

IMPIEGO PREVISTO

Il kit del reagente per il test al lattice *E. coli* O157 Prolex™ è un kit per test di agglutinazione utilizzato per l'identificazione presuntiva del sierogruppo O157 di *Escherichia coli*.

INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

Il sierotipo O157:H7 dell'*Escherichia coli* è un patogeno che produce la tossina di Shiga.^{1,2} Questo sierotipo è stato indicato come agente eziologico in casi sporadici ed epidemici di colite emorragica.^{3,4,5} È inoltre associato alla sindrome uremica emolitica.⁶ Anche certi sierotipi di *E. coli* diversi dallo O157:H7 producono la tossina di Shiga.^{7,8,9} Tuttavia, la diarrea causata da questi sierotipi diversi generalmente non presenta sangue. Inoltre, il sierotipo O157:H7 dell'*E. coli* non fermenta il sorbitolo, cosa che invece accade con la maggior parte degli altri sierotipi.^{10,11} Di conseguenza, se si effettua uno screening primario con il sorbitolo MacConkey agar, le colonie del sierotipo O157 dell'*E. coli* sono incolore (colonie non fermentanti il sorbitolo, [NSFC]), mentre le colonie di altri sierotipi hanno la caratteristica colorazione rosa (colonie fermentanti il sorbitolo, SFC).¹¹

PRINCIPIO DEL METODO

Le particelle di lattice di polistirene utilizzate in questo kit sono ricoperte con un anticorpo contro l'antigene somatico O157 dell'*E. coli*. Quando queste particelle di lattice vengono mischiate con colonie fresche del sierogruppo O157 di *E. coli*, i batteri si legano all'anticorpo causando l'agglutinazione delle particelle di lattice (reazione positiva). I batteri che non appartengono al sierogruppo O157 di *E. coli* non si legano all'anticorpo e non agglutinano (reazione negativa).

MATERIALI FORNITI

Reagente al lattice O157 *E. coli* Prolex™ (PL.072B / PL.073B):

- Un flacone con contagocce contenente 3,1 ml (PL.070B) o 6,2 ml (PL.071B) di particelle di lattice rivestite di IgG purificate di coniglio che reagiscono con il sierogruppo O157 di *E. coli*. Le particelle di lattice sono risospese in tampone contenente 0,098% sodio azide come conservante.

Controllo positivo O157 *E. coli* Prolex™ (PL.074B / PL.075B):

- Un flacone con contagocce contenente 1,5 ml (PL.070B) o 3,0 ml (PL.071B) di sospensione di controllo positivo contenente un antigene del sierotipo O157:H7 dell'*E. coli* prodotto mediante raccolta e inattivazione di colonie del sierotipo O157:H7 dell'*E. coli* cresciute su terreno solido. L'antigene è risospeso in tampone contenente 0,095% sodio azide come conservante.

Reagente al lattice per controllo negativo O157 *E. coli* Prolex™ (PL.077B / PL.076B):

- Un flacone con contagocce contenente 1,5 ml (PL.070B) o 3,0 ml (PL.071B) di particelle di lattice rivestite di IgG purificate di coniglio che non reagiscono con il sierogruppo O157 di *E. coli*. Le particelle di lattice sono risospese in tampone contenente 0,098% sodio azide come conservante.
- Test card
- Mixing stick
- Istruzioni per l'uso

MATERIALE NECESSARIO, MA NON FORNITO

- Soluzione fisiologica
- Provette 12 x 75 mm
- Ago o ansa per inoculazione
- Pipette Pasteur

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Tutti i reagenti devono essere conservati a 2 - 8°C. I reagenti conservati in queste condizioni resteranno stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta del prodotto. **Non congelare.**

AVVERTENZE

1. Il kit è destinato esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*.
2. Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto.
3. I reagenti contengono ≤ lo 0,098% di sodio azide. Il sodio azide può reagire in modo esplosivo con le condutture in rame o piombo se lasciato accumulare. Benché la quantità di sodio azide nei reagenti sia minima, è necessario utilizzare una grande quantità di acqua quando si scaricano nel lavandino i reagenti utilizzati.
4. I campioni e i reagenti devono essere considerati potenzialmente infettivi e al momento dell'esecuzione del test è opportuno adottare precauzioni universali.
5. Non utilizzare i reagenti al lattice al lattici in presenza di segni evidenti di autoagglutinazione. Questa può avere luogo sotto forma di agglutinazione del reagente al lattice O157 *E. coli* Prolex™ in assenza di isolato oppure sotto forma di agglutinazione del reagente al lattice per controllo negativo in presenza di antigene per il controllo positivo o di isolato.
6. Per ottenere risultati attendibili è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni descritte in queste istruzioni.
7. Alcuni reagenti contengono materiali di origine animale e devono essere manipolati come potenziale portatori e trasmettitori di malattie.

PREPARAZIONE DELLE COLTURE

Seminare i campioni clinici su terreno Sorbitolo MacConkey Agar. Testare le colonie non fermentanti il sorbitolo (NSFC) direttamente o da una sottocultura su un terreno solido non selettivo. Prelevare con cura dalla superficie dell'agar le colonie cresciute durante la notte (18 - 24 ore) usando un'ansa o un ago sterili. I migliori risultati si ottengono generalmente con culture fresche a crescita rapida.

PROTOCOLLO

1. Prima dell'uso lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente.
2. Utilizzando una pipetta, trasferire 0,2 ml di soluzione fisiologica in una provetta da 12 x 75 mm.
3. Utilizzando un'ansa o un ago sterili, raccogliere una quantità sufficiente di colonie dalla piastra e metterle in sospensione nella soluzione fisiologica in modo da ottenere una torbidità corrispondente ad uno standard di 3 - 5 McFarland.
4. Depositare una goccia di reagente al lattice O157 *E. coli* Prolex™ in uno dei cerchi presenti su una delle test card in dotazione. Utilizzando una pipetta Pasteur aggiungere una goccia della sospensione nello stesso cerchio e miscelare utilizzando uno dei mixing stick in dotazione.
5. Inclinare delicatamente la card e dopo un paio di minuti verificare la presenza di agglutinazione.
6. Gli isolati che danno un risultato positivo al lattice devono essere ritestati ripetendo la procedura con il reagente al lattice per controllo negativo Prolex™.

PROCEDURE DI CONTROLLO QUALITÀ

Prima di eseguire gli isolati, testare il reagente al lattice O157 *E. coli* Prolex™ e il reagente al lattice per controllo negativo Prolex™ utilizzando il controllo positivo Prolex™. Con il reagente al lattice O157 *E. coli* Prolex™ l'agglutinazione deve avere luogo entro due minuti mentre con il reagente al lattice per controllo negativo Prolex™ non vi deve essere alcuna agglutinazione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. La seguente tabella mostra come interpretare i risultati ottenuti con i reagenti al lattice O157 *E. coli* Prolex™ e il controllo positivo O157 *E. coli* Prolex™:

REAGENTE AL LATTICE O157	CONTROLLO NEGATIVO REAGENTE AL LATTICE	OSSERVAZIONI
+	-	I risultati ottenuti con il kit sono soddisfacenti..
-	-	La sensibilità è insufficiente. Sostituire i reagenti
+	+	Autoagglutinazione: Sostituire i reagenti

2. L'agglutinazione dei reagenti al lattice con il campione in esame deve essere interpretata come indicato di seguito:

REAGENTE AL LATTICE O157	CONTROLLO NEGATIVO REAGENTE AL LATTICE	OSSERVAZIONI
+	-	Presuntivo per Sierogruppo O157 dell' <i>E. coli</i> .
+	+	Presente un ceppo autoagglutinante o cross-reattivo. Eseguire ulteriori test per escludere l'O157 dell' <i>E. coli</i> .
-	non effettuato	Indica assenza di sierogruppo O157 dell' <i>E. coli</i> .
Aspetto filamentoso o mucoide aggregati	non effettuato	Ininterpretabile. Versare la sospensione fresca di colonie nella soluzione fisiologica e lasciare depositare gli. Rianalizzare il supernatante.

LIMITI DEL METODO

1. Analizzare solo le colonie che mostrano la tipica morfologia a colonia sul sorbitolo MacConkey Agar (non fermentanti il sorbitolo).
2. Confermare i risultati positivi ottenuti con analisi biochimiche di routine.
3. Questo reagente è stato sviluppato per rilevare la presenza di antigene del sierogruppo O157 dell'*E. coli*. Anche alcuni altri ceppi O157 di *E. coli* (ad es. O157:H16) che non sono fermentanti il sorbitolo danno un risultato positivo quando analizzati con questo test.^{1,12,13}
4. Sebbene questo test sia stato appositamente sviluppato per ridurre la normale reattività incrociata di *Escherichia hermannii* (12), è possibile che alcuni rari ceppi presentino tale reattività.

PERFORMANCE DEL METODO

Le performance cliniche del kit O157 *E. coli* Prolex™ sono state valutate in un laboratorio ospedaliero di microbiologia. Complessivamente sono stati sottoposti a cultura campioni di feci contenenti sangue di 474 pazienti con diarrea, colite emorragica o sindrome uremica emolitica. Di questi 474 campioni, 47 hanno sviluppato colonie sorbitolo-negative che sono state identificate come positive per il ceppo O157 di *E. coli* con un test commerciale. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati da test biochimici convenzionali. Tutti i 47 isolati hanno dato reazione positiva quando analizzati utilizzando il kit di reagente al lattice O157 *E. coli* Prolex™ (47/47: 100% di sensibilità).

BIBLIOGRAFIA

1. **Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S.** 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779.
2. **Ratnam S., March S.B., Ahmed R., Bezanson G.S., Kasatiya S.** 1988. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 26:2006-2012.
3. **C.D.C.** 1982. Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis. *United States MMRW* 31:580-585.
4. **Johnson W.M., Lior H., Bezanson G.S.** 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* i:76.
5. **Krishnan C., Fitzgerald V., Dakin S., Behme R.J.** 1987. Laboratory investigation of outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 25:1043-1047.
6. **Karmali M.A., Steele B.T., Petric M., Lim C.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* i:619-620.
7. **Karmali M.A., Petric M., Lim C., Cheung R., Arbus G.S.** 1985. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 22:614-619.
8. **Law D.** 1988. Virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 26:1-10.
9. **Scotland S.M., Day N.P., Rowe B.** 1980. Production of a cytotoxin affecting vero cells by strains of *Escherichia coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroups. *FEMS Microbiol. Lett.* 7:15-17.
10. **Farmer III J.J., Davis B.R.** 1985. H7 Antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 22:620-625.
11. **March S.B., Ratnam S.** 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23:869-872.
12. **Borczyk A., Lior H., Cebin B.** 1987. False positive identification of *Escherichia coli* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 4:347-349.
13. **Thompson J.S., Hodge D.S., Borczyk A.A.** 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J. Clin. Microbiol.* 28:2165-2168.

	= Produttore
	= Mandatario nella Comunta Europea
	= Quantita sufficiente per (n) test
	= Dispositivo medico diagnostico in vitro
	= Limiti di temperatura
	= Per l'uso consultare le istruzioni

Le presenti istruzioni per l'uso sono state accuratamente tradotte dalla versione originale in lingua inglese. In caso di ambiguità o apparente discrepanza rivolgersi al servizio assistenza Pro-Lab.