

RIDASCREEN[®] Verotoxin

Codice prodotto: C2201



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, D-64297 Darmstadt, Germany

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



1. Campo di applicazione

Per uso diagnostico *in vitro*. RIDASCREEN® Verotoxin è un test immunoenzimatico per la rilevazione qualitativa di verocitotossine (tossine Shiga) dall'arricchimento delle feci in terreno mTSB.

2. Sintesi e spiegazione del test

Le enterobatteriacee della specie *Escherichia coli* (*E. coli*) sono componenti della flora intestinale sana dell'uomo, ma anche di molti animali di fattoria. Di conseguenza, sono anche considerati degli indicatori di inquinamento fecale provocato dall'acqua e dagli alimenti. Si tratta di batteri a bastoncino gram-negativi, anaerobi facoltativi, che si muovono mediante flagelli peritrichi. A seconda degli antigeni O (LPS della membrana esterna) e H (antigene flagellare) gli *E. coli* possono essere suddivisi in diversi sierotipi. A causa di vari fattori di patogenicità, spesso codificati da plasmidi o trasmessi da fagi, gli *E. coli* vanno considerati facoltativamente patogeni. Dal 1977, si sa che gli *E. coli* sono in grado di produrre due citotossine, la verocitotossina 1 e 2. I geni di queste verocitotossine (VT) sono ubicati sul cromosoma nella regione di un profago. Sono stati isolati *E. coli* contenenti entrambi questi geni o anche solo uno dei due. Data la somiglianza delle verocitotossine con la tossina Shiga della *Shigella dysenteriae*, esse vengono chiamate anche tossine Shiga-like I e II (SLT I e II). Parte di questi *E. coli* verotossigenici (VTEC) può causare gravi forme di diarrea mediante la formazione di altri fattori di patogenicità. I sintomi clinici causati dall'EHEC variano da forme lievi di diarrea a gravi gastroenteriti fino alla colite emorragica, che insorge in circa il 10 - 20 % delle infezioni. Può insorgere una complicanza post-infezione letale nel 5 - 10 % delle infezioni, in particolare nei neonati e nei bambini piccoli, ma anche nei pazienti anziani o immunocompromessi: Sindrome uremica emolitica (SEU) o Porpora trombotica trombocitopenica (PTT). La letalità della SEU della PTT è elevata, soprattutto in età infantile (ca. 10 - 15 %). Esse possono inoltre provocare insufficienza renale acuta con dipendenza da dialisi temporanea o una perdita irreversibile della funzionalità renale con conseguente dipendenza da dialisi permanente. Alcuni dei metodi utilizzati in passato per diagnosticare un'infezione da EHEC si sono rivelati inadeguati. Dato che solo l'1 % ca. degli *E. coli* non appartenenti al gruppo degli EHEC è in grado di produrre enteroemolisina, la rilevazione di batteri coliformi enteroemolitici su piastre di agar sangue è senza dubbio un indicatore importante di EHEC. Esistono tuttavia anche EHEC isolati da pazienti affetti da SEU, che non esprimono l'enteroemolisina. È stato inoltre riscontrato che il tipo O157 individuato inizialmente è responsabile solo del 70 - 80 % dei casi di SEU in Germania. Nelle gastroenteriti semplici prevalgono persino altri sierotipi. Una singola rilevazione del sierotipo O157, pertanto, non è sufficiente. La procedura diagnostica attualmente consigliata è un pre-arricchimento del patogeno per una notte in terreno mTSB (con l'aggiunta di 50 ng/ml di mitomicina C) e successivo isolamento. Al tempo stesso, si dovrebbe cercare di rilevare la verocitotossina come fattore di patogenicità più sicuro dal supernatante di coltura. Per via immunologica si può fare mediante un test ELISA o dimostrando l'effetto citopatico su una coltura di cellule Vero. Diversamente dal test di citotossicità per cellule Vero, la tecnica del test

ELISA, fornita dall'EIA RIDASCREEN® Verotoxin, è un metodo semplice, eseguibile in qualsiasi laboratorio. Il prearricchimento del germe è necessario in entrambi i metodi, in quanto l'escrezione del germe e il contenuto di tossine nelle feci possono essere molto bassi. L'escrezione può anche essersi fermata del tutto, in particolare in pazienti affetti da SEU e PTT. Al fine di conseguire un risultato veloce, nel singolo caso si può tentare di eseguire la rilevazione della tossina direttamente sul campione di feci senza preventivo arricchimento. Tuttavia, vista la mancanza di sensibilità di tale procedura, un risultato negativo deve essere interpretato esclusivamente come indicazione preliminare, mentre si deve attendere il risultato dell'arricchimento. In generale, non è indicata una chemioterapia antibatterica in quanto prolungherebbe l'escrezione di batteri e potrebbe persino stimolare la formazione di tossine.

3. Principio del test

Il test RIDASCREEN® Verotoxin utilizza anticorpi specifici in un metodo a sandwich. La superficie dei pozzetti della micropiastra viene rivestita con anticorpi monoclonali alle verocitotossine 1 e 2. Una sospensione del campione di feci da esaminare o il supernatante di un arricchimento di una notte del campione di feci in brodo mTSB e i controlli vengono pipettati nel rispettivo pozzetto della micropiastra insieme ad anticorpi anti-verocitotossina biotinilati (Coniugato 1) a temperatura ambiente (20–25°C). Dopo il lavaggio il coniugato poli-streptavidina-perossidasi (Coniugato 2) viene aggiunto e incubato una seconda volta a temperatura ambiente (20–25°C). Se nel campione sono presenti verocitotossine, si forma un complesso a sandwich composto di anticorpi immobilizzati, verocitotossine e anticorpi anti-verocitotossina biotinilati con il complesso poli-streptavidina-perossidasi. Un ulteriore lavaggio rimuove il coniugato poli-streptavidina-perossidasi non legato. Nei campioni positivi, l'aggiunta di un substrato trasforma l'enzima legato da una soluzione incolore in una soluzione blu. L'aggiunta di un reagente bloccante causa una variazione cromatica da blu a giallo. L'estinzione è proporzionale alla concentrazione di verocitotossine presenti nel campione.

4. Contenuto della confezione

I reagenti nel kit sono sufficienti per 96 test.

Plate	96 ril.	Piastra di microtitolazione, 12 strisce da microtitolazione (separabili) in telaio di fissaggio; rivestimento con anticorpi monoclonali specifici alle verocitotossine 1 e 2
Diluent 1	100 ml	Tampone di diluizione del campione, soluzione salina proteica tamponata, pronta per l'uso, colorazione blu
Wash	100 ml	Tampone di lavaggio, soluzione tamponata al fosfato NaCl (concentrata 10 volte); contiene 0,1 % di Thimerosal
Control +	2 ml	Controllo positivo; coltura di verocitotossina inattivata, pronto per l'uso

Control -	2 ml	Controllo negativo (tampone di diluizione dei campioni); pronto per l'uso
Conjugate 1	13 ml	Anticorpi biotina-coniugati alle verocitotossine 1 e 2 in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso; colorazione viola
Conjugate 2	13 ml	Poli-coniugato streptavidina-perossidasi in soluzione proteica stabilizzata; pronto per l'uso; colorazione arancione
Substrate	13 ml	Perossido di idrogeno/TMB; pronto per l'uso
Stop	12 ml	Reagente di bloccaggio; acido solforico 1 N; pronto per l'uso

5. Istruzioni di conservazione per reagenti

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 - 8 °C e possono essere utilizzati fino alla data stampata sull'etichetta. Il tampone di lavaggio diluito è utilizzabile per quattro settimane se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Evitare la contaminazione microbica. Dopo la data di scadenza, non può essere più fornita alcuna garanzia di qualità. La busta in alluminio deve essere aperta con le forbici, in modo tale da non rimuovere la chiusura a clip. Le strisce da microtitolazione che non sono necessarie devono essere rimesse nella busta di alluminio e conservate immediatamente a 2-8 °C. Il substrato incolore deve essere protetto dalla luce diretta per evitare che si decomponga o diventi blu per effetto dell'auto-ossidazione. Un substrato che sia diventato blu non deve essere utilizzato.

6. Reagenti aggiuntivi necessari e dispositivi accessori

6.1. Reagenti

- Acqua distillata o deionizzata

6.2. Accessori

- RIDA® enrichment broth (cod. prod. Z1000)
- Pipette monouso (cod. prod.: Z0001)
- Vorticatore (opzionale, vedere punto 9.3.)
- Micropipetta da 50 - 100 µl e 1 ml in volume
- Cilindro graduato (1000 ml)
- Cronometro
- Dispositivo di lavaggio per piastre di microtitolazione o pipette multicanale (300 µl)
- Fotometro per piastre di microtitolazione (450 nm e filtro di riferimento 620–650 nm)
- Carta filtrante (carta da laboratorio)
- Contenitore di rifiuti con soluzione di ipoclorito allo 0,5 %

7. Misure precauzionali

Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.

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

Il kit include un controllo positivo che contiene la verocitotossina inattivata. Deve essere trattato come potenzialmente infettivo, analogamente ai campioni dei pazienti, e maneggiato in conformità alle disposizioni di sicurezza nazionali vigenti.

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

Il tampone di lavaggio contiene 0,1 % di Thimerosal come conservante. Questa sostanza non deve entrare in contatto con la cute o le mucose.

Il perossido di urea può provocare ustioni chimiche. Maneggiare con cautela.

Il reagente bloccante contiene 1 N di acido solforico. Evitare il contatto con la pelle e con gli indumenti. In caso di contatto del reagente con la pelle, sciacquare con acqua.

Tutti i reagenti e materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con adeguato disinfettante o sottoposti a sterilizzazione a vapore per almeno un'ora a 121 °C. ATTENZIONE: per evitare la formazione di gas velenosi, i residui liquidi contenenti reagente bloccante devono essere neutralizzati prima di essere aggiunti a una soluzione di ipoclorito.

8. Raccolta e conservazione dei campioni

Se non sono utilizzati quando sono freschi, i campioni di feci da sottoporre a test per le verocitotossine si possono conservare come indicato di seguito:

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

Si sconsiglia di congelare i campioni in quanto i batteri EHEC potrebbero essere 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 additivi e conservati prima dell'inizio del test a 2 – 8 °C.

I campioni di feci e i prelievi rettali non devono essere riposti in contenitori per il trasporto contenenti sostanze per il trasporto come conservanti, sieri animali, ioni metallici, agenti ossidanti e detergenti, in quanto potrebbero crearsi interferenze con il test RIDASCREEN® Verotoxin.

Se vengono usati prelievi rettali, assicurarsi che il volume del materiale fecale sia sufficiente (circa 100 mg) per il test.

Le indagini ambientali devono includere anche campioni di feci prelevati da persone che non mostrano sintomi clinici al fine di identificare i portatori asintomatici.

9. Esecuzione del test

9.1. Informazioni generali

Tutti i reagenti e la piastra di microtitolazione **Plate** devono essere portati a temperatura ambiente (20 - 25 °C) prima dell'uso. Le strisce di microtitolazione devono essere rimosse dalla busta in alluminio solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente. Mescolare con cura i reagenti immediatamente prima dell'utilizzo. Dopo l'uso, le strisce di microtitolazione (inserite in buste sigillate) e i reagenti devono essere conservati a una temperatura compresa tra 2 e -8 °C. Una volta usate, le strisce di microtitolazione non devono essere riutilizzate. I reagenti e le strisce di microtitolazione non devono essere utilizzati se l'imballaggio è danneggiato o i flaconi non sono ermetici. Evitare il contatto diretto dei campioni con i componenti del kit per evitare la contaminazione incrociata. Il test non deve essere esposto all'irradiazione solare diretta. Si raccomanda di coprire o sigillare con una pellicola in plastica la piastra di microtitolazione per evitare perdite per evaporazione.

9.2. Preparazione dei campioni

Miscelare 1 parte di concentrato di tampone di lavaggio **Wash** con 9 parti di acqua distillata. Eventuali cristalli presenti nel concentrato devono essere precedentemente riscaldati in un bagnomaria a 37°C per scioglierli.

9.3. Preparazione dei campioni

Al fine di ottenere un primo risultato è possibile eseguire una rilevazione della tossina direttamente sul campione di feci. Poiché la concentrazione di tossina nelle feci può essere bassa, un risultato negativo non deve essere considerato equivalente a un esito EHEC negativo. Per ottenere una maggiore sensibilità, anche in caso di esito negativo delle feci, in generale la rilevazione di tossina deve essere condotta sulla coltura di arricchimento. Attualmente, in Germania si consiglia l'arricchimento durante la notte in una coltura agitata a 37 °C in terreno mTSB con aggiunta di mitomicina C (50 ng/ml). Altri mezzi di arricchimento quali il brodo GN non hanno evidenziato influenze negative (effetti matrice) nel test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin; tuttavia, non rappresentano i mezzi di arricchimento raccomandati dalle associazioni di settore.

9.3.1. Esame di campioni di feci freschi o congelati

Diluire i campioni di feci con tampone di diluizione dei campioni di verocitotossina 1:11 (v/v). Prelevare con una pipetta monouso 1 ml di feci liquide (cod. prod.: Z0001) e mescolare in una provetta contrassegnata con 4 ml di tampone. Prelevare un corrispondente volume di feci solide

con un'ansa di inoculazione monouso. Omogeneizzare la sospensione fecale mediante aspirazione ed espulsione tramite pipetta monouso oppure, in alternativa, miscelare in un vorticolatore. Dopo un breve tempo di posa (10 min., chiarificando per sedimentazione) introdurre direttamente nel test 100 µl di supernatante della sospensione. Se l'esecuzione del test viene eseguita in un sistema ELISA automatico, il supernatante non deve contenere particelle. In questo caso, è consigliabile centrifugare il campione a 2500 G per 5 minuti.

Importante: la rilevazione del campione di feci non arricchito può essere considerata, a causa della scarsa sensibilità, solo come veloce pre-screening in casi di urgenza anamnestica. Un risultato negativo non è valido. In questo caso, attendere il risultato dei test eseguiti sul campione arricchito.

9.3.2. Esame di campioni della coltura di arricchimento

La procedura qui descritta è conforme alle raccomandazioni del RKI (Istituto Robert Koch) e del BfR (Istituto federale per la valutazione del rischio). Si prega di osservare le istruzioni per il RIDA® Enrichment broth (cod. prod. Z1000). Il supernatante di una coltura di arricchimento (RIDA® Enrichment broth) può essere impiegato direttamente nel test dopo una breve centrifugazione senza ulteriore diluizione.

Importante: Assicurarsi che le temperature del brodo e del controllo negativo (entrambi devono essere regolati alla temperatura ambiente (20 – 25 °C) all'inizio del test) siano uniformate. Temperature elevate del brodo possono causare valori OD falsi positivi.

Trasferire inizialmente 100 µl di feci liquide o una quantità equivalente (50 – 100 mg) di un campione di feci solide in 4 ml di mTSB con mitomicina C (ad es. RIDA® Enrichment broth, cod. prod. Z1000) e incubare con sufficiente apporto di ossigeno (mezzo giro del tappo a vite) in posizione inclinata a 37 °C per 18 - 24 ore al massimo. Centrifugare l'intero campione dopo l'incubazione per 5 min a 2.500 x g. 100 µl del supernatante trasparente vengono utilizzati nel test ELISA.

Conservare i sedimenti e i campioni di feci originali per una successiva conferma. Il procedimento migliore consiste nel prelevare il sedimento per mezzo di un tampone, trasferirlo in un terreno di trasporto adeguato (Amies, Stuart o Cary-Blair) e poi conservarlo a 2 – 8 °C fino all'invio.

9.4. Prima incubazione

Dopo aver introdotto un numero sufficiente di pozzetti nel telaio di fissaggio, pipettare 100 µL del controllo positivo, il controllo negativo, la coltura di arricchimento (o, facoltativamente, la sospensione del campione di feci) nei pozzetti. Quindi aggiungere 100 µl dell'anticorpo biotina-coniugato e miscelare (dando dei leggeri colpi sul bordo della piastra); successivamente, incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.5. Lavaggio

Un accurato lavaggio è importante per ottenere risultati corretti e deve pertanto essere effettuato in stretta conformità con le istruzioni. Il prodotto di incubazione dei pozzetti deve essere svuotato in un contenitore per rifiuti per poi essere smaltito nel rispetto delle disposizioni ufficiali. Quindi, tamponare la piastra su carta assorbente per rimuovere l'umidità residua. Lavare la piastra cinque volte utilizzando 300 µl di tampone di lavaggio ogni volta. Assicurarsi che i pozzetti vengano completamente svuotati picchiettandoli per svuotarli dopo ciascun lavaggio su un'area di carta assorbente ancora asciutta e inutilizzata.

Se si utilizza una lavatrice per micropiastre o un sistema ELISA completamente automatico, assicurarsi che la macchina sia correttamente regolata o, se necessario, chiedere le impostazioni al produttore. I dispositivi forniti da R-Biopharm sono già programmati con le impostazioni e i protocolli di lavoro convalidati. Per evitare di bloccare gli aghi di lavaggio, introdurre solo sospensioni di feci prive di particelle (vedere Punto 9.3., Preparazione dei campioni). Inoltre, assicurarsi che tutto il liquido venga aspirato in ogni fase di lavaggio.

9.6. Seconda incubazione

Utilizzare una pipetta per introdurre 100 µl di poli-coniugato streptavidina-perossidasi **Conjugate 2** nei pozzetti, quindi incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavaggio

Lavare come descritto al Punto 9.5.

9.8. Terza incubazione

Iniettare nei pozzetti 100 µl di substrato **Substrate**. Quindi incubare la piastra per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Successivamente riempire tutti i pozzetti con 50 µl di reagente bloccante **Stop** per arrestare la reazione. Dopo aver accuratamente miscelato picchiettando leggermente sul lato della piastra, misurare l'estinzione a 450 nm (opzionale: 450/620 nm). Regolare il punto zero contro aria, ovvero senza la piastra di microtitolazione.

Nota:

I campioni di pazienti altamente positivi possono causare precipitati nerastri del substrato

10. Controllo della qualità – indicazioni della scadenza dei reagenti

Per il controllo della qualità eseguire il controllo positivo e negativo ad ogni esecuzione del test, per garantire la corretta esecuzione del test e la stabilità dei reagenti. Il test è eseguito correttamente se il tasso di estinzione (OD) del controllo negativo è inferiore a 0,2 a 450 nm (inferiore a 0,160 a 450/620 nm) e il valore misurazione del controllo positivo è superiore a 0,8 a

450 nm o a 450/620 nm. Un valore superiore a 0,2 (0,160) per il controllo negativo può indicare un lavaggio insufficiente. La deviazione dai valori richiesti, proprio come un'opacizzazione o una colorazione blu del substrato incolore prima dell'inserimento nei pozzetti, può indicare che i reagenti sono scaduti. Se i valori stipulati non vengono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare i seguenti punti:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata (p.es. calibrazione)
- Procedura di esecuzione del test corretta
- Controllare visivamente che i componenti del kit non presentino contaminazione o perdite: non utilizzare una soluzione di substrato che sia diventata blu.

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo la ripetizione del test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale..

11. Valutazione e interpretazione

11.1. Calcolo del valore limite

La valutazione del test si basa sullo stesso calcolo del valore limite per entrambi i tipi di materiale di test (supernatante della coltura di arricchimento o campione di feci naturali).

$$\text{valore limite} = \text{estinzione per il controllo negativo} + 0,150$$

11.2. Risultato del test

Il campione è considerato **positivo** se il tasso di estinzione supera il valore limite calcolato di più del 10 %.

Il campione viene considerato **marginale** e il test deve essere ripetuto se il tasso di estinzione è compreso tra il 10 % in meno e il 10 % in più rispetto al valore limite. Se l'esame ripetuto con un campione di feci fresco rientra ancora nella zona grigia, il campione deve essere considerato negativo.

I campioni che sono inferiori di oltre il 10 % rispetto al valore limite calcolato devono essere considerati **negativi**.

12. Limiti del metodo

Il test RIDASCREEN® Verotoxin rileva le verocitotossine 1 e 2 di *E. coli* verotossigenici in campioni di feci o in colture di arricchimento. Non è possibile stabilire una relazione tra il livello di estinzione rilevato e l'insorgenza o la gravità della sintomatologia clinica. **I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati tenendo conto dei segni e dei sintomi clinici. Un risultato positivo della tossina con simultanea identificazione del germe è considerato il metodo più sicuro per la rilevazione dell'EHEC.**

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

Un risultato **negativo** non esclude la possibilità di infezione da *E. coli* verotossigenico. Un risultato simile può essere dovuto a escrezione intermittente dell'agente patogeno oppure è possibile che la quantità di antigene nel campione sia insufficiente. Qualora a livello anamnestico sussista il sospetto di un'infezione da *E. coli* verotossigenico, l'esame deve essere ripetuto con un altro campione di feci.

Alcuni ceppi di EHEC producono solo esigue quantità di verocitotossina. A causa del contenuto spesso esiguo di tossine nei campioni di feci, la rilevazione diretta delle tossine nelle feci come unico metodo non è sufficientemente sensibile.

Un risultato positivo dalle feci fornisce un'indicazione rapida di una possibile infezione da EHEC, ma in caso di risultato negativo non è comunque possibile escludere l'infezione da EHEC.

Un risultato **marginale** può essere dovuto a una distribuzione non omogenea dei batteri nel campione di feci. In questo caso, l'esame deve essere ripetuto con una seconda sospensione dallo stesso campione; in alternativa, dovrà essere richiesto un altro campione di feci.

Se la rilevazione della tossina è positiva, deve essere seguita dall'isolamento dell'*E. coli*. Solo con l'identificazione e la caratterizzazione dell'agente patogeno è possibile stabilire un collegamento tra la tossina rilevata e la sintomatologia clinica.

Malgrado la presenza di un'infezione da EHEC, la rilevazione delle tossine da una coltura di arricchimento può risultare negativa. A seconda delle condizioni della coltura, l'arricchimento può non essere ottimale. Inoltre, sebbene la coltura di *E. coli* sia riuscita, il contenuto di tossine nel mezzo di coltura può essere talmente esiguo da far risultare negativo il test. Le cause di ciò vanno ricercate nella bassa percentuale di EHEC nella flora fisiologica di *E. coli* (talvolta volte solo un EHEC su 200 - 300 *E. coli*), oppure nella sospensione di produzione ed escrezione di tossine in determinate condizioni di crescita. È quindi possibile che la rilevazione di tossine direttamente dalle feci risulti (debolmente) positiva, mentre la rilevazione dalla coltura è negativa.

A causa dell'impostazione sulla massima sensibilità del test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin, l'esame di feci naturali può avere un risultato nel limite o debolmente positivo anche a causa di effetti matrice non specifici. Di conseguenza, per l'esame diretto delle feci è assolutamente necessario un accurato lavaggio.

Qualora insorgano sintomi post-infezione quali SEU o PTT, la quantità di patogeni nelle feci può essersi già talmente ridotta da non consentire più l'isolamento del germe. In questo caso anche il test ELISA per la rilevazione delle verocitotossine risulterà negativo. È quindi importante esaminare i campioni di feci all'inizio della fase enteritica.

Per il resto, consultare il piano multifase di diagnostica dell'EHEC raccomandato dal Centro di Riferimento Nazionale dell'Istituto Robert Koch (Lit. 15).

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1. Qualità del test

Uno studio di validazione con il test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin ha esaminato 94 campioni. I campioni erano campioni di feci arricchiti in brodo mTSB da un laboratorio di routine tedesco, congelati e conservati per un uso successivo dopo l'esame di routine per la validazione del test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin presso il loro laboratorio. Dopo lo scongelamento, i campioni sono stati sottoposti a esame comparativo con il test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin e con altri due test ELISA commerciali. I risultati di questo studio sono riepilogati nella Tabella 1.

Tabella 1: Correlazione fra il test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin e altri due ELISA commerciali

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

Riscontro positivo:	94,6 %	93,2 %
Riscontro negativo:	96,5 %	95,7 %

13.2. Reattività incrociata

Vari organismi patogeni sono stati esaminati con il test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin e non hanno evidenziato alcuna reattività incrociata ad eccezione del *S. aureus*. Questi studi sono stati condotti con sospensioni batteriche non diluite che presentavano una concentrazione da 10^6 a 10^9 per ml. I supernatanti della coltura virale sono rispettivamente indicati.

Il *S. aureus* è stato introdotto a una concentrazione di $\sim 6,3 \times 10^7$ CFU/ml nel test e ha dato risultati debolmente positivi in 2 replicati su 3. I risultati di questo studio sono elencati nella Tabella 2.

Tabella 2: Reattività incrociata con microrganismi patogeni

Organismo	Origine	Valore medio [OD 450/620]
Adenovirus	Supernatante di coltura cellulare	-0,006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Coltura	0,043
Astrovirus	Supernatante di coltura cellulare	0,000
<i>Bacillus cereus</i>	Coltura	-0,001
<i>Bacteroides fragilis</i>	Coltura	0,002
<i>Campylobacter coli</i>	Coltura	0,021
<i>Campylobacter jejuni</i>	Coltura	0,028
<i>Candida albicans</i>	Coltura	0,006

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

13.3. Precisione

La riproducibilità del test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin è stata verificata su sei riferimenti che rappresentano l'intero range di misurazione da debolmente ad altamente positivo. Per la determinazione della riproducibilità intra-analisi, sono stati esaminati 40 replicati di questi riferimenti. Sono stati determinati i valori medi e i coefficienti di variazione (CV) per 3 lotti. Per la riproducibilità inter-analisi, le misurazioni dei riferimenti sono state eseguite in 10 giorni lavorativi diversi con 2 serie al giorno con test doppi. Le misurazioni sono state determinate in 3 lotti da 2 tecnici. La riproducibilità inter-lotto è stata determinata per tutti e 3 i lotti. I risultati sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3: Risultati dalla riproducibilità/precisione del test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin

Riferimento Valore medio / CV		Intra-analisi			Inter-analisi			Inter-lotto
		Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotto kit 1	Lotto kit 2	Lotto kit 3	Lotti kit 1-3
1	MV	2,387	2,021	2,374	2,371	2,098	2,448	2,306
	VC (%)	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
	VC (%)	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
	VC (%)	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
	VC (%)	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
	VC (%)	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
	VC (%)	non disponibile						

13.4. Sensibilità analitica

Per determinare la sensibilità analitica del test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin è stata eseguita l'analisi del limite di bianco (LoB) in 90 test di campioni negativi (brodo di arricchimento), e il limite di rilevazione (LoD) è stato analizzato in 72 test delle tue tossine. I risultati di queste misurazioni sono presentati nella Tabella 4.

Tabella 4: Risultati della sensibilità analitica del test ELISA RIDASCREEN® Verotoxin

	MV [OD 450/620]	pg/ml
LoB	0,022	-
LoD verocitotossina 1	-	12,5
LoD verocitotossina 2	-	25,0

13.5. Sostanze interferenti

Le sostanze incluse nell'elenco seguente non hanno mostrato effetti sui risultati dei test quando miscelate nei supernatanti di campioni di feci positivi a verocitotossina e negativi a verocito-

tossina nelle concentrazioni descritte: mucina (5 % v/v), sangue umano (5 % v/v), solfato di bario (18,5 % v/v), loperamide (0,02 % p/v), Pepto-bismol (6,6 % v/v), acido stearico/palmitico (40 % v/v), metronidazolo (3 % p/v), diclofenac (0,1 % p/v), miscela di ciclamato/saccharina (1,3 % v/v).

La mucina e il solfato di bario hanno inoltre evidenziato una riduzione dose-dipendente dei valori OD se ulteriormente diluiti rispetto alle concentrazioni di cui sopra.

Appendice

Simboli specifici del test:

Plate	Piastra di microtitolazione
Diluent 1	Tampone di diluizione del campione
Wash	Tampone di lavaggio
Control +	Controllo positivo
Control -	Controllo negativo
Conjugate 1	Coniugato 1
Conjugate 2	Coniugato 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente bloccante

Letteratura

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⁻. 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)