

RIDASCREEN[®] Verotoxin

Art. n°.: C 2201



R-Biopharm AG, Landwehrstr. D-64293 Darmstadt, Alemania
Telf.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El test RIDASCREEN® Verotoxin es un enzimoimmunoensayo para la identificación cualitativa de Verotoxinas 1 y 2 (Shiga-like toxinas I y II) de *Escherichia coli* en muestras de heces y en cultivos enriquecidos.

2. Resumen y explicación del test

Las enterobacteriáceas del tipo *Escherichia coli* (*E. coli*) son componentes de la flora intestinal sana del hombre, pero también de muchos animales útiles del campo. Por este motivo también se les ha designado como indicadores de las contaminaciones fecales de aguas y alimentos. Se trata de bacterias gramnegativas, de movimientos por flagelación peritrica, a menudo anaerobias y con forma de bastoncillos. Debido a los antígenos O (LPS de la membrana exterior) y a los antígenos H (antígenos flagelados) pueden dividirse a las *E. coli* en diferentes serotipos. Las *E. coli* deben considerarse como patógenas facultativas debido a la característica de sus diferentes factores patogénicos que a menudo están codificados por plásmidos o transmitidos por fagos. Desde 1977 se conoce que las *E. coli* son capaces de producir dos citotoxinas, la **Verotoxina** 1 y la 2. Los genes para estas Verotoxinas (VT) están localizados en el cromosoma en la zona de un profago. Se han aislado *E. coli* conteniendo ambos genes o solo uno de ellos. A causa de la similitud de las Verotoxinas con la Shiga-Toxina de la *Shigella dysenteriae* se les denomina también como Shiga-like Toxinas I y II (SLT-I y -II). Una parte de estas *E. coli* generadoras de Verotoxinas (VTEC) es capaz de provocar graves diarreas hemorrágicas debido a la formación de otros factores patogénicos. El „prototipo“ de estas *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) fue descrito por primera vez en 1982 y resultó pertenecer al serotipo O157:H7. Entretanto se han descubierto EHEC de los más variados serotipos O. Existen adicionalmente otros factores de patogenicidad que caracterizan al tipo EHEC, como una enterohemolisina codificada por plásmidos y una adhesina intimina, cuyo gen (*eae A*) junto a genes de otros factores de virulencia, está localizado en una isla de patogenicidad (PAI = Pathogenicity Island) en el cromosoma. Los síntomas clínicos provocados por las EHEC, van desde diarreas ligeras, pasando por gastroenteritis graves y llegan hasta las colitis hemorrágicas, que aparecen en aprox. 10 - 20 % de las infecciones. Como complicación postinfecciosa con riesgo para la vida puede ocurrir en el 5 - 10 % de las infecciones particularmente en lactantes y niños pequeños, pero también en pacientes viejos o inmunodeprimidos la formación de un síndrome urémico hemolítico (SUH) o de una púrpura trombocitopénica trombótica (PTT). La tasa de letalidad por SUH y PTT es especialmente alta en la niñez (aprox. 10 - 15 %). Es posible que se manifieste una deficiencia renal con compromiso de diálisis temporal, e incluso una pérdida irreversible de la función renal con la resultante de la necesidad permanente de diálisis. La manifestación del cuadro clínico depende por un lado de la predisposición del paciente, pero por otro lado también del fenotipo de EHEC correspondiente; lo que significa que el curso de la enfermedad también es dependiente de la

expresión diferenciada de los factores de patogenicidad. Aquí juegan un rol todavía hoy determinados factores desconocidos. El tiempo de incubación está en dependencia de la dosis de infección y está entre 1 a 3 días. Pero también puede llegar a ser de 8 días. La alta resistencia ambiental y la relativa tolerancia a los ácidos dan por resultado que la dosis de infección para las EHEC sea sólo de unos 100 gérmenes. Las fuentes de infección proceden de los alimentos contaminados obtenidos del ganado vacuno, ovejas o cabras, especialmente carne cruda o no suficientemente cocida y productos cárnicos así como de la leche cruda o certificada no pasteurizada. Pero también la cadena de infección persona-persona, especialmente en instituciones colectivas como jardines infantiles, asilo de ancianos u hospitales, o el contacto directo con los animales son de importancia. En los ambientes cercanos a los pacientes también se han detectado secretores clínicamente asintomáticos. En el diagnóstico de una infección con EHEC se ha puesto en evidencia que algunas de las rutas seguidas al principio no son suficientes. Debido a que tan solo un aproximado del 1 % de las E. coli que no pertenecen al grupo de las EHEC poseen la capacidad de la formación de enterohemolisinas, resulta de aquí que la identificación de colibacterias enterohemolíticas en sangre-agar es un indicio seguro e importante de la presencia de EHEC. Existen sin embargo EHEC que han sido aisladas de pacientes con SUH y no excretan enterohemolisina. Además se ha demostrado que el primer tipo encontrado O157 sólo es responsable de 70 - 80 % de los casos de SUH en Alemania. En las gastroenteritis puras predominan incluso otros serotipos. Por ello resulta insuficiente una identificación únicamente del serotipo O157. El procedimiento recomendado hoy en día para el diagnóstico es el enriquecimiento del patógeno toda la noche en medio mTSB (con adición de mitomicina C, 50 ng/ml) y posterior aislamiento. Al mismo tiempo se debe tratar de detectar la Verotoxina en el sobrenadante del cultivo como factor más seguro de patogenicidad. Esto se puede llevar a cabo inmunológicamente mediante ELISA o por identificación del efecto citopático en un cultivo de células Vero. En comparación con el test de citotoxicidad en células Vero la técnica ELISA, como se brinda en el test RIDASCREEN® Verotoxin EIA, resulta ser un método sencillo y practicable en cualquier laboratorio. El enriquecimiento de los gérmenes es necesario en ambos métodos, ya que la excreción de gérmenes y también el contenido de toxina en las heces pueden ser muy bajos. Especialmente en pacientes de SUH y PTT es posible que la excreción permanezca totalmente ausente. Para conseguir un resultado rápido en casos particulares se puede probar la detección de toxinas directamente en la muestra de heces sin previo enriquecimiento. Sin embargo a causa de la sensibilidad deficiente de este procedimiento se debe considerar un resultado negativo solamente como indicio transitorio. En ese caso se debe esperar por el resultado del enriquecimiento. Como terapia para los pacientes de SUH y PTT solo se recomienda un tratamiento sintomático. Este consiste regularmente en una diuresis forzada y la plasmaféresis. En caso de insuficiencia renal total se realiza una hemodiálisis o una diálisis peritoneal. La quimioterapia antibacteriana generalmente no es oportuna aquí, ya que se alargaría la excreción bacteriana y podría incluso estimularse la formación de toxinas.

3. Fundamento del test

En el test RIDASCREEN® Verotoxin se emplean anticuerpos específicos en un procedimiento sándwich. La superficie de la cavidad de la microplaca de titulación está recubierta con anticuerpos monoclonales contra Verotoxina 1 y 2. Se pipetea una suspensión de la muestra a analizar, así como los controles a temperatura ambiente (20 – 25 °C) a la cavidad de la microplaca para realizar la incubación. Después de un paso de lavado se adicionan anticuerpos conjugados con peroxidasa contra Verotoxinas y se incuba a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Ante la presencia de Verotoxina se forma un complejo sándwich entre los anticuerpos inmovilizados, las Verotoxinas y los anticuerpos conjugados. Los anticuerpos no enlazados que están marcados con una enzima se eliminan en un paso posterior de lavado. Después de añadir el sustrato, si la muestra es positiva, la enzima enlazada transforma el color de la solución en las cavidades de la microplaca de incolora hacia el azul. Mediante la adición de reactivo de parada se lleva a cabo un cambio de color del azul al amarillo. La absorbancia es proporcional a la concentración de toxinas en la muestra.

4. Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 96 determinaciones

Plate	96 determ.	Microplaca de titulación, 12 tiras de microtitulación (separables) en marco de soporte; recubiertas con anticuerpos monoclonales contra Verotoxina 1 y 2
Diluent 2	100 ml	Buffer de dilución de muestras, solución de NaCl tamponada con buffer de proteína; contiene Proclin 300 al 0,05 %; listo para el uso; teñido de verde
Wash	100 ml	Buffer de lavado, solución de NaCl tamponada con buffer de fosfato (conc.10 veces); contiene Timerosal al 0,1 %
Control +	1,8 ml	Verotoxinas inactivadas; listo para el uso; contiene Kathon al 0,1 %
Conjugate	10 ml	Anticuerpos monoclonales conjugados con peroxidasa contra Verotoxina 1 y 2 en solución de proteína estabilizada; contiene Proclin 300 al 0,05 %; listo para el uso; teñido de verde
Substrate	10 ml	Peróxido de urea/TMB; listo para el uso
Stop	6 ml	Reactivo de parada; solución 1 N de ácido sulfúrico; listo para el uso

5. Reactivos y su almacenamiento

Todos los reactivos se deben guardar entre 2 – 8 °C y pueden usarse hasta la fecha de vencimiento impresa en las etiquetas. El buffer de lavado diluido se puede conservar 4 semanas si se mantiene entre 2 – 8 °C. La contaminación microbiana se debe evitar. Después de la fecha de vencimiento no se asumen garantías de calidad. La bolsa de aluminio se debe cortar con una tijera de manera que el cierre no sea eliminado. Las tiras de microtitulación no usadas se deben guardar de inmediato en la bolsa de aluminio cerrada y a temperaturas entre 2 – 8 °C. Se debe evitar la incidencia directa de la luz sobre el sustrato incoloro para prevenir la descomposición o su coloración de azul debido a la autoxidación. Si ocurre una coloración azul no se deberá utilizar el sustrato.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- RIDA® Anreicherungsbouillon (Art. n° Z 1000)
- Pipetas desechables (Art. n°.: Z 0001)
- Vibrador Vortex (opcional, véase 9.3.)
- Micropipetas de 50 – 100 µl y de 1 ml de volumen
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Instrumento de lavado para las microplacas de titulación o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro lector de microplacas de titulación (450 nm, eventualmente filtro de referencia ≥ 600 nm)
- Papel de filtro (pañeros de laboratorio)
- Recipiente de desechos con una solución de hipoclorito al 0,5 %

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

El control positivo que se encuentra en el kit contiene Verotoxina inactivada. No obstante debe ser manejado, al igual que las muestras de los pacientes, como potencialmente infeccioso de acuerdo a las reglamentaciones nacionales de seguridad.

No se debe pipetear las muestras o reactivos con la boca, así como también evitar el contacto con piel lesionada o mucosas. Durante el trabajo con las muestras deben usarse guantes desechables y lavar las manos después del test. En los locales donde se trabaje con las muestras o reactivos de prueba no está permitido fumar, comer o beber.

El buffer de dilución de muestras y el conjugado contienen Proclin300 al 0,05 %, y el control positivo Kathon al 0,1 % como agentes conservantes. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El buffer de lavado contiene Timerosal al 0,1 % como agente conservante. Se debe evitar por tanto el contacto con la piel o mucosas.

El peróxido de urea puede conducir a efectos cáusticos sobre la piel. ¡Manéjese con cuidado!

El reactivo de parada contiene una solución 1 N de ácido sulfúrico ¡Evítese el contacto con la piel o ropa! Si se produce contacto con la piel debe enjuagarse con agua.

Todos los materiales y reactivos que entren en contacto con muestras potencialmente infecciosas se requiere que sean tratados con agentes desinfectantes adecuados o se sometan a autoclave por lo menos una hora a 121 °C. ATENCIÓN: Para evitar la formación de gases venenosos deben neutralizarse los residuos líquidos que contengan reactivo de parada antes de echarlos en la solución de hipoclorito.

8. Recolección y conservación de las muestras

El material de examen se debe guardar entre 2 – 8 °C hasta el momento de su elaboración. Si el material no puede ser usado en el espacio de 3 días, se recomienda almacenarlo a –20 °C o menor temperatura. Evite congelar y descongelar las muestras varias veces. Las muestras de heces o frotis rectales no se deben recolectar en recipientes que contengan medios de transporte, agentes conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes debido a posibles interferencias con el test RIDASCREEN® Verotoxin. Si se van a utilizar frotis rectales se debe prestar atención a que haya suficiente material de heces (aprox. 100 mg) para la realización del test. En los estudios de entorno se deben incluir también muestras de heces de personas de contacto clínicamente inaparentes para identificar portadores asintomáticos.

9. Realización del test

9.1. Generalidades

Antes de su uso se deben llevar todos los reactivos y la microplaca de titulación **Plate** a la temperatura ambiente (20 – 25 °C). Las tiras de microtitulación no se deben sacar de la bolsa de aluminio hasta que no hayan alcanzado la temperatura del ambiente. Los reactivos se deben mezclar bien inmediatamente antes de su empleo. Posterior a su uso se deben conservar las tiras de microtitulación (cerradas en su bolsa) y los reactivos otra vez a temperaturas entre 2 – 8 °C. Las tiras de microtitulación que se hayan usado una vez no pueden volverse a utilizar. Los reactivos y las tiras de microtitulación no se deben usar cuando el envase esté dañado o los recipientes hayan perdido su hermeticidad. Se debe evitar el contacto directo de las muestras con los componentes del kit para prevenir la contaminación cruzada. Se debe evitar la incidencia directa de la luz solar durante la realización del test. Se recomienda tapar o pegar la microplaca de titulación para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del buffer de lavado

Se mezcla 1 parte del buffer de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Los cristales que pudieran encontrarse en el buffer concentrado se deben solubilizar primeramente con calor (baño María a 37 °C).

9.3. Preparación de las muestras

Para obtener rápidamente un primer resultado, se puede comenzar con un test de toxinas directamente de la muestra de heces. Debido a la posibilidad de un contenido muy bajo de toxina en las heces no se debe considerar que un resultado negativo aquí signifique también negativo para las EHEC. Para lograr una mayor sensibilidad se debe, en general, – también con un resultado negativo – realizar la detección de toxinas a partir de un cultivo enriquecido. En Alemania se recomienda actualmente realizar el enriquecimiento durante toda la noche en un cultivo bajo agitación a 37 °C en medio mTSB con adición de mitomicina C (50 ng/ml). Otros medios usados para enriquecimientos, como BRILA o GN-Bouillon, no mostraron en el RIDASCREEN® Verotoxin EIA influencias negativas (efectos de matriz); sin embargo estos productos no corresponden a los medios recomendados por las asociaciones especializadas.

9.3.1. Exámenes a muestras frescas o congeladas de heces

La muestra de heces se diluye con el buffer de dilución de muestras para Verotoxina 1 : 5 (v/v). Se utiliza en este paso una pipeta desechable (Art. n°: Z 0001) y se aspira 1 ml de muestra líquida mezclándola con 4 ml de buffer en un tubo rotulado. Para heces sólidas se usa un asa de siembra desechable y se toma un volumen semejante de muestra.

La homogeneización de la suspensión de heces se efectúa mediante aspiración y expulsión con la pipeta desechable o alternativamente por agitación en un vibrador Vortex. Después de un breve reposo (10 min de sedimentación para clarificar) se toman 100 µl del sobrenadante de la suspensión y se aplican directo en el test.

¡Atención! El examen con una muestra de heces no enriquecida solo debe valorarse, debido a su baja sensibilidad, como un pre-análisis rápido para casos de alta urgencia por evidencias anamnéticas. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente. En este caso es preciso esperar por el resultado del estudio con el cultivo enriquecido.

9.3.2. Exámenes a las muestras a partir del cultivo de enriquecimiento

El procedimiento descrito aquí está en concordancia con las recomendaciones del RKI (Robert-Koch-Instituto) y del BfR (Instituto Federal de Evaluación de Riesgos). Ud. debe tener en cuenta también las instrucciones del test RIDA® Anreicherungsbouillon (Art. n° Z 1000). El sobrenadante de un cultivo de enriquecimiento (RIDA® Anreicherungsbouillon) se puede utilizar sin previa dilución directamente en el test después de una breve centrifugación.

¡Atención! Es preciso controlar que exista igualdad de temperaturas entre el caldo y el control negativo (ambos deben estar al comenzar el test adaptados a la temperatura ambiente, o sea, 20 – 25 °C). Una temperatura elevada en el caldo puede causar valores positivos falsos de OD.

Primeramente se añaden 100 µl de muestra de heces líquida o una cantidad equivalente (50 – 100 mg) de una muestra sólida a 4 ml de medio mTSB conteniendo mitomicina C (por ej. RIDA® Anreicherungsbouillon, Art. n° Z 1000) y se incuban bajo agitación (aprox. 120 - 160 rpm) y suficiente entrada de oxígeno a 37 °C durante 18 y 24 horas como máximo. Para el mezclado son adecuados un agitador oscilante horizontal o un mezclador rotativo. Después de la incubación se le aplica una centrifugación a toda la muestra a 3000 rpm unos 15 minutos. Del sobrenadante claro se toman 100 µl para su análisis en el ELISA.

Los sedimentos, al igual que las muestras de heces originales, se deben conservar para posteriores análisis de comprobación. La conservación ideal se realiza mediante la absorción del sedimento con una torunda y la transferencia del mismo a un medio de transporte adecuado (Amies, Stuart o Cary-Blair) y después su almacenamiento entre 2 – 8 °C hasta el momento de su envío.

9.4. Primera incubación

Después de introducir una cantidad suficiente de cavidades en el marco de soporte se pipetea en cada una 2 gotas (100 µl) del control positivo **Control | +**, del buffer de dilución de muestras **Diluent | 2** (= control negativo) o de la muestra de heces en suspensión y se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C). En lugar del **Diluent | 2** se puede usar también caldo de enriquecimiento sin inocular como control negativo.

9.5. Lavado

Un lavado cuidadoso es importante para lograr resultados correctos por lo cual éste debe llevarse a cabo estrictamente según las instrucciones. Las muestras incubadas en las cavidades se deben vaciar primeramente en un recipiente de desechos con hipoclorito para la desinfección. Posteriormente se sacude la placa sobre un papel absorbente para eliminar los restos de humedad. Seguidamente se lava 5 veces con 300 µl de buffer de lavado en cada caso. Después de cada enjuague se debe prestar atención a vaciar completamente la placa sacudiéndola sobre partes secas y no usadas del papel.

Cuando se usen lavadores automáticos se debe poner atención al ajuste correcto del instrumento al tipo de microplaca utilizado. Igualmente se debe velar por una aspiración completa del líquido. Después del último lavado se debe sacudir la placa cuidadosamente sobre papel absorbente limpio o paños de laboratorio para eliminar la humedad residual. Para obtener resultados óptimos en el proceso de lavado se recomienda utilizar el modo de rebose con al menos 600 µl de buffer de lavado por cavidad y paso de enjuague. Es posible aumentar a más de 5 los pasos de enjuague y en casos particulares esto conduce a mejores resultados de lavado.

9.6. Segunda incubación

Se adicionan en las cavidades 2 gotas (100 µl) del anticuerpo conjugado con enzima, **Conjugate** se mezcla bien y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavado

Lavar según el punto 9.5. **¡Obsérvense estrictamente las instrucciones!**

9.8. Tercera incubación

Añadir 2 gotas de sustrato (100 µl) **Substrate** a cada uno de los pocillos. A continuación se incuba la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente (20 - 25 °C) en la oscuridad. Después se adiciona 1 gota (50 µl) de reactivo de parada **Stop** en todos los pocillos para detener la reacción. Se mezcla cuidadosamente (con ligeros golpes en los bordes de la placa) y se mide la absorbancia a 450 nm (opcional: Longitud de onda de referencia \geq 600 nm) La compensación del valor cero se debe realizar contra aire, o sea sin la microplaca.

Aviso : Muestras de pacientes con altos positivos pueden dar lugar a precipitados negruzcos del sustrato.

10. Control de calidad – Indicios de reactivos vencidos

Como control de calidad en cada determinación se debe añadir un control positivo y otro negativo para asegurar la estabilidad de los reactivos y un correcto desarrollo del test. El test ha transcurrido correctamente si el valor de absorbancia (O.D.) del control negativo a 450 nm es menor que 0,2 y el valor medido para el control positivo a 450 nm es mayor de 0,8. Si el valor del control negativo es mayor de 0,2 esto puede ser un indicio de que no se ha enjuagado suficientemente. Una desviación de los valores requeridos, lo mismo que una turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de ser transferidos a las cavidades, puede ser un indicio de vencimiento de los reactivos. Si los valores predefinidos no se cumplen, se deben verificar los siguientes puntos antes de repetir el análisis:

- Durabilidad de los reactivos empleados
- Funcionamiento correcto de los instrumentos utilizados (por ej. la calibración)
- Ejecución correcta del test
- Control visual de los componentes del kit con respecto a contaminación o pérdida de hermeticidad; una solución de sustrato azulada no se debe volver a usar.

Si al repetir la determinación se obtienen nuevamente valores incorrectos Ud. debe dirigirse al fabricante o a su distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del valor límite

En dependencia del material de análisis (sobrenadante de cultivos enriquecidos o muestra de heces sin tratar) es preciso considerar en la evaluación del test un valor límite diferente.

11.2.1. Exámenes a las muestras a partir del cultivo de enriquecimiento

Para establecer el valor límite (cut-off) se le suma 0,1 al valor de absorbancia obtenido para el control negativo.

$$\text{cut-off (Valor límite)} = \text{Valor de absorbancia del control negativo} + 0,1$$

11.2.2. Exámenes a muestras frescas o congeladas de heces (no enriquecidas)

Para establecer el valor límite (cut-off) se le suma 0,2 al valor de absorbancia obtenido para el control negativo.

$$\text{cut-off (Valor límite)} = \text{Valor de absorbancia del control negativo} + 0,2$$

11.3. Resultado del test

Se evalúan como **positivas** las muestras cuyo valor de absorbancia es mayor o igual que el valor límite calculado.

Se denominan como muestras de **valores límites** y que deben repetirse, aquellas cuyo valor de absorbancia está en el rango de 10 % por encima o por debajo del valor límite. Si una repetición del análisis con una muestra de heces fresca posee de nuevo valores que corresponden al rango gris, entonces se debe evaluar la muestra como negativa.

Las muestras cuyos valores se encuentren más de un 10 % por debajo del valor límite calculado se evalúan como **negativas**.

12. Limitaciones del método

El test RIDASCREEN® Verotoxin identifica en muestras de heces o en cultivos enriquecidos las Verotoxinas 1 y 2 generadas por la E. coli. No es posible a partir de este test deducir una relación entre la magnitud de un valor de absorbancia obtenido y la manifestación o gravedad de síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos siempre deben interpretarse de conjunto con el cuadro clínico. Un resultado positivo de toxinas junto a una identificación simultánea del germen se puede valorar como el método más seguro para la detección de las EHEC.**

Un resultado **positivo** no excluye la presencia de otros agentes infecciosos.

Un resultado **negativo** no excluye una posible infección con E. coli productoras de Verotoxina. La causa de ello puede ser una excreción intermitente del agente infeccioso o una cantidad demasiado baja de antígeno en la muestra.

Si existe la sospecha anamnésica fundada de una infección con E. coli productoras de Verotoxina, entonces se debe repetir el análisis con otra muestra de heces.

Algunas cepas de las EHEC producen sólo pequeñas cantidades de Verotoxina. Debido a que con frecuencia el contenido de Verotoxina presente en una muestra de heces es bajo, se considera por consiguiente que el análisis directo de toxinas en las heces como único método no es lo suficientemente sensible.

Un hallazgo positivo de toxinas en las heces brinda un rápido indicio de una posible infección con EHEC. En caso de un resultado negativo, sin embargo, no se puede excluir una infección con EHEC.

Un resultado **con valores límites** puede ser ocasionado por una distribución no homogénea de las bacterias en la muestra de heces. Por este motivo se debe examinar en tales casos una segunda suspensión de la misma muestra o solicitar otra muestra de heces para repetir el análisis.

Ante un hallazgo positivo de toxinas se debe siempre realizar un aislamiento de la 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 EHEC podría incluso resultar negativa la identificación de toxinas en un cultivo enriquecido. En dependencia de las condiciones de cultivo podría suceder que el enriquecimiento no hubiera transcurrido de forma óptima. Adicionalmente 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 un test en él diera negativo. La razón pudiera ser el bajo contenido de EHEC en la flora fisiológica de E. coli (parcialmente solo una EHEC por 200 - 300 E. coli), pero también la suspensión de la producción y excreción de toxinas en determinadas condiciones de crecimiento. De manera que es posible tener un resultado positivo de toxinas en el análisis directo de las heces (débil) y que sin embargo sea negativo para el cultivo.

A causa de la extrema sensibilidad del test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA es posible que en los exámenes de heces originales se obtenga un valor límite o positivo débil, pero podría también ser debido a los efectos inespecíficos de la matriz. Por este motivo se debe prestar especial atención a un lavado extremadamente meticuloso en las investigaciones directas de heces.

En los casos de presencia de síndromes postinfecciosos como el 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 el test de Verotoxina ELISA da negativo. Por eso es importante que las muestras de heces se investiguen lo más temprano posible durante la fase entérica.

Como punto adicional deseamos hacer mención del Plan de Niveles de Diagnóstico de EHEC recomendado por el Centro Nacional de Referencia del Instituto Robert-Koch (Ref. bibl. 15).

13. Características de rendimiento

13.1. Calidad del test

En un estudio clínico se evaluó el test RIDASCREEN® Verotoxin con un total de 223 muestras de heces después de su enriquecimiento; 221 de estas muestras se analizaron adicionalmente en forma directa a partir de la suspensión diluida de las heces originales. Como método de referencia se empleó un test de citotoxicidad en células Vero. Paralelamente se comparó el test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA también con otro método comercializado de enzimoimmunoensayo para Verotoxina certificado por el Instituto Paul Ehrlich. Los resultados del estudio de los sobrenadantes de cultivos enriquecidos se resumen en la Tabla 1. Los sobrenadantes se diluyeron 1 : 5 para realizar el test de citotoxicidad. En ambos enzimoimmunoensayos se procedió de acuerdo a las instrucciones de cada fabricante.

Tabla 1: Resultados del RIDASCREEN® Verotoxin EIA con sobrenadantes de cultivos enriquecidos

		RIDASCREEN® EIA (después de enriquecimiento)		otro EIA (después de enriquecimiento)	
		+	-	+	-
Test de citotoxicidad * (después de enriquecimiento)	+	24	6	22	8
	-	3	190	3	190

* a partir de una muestra que no se reconoció como positiva en el test de citotoxicidad, fue posible aislar una VTEC; esta muestra fue considerada en el cálculo de la sensibilidad y de la especificidad como positiva

	RIDASCREEN® EIA		otro EIA
Sensibilidad:	83,3 %	Sensibilidad:	76,6 %
Especificidad:	98,4 %	Especificidad:	98,4 %

Los resultados del estudio de muestras de heces originales en el EIA sin enriquecimiento se resumen en la Tabla 2. Como método estándar fue empleado el test de citotoxicidad en cultivos enriquecidos. Las muestras de heces fueron diluidas 1 : 5 en medio TSB para los tests de citotoxicidad y RIDASCREEN® EIA. En el otro enzimoimmunoensayo se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Tabla 2: Resultados del RIDASCREEN[®] Verotoxin EIA con muestras de heces originales

		RIDASCREEN [®] EIA (con heces sin tratar)		otro EIA (con heces sin tratar)	
		+	-	+	-
Test de citotoxicidad * (después de enriquecimiento)	+	9	19	11	17
	-	3	190	1	192

* a partir de una muestra que no se reconoció como positiva en el test de citotoxicidad, fue posible aislar una VTEC; esta muestra fue considerada en el cálculo de la sensibilidad y de la especificidad como positiva

RIDASCREEN [®] EIA		otro EIA	
Sensibilidad:	35,7 %	Sensibilidad:	42,8 %
Especificidad:	98,4 %	Especificidad:	99,5 %

En las investigaciones con muestras de heces originales sin enriquecimiento se observó en el test de citotoxicidad una sensibilidad baja similar (resultados no se presentan). A partir de estos resultados se puede no obstante concluir que la identificación directa de Verotoxina en muestras de heces sin enriquecimiento previo de los gérmenes no es suficiente como método de rutina debido a su demasiado baja sensibilidad y por tanto siempre requiere de verificación realizando determinaciones con cultivos enriquecidos.

13.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica de los tests RIDASCREEN[®] Verotoxin se comparó con la de otro EIA certificado para Verotoxina. Para ello se diluyeron los sobrenadantes de cultivos parcialmente purificados de cepas definidas, las cuales producen VT 1 o VT 2, en series de dilución en los correspondientes buffer de dilución de cada test y se midió la absorbancia. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Debido a que hasta ahora no se dispone de estándar de referencia para las Verotoxinas, se renunció a indicar la concentración proteínica de las preparaciones.

Tabla 3: Sensibilidad analítica del RIDASCREEN® Verotoxin EIA

Dilución	VT 1		VT 2	
	RIDASCREEN® EIA	otro EIA	RIDASCREEN® EIA	otro EIA
1 : 300	2,38	2,10	3,35	2,40
1 : 900	1,07	1,33	2,95	1,99
1 : 2.700	0,47	0,54	3,00	1,38
1 : 8.100	0,35	<u>0,18</u>	1,65	0,81
1 : 24.300	<u>0,20</u>	0,06	0,54	<u>0,23</u>
1 : 72.900	0,10	0,05	<u>0,20</u>	0,06
1 : 218.700	0,08	0,05	0,12	0,05

	RIDASCREEN® EIA	otro EIA
Control positivo:	2,83	1,64
Control negativo:	0,07	0,05
Valor límite:	0,17	0,18

13.3. Reactividad cruzada

Los gérmenes relevantes se incubaron toda la noche en un medio de enriquecimiento a 37 °C y los cultivos que contenían más de 10⁶ gérmenes/ml se sometieron, según las instrucciones del test, a la reacción en el ELISA (Tab. 5). Además se aislaron los siguientes gérmenes a partir de las muestras durante el estudio clínico, los cuales no presentaron reactividad en el test RIDASCREEN® Verotoxin (Tab. 4):

Tabla 4: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos (de las muestras de heces de pacientes)

Microorganismo	RIDASCREEN® Verotoxin
Campylobacter jejuni	negativo
Candida albicans	negativo
Clostridium difficile	negativo
Cryptosporidium	negativo
Giardia lamblia	negativo
Proteus	negativo
Salmonella typhimurium	negativo
Salmonella enteritidis	negativo
Staph. aureus	negativo
Yersinia enterocolitica	negativo
Adenovirus	negativo
Rotavirus	negativo

Tabla 5: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos (de cultivos)

Microorganismo	DO _{450nm} - DO _{620nm}
Acinetob. Iwoffii DSM 2403	0,001
Aeromonas hydrop. anaerogenes DSM 30188	0,002
Aeromonas hydrop. hydrophila DSM 30016	0,000
Campylobacter coli	0,008
Campylobacter fetus	0,008
Campylobacter jejuni	0,018
Citrob. freundii*	0,000
Citrob. freundii DSM 30039	0,006
Enterob. cloacae DSM 30054	0,005
Enterococcus faecalis DSM 2570	0,010
Enterococcus faecium ATCC 27164	0,009
E. coli*	0,002
E. coli*	0,002
E. hermanii DSM 4560	0,005
Lactococcus lactis DSM 20481	-0.005
Listeria innocua*	-0,008
Morganella morganii	0,084
Proteus mirabilis DSM 788	0,004
Proteus mirabilis DSM 4479	-0,005
Proteus vulgaris DSM 30119	-0,007
Providencia stuartii DSM 6676	-0,003
Pseudom. aerug. DSM 939	0,014
Pseudom. fluorescens DSM 4358	0,006
Pseudom. fluorescens DSM 50124	0,008
Salmonella Agona*	0,017
Salmonella Braenderup*	-0,003
Salmonella infantis*	-0,005
Salmonella Ohio*	0,001
Salmonella typhimurium*	0,000
Serratia proteamaculans DSM 4487	0,005
Shigella flexneri DSM 4782	0,008
Shigella sonnei DSM 5570	-0,006
Staph. aureus DSM 20372	0.042
Staph. aureus*	-0.004
Strep. agalactiae*	-0,003
Strep. dysgalactiae*	-0,001

Strep. uberis*	0,001
E. coli 026:H8 VT1	2,196
Control positivo E. coli VT 1+2 (0157:H7)	2,401
Control negativo (mTSB)	0,004
Control positivo (Kit de pruebas)	2,008
Cut-off (Valor límite)	0,104
* aislamiento	

13.3. Precisión

La reproducibilidad intraensayo se determinó con preparaciones de Verotoxina 1 y 2 (VT 1 y VT 2) en 4 concentraciones diferentes mediante mediciones con 24 repeticiones para cada una. Se precisaron el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad. La reproducibilidad interensayo se estableció con preparaciones de Verotoxina 1 y 2 (VT 1 y VT 2) en 4 concentraciones diferentes mediante mediciones con 11 repeticiones independientes para cada una (3 lotes de kits de prueba, 5 técnicos de laboratorio en 7 distintos días). Se precisaron el valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad (11 determinaciones por cada muestra). Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Reproducibilidad del test RIDASCREEN® Verotoxin EIA

	negativo	positivo débil	positivo	positivo acentuado
<u>Intra-Ensayo VT 1</u>				
Absorbancia promedio	0,05	0,651	1,227	1,887
Desv. estándar	0,009	0,046	0,058	0,101
Coeficiente de variabilidad (%)	17,93	7,06	4,75	5,37
<u>Intra-Ensayo VT 2</u>				
Absorbancia promedio	0,06	0,869	1,646	2,472
Desv. estándar	0,008	0,053	0,08	0,063
Coeficiente de variabilidad (%)	13,46	6,1	5,07	2,53
<u>Inter-Ensayo VT 1</u>				
Absorbancia promedio	0,056	0,626	1,192	2,105
Desv. estándar	0,008	0,092	0,105	0,111
Coeficiente de variabilidad (%)	14,80	14,70	8,80	5,29
<u>Inter-Ensayo VT 2</u>				
Absorbancia promedio	0,056	0,602	1,157	2,088
Desv. estándar	0,008	0,051	0,094	0,133
Coeficiente de variabilidad (%)	14,80	8,41	8,15	6,37

Bibliografie

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)