

RIDA[®] QUICK Verotoxin / O157 Combi

Art. No.: 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. Campo di applicazione

Per diagnostica *in vitro*. Il RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi è un test rapido immunocromatografico per la rilevazione qualitativa di verotossine (sin. Tossine di shiga) e/o del sierotipo E.coli O157 da una concentrazione fecale in brodo mTSB.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le tossine di shiga (Stx) rappresentano i fattori virulenti principali dell'*Escherichia coli* enteroemorragico (EHEC). I sintomi causati sono diarrea e sindrome uremica emolitica (HUS) letale, una delle principali cause di insufficienza renale acuta in età pediatrica. Il gruppo sierologico O157 è coinvolto in tutte le infezioni EHEC in misura pari al 70-90 % ca. La rilevazione rapida di questo agente patogeno è obbligatoria per la scelta di una terapia adeguata. Il RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi Test rileva contemporaneamente sia le tossine di shiga sia il gruppo sierologico O157 dal supernatante di una concentrazione fecale in brodo contenente mTSB nell'arco di un solo giorno.

3. Principio del test

Il presente test rapido è un test Lateral-Flow immunocromatografico monofase, nel quale anticorpi specifici mirati contro entrambi i rispettivi antigeni sono accoppiati a particelle di lattice rosse (specifici per la tossina di shiga) o verdi (specifici anti O157). Altri anticorpi specifici contro entrambi gli antigeni patogeni sono saldamente fissati alla membrana. Nella prima fase, il campione di feci da esaminare viene arricchito in un brodo di arricchimento (mTSB + mitomicina C) per ca. 18-24 h a 37°C per la micropropagazione dell'agente patogeno e della formazione di tossine di shiga. Dopo la centrifuga del brodo, con una aliquota di supernatante, si ottiene una diluizione 1:2 con il tampone campione specifico per il test nel quale viene impiegata. Con l'aggiunta della diluizione dei campioni ottenuta nella apertura di inserimento rotonda della cassetta per test gli anticorpi specifici, accoppiati a particelle di lattice colorate, si legano agli antigeni presenti nel campione e scorrono attraverso la membrana per poi legarsi alle bande di raccolta specifiche. A seconda dell'antigene presente nel campione sarà visibile una banda verde e/o rossa. Inoltre deve sempre apparire la banda di controllo blu a conferma della validità del risultato del test.

4. Contenuto della confezione

I reagenti di una confezione bastano per 20 determinazioni

Cassette	20 Det.	20 cassette per test confezionate singolarmente
Diluent	18 ml	Tampone di estrazione, pronto per l'uso; contiene 0,1 % di azoturo di sodio
Pipette	25 Pezzi	Busta con 25 pipette monocanale

5. Reagenti e relativa conservazione

La confezione può essere conservata a 2 – 30 °C ed è utilizzabile fino alla data di scadenza stampata. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. Analogamente, la funzionalità delle cassette non può essere garantita, se l'imballaggio delle singole cassette è danneggiato.

6. Reagenti aggiuntivi necessari - accessori richiesti

- Anse di inoculazione per sospensione fecale
- Miscelatore vortex (opzionale)
- Micropipetta (200 µl -1000 µl)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito di sodio allo 0,5%
- Brodo di arricchimento (mTSB + mitomicina C ; ad es. RIDA® Anreicherungsbouillon : Z 1003
- Centrifuga

7. Precauzioni

Solo per diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere condotto esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le disposizioni per il lavoro nei laboratori medici. Attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso nell'esecuzione del test.

Il tampone di diluizione dei campioni contiene azoturo di sodio come conservante. Evitare il contatto con la pelle o con le mucose.

Non introdurre con la bocca campioni o reagenti mediante pipetta, evitare il contatto con la cute lesa o con le mucose. Durante la manipolazione dei campioni indossare guanti monouso e lavare le mani dopo aver eseguito il test. Non fumare, mangiare o bere negli ambienti in cui si opera con i campioni.

Tutti i reagenti e materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati, esattamente come i campioni, prima dello smaltimento, con adeguato disinfettante (ad es. ipoclorito di sodio) o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 °C.

8. Raccolta e deposito dei campioni

I campioni di feci da esaminare per tossina di shiga o E.coli O157 possono essere conservati, prima dell'impiego, nel brodo di arricchimento, se non devono essere impiegati freschi, come di seguito riportato:

- fino a 24 ore a temperatura ambiente o a 2 – 8 °C
- fino a 72 ore a 2 – 8 °C

Si sconsiglia il congelamento dei campioni, in quanto i batteri EHEC ne risulterebbero compromessi e di conseguenza non sarebbero più in grado di riprodursi adeguatamente o non

si riprodurrebbero affatto nella coltura di arricchimento.

I campioni di feci devono essere raccolti in contenitori puliti senza alcuna aggiunta e devono essere conservati prima dell'inizio del test a 2 – 8 °C.

Nell'inserimento dei prelievi rettali, assicurarsi che sia presente una quantità sufficiente di materiale fecale (ca. 100 mg) per l'esecuzione del test.

Nelle indagini ambientali devono essere prelevati anche campioni di feci di persone di contatto ininfluenti dal punto di vista clinico, al fine di identificare portatori asintomatici.

9. Esecuzione del test

9.1. Generalità

Prima dell'utilizzo portare campioni, tampone di estrazione e cassette per test a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Le cassette per test devono essere rimosse dall'imballaggio con apertura a strappo solo poco prima dell'utilizzo. La cassette usate non possono essere riutilizzate. Evitare l'esposizione diretta all'irradiazione solare durante l'esecuzione del test.

9.2. Preparazione dei campioni

Trasferire inizialmente 100 µl di campione di feci liquide o un quantitativo equivalente (50 – 100 mg) di feci solide in 4 ml di mTSB con mitomicina C (ad es. RIDA[®] Anreicherungsbouillon, Art. Nr. Z 1003) e incubare con agitazione (ca. 120 - 160 rpm) e con sufficiente apporto di ossigeno a 37 °C per 18 fino a massimo 24 ore. Per l'agitazione sono adeguati uno scuotitore orizzontale o un mixer a rotazione. Dopo l'incubazione centrifugare l'intero campione a 2500 g per 5 min. Dal supernatante chiaro si ottiene una diluizione 1:2 con il tampone di estrazione specifico da trasferire in una provetta pulita o pozzetto per microtitolazione non rivestito.

9.3. Esame dei campioni

Riporre la cassetta per test rimossa dall'imballaggio su superficie piana. Introdurre nell'apertura di inserimento rotonda della cassetta **Casette** per test 200 µl di sospensione di campione mediante micropipetta o 4 gocce mediante la pipetta **Pipet** monocanale Pipet. Assicurarsi che il liquido fluisca liberamente attraverso la membrana. Rimuovere precedentemente eventuali particelle introdotte mediante pipetta che potrebbero ostacolare tale flusso. Il risultato del test può essere letto dopo **15 minuti**.

10. Controllo della qualità - Segni di scadenza dei reagenti

Il test deve essere valutato, solo quando la cassetta per test **prima** della introduzione mediante pipetta della sospensione di campione è intatta e non sono presenti alcune variazioni o striature cromatiche sulla membrana. Inoltre **dopo** l'incubazione del test deve essere visibile almeno la banda di controllo blu. Qualora quest'ultima non appaia, prima di ripetere il test occorre verificare quanto segue:

- periodo di conservazione delle cassette per test e del tampone di estrazione utilizzato
- corretta esecuzione del test

- contaminazione del tampone di estrazione

Qualora dopo la ripetizione del test con una nuova cassetta per test la banda di controllo non sia nuovamente visibile, rivolgersi al produttore o al proprio distributore locale R-Biopharm.

11. Valutazione e interpretazione

Devono apparire un massimo di tre bande, viste nella seguente successione dal punto di prelievo del campione: Una banda verde (T_1 = banda per test 1), una rossa (T_2 = banda per test 2) e una blu (C = banda di controllo). **Se manca la banda di controllo blu, il test non è valutabile e non è valido!**

Sono possibili le seguenti interpretazioni:

- **O157 positivo** : le bande **verde** e **blu** sono visibili.
- **Tossina di shiga positivo**: le bande **rossa** e **blu** sono visibili.
- **positivo per O157 e tossina di shiga**: le bande **verde**, **rossa** e **blu** sono visibili.
- **Negativo**: è visibile solo la banda **blu**.
- **Non valido**: nessuna banda è visibile o è presente un'altra combinazione rispetto a quanto sopra descritto o un'altra colorazione delle bande. Analogamente, non hanno valore diagnostico e non sono da valutarsi cambiamenti di colore delle bande che compaiono dopo 15 minuti.

12. Limiti del metodo

Il RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi rileva antigene di O157 e/o tossina di shiga in campioni di feci arricchiti. Non è possibile dedurre una relazione tra l'intensità delle bande specifiche visibili e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. I risultati ottenuti devono essere sempre interpretati in relazione al quadro clinico.

Un risultato **positivo** non esclude la presenza di altri agenti patogeni infettivi.

Un risultato **negativo** non esclude una possibile infezione da EHEC o la presenza di ciguatoossina. Tale risultato può essere causato dalla quantità troppo scarsa di antigene nel campione. Qualora sussista a livello anamnestico il fondato sospetto di una infezione causata dagli agenti patogeni ricercati, occorre esaminare un ulteriore campione di feci del paziente.

13. Prestazioni opzionali

13.1. Qualità del test

Il test è stato convalidato nel laboratorio specializzato nella sindrome uremico-emolitica "Konsiliarlabor für HUS" dell'Istituto di Igiene dell'Università di Münster su un totale di 159 campioni. Tra i campioni testati vi erano 51 ceppi di riferimento EHEC, che rappresentano un ampio spettro di 38 sierotipi diversi. Erano rappresentati tutti i tipi di tossina di shiga patogeni per l'uomo, fino al sottotipo patogeno per gli animali Stx 2g. Inoltre sono stati esaminati 96 campioni di feci e 8 relativi isolati nonché 4 isolati di origine animale. I risultati sono stati confrontati con

metodi PCR specifici per Stx e O157 dell'Istituto. Per la verifica della produzione di Stx è stato inoltre impiegato un test di citotossicità con vero-cellule. I risultati sono riassunti nella Tabella 1.

Tab.1: Confronto del test rapido RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi con metodi PCR specifici per la rilevazione del gene codificante la Stx e del gene sfpA specifico del sierotipo 0157.

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

Sensibilità:	85,0 %	90,9 %
Specificità:	98,7 %	98,5 %
Valore predittivo pos.:	98,6 %	90,9 %
Valore predittivo neg.:	86,7 %	98,5 %
Precisione:	91,8 %	97,5 %

13.2. Sensibilità analitica

Per la determinazione del limite di rilevazione di entrambe le tossine di shiga, queste ultime sono state diluite in serie per poi essere impiegate nei test RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi. I risultati sono riassunti nella Tabella 2.

Tab. 2: Limite di rilevazione per Stx 1 e Stx 2

Stx 1 pura ng/ml	RIDAQuick Stx / O157	Stx 2 pura 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 di rilevazione

13.3 Specificità

Il RIDA® Quick Verotoxin / O157 Combi non ha rilevato alcuna reattività incrociata con altri sierotipi E.coli e neanche con altre enterobacteriacee ad eccezione delle salmonelle del Gruppo N, che presentano anch'esse sulla propria superficie antigene O157. Questo antigene di superficie si trova occasionalmente anche in alcuni ceppi della specie del Citrobacter, rendendo consigliabile l'identificazione dopo coltura, in caso di singola reazione della banda per il sierotipo O157. D'altro canto gli isolati dell'antigene O157, che hanno perso la capacità di formazione di tossina di shiga (perdita di fagi), sono molto rari.

Literature

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)