml	RIDAQuick Stx / 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	-

* Límite de detección

13.3 Especificidad

El ensayo RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi no mostró reactividad cruzada respecto a otros serotipos de E. coli ni tampoco con otros enterobacteriáceos a excepción de las salmonelas del grupo N, ya que éstas últimas presentan también el antígeno O157 en su superficie. Este antígeno superficial se detecta también ocasionalmente en algunas cepas de las especies Citrobacter, de modo que ante la presencia únicamente de una reacción de coloración típica para la banda del serotipo O157 es recomendable comprobar la identificación mediante un cultivo. Por otra parte, se debe recalcar que los aislamientos de O157 con pérdida de la capacidad de producir toxinas Shiga (pérdida de fagos) son muy raros.

Bibliografie

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* 0157: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)