

# RIDASCREEN<sup>®</sup> Verotoxin

N.º producto: C2201



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania

Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



## 1. Uso previsto

Diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Verotoxin es un enzimoimmunoensayo para la detección cuantitativa de verotoxinas (sin. shigatoxinas) a partir un cultivo de heces enriquecido con caldo mTSB.

## 2. Resumen y descripción del ensayo

Las enterobacterias del tipo *Escherichia coli* (*E. coli*) forman parte de la flora intestinal sana de las personas y de muchos animales de granja. Por consiguiente, se consideran un indicador de contaminación fecal en las masas de agua y los alimentos. Se trata de bacterias gramnegativas, anaerobias facultativas, con forma de bastón, que pueden desplazarse mediante flagelos peritricos. En función de los antígenos O (LPS de la membrana externa) y los antígenos H (antígenos flagelares), *E. coli* puede clasificarse en varios serotipos. *E. coli* debe considerarse un patógeno facultativo debido a sus distintos factores patogénicos que, con frecuencia, están codificados por plásmidos o transmitidos por bacteriófagos. Desde 1977, se sabe que *E. coli* puede producir dos citotoxinas: la verotoxina 1 y la verotoxina 2. Los genes para dichas verotoxinas (VT) se sitúan en el cromosoma en la región de un probacteriófago. Se han aislado *E. coli* con uno de estos genes o con ambos. Debido a la similitud de las verotoxinas con la shigatoxina de *Shigella dysenteriae*, se las denomina también toxinas de tipo Shiga I y II (SLT-I y SLT-II). Parte de estas *E. coli* verotoxigénicas (ECVT) pueden provocar diarreas intensas al crear otros factores patogénicos. Los síntomas clínicos causados por *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH) van desde ligeras diarreas, pasando por gastroenteritis graves, hasta colitis hemorrágicas, que se producen en el 10 % al 20 % de las infecciones. Del 5 % al 10 % de las infecciones pueden causar complicaciones postinfecciosas potencialmente mortales, sobre todo en lactantes y niños de corta edad, pero también en pacientes ancianos o inmunodeprimidos: síndrome urémico hemolítico (SUH) o púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). La mortalidad por SUH y por PTT es elevada, especialmente en niños (aprox. del 10 % al 15 %). Pueden provocar una insuficiencia renal aguda, con dependencia temporal de la diálisis, o una pérdida irreversible de la función renal que resulte en una necesidad permanente de diálisis. Algunos de los métodos anteriores para diagnosticar una infección por ECEH han demostrado ser insuficientes. Dado que solo alrededor del 1 % de las *E. coli* que no pertenecen al grupo de ECEH pueden producir enterohemolisinas, la detección de bacterias coliformes enterohemolíticas en placas de agar-sangre es con seguridad un indicador importante de la presencia de ECEH. Pero también se han aislado ECEH que no expresan enterohemolisinas en pacientes con SUH. Por otra parte, el serotipo O157, el primero descrito, es solo responsable del 70 % al 80 % de los casos de SUH en Alemania. En las gastroenteritis puras incluso predominan otros serotipos. La identificación exclusivamente del serotipo O157 es, por lo tanto, insuficiente. El procedimiento actualmente recomendado para el diagnóstico es el enriquecimiento del patógeno toda la noche en medio mTSB (con adición de 50 ng/ml de mitomicina C) y su posterior aislamiento. Al mismo tiempo, se debe tratar de detectar la verotoxina, como factor más seguro de patogenicidad, en el sobrenadante del cultivo. Esto se

puede realizar por métodos inmunológicos (mediante ELISA) o bien identificando el efecto citopático en un cultivo de células Vero. A diferencia de la prueba de citotoxicidad en células Vero, la técnica ELISA tal como la brinda RIDASCREEN® Verotoxin EIA es un método sencillo que puede llevarse a cabo en cualquier laboratorio. En ambos métodos es necesario el enriquecimiento bacteriano, ya que la excreción de bacterias y su contenido de toxinas en las heces pueden ser muy bajos. Incluso en pacientes con SUH y PTT, puede que no haya excreción en absoluto. Si se desea conseguir un resultado rápido en casos particulares, se puede intentar detectar las toxinas directamente en la muestra de heces, sin enriquecimiento previo. Sin embargo, dada la falta de sensibilidad de este procedimiento, un resultado negativo debe considerarse solo como una indicación preliminar. Se debe esperar entonces al resultado previo enriquecimiento. Por lo general no se recomienda la quimioterapia antibacteriana, ya que se prolongaría la excreción bacteriana y podría incluso estimularse la formación de toxinas.

### 3. Principio de la prueba

En la prueba RIDASCREEN® Verotoxin se utilizan anticuerpos específicos con un procedimiento tipo sándwich. La superficie de los pocillos de la placa de microtitulación está recubierta con anticuerpos monoclonales contra las verotoxinas 1 y 2. Se pipetea una suspensión de la muestra de heces objeto de ensayo, o el sobrenadante de una muestra de heces enriquecida durante toda la noche en caldo mTSB, así como los controles, junto con los anticuerpos antiverotoxina biotinilados (conjugado 1), en el pocillo correspondiente de la placa de microtitulación a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba de nuevo a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Si la muestra contiene verotoxinas, se forma un complejo tipo sándwich compuesto de anticuerpos inmovilizados, verotoxinas y anticuerpos antiverotoxina biotinilados con el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina. En el posterior paso de lavado se elimina el conjugado no enlazado de poliperoxidasa y estreptavidina. En caso de que la muestra sea positiva, la adición de un sustrato hace que la enzima enlazada cambie el color de la solución de incolora a azul. La adición de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de verotoxinas presente en la muestra.

### 4. Contenido del envase

Los reactivos del kit son suficientes para 96 ensayos.

<b>Plate</b>	96 det.	Placa de microtitulación, 12 tiras de pocillos (divisibles) en un portatiras; recubiertos con anticuerpos monoclonales contra verotoxina 1 y 2
<b>Diluent   1</b>	100 ml	Búfer de dilución de la muestra, solución salina tamponada con proteína, lista para usar, color azul

Wash	100 ml	Búfer de lavado, solución salada tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal al 0,1 %
Control   +	2 ml	Control positivo, verotoxinas inactivadas, listo para usar
Control   -	2 ml	Control negativo (búfer de dilución de la muestra), listo para usar
Conjugate   1	13 ml	Anticuerpos contra verotoxina 1 y 2 conjugados con biotina en solución de proteína estabilizada; listo para usar; color violeta
Conjugate   2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución de proteína estabilizada, listo para usar, color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N; listo para usar

## 5. Instrucciones de almacenamiento de los reactivos

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 – 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si el búfer de lavado se almacena a 2 – 8 °C, puede utilizarse como máximo durante 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. No se garantiza la calidad una vez alcanzada la fecha de caducidad de los reactivos. Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se separe el precinto de seguridad. Retornar las tiras de microtitulación que no se necesiten a la bolsa de aluminio y almacenarlas inmediatamente a 2 - 8 °C. El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

## 6. Reactivos necesarios pero no suministrados

### 6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

### 6.2. Accesorios

- Caldo de enriquecimiento RIDA<sup>®</sup> (n.º prod. Z1000)
- Pipetas desechables (n.º prod. Z0001)
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
- Micropipetas de 50 - 100 µl y de 1 ml de volumen
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Dispositivo de lavado de placas de microtitulación o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro lector de placas de microtitulación (450 nm y filtro de referencia de 620 – 650 nm)

- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito al 0,5 %

## **7. Medidas de precaución**

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

El kit incluye un control positivo que contiene la verotoxina inactivada. Al igual que las muestras de los pacientes, debe tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales.

No pipetear las muestras ni los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Utilizar guantes desechables para manipular las muestras y lavarse las manos al terminar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras o los reactivos de la prueba.

El búfer de lavado contiene timerosal al 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

El peróxido de urea puede provocar quemaduras químicas. Manipular con cuidado.

El reactivo de parada contiene ácido sulfúrico 1 N. Evitar el contacto con la piel y la ropa. Si se contamina la piel con el reactivo, aclararla con agua.

Todos los reactivos y materiales que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas deben tratarse con desinfectantes adecuados o esterilizarse a 121 °C en el autoclave durante por lo menos 1 hora. PRECAUCIÓN: Con el fin de evitar la formación de gases tóxicos, todos los residuos líquidos que contengan reactivo de parada se deben neutralizar antes de añadirlos a la solución de hipoclorito.

## **8. Obtención y almacenamiento de muestras**

Si no se utilizan de inmediato, las muestras de heces en las cuales se desea detectar las verotoxinas pueden conservarse como se describe a continuación:

- hasta 24 horas, a temperatura ambiente o entre 2 - 8 °C
- hasta 72 horas, entre 2 - 8 °C

No se recomienda la congelación de las muestras, ya que las bacterias ECEH pueden verse afectadas y no multiplicarse bien, o no hacerlo en absoluto, en el cultivo de enriquecimiento.

Las muestras de heces se deben recoger en recipientes limpios, sin ningún tipo de aditivo, y almacenarse a 2 - 8 °C antes de comenzar la prueba.

Las muestras de heces y los frotis rectales no deben recogerse en recipientes de transporte que contengan medios de transporte con conservantes, suero animal, iones metálicos, agentes

oxidantes o detergentes, ya que dichas sustancias pueden interferir en la prueba RIDASCREEN® Verotoxin.

En caso de utilizar frotis rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.

La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

## 9. Ejecución de la prueba

### 9.1. General

Todos los reactivos y la placa de microtitulación **Plate** deben llevarse a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de utilizarlos. No sacar las tiras de microtitulación de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Los reactivos deben mezclarse bien inmediatamente antes de usarlos. Tras su uso, las tiras de microtitulación (colocadas en bolsas selladas) y los reactivos deben almacenarse de nuevo a 2 - 8 °C. Una vez usadas, las tiras de microtitulación no podrán utilizarse de nuevo. No utilizar los reactivos y las tiras de microtitulación si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas. Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit. No realizar la prueba bajo la luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de microtitulación o sellarla con un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

### 9.2. Preparación del búfer de lavado

Mezclar 1 parte de búfer de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado en baño maría a 37 °C para disolver los posibles cristales presentes.

### 9.3. Preparación de las muestras

Para obtener un primer resultado, se puede comenzar con una prueba de detección de toxinas directamente en la muestra de heces. Debido a la posibilidad de que haya un contenido muy bajo de toxinas en las heces, un resultado negativo no significa que la muestra también sea negativa para ECEH. Para conseguir mayor sensibilidad, en general se debe realizar la detección de toxinas a partir de un cultivo enriquecido, incluso si el resultado para las heces es negativo. Actualmente en Alemania se recomienda realizar el enriquecimiento durante toda la noche en un cultivo con agitación a 37 °C en medio mTSB con adición de mitomicina C (50 ng/ml). Otros medios de enriquecimiento utilizados, como caldo GN, no mostraron influencias negativas (efectos de matriz) en el RIDASCREEN® Verotoxin ELISA; sin embargo, tales medios no están recomendados por las asociaciones profesionales.

#### 9.3.1. Examen de muestras frescas o congeladas de heces

Diluir la muestra de heces en una proporción 1:11 (v/v) con el búfer de dilución de muestras para verotoxinas. Aspirar 1 ml de muestra de heces líquida mediante una pipeta desechable

(n.º prod. Z0001) y mezclar con 4 ml de búfer en un tubo de ensayo etiquetado. Para heces sólidas, utilizar un asa de siembra desechable y tomar un volumen equivalente de muestra. Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice. Después de un breve periodo de reposo (10 min, para clarificar por sedimentación) tomar 100 µl del sobrenadante de la suspensión y utilizarlo directamente en la prueba. Si el procedimiento del ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante no debe contener partículas. Para ello se aconseja centrifugar la muestra a 2500 G durante 5 minutos.

**Importante: La detección en una muestra de heces no enriquecida solo debe valorarse, debido a su baja sensibilidad, como un preanálisis rápido para casos de urgencia anamnésica. Un resultado negativo no es válido. En tal caso, se debe esperar al resultado de las pruebas en la muestra enriquecida.**

#### 9.3.2. Examen de muestras a partir del cultivo de enriquecimiento

El procedimiento aquí descrito es acorde con las recomendaciones del RKI (Instituto Robert Koch) y del BfR (Instituto Federal de Evaluación de Riesgos). Deben tenerse en cuenta también las instrucciones del caldo de enriquecimiento RIDA<sup>®</sup> (n.º prod. Z1000). El sobrenadante de un cultivo de enriquecimiento (caldo de enriquecimiento RIDA<sup>®</sup>) puede utilizarse en la prueba directamente, sin dilución previa, tras una breve centrifugación.

**Importante: Se debe controlar que exista igualdad de temperaturas entre el caldo y el control negativo (ambos deben estar, al comenzar la prueba, a temperatura ambiente, es decir, 20 – 25 °C. Una temperatura del caldo elevada puede causar falsos positivos en los valores de DO.**

En primer lugar, añadir 100 µl de muestra de heces líquida o una cantidad equivalente (50 - 100 mg) de una muestra de heces sólida a 4 ml de medio mTSB que contenga mitomicina C (p. ej., caldo de enriquecimiento RIDA<sup>®</sup>, n.º prod. Z1000) e incubar con suficiente entrada de oxígeno (media vuelta de rosca del tapón) en posición inclinada a 37 °C durante 18 a 24 horas (máximo). Tras la incubación, centrifugar la muestra completa durante 5 min a 2500 G. En el ensayo ELISA se utilizan 100 µl de sobrenadante claro.

**Conservar los sedimentos y las muestras originales para una confirmación posterior. El procedimiento idóneo es absorber el sedimento con una torunda, transferirlo a un medio de transporte adecuado (Amies, Stuart o Cary-Blair) y almacenarlo a 2 – 8 °C hasta su envío.**

#### 9.4. Primera incubación

Tras insertar el número necesario de pocillos en el portatiras, pipetear 100 µl del control positivo [Control +], el control negativo [Control -] y el medio de cultivo de enriquecimiento (o de suspensión de la muestra de heces) en los pocillos. Añadir a continuación 100 µl del

anticuerpo conjugado con biotina **Conjugate | 1** y mezclar (golpeando suavemente contra un lado de la placa); incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

#### 9.5. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si se quieren obtener resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa oficial. Acto seguido, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de búfer de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

**Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar que esté ajustado correctamente; solicitar las configuraciones al fabricante, si es preciso. Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con configuraciones y protocolos de trabajo validados. A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3., Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.**

#### 9.6. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina **Conjugate | 2** en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 30 min.

#### 9.7. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.5.

#### 9.8. Tercera incubación

Añadir 100 µl de sustrato **Substrate** a todos los pocillos. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada **Stop** para detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de microtitulación.

#### **Nota:**

**En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.**

### **10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos**

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que



se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se ha realizado correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (DO) del control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado. Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Ejecución de la prueba correcta
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas. No utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

## 11. Evaluación e interpretación

### 11.1. Cálculo del corte

La evaluación de la prueba se basa en el mismo cálculo del valor de corte para ambos tipo de material de análisis (sobrenadante de cultivos enriquecidos o muestra de heces sin tratar).

$$\text{valor de corte} = \text{extinción para el control negativo} + 0,150$$

### 11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** y deberá repetirse el ensayo si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba con una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la muestra debe considerarse negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

## 12. Limitaciones del método

La prueba RIDASCREEN® Verotoxin detecta las verotoxinas 1 y 2 generadas por *E. coli* verotoxigénicas en muestras de heces o a partir de cultivos enriquecidos. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro y los**

**síntomas clínicos. Un resultado positivo para toxinas junto a una identificación simultánea de la bacteria se considera el método más seguro para detectar ECEH.**

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección con *E. coli* verotoxigénica. Dicho resultado puede deberse a la excreción intermitente del patógeno o a una cantidad demasiado baja de antígeno en la muestra. Si la historia del paciente da pie a sospechar una infección por *E. coli* verotoxigénica, deberá repetirse la prueba con una muestra de heces diferente.

Algunas cepas de ECEH producen solo pequeñas cantidades de verotoxina. Debido al bajo contenido en toxinas que suelen tener las muestras de heces, la detección directa de toxinas a partir de las heces como único método no es lo suficientemente sensible.

Un resultado positivo a partir de las heces es un rápido indicio de una posible infección por ECEH. Pero no puede descartarse una infección por ECEH si el resultado es negativo.

Un resultado **con valores límite** puede deberse a la distribución no homogénea de las bacterias en la muestra de heces. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

Si la detección de toxinas es positiva, se debe hacer el seguimiento necesario para el aislamiento de *E. coli*. Solo mediante la identificación y caracterización del patógeno es posible establecer una relación entre la toxina detectada y la sintomatología clínica.

A pesar de la existencia de una infección por ECEH, la identificación de toxinas en un cultivo enriquecido podría incluso resultar negativa. En función de las condiciones del cultivo, el cultivo podría no haberse producido de forma óptima. También es posible que, a pesar de lograr un cultivo exitoso de *E. coli*, el contenido de toxina en el medio de cultivo sea tan bajo que la prueba diera resultado negativo. El motivo puede ser un bajo porcentaje de ECEH en la flora fisiológica de *E. coli* (a veces solo una ECEH por cada 200 - 300 *E. coli*) pero también la suspensión de la producción y excreción de toxinas en determinadas condiciones de crecimiento. Por consiguiente, es posible obtener un resultado positivo (débil) de toxinas en el análisis directo de las heces y que, sin embargo, sea negativo en el cultivo.

A causa de la extrema sensibilidad de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, es posible que en los análisis de heces originales se obtenga un valor límite o positivo débil, pero podría también deberse a efectos inespecíficos de la matriz. Por este motivo se debe realizar un lavado extremadamente meticuloso en los análisis directos de heces.

En los casos de presencia de síndromes postinfecciosos como SUH o PTT, la cantidad de patógenos en las heces puede ser tan baja que el aislamiento del germen ya no sea posible. En este caso también la prueba de verotoxina ELISA es negativa. Por eso es importante que las muestras de heces se analicen lo más pronto posible durante la fase entérica.

**Por otra parte, cabe mencionar el plan de diagnóstico de ECEH recomendado por el Centro Nacional de Referencia del Instituto Robert-Koch (Ref. bibl. 15).**

### 13. Características de rendimiento

#### 13.1. Calidad del ensayo

En un estudio de validación de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA se analizaron 94 muestras. Se trataba de muestras de heces enriquecidas en caldo mTSB, procedente de un laboratorio alemán que realizaba estos análisis de forma habitual, congeladas y almacenadas para un uso posterior tras el análisis rutinario, para la validación de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA en su laboratorio. Tras descongelarlas, las muestras se sometieron a análisis comparativos con la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA y otras dos pruebas ELISA comercialmente disponibles. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: Correlación entre la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA y otras dos pruebas ELISA comerciales

		ELISA 1		ELISA 2	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Verotoxin	Positivo	35	4	34	5
	Negativo	0	55	0	55

Coincidencia de positivos: 94,6 % 93,2 %

Coincidencia de negativos: 96,5 % 95,7 %

#### 13.2. Reactividad cruzada

Se analizaron varios microorganismos patógenos con la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA y no se observó reactividad cruzada excepto para *S. aureus*. Estos estudios se realizaron con suspensiones de bacterias con concentraciones de  $10^6$  a  $10^9$  microorganismos por ml. Los sobrenadantes de los cultivos víricos se resumen en la lista correspondiente.

*S. aureus* se introdujo a una concentración aproximada de  $6,3 \times 10^7$  UFC/ml en la prueba y mostró resultados positivos débiles en 2 de 3 réplicas. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos

Microorganismo	Origen	Valor medio [DO 450/620]
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultivo	0,043
Astrovirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,000
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	-0,001
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultivo	0,002
<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	0,021
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	0,028
<i>Candida albicans</i>	Cultivo	0,006
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	-0,005

<i>Clostridium difficile</i>	Cultivo	-0,004
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo	-0,001
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultivo	0,056
<i>Cryptosporidium muris</i>	Cultivo	-0,001
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cultivo	-0,001
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cultivo	0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	0,003
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	0,005
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,007
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,001
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,006
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,005
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,002
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,006
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,002
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,002
<i>Escherichia coli</i>	Cultivo	-0,006
<i>Escherichia coli</i> (O26:H-)	Cultivo	-0,006
<i>Escherichia coli</i> (O6)	Cultivo	-0,002
<i>Giardia lamblia</i>	Heces	-0,001
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivo	0,003
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	0,004
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	-0,004
Rotavirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,001
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultivo	-0,005
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultivo	0,001
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	0,002
<i>Shigella dysenteriae</i>	Cultivo	0,004
<i>Shigella flexneri</i>	Cultivo	-0,002
<i>Shigella sonnei</i>	Cultivo	-0,005
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	0,126
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	-0,003
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultivo	-0,003
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultivo	-0,005

### 13.3. Precisión

La reproducibilidad de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA se analizó con seis referencias representativas del rango de medida completo, desde negativo a positivo alto. Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para 3 lotes. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de 10 días de trabajo diferentes, con 2 ensayos por día. Las medidas fueron realizadas sobre 3 lotes por 2 técnicos. La reproducibilidad interlote se determinó para los 3 lotes. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Resultados de reproducibilidad/precisión de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

Referencia Valor medio/ CV		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lote kit 1	Lote kit 2	Lote kit 3	Lotes kit 1–3
1	MV	2,387	2,021	2,374	2,371	2,098	2,448	2,306
	CV (%)	5,01%	5,91%	7,61%	9,01%	7,56%	8,76%	11,58%
2	MV	1,497	1,402	1,753	1,706	1,518	1,779	1,668
	CV (%)	5,01%	5,21%	7,40%	15,59%	8,69%	10,20%	12,67%
3	MV	0,808	0,711	0,835	0,850	0,784	0,949	0,861
	CV (%)	8,60%	10,94%	9,32%	10,85%	10,08%	12,81%	14,85%
4	MV	0,310	0,280	0,379	0,386	0,371	0,452	0,403
	CV (%)	9,15%	9,39%	13,49%	15,33%	11,71%	14,98%	17,63%
5	MV	0,200	0,190	0,302	0,224	0,223	0,278	0,242
	CV (%)	12,23%	13,40%	7,94%	21,67%	17,17%	18,22%	22,74%
6	MV	-0,003	0,002	-0,002	0,010	0,004	0,012	0,009
	CV (%)	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

#### 13.4. Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, se analizó el límite del blanco (LdB) en 90 ensayos de muestras negativas (enriquecidas) y el límite de detección (LdD) en 72 ensayos. Los resultados de las mediciones se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Resultados de la sensibilidad analítica de la prueba RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

	MV [DO 450/620]	pg/ml
LdB	0,022	-
LdD verotoxina 1	-	12,5
LdD verotoxina 2	-	25,0

### 13.5. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con los sobrenadantes de muestras de heces positivas y negativas para verotoxina en las concentraciones descritas: Mucina (5 % v/v), sangre humana (5 % v/v), sulfato de bario (18,5 % v/v), loperamida (0,02 % p/v), peptobismol (6,6 % v/v), ácido esteárico/palmítico (40 % v/v), metronidazol (3 % p/v), diclofenaco (0,1 % p/v), mezcla de ciclamato/sacarina (1,3 % v/v).

La mucina y el sulfato de bario también mostraron una reducción dependiente de la dosis de los valores de DO si se utilizaban más diluidos respecto a las concentraciones indicadas más arriba.

## Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de microtitulación
Diluent   1	Búfer de dilución de la muestra
Wash	Búfer de lavado
Control   +	Control positivo
Control   -	Control negativo
Conjugate   1	Conjugado 1
Conjugate   2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	reactivo de parada

## Bibliografia

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.: Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundhbl. 11, 426 - 429 (1996)
3. Bockemühl, J. et al.: Zur aktuellen Bedeutung der enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland (1994-1995). Bundesgesundhbl. 8, 290 - 296 (1996)
4. Bockemühl, J. et al.: Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. Bundesgesundhbl. 6, 194 - 197 (1997)
5. Bülte, M.: Enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme (EHEC) - Aktuell in der Bundesrepublik Deutschland? 1. Pathogenitätspotential von EHEC-Stämmen - Bedeutung als Lebensmittelinfektionserreger. (Literaturübersicht) Fleisch-wirtschaft 75, 1430 - 1432 (1995)
6. Bülte, M. et al.: Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) - aktuelle Lebensmittelinfektionserreger auch in der Bundesrepublik Deutschland? 2. Nachweis von VTEC-Stämmen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs Fleischwirtschaft 76, 88 - 91 (1996)
7. 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)
8. Karch, H. et al.: Clonal Structure and Pathogenicity of Shiga-Like Toxin-Producing, Sorbitol-Fermenting *Escherichia coli* 0157:H<sup>-</sup>. Journal of Clinical Microbiology 5, 1.200 - 1.205 (1993)
9. Kuntze, U. et al.: Nachweis von verotoxinbildenden *E. coli*-Stämmen in Rohmilch und Rohmilchkäse. Archiv f. Lebensmittelhygiene 47, 141 - 144 (1996)
10. 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)
11. Strockbine, N. A. et al.: Characterization of Monoclonal Antibodies against Shiga-Like Toxin from *Escherichia coli*. Infection and Immunity, Dec., 695 - 700 (1985)
12. 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)
13. Walterspiel, J. N. et al.: Effect of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on Extracellular Shiga-like Toxin I. Infection 20, No. 1, 25 - 29 (1992)
14. Gerritzen, A. et al.: Flüssige Vorkultur von Stuhlproben verbessert den EHEC-Toxinnachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest. J. Lab. Med. 22 (2), 097 - 101 (1998)
15. Fruth, A. et al.: Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohemorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundheitsbl.- Gesundheitsforsch.-Gesundheitsschutz 43, 310-317 (2000)