

RIDA[®] Anreicherungsbouillon

mTSB per l'arricchimento di batteri E-coli produttori tossina
Shiga

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. Campo di applicazione

Per diagnostica *in vitro*. Il RIDA® Anreicherungsbouillon si impiega per l'arricchimento di batteri *E. coli* produttori di ciguatossina in campioni di feci.

2. Sintesi e spiegazione del test

Tra le diverse varianti immunopatogene di batteri intestinali *Escherichia coli*, i batteri EHEC si distinguono sostanzialmente per la formazione delle cosiddette ciguatossine o verotossine. Entrambi i sinonimi utilizzati si riferiscono da un lato alla loro alta omologia con la tossina shigella (trova impiego anche il concetto di tossina shiga-like) e dall'altro alla loro tossicità nei confronti delle vero-cellule. Attualmente con EHEC si indicano determinati STEC / VTEC (*E. coli* ciguatossine-produttori / *E. coli* verotossine-produttori) che provocano fenomeni patologici nell'uomo costituendo pertanto dei patovar. Data la struttura antigenica essi sono a loro volta suddivisi in diversi tipi di siero. Alcuni sierotipi, di numero inferiore, sono più spesso individuati nei soggetti affetti rispetto ad altri. Inoltre, non tutti posseggono le stesse caratteristiche per quanto riguarda i marker di virulenza, tra i quali, oltre alle ciguatossine Stx 1 e Stx 2 si citano soprattutto l'intimina e l'enteroemolisina. L'informazione sulla formazione di ciguatossina si trova in un batteriofago, integrato nel cromosoma del batterio. La formazione della ciguatossina è particolarmente forte nei diversi ceppi di STEC, tanto da rendere sconsigliato uno screening per la presenza di tale tossina direttamente sul campione di feci di pazienti affetti da EHEC. Nella prima fase, gli agenti patogeni di tali campioni di feci dei pazienti devono essere arricchiti mediante coltura in un mezzo adeguato. Sono idonei i mezzi che attivano, oltre ai fattori di selettività dell'*Escherichia coli*, anche e in particolare il potenziale di formazione di ciguatossina presente. Il rapporto tra germi EHEC e la flora intestinale fisiologica commensale dell'*E.coli* è di circa 1 : 200. Pertanto, un efficace arricchimento con induzione di formazione della ciguatossina costituisce il presupposto per uno screening di successo con l'ELISA. Il presente brodo di arricchimento risponde a tali requisiti.

3. Principio del test

Il RIDA® Anreicherungsbouillon stimola in modo selettivo i germi di *E. coli* per mezzo della loro componente di sali biliari e inibisce i germi gram-positivi in crescita. L'aggiunta di mitomicina C favorisce la formazione di ciguatossine in particolare mediante l'induzione di profagi lambdaidei sul cromosoma del batterio ed il loro rilascio per lisi cellulare, in modo che, anche in caso di debole formazione di tossine, nel successivo test di screening ELISA è possibile la determinazione sicura delle tossine del supernatante della coltura di arricchimento.

Ciò è particolarmente importante nei pazienti affetti da HUS, nei quali spesso è possibile trovare nelle feci solo pochissimi germi EHEC.

4. Contenuto della confezione

I reagenti di una confezione bastano per 100 determinazioni.

Tube 100 (25) Provetta con 4 ml di brodo di arricchimento; contiene mTSB e mitomicina C

5. Reagenti e relativa conservazione

Le provette contenenti brodo di arricchimento devono essere conservate a 2 - 8 °C e sono utilizzabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Evitare la contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. L'evidente opacizzazione del brodo di arricchimento giallo chiaro è un'indicazione di contaminazione microbica. Queste provette non devono essere più utilizzate e devono essere smaltite in conformità con il punto 10.2.

6. Reagenti aggiuntivi necessari - accessori richiesti

6.1. Reagenti

- Tampone PBS o soluzione fisiologica di cloruro sodico (opzionale)
- Soluzione di smaltimento (P. 10.1.)

6.2. Accessori

- Pipette monocanale (Art. Nr.: Z 0001)
- micropipetta per 100 µl in volume
- Tampone di ovatta diluito
- Agitatore orizzontale o mixer a rotazione con rack contenitore per provette di dimensione 16,5 x 105 mm
- Incubatrice da 37 °C

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 mezzo di arricchimento contiene mitomicina C. Evitare assolutamente il contatto con la cute o con le mucose. Tuttavia, in caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua e rimuovere gli indumenti contaminati.

I materiali (punte delle pipette, tamponi) che entrano in contatto con il brodo di arricchimento, devono essere analogamente smaltiti (P. 10.3.). Rispettare le disposizioni relative allo smaltimento del brodo di arricchimento (P. 10.2.).

8. Raccolta e deposito dei campioni

I campioni di feci da esaminare per cigua- o verotossina 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.

9. Esecuzione del test

Per la riuscita dell'arricchimento attenersi il più possibile esattamente alle procedure e ai volumi delle pipette di seguito riportati. Tali procedure corrispondono all'attuale stato della conoscenza e sono state definite in stretta collaborazione con i relativi centri di riferimento dell'RKI (Robert-Koch-Institut) e BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Impiegare esclusivamente campioni di feci freschi o al massimo conservati da 3 giorni a 2 - 8 °C.

9.1. Campioni di feci liquidi o acquosi

Trasferire 100 µl (nel caso di utilizzo di pipette monocanale Art.-Nr. Z0001 tale valore corrisponde a superare di poco la seconda tacca) o un tampone diluito imbevuto con il campione in 4 ml di RIDA[®] Anreicherungsbouillon e sospendere di nuovo agitando sufficientemente.

9.2. Campioni di feci solidi

Prelevare 50 - 100 mg con una spatola o con un'ansa di diluizione monouso e sospendere in 4 ml di RIDA[®] Anreicherungsbouillon. In alternativa può essere prelevata una quantità equivalente con un tampone diluito mediante raschiamento (preferibilmente in diversi punti del campione di feci) e sospendere di nuovo agitando con vigore in 4 ml di RIDA[®] Anreicherungsbouillon. Trova uguale impiego una sospensione di feci precedentemente prodotta in PBS (50 - 100 mg in 1 ml di tampone), inocolandone 500 µl in 4 ml di RIDA[®] Anreicherungsbouillon.

9.3. Arricchimento

Incubare il brodo di arricchimento inoculato secondo il punto 9.1 o 9.2 per 18 – 24 ore a 37 °C in agitazione (120 – 160 rpm) con un sufficiente apporto di ossigeno (mezza rotazione della chiusura) in posizione obliqua. Assicurarsi che non fuoriesca liquido. Per l'agitazione sono adeguati uno scuotitore orizzontale o un mixer a rotazione. Dopo massimo 24 ore centrifugare il brodo di arricchimento a 2500 g per 5 min. Inserire nel RIDASCREEN[®] Verotoxin ELISA 100 µl di supernatante non diluito.

Attenzione:

Qualora si sia formata muffa nel brodo di arricchimento, eliminarla accuratamente in modo da non trasferirla nella micropiastra. Tale muffa può provocare risultati falsi positivi a causa dell'alta viscosità nelle cavità della micropiastra.

Qualora, dopo un risultato positivo all'ELISA, il materiale debba essere spedito per una conferma da parte di un laboratorio di riferimento autorizzato (PCR e identificazione del germe), si raccomanda la seguente procedura:

1. decantazione dalla provetta del supernatante residuo dopo centrifuga
2. rimuovere completamente i granuli con un tampone
3. riporre il materiale tampone in un apposito mezzo di trasporto (Cary Blair, Stuart o Amies)
4. inviare il materiale (meglio se refrigerato) al relativo laboratorio specializzato per ulteriore analisi

Attenzione:

anche un tampone riempito direttamente con campioni di feci può essere inviato per ulteriore analisi mediante i mezzi di trasporto su indicati.

10. Smaltimento di mezzi e materiali contenenti mitomicina C

Dato che la mitomicina C è cancerogena, lo smaltimento delle sostanze alimentari contenenti mitomicina C e dei materiali entrati in contatto con essa deve avvenire, in Germania, in conformità con le disposizioni in materia di sostanze pericolose (rifiuti speciali) e all'estero secondo le direttive nazionali vigenti in materia.

10.1. Soluzione di smaltimento

0,5 % Wofasteril® (o 0,2 % acido paracetico) in 5 % acido acetico

ovvero 50 ml di acido acetico

+ 5 ml Wofasteril® (o 2 ml acido paracetico)

in 1 l Aqua dest.

Conservazione a 2 - 8 °C

Indicazione:

Wofasteril® è disponibile presso Kesla Hygiene AG, D-06803 Greppin, Germany

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

10.2. Smaltimento del brodo di arricchimento

Aggiungere volumi equivalenti di soluzione di smaltimento nel brodo di arricchimento (ovvero 4 ml coltura + 4 ml di soluzione di smaltimento), lasciare agire durante la notte a temperatura ambiente, quindi sterilizzare a vapore per almeno un'ora a 121 °C.

10.3. Smaltimento del materiale

Le punte delle pipette e il tampone possono essere smaltite in conformità con il P. 10.2. insieme al brodo di arricchimento.

11. Risultati clinici

In un esame di convalida dei mezzi di arricchimento condotto dal BGVV il RIDA® Anreicherungs-

bouillon con aggiunta di mitomicina si è rivelato notevolmente superiore rispetto ai mezzi non contenenti mitomicina, a prescindere dalla loro integrazione soltanto con antibiotici (novobiocina, cefsoludina), soltanto con sali biliari o con entrambi.

Nei campioni di feci clinici di pazienti affetti da HUS l'aggiunta di mitomicina ha comportato un aumento in media del 37,5 %. Nel caso di campioni di feci accuratamente inoculati con isolati di ceppi (noti ciguatossina-produttori) l'aggiunta di mitomicina ha comportato un aumento delle rilevazioni di ciguatossina compreso tra il 40 % e il 50 % rispetto ai mezzi di arricchimento privi di mitomicina. La concentrazione di mitomicina impiegata nel brodo di arricchimento si è rivelata, in un breve studio sulla mutagenicità (non pubblicato), a grado di mutagenicità molto basso, in modo da giustificare l'impiego per l'ottenimento di una diagnostica sensibile della ciguatossina. Attualmente non si conoscono induttori migliori, e contemporaneamente non dannosi, del rilascio di ciguatossina.