



ISTRUZIONI PER L'USO

O157 E. COLI CARD PLUSTEST IMMUNOCROMATOGRAFICO RAPIDO PER LA DETERMINAZIONE QUALITATIVA DI *E. COLI O157* IN CAMPIONI DI FECI UMANE, CAMPIONI ALIMENTARI E IN COLONIE SOSPETTE**1 – INTRODUZIONE E DESTINAZIONE D'USO**

L'infezione da *Escherichia coli O157:H7* (*Escherichia coli* enteroemorragico, EHEC) presenta un ampio spettro di manifestazioni cliniche, tra cui diarrea non sanguinolenta, colite emorragica, sindrome emolitico-uremica (HUS) e porpora trombocitopenica (TTP). L'*Escherichia coli O157:H7* non solo è un importante agente della colite emorragica, ma è anche una delle principali cause di diarrea batterica. Alcuni soggetti possono essere portatori sani senza manifestazione di sintomi.

La trasmissione dell'*Escherichia coli O157:H7* avviene principalmente per via alimentare. Si ritrova più comunemente nella carne poco cotta, ma anche nei prodotti caseari. Importante anche la diffusione secondaria da persona a persona. L'organismo produce almeno due tossine Shiga-like. Si ritiene che queste tossine abbiano un significato patogeno diretto nell'infezione da *Escherichia coli O157:H7*. Questa infezione viene solitamente diagnosticata da coprocultura positiva, dalla presenza di tossine Shiga-like o da entrambe. La raccolta tempestiva (entro 7 giorni dall'inizio della malattia) di un campione di feci per la coltura è indispensabile per ottenere un'elevata percentuale di recupero.

O157 E. COLI CARD PLUS è un test immunocromatografico manuale e rapido per la rilevazione qualitativa di *Escherichia coli O157:H7* negli alimenti e nei campioni di feci umane, per aiutare la diagnosi delle infezioni da *E. coli*. È possibile rilevare l'*E. coli O157:H7* da colonie sospette in colture di feci. Il test include il controllo positivo. Il test offre un'analisi di screening semplice e altamente sensibile per effettuare una diagnosi presuntiva di infezione da *Escherichia coli O157:H7* e può essere utilizzato per identificare isolati sospetti di *E. coli O157:H7* da terreni selettivi.

2 – PRINCIPIO DEL METODO

O157 E. COLI CARD PLUS è un metodo immunocromatografico assolutamente non invasivo, semplice da eseguire, rapido e molto preciso nel risultato, per la determinazione di *Escherichia coli O157:H7* in campioni alimentari, in campioni fecali e in colonie sospette provenienti da coltura fecale.

Nel device vi è una strip costituita da una membrana di nitrocellulosa pre-rivestita con anticorpi specifici per *Escherichia coli O157:H7* in corrispondenza della banda test e con anticorpi policlonali di coniglio contro una proteina specifica, sulla linea di controllo (C). Il tampone assorbente della strip viene spruzzato con una soluzione contenente anticorpi anti-*Escherichia coli O157:H7* coniugati con lattice di polistirene rosso e con una soluzione contenente una proteina legante specifica coniugata con lattice di polistirene verde, formando complessi coniugati colorati. Se il campione è positivo per *Escherichia coli O157:H7*, gli antigeni del campione diluito reagiscono con il complesso di colore rosso (anticorpi anti-*Escherichia coli O157:H7* e microsferi di polistirene rosso), precedentemente pre-essiccata sul tampone assorbente. La miscela si muove quindi lungo la membrana per azione capillare. Mentre il campione scorre, trascina anche i complessi coniugati. Gli anticorpi anti-*Escherichia coli O157:H7* presenti sulla membrana (linea del test) catturano il coniugato colorato e si formerà una linea colorata (rossa). Questa banda viene utilizzata per interpretare il risultato.

Se il campione è negativo, non c'è presenza di antigeni di *Escherichia coli O157:H7* oppure gli antigeni possono essere presenti in una concentrazione inferiore al valore limite di rilevabilità, per cui la reazione non avverrà con il complesso coniugato di colore rosso. Gli anticorpi anti-*Escherichia coli O157:H7* presenti sulla membrana (linea di test) non cattureranno il complesso coniugato antigene-rosso (non formato), per cui non apparirà la linea rossa.

Indipendentemente dal fatto che il campione sia positivo o meno, la miscela continua a muoversi attraverso la membrana verso gli anticorpi specifici immobilizzati posti nella linea di controllo. Gli anticorpi anti-specifici presenti sulla membrana cattureranno il complesso verde-coniugato del controllo e apparirà sempre la banda di controllo. La presenza di questa linea verde serve a: 1) verificare che sia stato aggiunto un volume sufficiente, 2) verificare che il flusso sia corretto e 3) come un controllo interno per i reagenti.

3 – MATERIALI FORNITI – CONFEZIONAMENTO

Prodotto	Tipologia	REF	Confezione
O157 E. COLI CARD PLUS	Test immunocromatografico	VC1010P (25 test)	25 buste di alluminio sigillate contenenti la card e un essiccante. 1 flacone di plastica con tappo gocciolatore contenente il liquido di estrazione. Usare anche come controllo negativo (1 x 20 mL). 1 flacone di vetro con tappo gocciolatore rosso contenente il controllo positivo, componenti non infettivi e NaN ₃ come conservante (1 x 0,5 mL). 5 pipette di plastica. Imballo secondario: scatola di cartone.

4 – MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Dispositivi per la raccolta dei campioni; Provette/tubi da saggio; Guanti monouso; Cronometro. Incubatori +37°C ± 1°C e acqua purificata. Terreno di arricchimento per O157 E.COLI (Ref. Biolife 551425), Bagmixer 1 (Ref. Biolife 7221230), Sorbitol MacConkey Agar (Ref. Biolife 541669S).

5 – PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- Tutte le operazioni riferite all'esecuzione del test devono essere condotte in accordo alle Buone Pratiche di Laboratorio.
- O157 E. COLI CARD PLUS è un kit qualitativo per l'uso diagnostico *in vitro*, per il solo uso professionale; deve essere utilizzato da personale di laboratorio qualificato e adeguatamente addestrato.
- Questo prodotto è classificato non pericoloso in accordo alla Legislazione Europea vigente.
- Evitare di toccare le strisce di nitrocellulosa con le dita.
- Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi e manipolati nello stesso modo di agenti infettivi.
- Ciascuna card deve essere usata una sola volta.
- Non usare reagenti di altri lotti o di altri kit.
- La card deve rimanere nella busta chiusa fino al suo utilizzo; e comunque eseguire il test entro 2 ore dall'apertura della busta.
- Non usare la card se la busta è danneggiata.
- La presenza di linee gialline nella finestra dei risultati visibili prima dell'esecuzione del test è del tutto normale. Questo non influenza la funzionalità del test.
- Usare i guanti per la manipolazione dei campioni.
- Eliminare i guanti, i liquidi di estrazione, le provette e le card utilizzate rispettando le regole di laboratorio utilizzando appositi contenitori per il rischio biologico.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza e non usare il test se la confezione è danneggiata. La qualità dei reagenti non può essere garantita oltre la data di scadenza o se il kit è conservato in condizioni non appropriate.
- Il Certificato di Analisi e la Scheda Dati di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito web: www.masciabrunelli.it.





- Se il dispositivo contiene materie prime di origine animale, la materia prima in questione proviene da animali che sono stati macellati in un macello autorizzato e che, a seguito di un'ispezione antemortem, non hanno mostrato alcun segno di malattia trasmissibile all'uomo o agli animali. In ogni caso si raccomanda di trattare il kit come potenzialmente infettivo, e di manipolarlo osservando le consuete precauzioni specifiche: non ingerire, inalare o far entrare in contatto con pelle, occhi, mucose.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.
- Comunicare a Mascia Brunelli Spa e alle Autorità competenti qualsiasi incidente grave verificatosi in relazione al dispositivo diagnostico in vitro. complaint@masciabrunelli.it

6 – CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E DATA DI SCADENZA

Conservare nella confezione sigillata in frigorifero o a temperatura ambiente (2-30°C/36-86°F). Il kit è stabile fino alla data di scadenza stampata sulla confezione se opportunamente conservato. I dispositivi (card) devono rimanere nelle buste chiuse fino all'utilizzo. Non usare la card dopo 2 ore dall'apertura. Non congelare.

7 – RACCOLTA DEL CAMPIONE E PROCEDIMENTO PER CAMPIONI FECALI

Campioni fecali: I campioni devono essere raccolti in un contenitore pulito ed asciutto e conservati a +2°C - +8°C per **1-2 giorni** prima di essere testati. Per periodi di stoccaggio più lunghi, massimo **un anno**, i campioni vanno congelati a -20°C. In questo caso, il campione andrà completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima di poter essere processato. Omogeneizzare il campione fecale e procedere appena possibile alla preparazione. Non sono raccomandati cicli di congelamento e scongelamento.

Preparazione dei campioni

Utilizzare un tampone o un bastoncino, un contagocce e una provetta o una provetta per ogni campione. Dispensare 0,7 mL (o 14 gocce) di tampone di estrazione in una provetta. Prelevare il campione con un bastoncino, toccando le feci in *quattro* punti diversi. Verificare di trasferire una piccola quantità di feci (circa 125 mg). Porre il bastoncino all'interno della provetta e miscelare per ottenere una soluzione omogenea. Se necessario ripetere queste operazioni fino ad ottenere una soluzione giallo scuro-bruna.

Trasferire poche feci, miscelare poco la soluzione o lasciare le feci in sospensione nella provetta può dare origine a risultati falsi negativi. Miscelare il campione su vortex prima dell'uso. L'aggiunta di una quantità superiore di feci potrebbe dare luogo a risultati non validi per la migrazione difficoltosa del campione lungo la membrana. Per **feci liquide o semi-solide** usare una pipetta di trasferimento, prelevando una quantità di feci dal campione stesso. Dispensare 125µL del campione fecale in una provetta contenente il liquido di estrazione (0,7 mL o 14 gocce). Agitare delicatamente e assicurarsi che il campione sia ben disperso.

Procedimento del test

Prima di effettuare il test lasciare che i campioni di feci e il liquido di estrazione raggiungano temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F). Non aprire le buste con le card fino a quando non si è pronti ad effettuare l'analisi.

1. Togliere la card dalla busta e usare il prima possibile. Identificarla con i dati del paziente.
2. Usare una card per ciascun campione. Prelevare con una pipetta del liquido dalla parte superiore della provetta contenente il campione e il liquido di estrazione.
3. Dispensare 4 gocce nel pozzetto del campione. Far partire il cronometro.
4. Leggere il risultato 10 minuti dopo aver dispensato il campione. Non superare i 10 minuti.

Se il test non funziona a causa di particelle solide, agitare il campione aggiunto nella finestra del campione (S) con il bastoncino. Se non funziona, dispensare una goccia di diluente fino a vedere il liquido scorrere nella zona di reazione.

8 – RACCOLTA DEL CAMPIONE E PROCEDIMENTO PER CAMPIONI ALIMENTARI

I campioni di cibo devono essere raccolti in contenitori puliti e il test deve essere eseguito subito dopo la raccolta. I campioni possono essere conservati in frigorifero (2-4 °C) per 1-2 giorni prima del test. Per una conservazione più lunga, il campione deve essere conservato congelato a -20°C. In questo caso, il campione deve essere completamente scongelato e portato a temperatura ambiente prima del test. Assicurarsi che venga scongelata solo la quantità necessaria, poiché non sono raccomandati cicli di congelamento e scongelamento. Omogeneizzare il campione il più accuratamente possibile prima della preparazione.

Arricchimento del campione

- Miscelare 25 g di campione solido o 25 mL di campione liquido con 225 mL di terreno di arricchimento: ECBroth ; se necessario, omogeneare con un omogenizzatore per 2 minuti. (Bagmixer 1) .
- Incubare per 18-24 ore a 37°C ± 1°C.

Procedimento del test

Prima di effettuare il test lasciare che i campioni e il liquido di estrazione raggiungano temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F). Non aprire le buste con le card fino a quando non si è pronti ad effettuare l'analisi.

1. Trasferire 1 o 2 mL di campione arricchito in una provetta e coprirlo. Prima di aprirla, portare a temperatura ambiente solo il numero di test necessari per l'analisi.
2. Utilizzare un dispositivo diverso per ogni campione. Estrarre un po' di liquido dalla parte superiore con un contagocce e dispensare 150 µL nel pozzetto del campione. Avviare il timer.
3. Leggere il risultato a 5 minuti dall'erogazione del campione.

9 – PROCEDIMENTO PER COLONIE SOSPETTE

Colonie sospette di *E. coli* O157:H7 in coprocultura. Il Sorbitol MacConkey Agar (Biolife Ref. 541669S) è il metodo di scelta per l'isolamento di *E. coli* O157:H7 (atmosfera aerobica, 24 ore/37°C). Dopo 24 ore di incubazione in terreno selettivo, le colonie tipiche di *E. coli* O157:H7 si presenteranno incolori.

1. Esaminare le piastre dopo 1 giorno di incubazione. Selezionare le colonie tipiche di *E. coli* O157:H7. Dispensare 0,7 mL (o 14 gocce) di tampone di estrazione in una provetta di raccolta. Con un'ansa da inoculo prelevare 3 o 4 colonie sospette di *E. coli* O157:H7 e aggiungerle alla provetta di raccolta.
2. Chiudere la provetta contenente il tampone di estrazione e le colonie sospette. Agitare la provetta per assicurare una buona dispersione del campione.

Procedimento del test

Prima di effettuare il test lasciare che i dispositivi e il liquido di estrazione raggiungano temperatura ambiente (15-30°C/59-86°F). Non aprire le buste con le card fino a quando non si è pronti ad effettuare l'analisi.

1. Togliere la card dalla busta e usare il prima possibile. Identificarla con i dati del paziente.
2. Usare una card per ciascun campione. Prelevare con un contagocce una quantità di liquido estratto.
3. Dispensare 4 gocce nel pozzetto del campione. Far partire il cronometro.





4. Leggere il risultato 10 minuti dopo aver dispensato il campione. Non superare i 10 minuti.

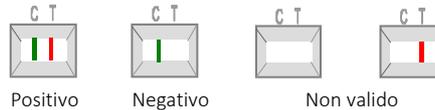
10 – PROCEDIMENTO PER I CONTROLLI

Portare i reattivi e i dispositivi a temperatura ambiente prima di effettuare il test.

1. Togliere la card dalla busta e usare il prima possibile. Identificarla con i dati del controllo positivo.
2. Dispensare 2-3 gocce (circa 100 µL) di controllo positivo/negativo nel pozzetto del campione. Far partire il cronometro.
3. Leggere il risultato 10 minuti dopo aver dispensato il controllo. Non superare i 10 minuti.

11 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati devono essere interpretati nel seguente modo:



	E. coli O157:H7	Interpretazione dei risultati
1.	- VERDE	Assenza di <i>E. coli</i> O157:H7. Nessuna infezione causata da <i>E. coli</i> O157:H7. Risultato negativo.
2.	+ ROSSO-VERDE	Presenza di <i>E. coli</i> O157:H7. L'infezione da <i>E. coli</i> O157:H7 si presenta con un ampio spettro di manifestazioni cliniche, tra cui diarrea non sanguinolenta, colite emorragica, sindrome emolitico-uremica (HUS) e porpora trombocitopenica (TTP). Alcuni soggetti potrebbero essere portatori sani.
3.	ALTRI RISULTATI	Risultati non validi, si consiglia di ripetere il test usando lo stesso campione con un'altra card.

NON VALIDO: Assenza totale di linee di controllo (VERDE) indipendentemente dalla comparsa o meno delle linee test (ROSSO). Volume insufficiente del campione, tecniche procedurali errate o deterioramento dei reagenti sono le ragioni principali della mancanza delle linee di controllo. Rivedere la procedura e ripetere il test con un nuovo dispositivo. Se i sintomi o la situazione persistono e contattare il distributore locale.

NOTA ALL'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'intensità della linea test rossa (T) nella finestra dei risultati varia in funzione della concentrazione di antigeni presenti nel campione, tuttavia, non è possibile effettuare nessuna valutazione quantitativa così come nessun tasso di aumento degli antigeni.

12 – CONTROLLO QUALITÀ INTERNO

In ogni striscia reattiva è inclusa la procedura di Controllo Qualità interno. La formazione della banda di controllo "C" conferma che la tecnica procedurale è corretta e che il volume del campione è sufficiente.

13 – VALORI ATTESI

L'*Escherichia coli* O157:H7 causa ogni anno 73.000 malattie negli Stati Uniti. Ciò significa 8.598 casi, il 17% dei quali richiede ricoveri ospedalieri, il 4% casi di sindrome emolitico-uremica e lo 0,5% di decessi. Le principali vie di trasmissione sono: 52% per via alimentare, 21% sconosciuta, 14% da persona a persona, 31% per via idrica, 3% per contatto con animali e 0,3% via laboratorio.

14 – CARATTERISTICHE

Sensibilità analitica (limite di rilevabilità)

Il valore del limite di rilevabilità per O157 E. COLI CARD PLUS è 1.87x10⁴ CFU/mL.

Sensibilità e Specificità Cliniche

È stato valutato il kit O157 E. COLI CARD PLUS per determinare la sensibilità in colture e campioni di arricchimento selettivo, la specificità con organismi produttori di tossine Shiga, produttori di tossine non Shiga e altre specie di Enterobacteriaceae (Reference Laboratory for Escherichia coli - LREC).

14 ceppi STEC (antigene O157:H7); 4 ceppi non STEC (O157); 9 ceppi STEC (non O157); 4 altre Enterobacteriaceae spp.

I risultati mostrano: >99% di sensibilità, 85% di specificità, PPV 70% e NPV >99%.

Cross-Reattività ed interferenze

È stata valutata la cross-reattività di O157 E. COLI CARD PLUS; non c'è cross-reazione con patogeni gastrointestinali occasionalmente presenti nelle feci: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*; *Citrobacter freundii*; *C. difficile*; *E. coli* O22:H8, O91:H-, O103:H2, O111:H21, O145:H-, O171:H2, O174:H8; *Klebsiella pneumoniae*; *H. pylori*; *Listeria monocytogenes*; *Morganella morganii*; *Proteus mirabilis*; *Salmonella enteritidis*, *paratyphi*, *typhi*, *typhimurium*; *Shigella boydii*, *dysenteriae*, *flexneri*, *sonnei*; *Staphylococcus aureus*; *Yersinia enterocolitica*.

15 – LIMITI DEL METODO

- Un eccesso di campione fecale potrebbe dare un risultato errato (comparsa di banda marrone o assenza di banda di controllo). Diluire il campione con il tampone e ripetere il test.
- O157 E. COLI CARD PLUS deve essere utilizzato solo su campioni fecali umani. L'uso di altri tipi di campioni non è stato valutato. La qualità del test dipende dalla qualità del campione; è necessario ottenere campioni fecali adeguati.
- Un risultato positivo determina la presenza di *E. coli* O157:H7 nel campione (determinazione qualitativa); tuttavia, un risultato positivo deve essere confermato con ulteriori tecniche di laboratorio (metodo biochimico o PCR). La conferma dell'infezione deve comunque essere fatta dal medico solo dopo aver valutato tutti i risultati clinici e di laboratorio e deve basarsi sulla correlazione dei risultati con ulteriori osservazioni cliniche.
- Un risultato negativo non è significativo perché è possibile che la concentrazione di antigeni nel campione di feci sia inferiore al valore limite di rilevazione. Se i sintomi persistono, è necessario eseguire una determinazione di *E. coli* O157:H7 su un campione proveniente da una coltura di arricchimento.

16 – BIBLIOGRAFIA

1. THOMPSON, J., HODGE, D. and BORCZYK, A.; "Rapid Biochemical Test to Identify Verocytotoxin-Positive Strains of Escherichia coli Serotype O157"; Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1990, Vol. 28, No. 10, pp 2165-2168.
2. VALLANCE B.A. and FINLAY B.B., "Explantation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli", PNAS, August 2000, Vol. 97, No. 16, pp. 8799-8806.
3. BLANCO, M. et al. "Escherichia coli Verotoxigenicos (ECVT) en Espana: ECVT O157:H7 y NO-O157 en humanos y alimentos. El Ganado bovino y ovino como reservorio. Técnicas para detección de ECVT" Laboratorio de Referencia de Escherichia coli (LREC).





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 IVD	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti di temperatura	 LOT	Codice del lotto (DXXX)		Fabbricante		Mantenere asciutto	 UDI	Identificatore dispositivo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Utilizzare entro (anno/mese)	 REF	Numero di catalogo		Non riutilizzare		Fragile, maneggiare con cura		Tenere lontano dal calore

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Istruzioni per l'uso (IFU) - Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	2023/03

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

