

RIDA[®]QUICK Verotoxin / O157 Combi

N° art. : N 2203



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



1. Domaine d'utilisation

Pour le diagnostic *in vitro*. Le test RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi est un test rapide immunochromatographique pour caractériser qualitativement les vérotoxines (syn. Shigatoxine) ou le sérovar E.coli O157 provenant d'une culture de selles dans un bouillon mTSB.

2. Résumé et explication du test

Les shigatoxines (Stx) sont les facteurs de virulence les plus importants des Escherichia coli (EHEC) entérohémorragiques. Ils provoquent des diarrhées et le syndrome hémolytique - urémique (HUS) mortel, une cause principale de la défaillance aiguë des reins au cours de l'enfance. Le sérotype O157 est présent dans toutes les infections EHEC à env. 70-90 %. La caractérisation rapide de ce pathogène est obligatoire pour décider d'un traitement adéquat. Le test RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi Test détecte aussi bien les shigatoxines que le sérotype O157 à partir du liquide clair formé sur le dessus d'une culture de selles contenant du mTSB en un jour seulement.

3. Principe du test

Le présent test rapide est un test à débit latéral immunochromatographique à un niveau, dans lequel les anticorps spécifiques dirigés contre les deux antigènes cibles sont couplés à des particules de latex rouges (spécifiques aux shigatoxines) ou vertes (spécifiques à l'O157). D'autres anticorps spécifiques contre les deux antigènes sont liés de manière fixe à la membrane. L'échantillon de selles à examiner est d'abord cultivé dans un bouillon d'enrichissement (mTSB + Mitomycine C) pendant env. 18-24 h à 37°C pour multiplier l'agent pathogène et la formation de shigatoxines. Après centrifugation du bouillon, une dilution à 1:2 est réalisée avec un aliquote du liquide clair au-dessus du prélèvement à l'aide du tampon de l'échantillon spécifique au test ; cette dilution est ensuite utilisée dans le test. En ajoutant la dilution de l'échantillon ainsi fabriquée dans l'orifice rond de la cassette de test, des anticorps spécifiques couplés aux particules de latex de couleur se lient aux antigènes présents dans l'échantillon et passent à travers la membrane jusqu'aux bandes collectrices spécifiques sur lesquelles ils se lient de nouveau de manière spécifique. En fonction de l'antigène présent dans l'échantillon, une bande rouge et/ou verte est ensuite visible. La bande de contrôle doit toujours apparaître pour valider un résultat de test correct.

4. Contenu de l'emballage

Les réactifs d'un emballage suffisent à 20 déterminations.

Cassette	20 déterm.	20 cassettes de test sous emballage individuel
Diluent	18 ml	Tampon d'extraction, prêt à l'emploi : enthält 0,1 % Natriumazid
Pipet	25 pcs	Sachet avec 25 pipettes à usage unique

5. Les réactifs et leur stockage

Le paquet peut être entreposé à 2 – 30° C et peut être utilisé jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Lorsque la date de péremption est atteinte, aucune garantie de qualité ne peut plus être acceptée. L'utilisation possible des cassettes ne peut plus non plus être garantie lorsque l'emballage individuel des cassettes est altéré.

6. Réactifs supplémentaires nécessaires – Accessoires requis

- Tubes à essai pour suspension de selles
- Mélangeur Vortex (en option)
- Micropipette (200 µl - 1000 µl)
- Poubelle avec une solution d'hypochlorite au sodium à 0,5 %
- Bouillon d'enrichissement (mTSB + Mitomycine C ; par ex. RIDA® Anreicherungsbouillon : Z 1003)
- Centrifuge

7. Mesures de précaution

Uniquement pour le diagnostic *in vitro*.

Ce test ne doit être effectué que par un personnel de laboratoire formé. Les directives concernant le travail dans des laboratoires médicaux doivent être respectées. La notice d'utilisation de réalisation du test doit être respectée rigoureusement.

Le tampon de dilution des échantillons contient de l'azide de sodium comme agent conservateur. Tout contact avec la peau ou les muqueuses doit être évité.

Ne pas pipeter les échantillons ou les réactifs avec la bouche, éviter tout contact sur des lésions de la peau ou sur des muqueuses. Au cours du maniement avec les échantillons, porter des gants à usage unique et à l'issue du test, se laver les mains. Ne pas fumer, manger ou boire dans les locaux dans lesquels les échantillons sont manipulés.

Tous les réactifs et les matériaux, pouvant entrer en contact avec des échantillons potentiellement infectieux, doivent être traités comme ces derniers avant leur élimination avec des désinfectants adéquats (par ex. hypochlorite de sodium) ou être passés à l'autoclave au minimum pendant une heure à 121° C.

8. Accumulation et stockage des échantillons

Les échantillons de selles devant être contrôlés pour détecter des shigatoxines ou l'E.coli O157 peuvent être entreposés avant d'être utilisés dans le bouillon d'enrichissement – à condition qu'ils ne doivent pas être utilisés frais – de la manière suivante :

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

Il n'est pas recommandé de surgeler les échantillons puisque les bactéries EHEC en souffrent et ne sont plus ensuite capables de croître correctement dans la culture d'enrichissement.

Les échantillons de selles doivent être collectés dans des récipients propres sans un quelconque additif et doivent être stockés à 2 – 8° C avant le début du test.

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

Lors d'examens de l'environnement, il convient de prendre également des échantillons de selles de personnes contacts n'ayant aucun symptôme clinique afin d'identifier des porteurs asymptomatiques.

9. Réalisation du test

9.1. Généralités

Avant d'utiliser le test, les échantillons, le tampon d'extraction et les cassettes de test doivent être amenés à température ambiante (20 - 25° C). Les cassettes de test doivent être retirées juste avant être d'utilisée de leur emballage en déchirant ce dernier. Les cassettes utilisées ne doivent pas être réutilisées. Tout rayonnement direct du soleil au cours de la réalisation du test doit être évité.

9.2. Préparation des échantillons

100 µl de selles liquides ou une quantité équivalente (50 – 100 mg) provenant d'un échantillon de selles solides sont tout d'abord ajoutés à 4 ml mTSB avec de la Mitomycine C (par ex. RIDA® Anreicherungsbouillon, n° art. Z 1003) puis sont mis à incuber en étant agités (env. 120 - 160 tpm) et avec un approvisionnement suffisant en oxygène pendant 18 à 24 heures au maximum à 37 °C. Des agitateurs horizontaux ou des mélangeurs à rotation sont indiqués pour effectuer l'agitation. A l'issue de l'incubation, tout l'échantillon est centrifugé à 2500 g pendant 5 minutes. Une dilution 1:2 est réalisée avec le liquide clair du dessus à l'aide du tampon d'extraction spécifique et est transvasée dans une éprouvette propre ou un puits de microtitration non revêtu.

9.3. Test du prélèvement

La cassette de test retirée de l'emballage **Cassette** est posée sur une surface plane. 200 µl de la suspension de l'échantillon réalisée sont ensuite pipetés au moyen de la micropipette ou 4 gouttes sont pipetées avec la pipette à usage unique **Pipet** dans l'ouverture ronde de la cassette de test. Le liquide doit s'écouler dans problème à travers la membrane. Les particules éventuellement pipetées simultanément et pouvant entraver ce passage doivent être retirées au préalable. Au bout de **15 minutes**, le résultat du test peut être lu.

10. Contrôle de qualité – Signes d'une dénaturation du réactif

Ce test ne peut être exploité que lorsque la cassette de test est intacte **avant** d'être pipetée dans la suspension réalisée du prélèvement et lorsqu'elle ne présente aucune altération de couleur ou aucune bande de couleur sur la membrane. De plus, **à l'issue** de l'incubation test, la

bande de contrôle bleue doit être au minimum visible. Si celle-ci n'apparaît pas, il convient de contrôler les éléments suivants avant de renouveler le test :

- Conservation des cassettes de test et du tampon d'extraction utilisé
- Réalisation correcte du test
- Contamination du tampon d'extraction

Lors du renouvellement du test avec une nouvelle cassette de test, si la bande de contrôle n'est toujours pas visible, il faut vous adresser au fabricant ou à votre distributeur local R-Biopharm.

11. Analyse et interprétation

Au maximum trois bandes peuvent apparaître, en étant aperçues de l'endroit de prélèvement de l'échantillon et dans l'ordre suivant : une bande verte (T_1 = bande test 1), une rouge (T_2 = bande test 2) et une bleue (C = bande de contrôle). **Si la bande de contrôle bleue manque, le test ne peut pas être analysé et n'est plus valable !**

Les interprétations suivantes sont possibles :

- **O157 positif** : les bandes **verte** et **bleue** sont visibles.
- **Shigatoxine positif** : les bandes **rouge** et **bleue** sont visibles.
- **O157 et Shigatoxine positif** : les bandes **verte**, **rouge** et **bleue** sont visibles.
- **Négatif** : uniquement la bande **bleue** est visible.
- **Non valable** : aucune bande n'est visible ou une autre constellation que celle décrite ci-dessus et d'autres altérations de couleurs des bandes sont présentes. De plus, les colorations des bandes, survenant au bout de 15 minutes, n'influent pas sur le diagnostic et ne doivent pas être analysées.

12. Limites de la méthode

Le RIDA[®] Quick Verotoxin / O157 Combi caractérise l'antigène de l'O157 et / ou de la shigatoxine dans des échantillons de selles enrichis. Il n'est pas possible d'en déduire un rapport entre l'intensité des bandes spécifiques visibles et l'apparition ou la gravité des symptômes cliniques. Les résultats obtenus doivent toujours être interprétés en liaison avec le tableau clinique.

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

Un résultat **négatif** n'exclut pas une éventuelle infection EHEC ou la présence de shigatoxines. Il peut être causé par une quantité trop faible d'antigène dans l'échantillon. Si, sur le plan de l'anamnèse, une infection avec l'agent pathogène recherché est soupçonnée avec raison, un autre prélèvement de selles du patient doit être examiné.

13. Caractéristiques

13.1. Qualité du test

La validation du test a été effectuée dans le laboratoire expert pour HUS de l'institut d'hygiène de l'université de Münster avec un total de 159 échantillons. 51 souches de référence EHEC s'y trouvaient, elles représentaient un large spectre de 38 sérotypes différents. Excepté le sous-type pathogène pour les animaux Stx 2g, tous les autres types de shigatoxines pathogènes pour les humains étaient représentés. De plus, 96 échantillons de selles et 8 éléments isolés, ainsi que 4 éléments isolés provenant d'animaux ont été étudiés. Les résultats ont été comparés avec les méthodes PCR spécifiques Stx – et O157 – de l'institut. Pour vérifier la production Stx, un test de cytotoxicité avec des cellules vero a été utilisé. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.

Tab. 1 :

Comparaison du test rapide RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi aux méthodes PCR spécifiques pour caractériser le gène permettant de coder les Stx et le gène sfpA spécifique au sérotype O157.

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

Sensitivité :	85,0 %	90,9 %
Spécificité :	98,7 %	98,5 %
Valeur prédictive pos. :	98,6 %	90,9 %
Valeur prédictive nég. :	86,7 %	98,5 %
Exactitude :	91,8 %	97,5 %

13.2. Sensitivité analytique

Pour déterminer la limite de caractérisation pour les deux shigatoxines, les deux toxines ont été diluées successivement puis ont été utilisées dans le test RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi. Les résultats sont repris dans le tableau 2.

Tab. 2 : limite de caractérisation pour Stx 1 et Stx 2

Stx 1 pur ng/ml	RIDAQuick Stx / O157	Stx 2 pur 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	-

* Limite de la caractérisation

13.3 Spécificité

Le RIDA[®] Quick Verotoxin / O157 Combi n'a pas présenté de réactivité croisée avec les autres sérotypes E.coli et pas non plus avec les autres entérobactéries, exceptées les salmonelles du groupe N qui possèdent aussi l'antigène O157 sur leur surface. Cet antigène de surface est trouvé de temps en temps également sur certaines souches de l'espèce Citrobacter de sorte qu'une identification selon la culture est conseillée en cas de réaction seule de la bande O157. D'autre part, les éléments isolés O157 qui ont perdu la capacité de former les shigatoxines (perte de phage) sont très rares.

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. 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)