

RIDASCREEN[®] Verotoxin

N.º do art.: C2201



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

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



1. Uso previsto

Para uso em diagnóstico *in vitro*. RIDASCREEN® Verotoxin é um ensaio imunoenzimático para a detecção qualitativa de verotoxinas (sin. toxinas Shiga) provenientes de enriquecimento de fezes em caldo mTSB.

2. Sumário e explicação do teste

Enterobacteriaceae do tipo *Escherichia coli* (*E. coli*) fazem parte de uma flora intestinal saudável em humanos, mas também em muitos animais domésticos. Portanto, elas também são um indicador de contaminação fecal na água e em alimentos. Elas são bactérias gram-negativas, opcionalmente anaeróbicas em forma de bastão, que podem mover-se por flagelação peritrica. Com base em antígenos O (LPS da membrana exterior) e antígenos H (antígenos flagelares), a *E. coli* pode ser dividida em diferentes serotipos. A *E. coli* deve ser considerada opcionalmente patogênica devido a diversos fatores patogênicos que são frequentemente codificados por plasmídeo ou transmitidos através de fagos. Desde 1977, a *E. coli* é conhecida como sendo capaz de produzir duas citotoxinas: a verotoxina 1 e 2. Os genes dessas verotoxinas (VT) estão localizadas no cromossomo na região de um prófago. A *E. coli* tem sido isolada, incluindo ambos os genes ou apenas um dos dois. Devido à similaridade das verotoxinas com a toxina Shiga da *Shigella dysenteriae*, elas também são chamadas de Toxinas Shiga-like I e II (SLT-I e -II). Uma parte dessa *E. coli* (VTEC) verotoxinogênica pode causar diarreias severas, formando outros fatores de patogenicidade adicionais. Os sintomas clínicos causados pela EHEC variam desde diarreias leves até gastroenterites severas e colites hemorrágicas, que ocorrem em, aproximadamente, 10 a 20% das infecções. Uma complicação pós-infecciosa de risco de vida pode ocorrer em 5 a 10% das infecções, particularmente em crianças e jovens, mas também em pacientes idosos e com sistema imunológico comprometido: síndrome hemolítica-urêmica (HUS) ou púrpura trombocitopênica-trombótica (TTP). A mortalidade da HUS e da TTP é alta, particularmente durante a infância (aproximadamente 10 a 15%). Elas podem levar a uma falência renal aguda, com dependência temporária de diálise ou a uma perda irreversível da função renal, resultando em dependência permanente de diálise. Alguns dos métodos anteriores para diagnosticar uma infecção EHEC foram considerados insuficientes. Uma vez que aproximadamente 1% da *E. coli* que não pertence ao grupo EHEC pode formar uma entero-hemolisina, a detecção de bactérias coliformes entero-hemolíticas em placas de ágar sangue é, certamente, uma indicação importante de EHEC. Mas também há EHEC que foram isoladas de pacientes HUS e não apresentaram entero-hemolisina. Também se descobriu que o tipo O157 encontrado primeiramente é responsável apenas por 70 a 80% dos casos de HUS na Alemanha. Outros sorotipos são até mesmo predominantes em gastroenterites puras. A detecção individual do sorotipo O157 é, portanto, insuficiente. O procedimento recomendado atualmente para o diagnóstico é a pré-concentração do patógeno durante a noite em meio mTSB (com adição de 50 ng/ml de mitomicina-C) e posterior isolamento. Ao mesmo tempo, deve-se tentar detectar a

verotoxina como o fator de patogenicidade mais seguro da cultura sobrenadante. Isso pode ser feito imunologicamente através de um ELISA, ou por meio da demonstração do efeito citopático sobre uma cultura de células vero. Diferentemente do teste de citotoxicidade em células vero, a técnica ELISA, do jeito que é oferecida pelo RIDASCREEN® Verotoxin EIA, é um método simples que pode ser realizado em qualquer laboratório. A pré-concentração do germe é necessária em ambos os métodos, uma vez que a excreção do germe e o conteúdo de toxina na amostra de fezes podem ser muito baixos. A excreção também pode ter parado completamente, particularmente em pacientes de HUS e TTP. Pode-se tentar realizar a detecção direta da toxina na amostra de fezes sem o enriquecimento prévio, com a finalidade de obter-se um resultado rápido em um caso individual. Devido à falta de sensibilidade desse procedimento, um resultado negativo só deve ser considerado uma indicação preliminar. Deve-se aguardar pelo resultado do enriquecimento. Uma quimioterapia antibacteriana geralmente não é indicada, pois ela prolongaria a excreção de bactérias e poderia até mesmo estimular a formação de toxina.

3. Princípio do teste

O RIDASCREEN® Verotoxin Test utiliza anticorpos específicos em um método do tipo sanduíche. Anticorpos monoclonais contra verotoxinas 1 e 2 são revestidos na superfície do poço da placa de micropoços. Uma suspensão da amostra de fezes de teste ou do sobrenadante de um enriquecimento da amostra de fezes durante a noite no caldo de mTSB e os controles são pipetados juntamente com os anticorpos antiverotoxina biotinilados (Conjugado 1) para o respectivo poço da placa de micropoços em temperatura ambiente (20 - 25 °C). Após um estágio de lavagem, o conjugado de estreptavidina poliperoxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente em temperatura ambiente (20 - 25°C). Se as verotoxinas estiverem presentes na amostra, um complexo de sanduíche se formará, consistindo em anticorpos imobilizados, verotoxinas e nos anticorpos antiverotoxina biotinilados com o complexo estreptavidina poliperoxidase. Um estágio de lavagem adicional remove o conjugado de estreptavidina poliperoxidase não ligado. Em amostras positivas, a adição de um substrato muda a enzima ligada de uma solução incolor para uma solução azul. A adição de um reagente de parada muda a cor, de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de verotoxinas encontradas na amostra.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes fornecidos no kit são suficientes para 96 exames.

Plate	96 det.	Placa de micropoços, 12 tiras de micropoços (que podem ser divididas) no suporte para tiras; revestidas com anticorpos monoclonais contra verotoxina 1 e 2.
Diluent 1	100 ml	Tampão de diluição de amostra, solução tampão proteica de NaCl, pronta para uso, coloração azul

Wash	100 ml	Tampão de lavagem, solução tampão fosfato de NaCl (concentração 10x); contém 0,1% de timerosal
Control +	2 ml	Controle positivo, cultura de verotoxina inativa; pronto para uso
Control -	2 ml	Controle negativo (tampão de diluição de amostra); pronto para uso
Conjugate 1	13 ml	Anticorpos de verotoxina 1 e 2 conjugados com biotina, em solução de proteína estabilizada; pronta para uso; coloração púrpura
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de estreptavidina poliperoxidase de proteína estabilizada; pronto para uso; coloração laranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para uso
Stop	12 ml	Reagente de parada; ácido sulfúrico 1N; pronto para uso

5. Instruções de armazenamento para reagentes

Todos os reagentes devem ser armazenados entre 2 e 8 °C e podem ser usados até a data impressa no rótulo. Se o tampão de lavagem diluído for armazenado entre 2 e 8°C, ele pode ser usado por, no máximo, 4 semanas. A contaminação microbiana deve ser evitada. Nenhuma garantia de qualidade poderá ser assegurada após o término do prazo de validade. A embalagem de alumínio deve ser aberta com tesoura, de modo que o fecho de encaixe não seja separado. As tiras de microtitulação que não forem necessárias devem ser devolvidas à embalagem de alumínio e armazenadas imediatamente em temperatura entre 2 e 8 °C. O substrato incolor deve também ser protegido da luz direta, para evitar que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Se o substrato ficar azul, ele não deve ser utilizado.

6. Reagentes necessários, mas não fornecidos

6.1. Reagentes

- Água destilada ou desionizada

6.2. Acessórios

- Caldo de enriquecimento RIDA[®] (n.º do art. Z1000)
- Pipetas descartáveis (n.º do art.: Z0001)
- Misturador vórtice (opcional, veja 9.3)
- Micropipeta para volumes de 50 - 100 µl e 1 ml
- Cilindro de medição (1000 ml)
- Cronômetro

- Dispositivo de lavagem para placas de micropoços ou pipetas multicanal (300 µl)
- Fotômetro para placas de micropoços (450 nm e filtro de referência de 620 - 650 nm)
- Papel filtro (toalhas de laboratório)
- Recipiente de descarte com solução de hipoclorito a 0,5 %

7. Precauções de uso

Apenas para diagnóstico *in vitro*.

Esse teste deve ser realizado apenas por pessoal de laboratório treinado. As diretrizes para trabalho em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre cumpra estritamente as instruções de usuário para esse teste.

O kit inclui um controle positivo que contém a verotoxina inativa. Assim como as amostras de paciente, ele deve ser tratado como um material potencialmente infeccioso e manuseado de acordo com as normas de segurança nacionais.

Não pipete amostras ou reagentes para a boca, e evite o contato com membranas mucosas ou pele lesionada. Ao manusear as amostras, utilize luvas descartáveis e, ao finalizar o teste, lave as mãos. Não fume, coma ou beba em áreas onde as amostras ou reagentes de teste estiverem sendo usados.

O tampão de lavagem contém 0,1% de timerosal, usado como conservante. Não deve-se permitir que essa substância entre em contato com a pele ou com membranas mucosas.

O peróxido de ureia pode causar queimaduras químicas. Manuseie com cuidado.

O reagente de parada contém ácido sulfúrico 1 N. Evite o contato com a pele e com a roupa. Se a pele for contaminada com o reagente, remova-o com água.

Todos os reagentes e materiais que entrarem em contato com amostras potencialmente infecciosas devem ser tratados com os desinfetantes adequados ou submetidos à autoclavagem a uma temperatura de 121°C por pelo menos 1 hora. CUIDADO: Para evitar a formação de gases tóxicos, todos os resíduos líquidos que contenham o reagente de parada devem ser neutralizados antes da adição à solução de hipoclorito.

8. Coleta e armazenamento de amostra

Se as amostras de fezes não forem utilizadas frescas, elas devem ser testadas em relação a verotoxinas, da seguinte maneira:

- em até 24 horas em temperatura ambiente ou entre 2 e 8 °C
- em até 72 horas, entre 2 e 8 °C

Não é recomendável o congelamento das amostras, pois as bactérias EHEC podem sofrer e não serem capazes de multiplicar-se tão bem, ou simplesmente de multiplicar-se, na cultura de enriquecimento.

As amostras de fezes devem ser coletadas em recipientes limpos sem aditivos e armazenadas

entre 2 e 8 °C antes do início do teste.

As amostras de fezes e esfregaços fecais não devem ser coletados em recipientes de transporte que contenham meios de transporte com conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, uma vez que esses materiais podem interferir no RIDASCREEN® Verotoxin Test.

Se forem utilizados esfregaços fecais, certifique-se de que o volume do material fecal seja suficiente (aproximadamente 100 mg) para o teste.

O rastreamento de contato deve incluir amostras de fezes de pessoas de contacto que não exibam sintomas clínicos, para identificar portadores assintomáticos.

9. Realização do teste

9.1. Informação geral

Todos os reagentes e a placa de micropoços [Plate] devem estar em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da embalagem de alumínio até que tenham chegado à temperatura ambiente. Os reagentes devem ser completamente misturados imediatamente antes do uso. Após o uso, as tiras de micropoços (colocadas em embalagens seladas) e os reagentes devem ser armazenados novamente a 2-8°C. Uma vez usadas, as tiras de micropoços não devem ser reutilizadas. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou se os frascos estiverem vazando. Para evitar a contaminação cruzada, deve-se evitar que as amostras entrem em contato direto com os componentes do kit. O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos cobrir a placa de micropoços ou selá-la com uma embalagem plástica para evitar perdas ocasionadas pela evaporação.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

Misture 1 parte de concentrado de tampão de lavagem [Wash] com 9 partes de água destilada. Todos os cristais presentes no concentrado devem ser dissolvidos com antecedência, aquecendo-os em banho de água a 37 °C.

9.3. Preparação das amostras

Deve ser realizado um teste direto de detecção de toxina da amostra de fezes para obter um resultado inicial. Uma vez que a concentração de toxina nas fezes pode ser baixa, um resultado negativo não deve ser considerado um resultado negativo para EHEC. A detecção de toxina deve, em geral, ser baseada na cultura de enriquecimento – mesmo se os resultados das fezes forem negativos – para obter uma maior sensibilidade. Na Alemanha, a recomendação atual é o enriquecimento durante a noite em uma cultura a 37 °C em meio de mTSB com adição de 50 ng/ml de mitomicina-C. Outros meios de enriquecimento, como caldo GN, não mostraram influências negativas (efeitos matriz) no RIDASCREEN® Verotoxin ELISA; mas eles não são o meio de enriquecimento recomendado pelas associações profissionais.

9.3.1. Exame de amostras de fezes frescas ou congeladas

Dilua a amostra de fezes a uma proporção de 1:11 (v/v) com o tampão de diluição de amostra de verotoxina. Pegue 1 ml de fezes líquidas usando uma pipeta descartável (n.º do item: Z0001) e misture com 4 ml de tampão em um tubo de teste rotulado. Pegue um volume respectivo de fezes sólidas usando uma rede de inoculação descartável. Homogenize a suspensão de fezes por meio de sucção e ejeção de uma pipeta descartável ou por meio de mistura em um misturador vórtice. Permita que o lote descanse por um período curto (10 minutos, clarificando por sedimentação), 100 µl do sobrenadante da suspensão são usados diretamente no teste. Se o procedimento de teste for realizado em um sistema ELISA automatizado, o sobrenadante deve ser livre de partículas. Nesse caso, é aconselhável centrifugar a amostra a 2500 G por 5 minutos.

Importante: Devido a sua baixa sensibilidade, a detecção de amostras de fezes não enriquecidas pode ser considerada apenas um rápido pré-exame em casos de urgência anamnésica. Um resultado negativo não é válido. Em vez disso, aguarde o resultado dos testes na amostra enriquecida.

9.3.2. Exame de amostras a partir da cultura de enriquecimento

O procedimento descrito aqui está em conformidade com as recomendações do RKI (Robert Koch Institute) e do BfR (Instituto Federal de Avaliação de Risco). Siga as instruções de teste para o caldo de enriquecimento RIDA[®] (n.º do item Z1000). O sobrenadante de uma cultura de enriquecimento (caldo de enriquecimento RIDA[®]) pode ser usado diretamente no teste sem mais diluição após uma breve centrifugação.

Importante: Verifique se as temperaturas do caldo e do controle negativo (ambas devem ser ajustadas à temperatura ambiente – 20 a 25 °C – no início do teste) estão equalizadas. Temperaturas elevadas do caldo podem causar valores de OD falso positivos.

Primeiro, transfira 100 µl das fezes líquidas ou uma quantidade equivalente (50 - 100 mg) de uma amostra de fezes sólidas para 4 ml de mTSB com mitomicina-C (por ex., caldo de enriquecimento RIDA[®], n.º do item Z1000) e incuba sob um fornecimento suficiente de oxigênio (meia volta da tampa de rosca) em posição inclinada a 37 °C por 18 a 24 horas, no máximo. Centrifugue toda a amostra após a incubação por 5 minutos a 2500 g. 100 µl do sobrenadante limpo são usados no teste ELISA.

Armazene os sedimentos e as amostras originais para confirmação posterior. De preferência, pegue o sedimento com um cotonete e transfira-o para um meio de transporte adequado (Amies, Stuart ou Cary-Blair), então armazene-o entre 2 e 8 °C até que ele seja necessário.

9.4. Primeira incubação

Após inserir um número suficiente de poços no suporte de tiras, pipete 100 µL do controle positivo **Control | +**, do controle negativo **Control | -** e da cultura de enriquecimento (ou, opcionalmente, da suspensão da amostra de fezes) para os poços. Adicione então 100 µl do anticorpo conjugado com biotina **Conjugate | 1** e misture (batendo levemente no lado da placa) e incube por 60 minutos em temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.5. Lavagem

A lavagem cuidadosa é importante para obter resultados corretos e deve, portanto, ser realizada estritamente de acordo com as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um recipiente de dejetos para descarte, de acordo com as normas oficiais. Após essa etapa, bata a placa em papel absorvente para remover a umidade residual. Lave então a placa cinco vezes, usando 300 µl de tampão de lavagem a cada vez. Certifique-se que os poços estejam completamente vazios, batendo neles após cada lavagem em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não utilizada.

Se uma lavadora de microplacas ou ELISA completamente automatizada for utilizada, certifique-se que a máquina esteja ajustada corretamente, ou solicite as configurações ao fabricante, se necessário. As ferramentas fornecidas pela R-Biopharm já são programadas com configurações e protocolos de trabalho validados. Para evitar o bloqueio das agulhas de lavagem, apenas devem ser usadas suspensões de fezes livres de partículas (ver 9.3, Preparação das amostras). Certifique-se também de que todo o líquido seja aspirado durante cada estágio da lavagem.

9.6. Segunda incubação

Utilize uma pipeta para encher 100 µL de conjugado de estreptavidina poliperoxidase **Conjugate | 2** nos poços, então incube por 30 minutos em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C).

9.7. Lavagem

Lave do modo descrito em 9.5.

9.8. Terceira incubação

Encha todos os poços com 100 µl de substrato **Substrate**. Então incube a placa por 15 minutos no escuro, em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). Subsequentemente, encha todos os poços com 50 µL de reagente de parada **Stop** para parar a reação. Após misturar cuidadosamente, batendo levemente na lateral da placa, meça a extinção em 450 nm (opcional: 450/ 620 nm). Ajuste o ponto zero no ar, ou seja, sem a placa de micropoços.

Nota:

Amostras de paciente alto-positivo podem criar precipitados negros do substrato.

10. Controle de qualidade - indicações da expiração do reagente

Para propósito de controle de qualidade, os controles positivo e negativo devem ser usados todas as vezes que o teste for realizado, para garantir que o teste seja realizado corretamente e que os reagentes estejam estáveis. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extração (OD) para o controle negativo for menor que 0,2 a 450 nm (menos que 0,160 a 450/620 nm) e o valor medido para o controle positivo for maior que 0,8 a 450 nm ou a 450/620 nm. Um valor maior que 0,2 (0,160) para o controle negativo pode indicar que a lavagem não foi suficiente. O desvio dos valores necessários, assim como uma coloração turva ou azulada do substrato incolor antes que seja colocado nos poços, pode indicar que os reagentes estão fora do prazo de validade. Se os valores estipulados não forem obtidos, os seguintes pontos devem ser verificados antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (por ex., calibração)
- Execução correta do teste
- Inspeção visual dos componentes do kit, à procura de contaminação ou vazamentos – uma solução de substrato que ficou azul não deve ser usada.

Se as condições ainda não tiverem sido cumpridas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor R-Biopharm local.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do limite

A avaliação do teste baseia-se no mesmo cálculo de limite para ambos os tipos de material de teste (sobrenadante da cultura de enriquecimento ou amostra de fezes nativa).

$$\text{limite} = \text{extinção para o controle negativo} + 0,150$$

11.2. Resultado do teste

A avaliação da amostra é **positiva** se a taxa de extinção for mais que 10% maior que o valor limite calculado.

A avaliação da amostra é **marginal** e o teste precisa ser repetido se a taxa de extinção variar entre 10% menos a 10% mais do que o valor limite. Se o exame repetido com uma amostra de fezes frescas ficar novamente na zona cinzenta, a amostra deve ser considerada negativa.

As amostras que estiverem mais do que 10% abaixo do limite calculado devem ser consideradas **negativas**.

12. Limitações do método

O RIDASCREEN® Verotoxin Test detecta as verotoxinas 1 e 2 do *E. coli* verotoxinogênico em amostras de fezes ou a partir de culturas de enriquecimento. Não é possível associar o nível de

extinção determinado com a ocorrência ou severidade dos sintomas clínicos. **Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em combinação com os sinais clínicos e com os sintomas. Um resultado de toxina positivo e a identificação simultânea do germe é considerado o método mais seguro para detecção do EHEC.**

Um resultado **positivo** não descarta a presença de outros patógenos infecciosos.

Um resultado **negativo** não descarta a possibilidade de uma infecção com o *E. coli* verotoxinogênico. Tal resultado pode ser devido à excreção intermitente do patógeno, ou a quantidade de antígeno na amostra pode ser muito pequena. Se o histórico do paciente levantar a suspeita de infecção por *E. coli* verotoxinogênico, o exame deve ser repetido com outra amostra de fezes.

Algumas estirpes de EHEC produzem apenas pequenas quantidades de verotoxina. Devido ao conteúdo geralmente baixo de toxina em uma amostra de fezes, a detecção direta de toxina a partir das fezes como método único não é sensível o suficiente.

Um resultado positivo a partir das fezes é um indicativo rápido de potencial infecção por EHEC. Mas uma infecção por EHEC não deve ser descartada se o resultado for negativo.

Um resultado **marginal** pode ocorrer devido à distribuição não homogênea dos antígenos na amostra de fezes. Nesse caso, o exame deve ser repetido com uma segunda suspensão da mesma amostra ou outra amostra de fezes deve ser solicitada.

Se a detecção de toxina for positiva, ela deve ser seguida pelo isolamento da *E. coli*. Uma conexão entre a toxina detectada e os sintomas clínicos só pode ser estabelecida por meio da identificação e caracterização do patógeno.

A detecção de toxina a partir de uma cultura de enriquecimento pode ser negativa, mesmo que uma infecção por EHEC esteja presente. O enriquecimento pode ser subótimo, dependendo das condições de cultura. Apesar do cultivo bem sucedido de *E. coli*, o conteúdo de toxina no meio de cultura pode ser tão baixo que o teste pode ter resultado negativo. O motivo pode ser a baixa porcentagem de EHEC na flora *E. coli* fisiológica (algumas vezes, há apenas um EHEC para 200 - 300 *E. coli*), ou a produção e excreção de toxina é suspensa sob condições específicas de crescimento. É, portanto, possível que a detecção de toxina diretamente a partir das fezes seja (fracamente) positiva, enquanto a detecção a partir da cultura seja negativa.

Devido à alta configuração de sensibilidade do RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, um resultado marginal ou fracamente positivo também pode ser causado por efeitos matriz não específicos durante o exame de fezes nativas. Portanto, é imperativa uma lavagem cuidadosa para o exame direto das fezes.

Quando sintomas pós-infecciosos como HUS ou TTP desenvolvem-se, a quantidade de patógenos nas fezes pode ter caído para um ponto no qual o germe não pode mais ser isolado. Nesse caso, o ELISA da verotoxina também será negativo. É, portanto, importante que as amostras de fezes sejam examinadas o mais cedo possível durante a fase entérica.

Caso contrário, consulte o plano multiestágios de diagnóstico de EHEC recomendado pelo Centro de Referência Nacional do Instituto Robert Koch (Ref. 15).

13. Características de desempenho

13.1. Qualidade do teste

Um estudo de validação com o RIDASCREEN® Verotoxin ELISA examinou 94 amostras. As amostras eram amostras de fezes enriquecidas em caldo mTSB de um laboratório de rotina alemão, que foram congeladas e armazenadas para uso posterior após o exame de rotina para a validação do RIDASCREEN® Verotoxin ELISA em seu laboratório. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas a exame comparativo com RIDASCREEN® Verotoxin ELISA e dois ELISAs comerciais. Os resultados do estudo estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Correlação entre o RIDASCREEN® Verotoxin ELISA e dois ELISAs comerciais

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

Correspondência positiva: 94,6 % 93,2 %

Correspondência negativa: 96,5 % 95,7 %

13.2. Reatividade cruzada

Diversos organismos patogênicos foram investigados com RIDASCREEN® Verotoxin ELISA e não mostraram reatividade cruzada, exceto o *S. aureus*. Esses estudos foram realizados com suspensões bacterianas que mostraram ter concentrações de 10^6 a 10^9 organismos por ml. Sobrenadantes de cultura viral estão adequadamente listados.

S. aureus foi introduzida em uma concentração de aprox. 6.3×10^7 CFU/ml no teste e mostrou resultados positivos fracos em 2 de 3 repetições. Os resultados desse estudo estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos

Organismo	Origem	Valor médio [OD 450/620]
Adenovírus	Sobrenadante de cultura celular	-0,006
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultura	0,043
Astrovírus	Sobrenadante de cultura celular	0,000
<i>Bacillus cereus</i>	Cultura	-0,001
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultura	0,002
<i>Campylobacter coli</i>	Cultura	0,021
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultura	0,028
<i>Candida albicans</i>	Cultura	0,006

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

13.3. Precisão

A reprodutibilidade do RIDASCREEN® Verotoxin ELISA foi testada com seis referências, representando a faixa de medição completa de fraco a alto positivo. Para determinar a reprodutibilidade entre ensaios, 40 réplicas dessas referências foram testadas. Os valores médios e os coeficientes de variação (CV) foram determinados para 3 lotes. Para a reprodutibilidade entre ensaios, as referências de 10 diferentes dias de trabalho foram examinadas em duplicatas, com 2 execuções por dia. As medições foram determinadas em 3 lotes por 2 técnicos. A reprodutibilidade entre lotes foi determinada para todos os 3 lotes. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados da reprodutibilidade/precisão do RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

Referências Valor médio / CV		Intraensaio			Entre-ensaio			Entre-lote
		Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lote 1 do kit	Lote 2 do kit	Lote 3 do kit	Lotes 1–3 do kit
1	VM	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	VM	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	VM	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	VM	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	VM	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	VM	-0,003	0,002	-0,002	0,010	0,004	0,012	0,009
	CV (%)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

13.4. Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do RIDASCREEN® Verotoxin ELISA, o limite de branco (LoB) foi analisado em 90 ensaios de amostras negativas (caldo de enriquecimento), e o limite de detecção (LoD) foi analisado em 72 ensaios das duas toxinas. Os resultados dessas medições são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados da sensibilidade analítica do RIDASCREEN® Verotoxin ELISA

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

13.5. Substâncias interferentes

A seguinte lista de substâncias não mostrou efeitos nos resultados do teste quando foram misturadas nos sobrenadantes de amostras de fezes com Verotoxina positiva e Verotoxina

negativa nas concentrações descritas: Mucina (5 % v/v), sangue humano (5 % v/v), sulfato de bário (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), mistura de ciclamato/sacarina (1,3 % v/v).

A mucina e o sulfato de bário também mostraram uma redução dependente de dose dos valores OD se usados com diluição além das concentrações mencionadas acima.

Apêndice

Símbolos específicos de teste:

Plate	Placa de micropoços
Diluent 1	Tampão de diluição de amostra
Wash	Tampão de lavagem
Control +	Controle positivo
Control -	Controle negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente de parada

Referências

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)