

RIDA[®]QUICK Verotoxin / O157 Combi

Art. N°: N 2203



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



1. Área de utilização

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDA® Quick Verotoxin / O157 é um teste rápido e imunocromatográfico para a comprovação qualitativa de verotoxinas (syn. Shigatoxine) e/ou de E.coli Serovars O157 provenientes de um enriquecimento de fezes em caldo mTSB.

2. Resumo e explicação do teste

As shigatoxinas (Stx) são os factores de virulência mais importantes de Escherichia coli (EHEC) enterohemorrágicas. Estas provocam diarreias e a síndrome hemolítica urémica (SHU), uma das principais causas da disfunção aguda de risco fatal dos rins na infância. O serogrupo O157 faz parte de todas as infecções EHEC em aprox. 70-90%. A rápida detecção desta patologia é, obrigatoriamente, decisiva para uma terapia adequada. O teste RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi detecta tanto as shigatoxinas como o serogrupo O157 simultaneamente, pela sobrevivência de um caldo de enriquecimento de fezes que contenha mTSB dentro de um dia.

3. Princípio do teste

O teste rápido disponível é um teste Lateral-Flow imunocromatográfico, no qual anticorpos específicos dispostos contra ambos os antígenos-alvo são acoplados a partículas de látex vermelhas (específicas para shigatoxina) ou verdes (específicas para O157). Outros anticorpos específicos contra ambos os antígenos são ligados firmes na membrana. A amostra de fezes a examinar é enriquecida depois num caldo de enriquecimento (mTSB + mitomicina C) durante aprox. 18-24 h a 37°C para multiplicação do agente patogénico e da formação de shigatoxinas. Após a centrifugação do caldo, com uma parte do supernatante é produzida uma diluição 1:2 com o tampão de amostra específico do teste e utilizado no teste. Ao adicionar a diluição da amostra produzida desta forma no orifício redondo do cartucho do teste, depois, anticorpos específicos acoplados a partículas de látex colorida ligam-se aos antígenos que se encontram na amostra e fluem pela membrana até às tiras de captação, nas quais se ligam outra vez especificamente. Dependendo do antígeno disponível, na amostra é então visível uma tira verde e/ou vermelha. Além disso, tem de aparecer sempre a tira de controlo azul para confirmar um resultado válido do teste.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 20 doses

Cassette	20 doses	20 cartuchos de teste embalados individualmente
Diluent	18 ml	Tampão de extracção, pronto para o uso; contém 0,1 % Azida de sódio
Pipet	25 unidades	Saco com 25 pipetas descartáveis

5. Reagentes e sua armazenagem

A embalagem pode ser armazenada a 2 – 30 °C e deve ser usada até a data de expiração impressa. Após a expiração da data de validade, nenhuma garantia de qualidade pode ser oferecida. Do mesmo modo, a capacidade de uso dos cartuchos não pode mais ser garantida se a embalagem dos cartuchos individuais estiver danificada.

6. Reagentes adicionais necessários – equipamento necessário

- Tubo de amostra para suspensão de fezes
- Mixer Vortex (opcional)
- Micropipeta (200 µl – 1000 µl)
- Contentor para lixo com uma solução de hipocloreto de sódio de 0,5%
- Caldo de enriquecimento (mTSB + mitomicina C ; ex. Caldo de enriquecimento RIDA® Anreicherungsbouillon Z 1003)
- Centrífuga

7. Medidas de precaução

Apenas para o diagnóstico *in vitro*.

Este teste só deve ser executado por pessoal de laboratório instruído. As regras para o trabalho nos laboratórios médicos devem ser observada. As instruções de uso para a execução do teste devem ser estritamente seguidas.

O tampão de diluição de amostra contém azida de sódio como conservante. Deve-se evitar o contacto com a pele ou as mucosas.

Não pipetar as amostras ou reagentes com a boca, evitar o contacto com a pele ferida ou mucosas. Durante o manuseamento de amostras, deve usar luvas descartáveis e, após o término do teste, deve-se lavar as mãos. Nas áreas, nas quais se trabalha com as amostras, não fumar, comer ou beber.

Todos os materiais e reagentes, que vêm junto com as amostras potencialmente infecciosas, devem ser manejados com desinfectantes adequados (p. ex. hipocloreto de sódio) antes da eliminação ou autoclavados pelo menos 1 hora a 121 C.

8. Recolha e armazenamento das amostras

As amostras de fezes a serem examinadas pela presença de shigatoxina ou E.coli O157 podem, antes da utilização no caldo de enriquecimento, se não forem utilizadas frescas, ser armazenadas da seguinte maneira:

- até 24 horas a temperatura ambiente 2 –8 °C
- até 72 horas a 2 –8 °C

O congelamento das amostras não é recomendado, visto que as bactérias EHEC sofrem com este processo e não se podem multiplicar de forma ideal na cultura de enriquecimento.

As amostras de fezes devem ser colectadas em frascos limpos sem aditivos e armazenadas

antes do teste a 2 – 8 °C. Se forem utilizadas recolhas anais, deve-se observar que material de fezes suficiente (aprox. 100 mg) esteja disponível para o teste.

Nos exames de ambiente as amostras de fezes de pessoas de contacto clinicamente insuspeitáveis devem também ser recolhidas, para identificar os portadores assintomáticos.

9. Execução do teste

9.1. Generalidades

Antes da utilização, as amostras, o tampão de extracção e o cartucho do teste devem ser colocados em temperatura ambiente (20 – 25 °C). Os cartuchos de teste só devem ser retirados um pouco antes da utilização abrindo a embalagem. Os cartuchos não podem ser usados mais de uma vez. A luz do sol directa durante a execução do teste deve ser evitada.

9.2. Preparação das amostras

Depois, transferir 100 µl de fezes líquidas ou uma quantidade equivalente (50 – 100 mg) de uma amostra de fezes sólidas em 4 ml mTSB com mitomicina C (p. ex. RIDA® Anreicherungsbouillon, art. nº Z 1003) e incubar, sob agitação (aprox. 12 - 160 rpm) e alimentação de oxigénio suficiente a 37 °C durante 18 até 24 horas no máximo. Para a agitação, são adequados o agitador horizontal e o misturador de rotação. Após a incubação, a amostra total é centrifugada a 2500 g por 5 min. Do supernatante claro, é produzida uma diluição de 1:2 com o tampão de extracção específico e inserido num tubo limpo ou num frasco microtítulo não revestido.

9.3. Teste das amostras

O cartucho de teste **Cassette** retirado da embalagem é depositado numa superfície plana. Depois são pipetados da suspensão de amostras produzida 200 µl através da micropipeta ou 4 gotas com a pipeta descartável **Pipet** no orifício redondo do cartucho de teste. Deve-se observar que o líquido passe sem problemas pela membrana. As eventuais partículas pipetadas junto, que possam causar problemas, devem ser retiradas antes. Após **15 minutos** o resultado do teste pode ser lido.

10. Controlo de qualidade – Sinais de expiração do reagente

O teste só deve ser avaliado se o cartucho de teste estiver intacto **antes** da pipetagem da suspensão de amostras produzida e não se pode ver modificações ou tiras coloridas. Além disso, **após** a incubação do teste, pelo menos a tira de controlo **azul** deve ser visível. Se ela não aparece, antes de repetir o teste deve-se verificar o seguinte:

- Durabilidade dos cartuchos de teste e do tampão de extracção utilizado
- Execução correcta do teste
- Contaminação do tampão de extracção

Se após a repetição do teste com um novo cartucho de teste a tira de controlo não for visível, entre em contacto com o fabricante ou com o seu distribuidor local R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

Só podem aparecer três tiras no máximo, vistas da posição de recolha da amostra na seguinte sequência Uma tira verde (T_1 = tira de teste 1), uma vermelha (T_2 = tira de teste 2) e uma azul (C = tira de controlo). **Se faltar a tira de controlo azul o teste não é avaliável e é inválido !**

As seguintes interpretações são positivas:

- **O157 positivo** : as tiras **verde** e **azul** são visíveis.
- **Shigatoxina positiva** : as tiras **vermelha** e **azul** são visíveis.
- **O157 e shigatoxina positiva** : as tiras **verde**, **vermelha** e **azul** são visíveis.
- **Negativo** : apenas a tira **azul** é visível.
- **Inválido** : nenhuma tira visível ou uma constelação diferente daquela descrita, bem como outras colorações nas tiras. Do mesmo modo, as colorações das tiras que só aparecem após 15 minutos não têm valor diagnóstico e não devem ser avaliadas.

12. Limites dos métodos

O teste RIDA[®] Quick Verotoxin / O157 Combi detecta antígenos de O157 e/ou shigatoxinas nas amostras de fezes enriquecidas. Uma relação entre a intensidade das tiras específicas visíveis e dos sintomas presentes ou altamente clínicos não pode ser ignorada aqui. Os resultados alcançados devem sempre ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.

Um resultado **positivo** não exclui a presença de outros agentes patogénicos infecciosos.

Um resultado **negativo** não exclui uma possível infecção EHEC ou a existência de shigatoxinas. Tal pode ser provocado por uma quantidade ínfima de antígenos na amostra. Se houver de forma anamnésica a suspeita fundada de uma infecção com o agente patogénico procurado, uma outra amostra de fezes do paciente deve ser examinada.

13. Características de desempenho

13.1. Qualidade do teste

A validação do teste foi efectuada no laboratório de referência para HUS no Instituto de Higiene da Universidade de Münster com o total de 159 amostras. Neste encontraram-se 50 grupos de referência EHEC, que representavam uma vasta gama de 38 serotipos diferentes. Até ao subtipo Stx 2g patogénico aos animais, estavam todos os tipos de shigatoxinas patogénicas aos humanos. Além disso, foram examinadas 96 amostras de fezes e 8 isolados, dos quais 4 eram de animais. Os resultados foram comparados com métodos PCR específicos do Stx e O157 do instituto. Para verificar a produção Stx, foi utilizado também um teste de citotoxicidade com células vero. Os resultados estão resumidos na tabela 1.

Tab. 1:

Comparação do teste rápido RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi com métodos PCR específicos para detectar os genes codificados Stx, bem como os genes sfpA específicos para o serotipo O157.

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

Sensibilidade:	85,0 %	90,9 %
Especificidade:	98,7 %	98,5 %
Valor pos. previsto:	98,6 %	90,9 %
Valor neg. previsto:	86,7 %	98,5 %
Precisão:	91,8 %	97,5 %

13.2. Sensibilidade analítica

Para verificar os limites comprovados para ambas as shigatoxinas, ambas as toxinas foram diluídas em série e utilizadas no teste RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi. Os resultados estão resumidos na tabela 2.

Tab. 2: Limites comprovados para Stx 1 e Stx 2

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

* Limites da comprovação

13.3 Especificidade

O RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi não mostrou actividade cruzada face a outros serotipos E-coli nem a outras entero-bactérias excepto das salmonelas do grupo N, que possuem também o antígeno O157 na sua superfície. Este antígeno de superfície é também encontrado, ocasionalmente, nalguns grupos do Spezies Citrobacter, de modo a que em caso de uma reacção isolada das tiras O157, aconselha-se uma identificação por cultura. Por outro lado, os isolados O157 que perderam a capacidade de formação de shigatoxinas (perda de fagos), são muito 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* 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)