

RIDA[®] Anreicherungsbouillon

mTSB zur Anreicherung von Shigatoxin-bildenden
E. coli Bakterien

Art. No.: Z1000

Art. No.: Z1003



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. Die RIDA[®] Anreicherungsbouillon dient der Anreicherung von Shigatoxin-bildenden *E. coli* Bakterien aus Stuhlproben.

2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Unter den verschiedenen humanpathogenen Varianten des Darmbakteriums *Escherichia coli* zeichnen sich die EHEC-Bakterien unter anderem durch die grundsätzliche Bildung von sogenannten Shigatoxinen oder Verotoxinen aus. Beide synonym verwendeten Namen beruhen einerseits auf ihrer hohen Homologie zu Shigellentoxin (auch der Begriff Shiga-Like-Toxin ist gebräuchlich) und andererseits auf ihrer Toxizität gegenüber Verozellen.

Als EHEC werden nun solche STEC / VTEC (shigatoxinbildende *E. coli* / verotoxinbildende *E. coli*) bezeichnet, die beim Menschen Krankheitserscheinungen auslösen und somit Pathovaren für den Menschen darstellen.

Aufgrund der Antigenstruktur werden diese wiederum verschiedenen Serovaren zugeordnet. Einige wenige Serovare werden bei Erkrankten häufiger gefunden als andere. Auch besitzen nicht alle die gleiche Ausstattung an Virulenzmarkern, von denen neben den beiden Shigatoxinen Stx 1 und Stx 2 vor allem das Intimin und das Enterohämolysin zu nennen sind.

Die Information für die Shigatoxinbildung befindet sich auf einem Bakteriophagen, der im Bakterienchromosom integriert ist. Die Bildung von Shigatoxin ist unterschiedlich stark bei den verschiedenen STEC-Stämmen, so dass ein Screening auf das Vorhandensein dieser Toxine direkt aus der Stuhlprobe von an EHEC erkrankten Patienten nicht empfohlen werden kann. Es müssen im ersten Schritt aus einer Patientenstuhlprobe die Erreger durch Anzucht in einem geeigneten Medium angereichert werden. Geeignet sind solche Medien, die neben Selektivitätsfaktoren für *Escherichia coli* auch besonders das vorhandene Potential zur Shigatoxinbildung aktivieren. Das Verhältnis von EHEC-Keimen zur physiologischen, kommensalen *E. coli* Darmflora liegt bei etwa 1 : 200. Insofern ist eine effektive Anreicherung mit Induktion der Shigatoxinbildung die Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Screening im ELISA.

Die vorliegende Anreicherungsbouillon trägt diesen Erfordernissen Rechnung.

3. Testprinzip

Die RIDA[®] Anreicherungsbouillon fördert selektiv *E. coli* – Keime durch ihren Anteil an Gallensalzen und unterdrückt gram-positive Keime im Wachstum. Der Zusatz von Mitomycin C fördert insbesondere durch Induktion des lambdoiden Prophagen auf dem Bakterienchromosom die Shigatoxinbildung und durch Zellyse deren Freisetzung, so dass auch bei schwachen Toxinbildnern im anschließenden Screening ELISA aus dem Überstand der Anreicherungskultur die Toxine sicher nachgewiesen werden können. Dies ist insbesondere wichtig bei HUS-Patienten, wo häufig nur noch sehr wenig EHEC - Keime im Stuhl zu finden sind.

4. Packungsinhalt

Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 (Z1000) oder 25 (Z1003) Bestimmungen.

| | | |
|------|----------|--|
| Tube | 100 (25) | Röhrchen mit je 4 ml Anreicherungsbouillon; enthält mTSB und Mitomycin C |
|------|----------|--|

5. Reagenzien und ihre Lagerung

Die Röhrchen mit der Anreicherungsbouillon sind bei 2 – 8 °C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten aufgedruckten Verfallsdatum verwendungsfähig. Mikrobielle Kontamination ist zu vermeiden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.

Eine sichtbare Trübung der klaren hellgelben Anreicherungsbouillon ist Hinweis auf eine mikrobielle Kontamination. Solche Röhrchen sollten nicht mehr verwendet werden und sind gemäß 10.2. zu entsorgen.

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien - erforderliches Zubehör

6.1. Reagenzien

- PBS-Puffer oder physiologische Kochsalzlösung (optional)
- Entsorgungslösung (Pkt. 10.1.)

6.2. Zubehör

- Einwegpipetten (Art. Nr.: Z 0001)
- Mikropipette für 100 µl – Volumina
- Dünne Wattetupfer
- Horizontalschüttler oder Rotationsmischer mit Aufnahmerack für Röhrchen der Größe 16,5 x 105 mm
- 37 °C Inkubator

7. Vorsichtsmaßnahmen

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.

Das Anreicherungsmedium enthält Mitomycin C. Kontakt mit Haut und Schleimhäuten ist unbedingt zu vermeiden. Sollte dennoch Kontakt erfolgen, ist mit reichlich Wasser zu spülen und kontaminierte Kleidung muss gewechselt werden.

Materialien (Pipettenspitzen, Tupfer), die mit der Anreicherungsbouillon in Berührung kommen, sind wie diese zu entsorgen (Pkt. 10.3.). Die Entsorgung der Anreicherungsbouillon (Pkt. 10.2.) ist zu beachten.

8. Sammlung und Lagerung der Proben

Die auf Shiga- bzw. Verotoxin 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.

9. Testdurchführung

Für eine erfolgreiche Anreicherung ist die nachfolgend beschriebene Vorgehensweise und die dort angegebenen Pipettiervolumina möglichst exakt einzuhalten. Sie entsprechen dem heutigen Stand der Kenntnis und sind in enger Zusammenarbeit mit den entsprechenden Referenzstellen des RKI (Robert-Koch-Institut) und BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) abgestimmt.

Es sollten nur frische oder maximal 3 Tage bei 2 - 8 °C gelagerte Stuhlproben zum Einsatz kommen.

9.1. Flüssige oder wässrige Stuhlprobe

100 µl (bei Verwendung von Einwegpipetten Art.-Nr. Z 0001 entspricht dies der Menge bis kurz oberhalb der zweiten Verdickung) oder ein dünner mit der Probe getränkter Tupfer wird in 4 ml RIDA[®] Anreicherungsbouillon überführt und durch ausreichendes Schütteln resuspendiert.

9.2. Feste Stuhlprobe

50 - 100 mg werden mit einem Spatel oder einer Einwegimpföse entnommen und in 4 ml RIDA[®] Anreicherungsbouillon suspendiert. Alternativ kann auch mit einem dünnen Tupfer durch Abstreichen (vorzugsweise an verschiedenen Stellen der Stuhlprobe) eine äquivalente Menge entnommen werden und durch kräftiges Ausschütteln in 4 ml RIDA[®] Anreicherungsbouillon resuspendiert werden.

Ebenso eignet sich eine zuvor in PBS (50 - 100 mg in 1 ml Puffer) hergestellte Stuhlsuspension, von der dann 500 µl in 4 ml RIDA[®] Anreicherungsbouillon überimpft werden.

9.3. Anreicherung

Die nach 9.1. oder 9.2. angeimpfte Anreicherungsbouillon wird für 18 - 24 h bei 37 °C unter Schütteln (120 - 160 rpm) und ausreichender Sauerstoffzufuhr (halbe Drehung des Drehverschlusses) in Schräglage inkubiert. Es ist darauf zu achten, dass keine Flüssigkeit ausläuft. Zum Schütteln eignen sich Horizontalschüttler und Rotationsmischer gleichermaßen.

Nach maximal 24 h wird die Anreicherungsbouillon bei 2500 g für 5 min zentrifugiert. Vom Überstand werden 100 µl unverdünnt im RIDASCREEN[®] Verotoxin ELISA eingesetzt.

Achtung:

Sollte sich auf der Anreicherungsbouillon eine Kahmhaut gebildet haben, so sollte diese sorgfältig beseitigt werden, damit sie nicht mit in die Mikrotiterplatte übertragen wird. Diese Kahmhaut kann Ursache für falsch positive Ergebnisse sein aufgrund ihrer hohen Klebrigkeit in den Kavitäten der Mikrotiterplatte.

Soll nach einem positiven ELISA-Ergebnis für eine Bestätigung durch ein autorisiertes Referenzlabor (PCR und Keimidentifizierung) Material verschickt werden, so empfiehlt sich folgende Vorgehensweise:

1. Dekantieren des restlichen Überstandes nach Zentrifugation aus dem Röhrchen
2. Entnahme des kompletten Pellets mit einem Tupfer
3. Einbringen des Tupfermaterials in ein geeignetes Transportmedium (Cary Blair, Stuart oder Amies)
4. Versand (optimal unter Kühlung) in das entsprechende Speziallabor für weitere Analysen

Achtung:

auch ein mit der Stuhlprobe beladener Tupfer kann in den oben genannten Transportmedien zur weiteren Analyse versendet werden.

10. Entsorgung Mitomycin C-haltiger Medien und Materialien

Da Mitomycin C als kanzerogen gilt, muss die Entsorgung der entsprechenden Mitomycin C-haltigen Nährmedien und der mit ihm in Kontakt gekommenen Materialien in Deutschland entsprechend der Gefahrstoffverordnung (Sondermüll) erfolgen, bzw. im Ausland nach den jeweiligen nationalen Richtlinien.

10.1. Entsorgungslösung

0,5 % Wofasteril[®] (oder 0,2 % Peressigsäure) in 5 % Essigsäure

d.h. 50 ml Essigsäure

+ 5 ml Wofasteril[®] (oder 2 ml Peressigsäure)

auf 1 l Aqua dest.

Lagerung bei 2 – 8 °C

Hinweis:

Wofasteril[®] ist erhältlich bei Kesla Hygiene AG, D-06803 Greppin

Tel.: +49 (0) 3494 69950 ; www.kesla.de/hygiene

10.2. Entsorgung von Anreicherungsbouillon

Gleiches Volumen der Entsorgungslösung in die Anreicherungskultur zugeben (d.h. 4 ml Kultur + 4 ml Entsorgungslösung), über Nacht bei Raumtemperatur einwirken lassen und dann für mindestens eine Stunde bei 121 °C autoklavieren.

10.3. Entsorgung von Material

Pipettenspitzen und Tupfer können zusammen mit der unter Pkt. 10.2. zu entsorgenden Anreicherungsbouillon entsorgt werden.

11. Klinische Ergebnisse

In einer vom BGVV durchgeführten Validierung von Anreicherungsmedien erwies sich die RIDA® Anreicherungsbouillon mit Mitomycin-Zusatz deutlich überlegen gegenüber Medien, die kein Mitomycin enthielten, egal ob diese Medien nur mit Antibiotika (Novobiocin, Cefsoludin), nur mit Gallelsalzen oder mit beidem supplementiert waren.

Bei klinischen Stuhlproben von HUS-Patienten erbrachte der Mitomycin-Zusatz eine Steigerung von durchschnittlich 37,5 %.

Bei mit Stammisolaten (bekannte Shigatoxin-Produzenten) künstlich angeimpften Stuhlproben erbrachte der Mitomycin-Zusatz eine Steigerung des Shigatoxin-Nachweises zwischen 40 % und 50 % gegenüber Anreicherungsmedien ohne Mitomycin.

Die in der Anreicherungsbouillon eingesetzte Konzentration an Mitomycin erwies sich in einer kürzlich durchgeführten Mutagenitätsstudie (nicht veröffentlicht) als sehr geringgradig mutagen, so dass sein Einsatz zur Erzielung einer sensitiven Shigatoxin-Diagnostik gerechtfertigt ist. Derzeit sind keine besseren und gleichzeitig harmloseren Induktoren für die Shigatoxin-Freisetzung bekannt.