

RIDA[®] Anreicherungsbouillon

mTSB para o enriquecimento de bactérias E. coli
formadoras de Shigatoxin

N.º do art.: Z1000

N.º do 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. Finalidade

Para diagnóstico *in vitro*. O RIDA[®] Anreicherungsbouillon serve para o enriquecimento de bactérias *E.coli* formadoras de Shigatoxin das amostras de fezes.

2. Resumo e explicação do teste

Entre as diferentes variantes humano-patogênicas da bactéria do intestino *Escherichia coli*, as bactérias EHEC se caracterizam, entre outros fatores, pela formação básica das chamadas shigatoxinas ou verotoxinas. Ambos os nomes utilizados como sinônimos se relacionam, por um lado, à sua alta homologia à toxina shigella (o termo Shiga-Like-Toxin é comum) e, por outro lado, à sua toxicidade contra células vero. Como EHEC são designadas aquelas STEC / VTEC (*E.coli* formadora da shigatoxina/ *E.coli* formadora de verotoxina) que provocam doenças nos humanos e que apresentam um patovar para os humanos. Devido à estrutura do antígeno, elas são relacionadas, por sua vez, a vários servovares. Alguns poucos servovares foram encontrados nos doentes com mais frequência do que os outros. E nem todos possuem a mesma composição de marcas de virulência, das quais deve-se nominar, além de ambas a shigatoxinas Stx 1 e Stx 2, principalmente a intimina e a enterohemolisina. A informação para a formação da shigatoxina encontra-se em um bacteriófago, que está integrado no cromossomo da bactéria. A formação de shigatoxina tem uma intensidade diversa nos diferentes grupos STEC, de modo que uma seleção da existência desta toxina diretamente nas amostras de fezes de um paciente com EHEC não pode ser recomendada. Como um primeiro passo, deve-se enriquecer o agente patogênico da amostra através da cultura em um meio adequado. São considerados adequados os meios que, além dos fatores de seletividade para *Escherichia coli*, ativam também o potencial presente da formação da shigatoxina. O comportamento dos germes EHEC em relação à flora intestinal fisiológica, comensal *E. coli* é de aprox. 1 : 200. Deste modo, um enriquecimento efetivo com indução da formação da shigatoxina é a condição básica para uma seleção bem sucedida no ELISA. O presente caldo de enriquecimento preenche esta condição.

3. Princípio do teste

O RIDA[®] Anreicherungsbouillon propicia seletivamente os germes *E. coli* através da sua participação nos sais da gale e diminui o crescimento dos germes gram-positivos. A adição de mitomicina C propicia a formação de shigatoxina, principalmente através da indução dos profagos lambdoides no cromossomo da bactéria e através da celise, a sua liberação, de modo que mesmo em caso de fraca formação de toxina com posterior seleção ELISA, podese detectar seguramente a toxina do supernatante da cultura de enriquecimento.

Isto é especialmente importante em pacientes com HUS, para os quais apenas muitos poucos germes EHEC são encontrados nas fezes.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 100 doses.

Tube	100(25)	Tubos com respectivamente 4 ml de caldo de enriquecimento; contém mTSB e mitomicina C
-------------	---------	---

5. Reagentes e a sua armazenagem

Os tubos com o caldo de enriquecimento devem ser armazenados a 2 – 8 °C e utilizados até a data de validade impressa na etiqueta. Deve-se evitar a contaminação microbiana. Após a expiração da data de validade, nenhuma garantia de qualidade pode ser oferecida. Uma coloração visivelmente escurecida do caldo de enriquecimento claro amarelado é uma indicação de uma contaminação microbiana. Estes tubos não devem mais ser usados e devem ser eliminados de acordo com o ponto 10.2.

6. Reagentes e equipamentos adicionais necessários

6.1. Reagentes

- Tampão PBS ou solução fisiológica de sal de cozinha (opcional)
- Solução de eliminação (ponto 10.1.)

6.2. Equipamento

- Pipetas descartáveis (nº. do art.: Z 0001)
- Micropipeta para 100 µl – volumes
- Chumaço fino de algodão
- Agitador horizontal ou misturador de rotação com barra de suporte para os tubos de dimensão de 16,5 x 105 mm
- Incubador a 37 °C

7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este teste só deve ser efetuado pelo pessoal de laboratório instruído. As regras de trabalho nos laboratórios médicos devem ser observadas. As instruções de uso para a execução do teste devem ser estritamente observadas.

O meio de enriquecimento contém mitomicina C. O contato com a pele e as mucosas devem ser completamente evitados. Se, porém, ocorrer o contato, deve-se lavar a área com água corrente e as roupas contaminadas devem ser trocadas.

Materiais (pontas de pipetas, chumaço de algodão), que entram em contato com o caldo de enriquecimento, devem ser eliminados igualmente (ponto 10.3.). A eliminação do caldo de enriquecimento (ponto 10.2.) deve ser observada.

8. Coleta e armazenagem das amostras

As amostras de fezes a serem examinadas pela presença de shigatoxina ou verotoxina podem, antes da utilização no caldo de enriquecimento, se não forem utilizadas frescas, ser armazenadas de 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 podem se multiplicar de forma ideal na cultura de enriquecimento.

9. Execução do teste

Para um enriquecimento bem sucedido, o procedimento descrito a seguir e os volumes indicados de pipetagem devem ser estritamente respeitados. Eles representam o estado atual do conhecimento e foram determinados em cooperação com os pontos de referência do RKI (Robert-Koch-Institut) e BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Só podem ser utilizadas amostras de fezes frescas ou armazenadas por um máximo de 3 dias a 2 - 8 °C.

9.1. Amostras de fezes líquidas ou aguadas

É inserido 100 µl (no caso de utilização de pipetas descartáveis, nº de art. Z 0001, esta quantidade corresponde até um pouco acima da segunda espessura) ou um chumaço de algodão molhado com a amostra em 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon e suspenso novamente com uma agitação suficiente.

9.2. Amostra de fezes sólidas

50 - 100 mg são retiradas com uma espátula ou uma agulha metálica descartável e suspensas em 4 ml do RIDA® Anreicherungsbouillon. Alternativamente, pode ser retirada uma quantidade equivalente passando um chumaço de algodão fino (preferivelmente em pontos diferentes da amostra de fezes) e suspensa novamente através de forte agitação em 4 ml do RIDA® Anreicherungsbouillon. Do mesmo modo, uma suspensão de fezes preparada anteriormente em PBS (50 - 100 mg em 1 ml de tampão) é também adequada, da qual então 500 µl são inseridos em 4 ml do RIDA® Anreicherungsbouillon.

9.3. Enriquecimento

O caldo de enriquecimento utilizado de acordo com os pontos 9.1. ou 9.2. é incubado por 18 - 24 horas a 37°C sob agitação (120 - 160 rpm) e alimentação de oxigênio (meio giro do fecho giratório) em posição inclinada. Nenhum líquido pode vazar. Para a agitação, são adequados o agitador horizontal e o misturador de rotação. Após um máximo de 24 horas, o caldo de enriquecimento é centrifugado a 2500 g por 5 min. Do supernatante, 100 µl não diluídos são utilizados no RIDASCREEN® Verotoxin ELISA.

Atenção:

Se uma película se formar sobre o caldo de enriquecimento, esta deve ser retirada cuidadosamente, para que não possa também ser transferida para a microplaca. Esta película pode ser a causa para falsos resultados positivos devido à sua alta adesividade às cavidades da microplaca.

Se, após um resultado ELISA positivo o material for enviado para uma confirmação a um laboratório de referência autorizado (PCR e identificação de germe), recomenda-se os seguintes procedimentos:

1. Decantamento do supernatante restante após a centrifugação dos tubos
2. Retirada da película completa com um chumaço
3. Colocação do material em um meio de transporte adequado (Cary Blair, Stuart ou Amies)
4. Envio (idealmente sob refrigeração) ao respectivo laboratório especializado para outras análises

Atenção:

um chumaço de algodão molhado com a amostra pode ser enviado nos meios de transporte acima mencionados para outras análises.

10. Eliminação de materiais e meios que contêm mitomicina C

Visto que a mitomicina C é considerada como cancerígena, a eliminação dos meios e materiais que contêm mitomicina C e dos materiais que entraram em contato com tal substância deve ser feita na Alemanha de acordo com as prescrições para as substâncias perigosas (lixo especial) ou, no exterior, de acordo com as respectivas leis nacionais.

10.1. Solução de eliminação

0,5 % Wofasteril® (ou 0,2 % ácido peracético) em 5 % ácido acético
ou seja, 50 ml de ácido acético
+ 5 ml Wofasteril® (ou 2 ml de ácido peracético)
em 1 l de água dest.
Armazenagem a 2 – 8 °C

Indicação:

Wofasteril® pode ser obtido com Kesla Hygiene AG, D-06803 Greppin
Tel.: +49 (0) 3494 69950 ; www.kesla.de/hygiene

10.2. Eliminação do caldo de enriquecimento

Adicionar o mesmo volume da solução de eliminação na cultura de enriquecimento (ou seja, 4 ml de cultura + 4 ml de solução de eliminação), deixar agir durante a noite a temperatura ambiente e então autoclavar por pelo menos 1 hora a 121 °C.

10.3. Eliminação do material

As pontas das pipetas e o chumaço podem ser eliminados juntamente com o caldo de enriquecimento descrito o ponto 10.2.

11. Resultados clínicos

Em uma validação dos meios de enriquecimento feita pelo BGVV, o RIDA[®] Anreicherungsbouillon com aditivo de mitomicina ficou bem acima dos meios que não contêm mitomicina, independente se estes meios foram suplementados somente com antibióticos (Novobiocin, Cefsoludin), somente com sais de gale ou com ambos. Nas amostras de fezes clínicas de pacientes com HUS, o aditivo de mitomicina provocou um aumento médio de 37,5 %. No caso de amostras de fezes suplementadas artificialmente com isolados (conhecidos produtores de shigatoxina), o aditivo de mitomicina provocou um aumento da detecção de shigatoxina entre 40 % e 50 % em comparação com os meios de enriquecimento sem mitomicina. A concentração de mitomicina utilizada no caldo e enriquecimento foi considerada em um estudo de mutagenidade (não publicado) como mutagene de baixo grau, de modo que a sua utilização para a obtenção de um diagnóstico sensível de shigatoxina é justificada. Atualmente não se conhece um melhor e, ao mesmo tempo, inócuo, indutor para a liberação da shigatoxina.