

## E.COLI O157 LATEX KIT

### IMPIEGO PREVISTO

E.Coli O157 Latex Kit consente l'identificazione presuntiva rapida dell'antigene del sierogruppo O157 di *E. coli* da coltura.

### INTRODUZIONE E OBIETTIVO DEL TEST

Il sierotipo O157:H7 di *E.coli* è un patogeno produttore di verotossina (VT).<sup>1,2</sup>

Questo sierotipo è stato riportato essere l'agente eziologico dei casi sporadici ed epidemici di colite emorragica.<sup>3,4,5</sup> E' inoltre associato alla sindrome uremica emolitica.<sup>6</sup> Anche alcuni sierotipi di *E. coli* diversi da O157:H7 producono verotossina.<sup>7,8,9</sup> Tuttavia, la diarrea causata da questi sierotipi non è normalmente emorragica.

Inoltre il sierotipo O157:H7 di *E. coli* non fermenta il sorbitolo, mentre la maggior parte degli altri sierotipi è in grado di farlo.<sup>10,11</sup> Di conseguenza, se si effettua uno screening primario con il terreno Sorbitolo-MacConkey Agar, le colonie del sierotipo O157:H7 di *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).<sup>11</sup>

### PRINCIPIO DEL METODO

Le particelle di lattice sono rivestite con un antisiero contro l'antigene O157 di *E. coli*. Quando le particelle di lattice così rivestite sono mescolate con colonie fresche di *E. coli* sierotipo O157, i batteri si legano all'antisiero causando una evidente agglutinazione delle particelle di lattice (reazione positiva). Batteri che non appartengono al sierotipo O157 non si legano all'antisiero e non inducono agglutinazione (reazione negativa).

### REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il kit E.COLI O157 Latex contiene:

- Una provetta dispensatrice di *E. coli* O157 Latex Reagent, contenente particelle di lattice ricoperte con IgG di coniglio purificate che reagiscono con il sierotipo O157 di *E. coli*. Quantità sufficiente per:
  - 50 test : 17PL070 3.1 ml
  - 100 test : 17PL071 6.2 ml
- Una provetta dispensatrice di Positive Control Suspension (Controllo Positivo), contenente l'antigene del sierotipo O157:H7 di *E. coli*. Per produrre il controllo positivo vengono raccolte ed inattivate colonie del sierotipo O157:H7 di *E. coli* cresciute su terreno solido. Quantità sufficiente per:
  - 50 test : 17PL070 1.5 ml
  - 100 test : 17PL071 3.0 ml
- Una provetta dispensatrice di Negative Control Latex (Controllo Negativo), contenente particelle di ricoperte con IgG di coniglio purificate che non reagiscono con il sierotipo O157 di *E. coli*. Quantità sufficiente per:
  - 50 test : 17PL070 1.5 ml
  - 100 test : 17PL071 3.0 ml
- Test Card e bastoncini di miscelazione in quantità sufficiente per:
  - 50 test : 17PL070
  - 100 test : 17PL071

### CONSERVAZIONE

I reagenti devono essere conservati a temperature comprese tra 2 e 8°C. NON CONGELARE. I reagenti conservati in queste condizioni sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

### MATERIALE E REAGENTI NECESSARI MA NON FORNITI

- Soluzione fisiologica;
- provette per coltura;
- anse o tamponi sterili;
- pipette Pasteur sterili.

### RACCOLTA DEI CAMPIONI

Seminare il campione su terreno Sorbitolo MacConkey Agar. Subcoltivare le colonie non fermentanti il sorbitolo (NSFC) su di un terreno agarizzato non selettivo. Prelevate con cura dalla superficie dell'agar le colonie cresciute entro le 18 ore di incubazione usando un'ansa o un tampone sterili. Colonie fresche in rapida crescita rispondono al test in maniera corretta.

### AVVERTENZE

- I reagenti sono per uso diagnostico *in vitro*;
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta;
- I reagenti contengono 0.02% di sodio azide. Il composto può reagire in modo esplosivo con rame o piombo se lasciato accumulare. Anche se la quantità di sodio azide nei reagenti è minima, è necessario utilizzare una grande quantità di acqua, quando si scaricano nel lavandino i reagenti utilizzati;
- I campioni devono essere considerati a potenziale infettivo: è quindi necessario adottare precauzioni appropriate al rischio microbiologico;
- Non utilizzare i reagenti se si riscontra autoagglutinazione. L'autoagglutinazione è definita come agglutinazione di *E. coli* Latex Reagent in assenza del campione da analizzare o agglutinazione del Negative Control Latex Reagent in presenza del Positive Control Antigen o del campione da analizzare. L'autoagglutinazione può indicare che si sono verificati contaminazione o deterioramento dei reagenti;
- Per ottenere risultati attendibili, è necessario seguire scrupolosamente le procedure, le condizioni di conservazione, le precauzioni e le limitazioni specificate in queste istruzioni.

### PROTOCOLLO

- Prima dell'uso, lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente.
- Prima di analizzare i campioni, *E. coli* O157 Latex Reagent e Negative Control Latex Reagent devono essere analizzati con il Positive Control Antigen. *E. coli* O157 Latex Reagent deve mostrare agglutinazione positiva, mentre il Negative Control Latex Reagent non deve mostrare agglutinazione entro 2 minuti. Se ciò avviene, indica che i reagenti hanno mantenuto la propria attività.
- Le colonie da analizzare possono essere ottenute da colture di campioni clinici, utilizzando alternativamente: colonie non fermentanti il sorbitolo (NSFC) isolate su Sorbitolo MacConkey Agar; subcolture di NSFC cresciute su terreno agarizzato non selettivo;
- prelevare colonie appropriate dalla superficie del terreno; risospendere le colonie con 0.2 ml di soluzione fisiologica in una provetta per coltura (12x75 o equivalente) in modo da ottenere una torbidità di 3-5 McFarland;
- depositare una goccia di *E. coli* O157 Latex Reagent in uno dei cerchi disegnati su una delle Test Card fornite nel kit. Utilizzando una pipetta Pasteur sterile aggiungere una goccia del campione in esame (sospensione batterica) nel cerchio e mescolare al Latex Reagent utilizzando uno dei bastoncini di miscelazione forniti;

### IL CAMPIONE NON DEVE VENIRE IN CONTATTO CON I FLACONCINI DEI REAGENTI. NON RIUTILIZZARE I BASTONCINI DI MISCELAZIONE;

- Far oscillare delicatamente la Test Card in modo tale che la soluzione fluisca lentamente lungo tutto il cerchio e osservare per due minuti se compare agglutinazione;
- i campioni che mostrano agglutinazione entro 2 minuti devono essere ulteriormente analizzati; analizzare nuovamente i campioni positivi, utilizzando il Negative Control Latex Reagent, ripetendo la procedura descritta.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

1. Perché i risultati siano considerati attendibili, *E. coli* O157 Latex Reagent deve mostrare agglutinazione entro due minuti quando unito al Positive Control Antigen, mentre nelle stesse condizioni il Negative Control Latex Reagent non deve mostrare agglutinazione.

L'agglutinazione dei reagenti con il Positive Control Antigen deve essere interpretata come indicato di seguito:

O157 LATEX REAGENT	CONTROLLO NEG. LATEX REAGENT	NOTE
+	-	Le prestazioni dei reagenti sono corrette.
-	-	Sensibilità insufficiente. Sostituire i reagenti.
+	+	Autoagglutinazione. Sostituire i reagenti.

2. L'agglutinazione dei Latex Reagents con il campione in esame deve essere interpretata come indicato di seguito:

O157 LATEX REAGENT	CONTROLLO NEG. LATEX REAGENT	NOTE
+	-	Potenziale presenza di <i>E. coli</i> sierotipo O157.
+	+	Indica assenza di <i>E. coli</i> sierotipo O157. E' presente un ceppo autoagglutinante o cross-reattivo.
-	non necessario	Indica assenza di <i>E. coli</i> sierotipo O157.
Filamentosa o mucoide	non necessario	Non interpretabile. Preparare una sospensione fresca di cellule in soluzione fisiologica e lasciare sedimentare gli aggregati. Analizzare il surnatante.

**LIMITI DEL METODO**

- Devono essere analizzate solo culture pure prelevate da terreno Sorbitolo MacConkey Agar che presentino la tipica morfologia delle colonie di *E. coli*;
- l'interpretazione dei risultati deve basarsi sia sulla personale esperienza del microbiologo, che sull'identificazione morfologica della colonia batterica e sull'esame del test di agglutinazione;
- i campioni positivi devono essere confermati per via biochimica. Per la conferma del sierotipo di colonie positive al test di agglutinazione si devono utilizzare metodologie convenzionali con l'utilizzo di antisieri per *E. coli* O ed *E. coli* H;
- i reagenti sono stati sviluppati per identificare la presenza dell'antigene di *E. coli* sierogruppo O157. La maggior parte delle colonie che non fermentano il sorbitolo (NSFC su terreno Sorbitolo-MacConkey Agar <sup>11</sup>) che danno reazione positiva con questo test sono presuntivamente identificate come *E. coli* O157:H7. Altri ceppi di *E. coli* O157 (ad esempio H16), che non fermentano il sorbitolo, possono dare reazione positiva al test;<sup>1, 12, 13</sup>
- sebbene questo test sia stato sviluppato specificatamente per ridurre la normale cross-reattività di *Escherichia hermannii*<sup>2</sup>, ceppi non comuni potrebbero dare una cross-reazione. La crescita su cellobiosio in presenza di KCN e con pigmentazione gialla possono essere usate per la differenziazione.

**PERFORMANCE DEL METODO**

Il test è stato valutato su campioni clinici 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 *E. coli* O157 con un test commerciale. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati da test biochimici convenzionali.

Tutti i 47 campioni confermati hanno dato reazione positiva quando analizzati utilizzando il kit PRO-LAB *E. coli* O157 Latex Reagent (47/47: 100% di sensibilità).

**BIBLIOGRAFIA**

- Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 18:775-779.
- 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.
- C.D.C. 1982. Isolation of *E. coli* O157:H7 from sporadic cases of hemorrhagic colitis. United States MMRW 31:580-585.
- Johnson W.M., Lior H., Bezanson G.S. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet i:76.
- 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.
- 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.
- 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.
- Law D. 1988. Virulence factors of enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 26:1-10.
- Scotland S.M., Day N.P., Rowe B. 1980. Production of a cytotoxin affecting vero cells by strains *E. coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroups. FEMS Microbiol. Lett. 7:15-17.
- 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.
- 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.
- Borczyk A., Lior H., Cebin B. 1987. False positive identification of *Escherichia coli* in foods. Int. J. Food Microbiol. 4:347-349.
- 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.

**CONFEZIONI:**

<b>E.COLI O157 LATEX KIT</b>	<b>17PL070</b>	<b>50 test</b>
<b>E.COLI O157 LATEX KIT</b>	<b>17PL071</b>	<b>100 test</b>

**PRODUTTORE :** Prolab-Diagnostic, Canada**Codice Ramo** **CND W0105011501**