

# RIDA<sup>®</sup> Anreicherungsbouillon

mTSB pour enrichir les bactéries E. coli  
formant des shigatoxines

N° art.: Z1000

N° art.: 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. Domaine d'utilisation

Pour le diagnostic *in vitro*. Le RIDA® Anreicherungsbouillon sert à l'enrichissement des bactéries *E. coli* formant des Shigatoxines provenant d'échantillons de selles.

## 2. Résumé et explication du test

Parmi les différentes variantes pathogènes pour l'humain de la bactérie intestinale *Escherichia coli*, les bactéries EHEC se caractérisent entre autres par la formation fondamentale des Shigatoxines ou des vérotoxines. Les deux noms utilisés de manière synonyme proviennent d'un côté de leur homologie élevée avec la toxine *Shigella* (on utilise aussi le terme de toxine Shiga-like) et d'un autre côté de leur toxicité vis-à-vis des cellules vero. EHEC désigne de telles bactéries STEC / VTEC (*E. coli* formant des toxines Shiga / des vérotoxines) qui déclenchent chez l'homme des infections et qui représentent ainsi pour l'homme des pathovars. En raison de la structure des antigènes, ceux-ci sont affectés à différents sérovars. Un petit nombre de sérovars est plus souvent trouvé chez les personnes malades que d'autres. Tous ne possèdent pas la même structure au niveau des marqueurs de virulence ; outre les toxines Shiga Stx 1 et Stx 2, on peut surtout nommer l'intimine et l'entéro-hémolysine. L'information pour la formation de toxine Shiga se trouve sur un phage bactérien qui est intégré au chromosome de la bactérie. La formation de toxine Shiga n'est pas identique en fonction des différentes souches STEC ; ainsi, un dépistage de la présence de cette toxine directement dans l'échantillon de selles de patients atteints d'EHEC ne peut pas être recommandé. Au cours d'une première étape, il convient d'enrichir les agents pathogènes en les cultivant dans une solution adéquate. Les solutions qui activent en particulier le potentiel existant de formation de toxine Shiga en plus des facteurs de sélectivité pour l'*Escherichia coli* sont appropriés. Le rapport des germes EHEC et de la flore intestinale *E. coli* commensale, physiologique est d'env. 1 : 200. C'est pourquoi, un enrichissement effectif avec induction de la formation de toxine Shiga est la condition de base pour un dépistage réussi dans l'ELISA. Le présent bouillon d'enrichissement satisfait à ces exigences.

## 3. Principe du test

Le RIDA® Anreicherungsbouillon favorise de manière sélective les germes *E. coli* grâce à leur pourcentage de sels biliaires et supprime les germes gram positifs au cours de la croissance. L'addition de Mitomycine C favorise en particulier à travers l'induction du prophage lambdaïde sur le chromosome de la bactérie la formation de toxines Shiga et favorise à travers la lyse cellulaire leur élimination. Il est ainsi possible au cours du dépistage ELISA suivant à partir du liquide clair formé sur le dessus de la culture d'enrichissement de caractériser les toxines de manière sûre même en cas de créateurs faibles de toxines. Ceci est très important pour les patients HUS, chez lesquels il est souvent possible de ne trouver qu'une petite quantité de germes EHEC.

#### 4. Contenu de l'emballage

Les réactifs d'un emballage suffisent à 100 déterminations.

Tube	100 (25)	Tube avec 4 ml de Anreicherungsbouillon; contient du mTSB et de la mitomycine C
------	----------	---

#### 5. Les réactifs et leur stockage

Les tubes avec le bouillon d'enrichissement doivent être entreposés à 2 – 8 °C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Il faut éviter toute contamination microbienne. Lorsque la date de péremption est atteinte, aucune garantie de qualité ne peut plus être acceptée. Si le bouillon d'enrichissement clair d'un jaune transparent est visiblement troublé, cela indique une contamination microbienne. De tels tubes ne doivent plus être utilisés et doivent être utilisés en fonction du point 10.2.

#### 6. Réactifs supplémentaires nécessaires – Accessoires requis

##### 6.1. Réactifs

- Tampon PBS ou solution de chlorure de sodium physiologique (en option)
- Solution d'élimination (point 10.1.)

##### 6.2. Accessoires

- Pipettes à usage unique (n° art. : Z 0001)
- Micropipette pour volume 100 µl
- Tampon de coton fin
- Agitateur horizontal ou mélangeur par rotation avec portoirs de tubes 16,5 x 105 mm
- Incubateur à 37 °C

#### 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.

La solution d'enrichissement contient de la mitomycine C. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. Si un contact a lieu, rincer abondamment à l'eau et changer les vêtements contaminés.

Les matériaux (pointes de pipettes, tampons) qui entrent en contact avec le bouillon d'enrichissement doivent être éliminés comme le bouillon (point 10.3). Il convient de respecter l'élimination du bouillon d'enrichissement (point 10.2).

#### 8. Accumulation et stockage des échantillons

Les échantillons de selles devant être contrôlés pour détecter des toxines Shiga ou des Véro-

toxines peuvent être entreposés avant d'être utilisés dans le bouillon d'enrichissement – pour autant 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.

## 9. Réalisation du test

Pour réussir un enrichissement, il convient de suivre le plus exactement possible la procédure décrite ci-dessous et de respecter les volumes de pipetage indiqués. Cette procédure correspond aux connaissances actuelles et a été définie en collaboration étroite avec les références correspondantes du RKI (institut Robert Koch) et du BfR (institut fédéral d'analyse des risques). Seuls des échantillons de selle frais ou entreposés au maximum pendant 3 jours à 2 - 8 °C peuvent être utilisés.

### 9.1. Echantillon liquide ou aqueux

100 µl (en utilisant des pipettes à usage unique n° art. Z0001, cela correspond à la quantité allant jusqu'au-dessus du deuxième gonflement) ou un tampon fin imbibé de l'échantillon sont mis dans 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon puis sont mis en suspension via une agitation suffisante.

### 9.2. Echantillon de selles solides

50 - 100 mg sont prélevés avec une spatule ou un oeillet d'inoculation à usage unique et sont mis en suspension dans 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon. Il est aussi possible de racler avec un petit tampon fin (de préférence à différents endroits de l'échantillon de selles) une quantité équivalente et de la mettre de nouveau en suspension dans 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon via une agitation importante. De même, on peut également utiliser une suspension de selles préparée au préalable dans du PBS (50 - 100 mg dans 1 ml de tampon), dont 500 µl sont de nouveau vaccinés dans 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon.

### 9.3. Enrichissement

Le RIDA® Anreicherungsbouillon vacciné selon 9.1. ou 9.2. est mis à incuber pendant 18 – 24 h à 37 °C en étant agité (120 - 160 tpm) et avec un apport suffisant d'oxygène (un demi-tour du verrouillage par rotation). Il faut veiller à ce que le liquide ne s'échappe pas. Des agitateurs horizontaux ou des mélangeurs à rotation sont indiqués pour effectuer l'agitation. Au bout de 24 heures au maximum, le bouillon d'enrichissement est centrifugé à 2500 g pendant 5 min. 100 µl non dilués du liquide clair formé sur le dessus sont utilisés dans le test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA.

#### **Attention:**

**Si un voile de moisissures s'est formé sur le bouillon d'enrichissement, celui-ci doit être**

**éliminé avec précaution pour ne pas être transmis dans la plaque de microtitration. Ce voile de moisissures peut être la cause de résultats faussement positifs en raison de son adhérence importante dans les cavités de la plaque de microtitration.**

Si, suite à un résultat ELISA positif, du matériel doit être envoyé pour une confirmation par un laboratoire de référence autorisé (PCR et identification des germes), il est recommandé de suivre la procédure suivante :

1. Décantation du liquide clair du dessus restant dans le tube après la centrifugation
2. Enlèvement du pellet complet avec un tampon
3. Placement du tampon dans une solution de transport adéquate (Cary Blair, Stuart ou Amies)
4. Envoi (de manière optimale en étant réfrigéré) au laboratoire spécialisé correspondant pour d'autres analyses

**Attention:**

**un tampon chargé directement de l'échantillon de selles peut également être envoyé pour une analyse complémentaire dans les solutions de transport mentionnées ci-dessus.**

## **10. Elimination des solutions et matériaux contenant de la mitomycine C**

Puisque la mitomycine C est considérée comme cancérigène, l'élimination des substances nutritives contenant de la mitomycine C correspondantes et des matériaux entrés en contact avec cette substance doit être effectuée en Allemagne en fonction de la directive sur les substances dangereuses (déchets spéciaux) et dans les autres pays en fonction des directives nationales correspondantes.

### 10.1. Solution d'élimination

0,5 % de Wofasteril® (ou 0,2 % d'acide péracétique) dans 5 % d'acide acétique

donc : 50 ml d'acide acétique  
+ 5 ml de Wofasteril® (ou 2 ml ,acide péracétique)  
sur 1 l d'eau dist.  
Stockage à 2 - 8 °C

**Remarque:**

Le Wofasteril® peut être obtenu chez Kesla Hygiene AG, D-06803 Greppin, Allemagne  
Tél.: +49 (0) 3494 69950 ; [www.kesla.de/hygiene](http://www.kesla.de/hygiene)

### 10.2. Elimination du bouillon d'enrichissement

Verser le même volume de la solution d'élimination dans la culture d'enrichissement (donc 4 ml de culture + 4 ml de la solution d'élimination), laisser agir pendant la nuit à température ambiante et passer à l'autoclave pendant une heure au minimum à 121 °C.

### 10.3. Elimination du matériel

Les pointes de pipettes et les tampons peuvent être éliminés avec le bouillon d'enrichissement à éliminer sous le point 10.2.

## 11. Résultats cliniques

Une validation effectuée par le BGVV des solutions d'enrichissement a montré la nette supériorité du RIDA<sup>®</sup> Anreicherungsbouillon avec une addition de mitomycine vis-à-vis des autres solutions qui ne contiennent aucune mitomycine, peu importe que ces solutions soient supplémentées uniquement avec des antibiotiques (Novobiocine, Cefsulodine) ou uniquement avec des sels biliaries ou avec les deux. Sur les échantillons de selles cliniques des patients HUS, l'addition de mitomycine a amené une augmentation d'environ 37,5 %. Sur les échantillons de selles vaccinés artificiellement avec des éléments isolés souches (producteurs connus de toxines Shiga), l'addition de mitomycine a amené une augmentation de la caractérisation de toxines Shiga de 40 à 50 % vis-à-vis des solutions d'enrichissement sans mitomycine. La concentration en mitomycine utilisée dans le bouillon d'enrichissement s'est révélée très faiblement mutagène au cours d'une étude de mutagénicité effectuée récemment (non publiée) ; ce qui justifie son utilisation pour obtenir un diagnostic sensible de toxines Shiga. Actuellement, on ne connaît pas de meilleur inducteur moins inoffensif pour la libération de toxines Shiga.