

EIA for the detection of the Toxins Produced by Enterohemorrhagic *E. coli* in Stool Specimens or Culture Systems

REF 608096

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

INTENDED USE

The Premier EHEC test is a rapid in vitro microwell EIA for the detection of Shiga Toxins I and II (Verotoxins) in stool specimens, broth cultures, from individual colonies or colony sweeps of agar plates. The Premier EHEC test is intended for use as an aid in the diagnosis of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) have been isolated from patients who have hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (HUS).^{5, 8, 14} To date, O157:H7 is the most frequently encountered EHEC strain in stools from these patients.^{9, 13} This is probably due to the fact that conventional diagnostic strategies such as O157 latex agglutination assays rely on the unique sorbitol negative fermentation property of this strain.^{2, 9, 13, 14} The major weakness in this approach is that at least 50 other EHEC serotypes have been reported to be associated with the development of hemorrhagic colitis and HUS.^{7-11, 16}

One virulence trait of all EHEC strains is the ability to produce cytotoxin(s) called Shiga toxin (ST) or verotoxin (VT).¹⁴ ST-I and ST-II are the two most common toxins and individual EHEC strains have the ability to produce both or either, in varying quantities. Therefore, ST production and not individual (O157:H7) serotype identification is a better diagnostic strategy for the determination of EHEC associated disease.^{7, 8, 16} Cytotoxin can be identified by a specific cytotoxin assay described by Karmali.⁸ The cytotoxin assay, however, is labor intensive, requires tissue culture facilities, has not been standardized and may take up to 72 hours to confirm the presence of cytotoxin.⁸

Exploiting the EHEC attribute to produce these toxins, Premier EHEC was developed for the direct detection of ST producing strains from stool specimens or culture systems.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The Premier EHEC test utilizes monoclonal anti-Shiga toxin capture antibodies adsorbed to microwells.⁴ Diluted samples are added to the wells and incubated at room temperature. A wash is performed to remove unbound material. Polyclonal anti-Shiga-like toxin antibodies are added for detection and incubated at room temperature. Another wash is used to remove unbound antibody. Enzyme conjugated anti-IgG polyclonal antibody is added and incubated at room temperature. If toxin is present, a reactive antibody-enzyme complex is formed. After washing to remove unbound conjugate, substrate is added and incubated for 10 minutes at room temperature. Color develops in the presence of bound enzyme. Stop Solution is added and the results are interpreted visually or spectrophotometrically.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this kit is listed on the outer box.

1. **Premier EHEC Antibody Coated Microwells** – Breakaway plastic wells coated with monoclonal antibodies specific for *E. coli* Shiga toxin I and II.
2. **Premier EHEC Positive Control** – Inactivated Shiga toxin in a buffered protein solution with preservative.
3. **Premier EHEC Negative Control** – Buffered solution with a preservative.
4. **Premier EHEC Sample Diluent** – Buffered Protein solution with a preservative.
5. **Premier 20X Wash Buffer II** – Concentrated wash buffer with a preservative.
6. **Premier EHEC Detection Antibody** – Rabbit antibodies specific for Shiga toxins in buffered protein solution containing preservative.
7. **Premier EHEC Enzyme Conjugate** – Goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase in buffered protein solution containing preservative.
8. **Premier Substrate II** – Buffered solution containing urea peroxidase.
9. **Premier Stop Solution II** – 2N Sulfuric Acid. **CAUTION:** Avoid contact with skin. Flush with water if contact occurs.
10. **Transfer pipettes** - Each pipette is marked to indicate 50 µL, 100 µL, 200 µL and 300 µL volumes.
11. **Microwell strip holder**
12. **Microwell strip sealers**

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Wooden applicator sticks
 2. Test tubes (12 x 75 mm) for dilution of sample
 3. Distilled or deionized water
 4. Squirt bottle
 5. Graduated cylinder for making 1X Wash Buffer
 6. EIA plate reader capable of reading absorbance of 450 nm or 450/630 nm*
 7. STAT Fax™ 2200 plate shaker or equivalent (Optional – Broth Method Only)*
- * NOTE: It is the operator's responsibility to validate readers and plate shakers prior to their use with this product.

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. Patient specimens may contain infectious agents and should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual, "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
3. All reagents should be mixed gently before use.
4. Do not interchange Microwells, Detection Antibody, Enzyme Conjugate or Positive Control Reagent between different kits. 20X Wash Buffer II, Sample Diluent, Substrate II and Stop Solution II can be interchanged provided they are within their expiration dates at the time of testing.
5. Allow reagents to warm to room temperature before use.
6. Hold reagent vials vertically at suitable distance above the well to insure proper drop size and delivery.
7. Do not use kit components beyond labeled expiration date.
8. Replace colored caps on correct vials.
9. Dispose of used wash buffer and all test materials in appropriate container. Treat as potential biohazard.
10. The Positive Control reagent contains inactivated Shiga toxin. It should be handled, however, as a potentially hazardous material.
11. Avoid skin contact with Stop Solution II (2N Sulfuric Acid). Flush with water immediately if contact occurs.
12. Do not reuse microwells.
13. Unused microwells must be placed back inside resealable pouch. It is important to protect strips from moisture.
14. Transfer pipettes provided must be used for specimen preparation and transfer. Use one per specimen.
15. Avoid splashing when dispensing diluted samples into microwell by placing transfer pipette tip about halfway down the well and dispensing slowly down the side of well.
16. Microwell washing is to be performed precisely as directed in assay procedure. **Inadequate washing will cause elevated background and false positive results.**
17. All reagents except the 20X Wash Buffer II are provided already diluted to the proper concentration.
18. Any deviation below or above set incubation times may affect sensitivity and specificity and should be avoided.
19. Do not use microwells with pouches that have been damaged (ie, show holes or punctures).

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

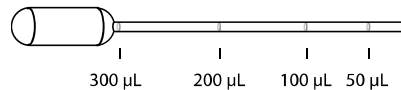
Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use.

PROCEDURAL NOTES

The Premier EHEC transfer pipette is diagrammed below:



REAGENT PREPARATION

1. Bring the entire kit, including microwell pouch, to room temperature before use.
 2. Prepare 1X Wash Buffer as needed.
- For example: 4.0 mL of 20X Wash Buffer II + 76.0 mL of distilled or deionized water is sufficient to wash one strip. Place in a clean squirt bottle. The 1X Wash Buffer can be stored at room temperature for up to three months.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. CDC Recommendations for Stool Specimen Storage, Isolation and Identification of EHEC Organisms:
 - Raw stool specimens should be examined as soon as they are received in the laboratory. If not processed immediately, they should be placed at 2-8 C or frozen at ≤ -70 C.
 - Refrigerated raw stool specimens should be examined within 1-2 hours. If stools cannot be examined within this time, they should be placed in a Cary-Blair-based transport medium. All rectal swabs should be placed immediately in a Cary-Blair-based transport medium.
 - If specimens in transport medium will be examined in 2-3 days, they should be refrigerated. If specimens in transport medium are not examined in 2-3 days, they should be frozen immediately at ≤ -70 C. Specimens in transport medium should not be refrigerated for days, then frozen or left for any time at room temperature.
2. Stool and Broth Storage Prior to Premier EHEC Testing: Stool specimens and broths may be held up to seven days at 2-8 C before testing in the EIA. If testing is not performed within this time period, the stool and/or broth should be frozen at (≤ -70 C). Repeated freeze-thaws should be avoided.
 - A. Direct Stool:**
 1. Add 200 µL of Sample Diluent to a clean 12 x 75 mm test tube. (NOTE: Third marking from tip on transfer pipette represents 200 µL.)
 2. Mix stool as thoroughly as possible prior to pipetting.
 - a. Liquid, semi-solid or stools in transport medium: Using a transfer pipette, draw stool to the 50 µL calibration point (first mark from the tip of the pipette). Dispense the stool into the Sample Diluent. Using the same pipette, gently withdraw and expel the stool suspension several times, then vortex 15 seconds. Leave transfer pipette in tube for later use.
 - b. Non-pipetable stools: Using a wooden applicator stick, transfer a small "BB" sized portion (3-4 mm diameter) of thoroughly mixed stool into Sample Diluent. Emulsify stool using the wooden applicator stick, then vortex 15 seconds. Place a transfer pipette in the tube.
 - B. Plate Method:**
 1. Add 20 µL of stool or specimen to MacConkey or Sorbitol/MacConkey plate and spread with an inoculating loop.
 2. Incubate 16-24 hours at 37 C.
 3. Individual colonies or colony sweeps can be removed with a loop and placed in 200 µL of Sample Diluent for EIA testing.
 - C. Broth Method:**
 1. Add 10-50 µL of stool to 5 mL of MacConkey's Broth, or GN Broth. Vortex 10-15 seconds.
 2. Incubate 16-24 hours at 37 C.
 3. Add 50 µL of growth to 200 µL Sample Diluent for EIA testing.

TEST PROCEDURE

NOTE: With large numbers of specimens, repetitive or multichannel pipettes may be used for dispensing the reagents.

1. After the pouch has reached temperature, break off the required number of microwells (1 well for each specimen plus 1 positive and 1 negative control well per batch). Place the microwells in the microwell strip holder and record the location of all wells. Unused microwells must be resealed in the pouch immediately.
2. Add 100 µL of diluted specimen (second mark from the tip of the pipette) to the appropriate well (place pipette tip halfway into well and let sample slowly run down side of well).
3. Add 2 free-falling drops of Positive and Negative Control to the appropriate wells. Mix wells by firmly shaking/swirling the plate for 30 seconds.
4. Cut plate sealer to size and press firmly onto top of microwells to seal. Incubate the plate for 1 hour at room temperature (22-27 C). Broth Method Only: Alternatively, laboratories equipped with a heated plate shaker (STAT Fax™-2200) can incubate and rotate the plate for 30 minutes at 25 C at 1000 rpm (setting 5).
5. **Carefully**, remove the plate sealer and wash wells:
 - a. Dump plate contents firmly into a biohazard receptacle.
 - b. Bang the inverted plate on a clean stack of paper towels.
 - c. Fill all wells with 1X Wash Buffer. Use of a squirt bottle is recommended.
 - d. Repeat washing cycle (dump, bang on fresh towels, fill) 4 additional times. After the last fill, dump and bang plates on fresh towels hard enough to remove as much excess Wash Buffer as possible but do not allow wells to completely dry at any time.
6. Add 2 free-falling drops of Detection Antibody to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds.
7. Press plate sealer firmly onto top of microwells to seal. Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (22-27 C). Broth Method Only: Alternatively, incubate and rotate the plate for 15 minutes on the STAT Fax™ at 25 C and at 1000 rpm (setting 5).
8. Repeat wash procedure (Step #5)
9. Add 2 free-falling drops of Enzyme Conjugate to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds.
10. Press plate sealer firmly onto top of microwells to seal. Incubate the plate for 30 minutes at room temperature (22-27 C). Broth Method Only: Alternatively, incubate and rotate the plate for 15 minutes on the STAT Fax™ at 25 C and at 1000 rpm (setting 5).
11. Repeat wash procedure (Step #5)
12. Clean the underside of all wells with a lint free tissue.
13. Add 2 free-falling drops of Substrate Solution II to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds. Incubate for 10 minutes at room temperature.
14. Add 2 free-falling drops of Stop Solution II to each well. Firmly shake/swirl the plate for 30 seconds. **NOTE:** Initial color of positive reaction is blue, which changes to yellow upon addition of Stop Solution II.
15. Observe Reactions:
 - a. Visual Determination – Read within 15 minutes after adding Stop Solution II.
 - b. Spectrophotometric Determination – Zero EIA reader on air. Wipe underside of wells with a lint free tissue. Read absorbance at 450 nm or 450/630 nm within 30 minutes of adding Stop Solution II.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. **Visual Reading**
 - Negative – colorless
 - Positive = definite yellow color
 - A faint yellow color must be evaluated spectrophotometrically
- NOTE:** In view of the epidemiological importance of obtaining bacterial isolates it is recommended that all toxin positive samples be submitted for isolation of Shiga toxin positive organisms. We suggest that individual microbiology laboratories coordinate bacterial isolation with their local state health laboratories.
2. **Spectrophotometric Single Wavelength (450 nm)**
 - Negative = OD₄₅₀ < 0.180
 - Positive = OD₄₅₀ ≥ 0.180
3. **Spectrophotometric Dual Wavelength (450/630 nm)**
 - Negative = OD_{450/630} < 0.150
 - Positive = OD_{450/630} ≥ 0.150

NOTE: A positive result indicates the presence of Shiga toxins. A negative result indicates the absence of Shiga toxins, or that the level of toxin is below that which can be detected by the test.

NOTE: See Quality Control section (Item #5) regarding low positive results. Extremely strong positive reactions may yield a purple precipitate within a few minutes of stopping the reaction.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

- The Positive and Negative Controls must be used with each assay run to provide quality assurance of the reagents.
- The Positive Control should read > 0.500 at either 450 nm or 450/630 nm. The Positive Control should be a definite yellow color when read visually.
- The Negative Control should read < 0.180 at 450 nm and <0.150 at 450/630 nm but greater than 0.00. If the Negative Control is < 0.00, re-blank the plate reader to air and re-read the plate. The Negative Control should be colorless when read visually.
- Any positive well without visible color should be repositioned, wiped on the underside of the well and re-read.
- If the frequency of low positive results (OD between 0.150 and 0.200 with dual wavelength or OD between 0.180 and 0.230 with single wavelength) is greater than 5% of specimens tested, this indicates insufficient washing. More vigorous washing or increasing the washes to seven washes in step 5 of the Procedure is recommended.
- If the expected control reactions are not observed and the reagents are still within their expiration date, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.
- At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing or leakage.
- It is suggested that results of each quality control check be recorded in an appropriate log book to maintain high quality testing records.

EXPECTED VALUES

The Premier EHEC test detects the presence of Shiga toxin. Expected values for a given population should be determined for each laboratory. The rate of positivity may vary depending on patient age, geographic location, method of specimen collection, handling and transportation, test employed and general health of the patient population under study.^{4, 5, 9, 16}

Only *Campylobacter* and *Salmonella* ranked above *E. coli* O157:H7 as the most frequently encountered pathogen isolated from stool in the states of Washington and Minnesota during the years 1984-1987. Similar data was obtained during that same time period in Alberta, British Columbia and Ontario, Canada.^{2, 12, 13, 15, 17-19} Direct fecal cytotoxin test have shown that an additional 10% of all specimens may contain undiagnosed EHEC organisms. Our clinical studies show that this number may be conservative.^{3, 7, 10, 11, 16}

Isolation rates of O157:H7 have been shown to be the greatest during the summer months of June, July and August. The rates for non-O157 SLT producing strains still need to be determined.^{2, 12}

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The Premier EHEC test detects the presence of Shiga toxin from stool, broths or culture isolates. The level of toxin has not been shown to be correlated with either the presence or severity of disease. As with all *in vitro* diagnostic procedures, test results should be interpreted by a physician in conjunction with other clinical information.
- Shiga toxin I and the toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1 strains (shiga toxin) are nearly identical. Therefore, Premier EHEC will generate a positive signal when Shiga toxin is present in the specimen of other infectious organisms.
- A positive result does not preclude the presence of other infectious organisms.
- Toxin expression may be lost upon serial passage. Colony sweeps may increase the likelihood of detecting ST producing organisms.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Premier EHEC test was evaluated at three major medical centers and one state health laboratory in the United States. Each study site tested diarrheal stools submitted for routine culture of enteric pathogens. Each stool was tested directly by and the broth method in the Premier EHEC assay. A specific ST cytotoxin neutralization assay was performed at Meridian Bioscience on these specimens. The results obtained for the direct stool assay and the broth assay are summarized in the following table.³

	Premier EHEC			
	Direct Stool		Broth Assay	
Cytotoxin	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	15	4	22	0
Negative	17	391	5	236
Indeterminate	2	17	0	3

Relative Sensitivity =	78.9% (56.6-91.5%)*	100% (85.1-100%)
Relative Specificity =	95.8% (93.4-97.4%)	97.9% (95.2-99.1%)
Relative Agreement =	95.1% (92.6-96.8%)	98.1% (95.6-99.2%)

ST producing EHEC were isolated from two of the 17 Premier EHEC positive/cytotoxin negative direct stool specimens: one O157:H7 and one O6:H untypeable. In addition, PCR** confirmed the presence of the ST gene in two Premier EHEC positive/cytotoxin negative and one Premier EHEC positive/cytotoxin indeterminate stool specimens. The 15 Premier EHEC positive/cytotoxin positive direct stool specimens were comprised of: nine – O157:H7, two – O6:H untypeable, one – O untypeable: H12, 41w or 51, and two – O111:NM EHEC strains. An isolate could not be obtained from the remaining stool specimen.

ST producing EHEC were isolated from two of five Premier EHEC positive/cytotoxin negative broths: one O157:H7 and one O111:NM. The 22 Premier EHEC positive/cytotoxin positive samples were comprised of 13 O157:H7, three O6:H untypeable, one O untypeable H:12, 41w or 51, and one O111:NM ST producing strains of EHEC. No isolates could be found in the remaining four broth specimens.

*95% confidence intervals calculated by the normal method as indicated in parenthesis.
**PCR is a research tool and not intended for *in vitro* diagnostic use.

Various *E. coli* ST producing organisms were tested in the EIA by both the Plate and Broth Methods (Specimen Preparation, Part B, and C.). Each strain is a clinical isolate and each was tested by a cytotoxin assay and by a polymerase chain reaction (PCR) to confirm the presence of the ST gene. All organisms generated positive results when tested in this manner. The number in parenthesis represents the number of different strains tested in that group type. Also, the type of toxin produced by each strain is indicated.³

Strain Type	ST Type	Strain Type	ST Type
O157:H7 (3)	I	O91:H21 (1)	II
O157:H7 (7)	II	O146:H21 (1)	I
O157:H7 (9)	I & II	O137:H41 (1)	I & II
O111:NM (3)	I & II	O111:H8 (1)	I & II
OX3:H21 (1)	II	O50:H7 (1)	I
O4:NM (1)	I & II	O145:NM (2)	II
O165:H25 (1)	II	O103:H2 (1)	I
O165:H25 (1)	I & II	O125:NM (2)	I
O45:H2 (1)	I	O26:H11 (1)	I
O126:H27 (1)	I	O5:NM (3)	I
O121:H19 (1)	I & II	O171:NM (1)	II
O121:H19 (1)	II	O83:H1 (1)	I & II

REPRODUCIBILITY

Intra-assay Variability – Ten replicates of two known positive broth specimens and two known stool positive specimens were tested in one assay.

Sample	Mean A _{450/630}	SD	% CV
Broth #1	0.362	0.013	3.5
Broth #2	1.920	0.094	4.9
Stool #1	0.317	0.010	3.1
Stool #2	0.774	0.032	4.2

Inter-assay Variability – Ten replicates of two known positive broth specimens and one negative broth specimen were run on three separate days. This protocol was repeated using one negative and two positive stool specimens.

Sample	Mean A _{450/630}	SD	% CV
Broth #1	0.369	0.032	8.7
Broth #2	1.546	0.293	18.9
Broth #3	0.074	0.007	9.2
Stool #1	0.335	0.027	8.1
Stool #2	0.818	0.079	9.6
Stool #3	0.058	0.007	11.4

CROSSREACTIVITY

The Premier EHEC EIA was tested for specificity using the clinical isolates (CI) or ATCC strains listed. Each strain was tested directly in the EIA by the Plate method using the colony isolate procedure (Specimen Preparation Section, Part B). Every strain was negative when tested in this manner. In an additional study, the bacterial strains were spiked into either a single positive EHEC stool or single negative EHEC stool at a concentration of approximately 2.4 x 10⁹ cfu/mL. The following clinical isolates (CI) or ATCC strains were all found to be negative after direct testing. In addition, the following strains did not alter the expected results when spiked into an EHEC positive or negative stool.³

Description		Description	
<i>Campylobacter coli</i>	CI	<i>Prevotella bivia</i>	ATCC 29303
<i>Campylobacter fetus</i>	CI	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380
<i>Campylobacter jejuni</i>	CI	<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 9886
<i>Campylobacter lari</i>	CI	<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 33672
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6570
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6571
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 14810	<i>Salmonella Group B</i>	CI
<i>Enterococcus faecalis</i>	CI	<i>Salmonella hilversum (Grp N)</i>	ATCC 15784
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13048	<i>Salmonella minnesota</i>	ATCC 9700
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	<i>Serratia liquefaciens</i>	CI
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 11456
<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469	<i>Shigella flexneri</i>	CI
<i>Escherichia faecalis</i>	ATCC 33650	<i>Shigella sonnei</i>	CI
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CI	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Helicobacter pylori</i>	CI	<i>Staphylococcus aureus (Cowan I)</i>	ATCC 12598
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CI
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CI	<i>Streptococcus faecalis</i>	CI
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CI	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CI
<i>Nocardia asteroides</i>	ATCC 3308	<i>Yersinia enterocolitica O:9</i>	ATCC 55075

ANALYTICAL SENSITIVITY

The limit of detection for ST-I and ST-II are approximately 7 and 15 pg/well respectively.

ITALIANO

PREMIER® EHEC

Test immunoenzimatico EIA per la ricerca delle tossine prodotte da *E. coli* enteroemorragico in campioni di feci o da coltura

REF 608096

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

Premier EHEC è un test rapido immunoenzimatico su micropozzetti (EIA) per la ricerca delle Tossine Shiga I e II (Verotossine) in campioni fecali, da brodcultura da colonie o da striscio su piastra. Il test Premier EHEC è da utilizzarsi come supporto alla diagnosi delle infezioni causate da ceppi enteroemorragici di *E. coli* (EHEC).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Ceppi enteroemorragici di *E. coli* (EHEC) sono stati isolati da pazienti con colite emorragica e con sindrome emolitica uremica (HUS).^{5, 8, 14} Attualmente, il ceppo O157:H7 viene considerato come quello di più frequente isolamento dalle feci di tali pazienti.^{9, 13} Tale dato probabilmente deriva dal fatto che i protocolli diagnostici tradizionali sfruttano unicamente una caratteristica fenotipica peculiare di tale sierotipo, cioè la mancata fermentazione del sorbitolo.^{2, 9, 13, 14} La principale lacuna di tale approccio diagnostico deriva dal fatto che sono stati identificati almeno altri 50 sierotipi enteroemorragici in grado di provocare colite emorragica e HUS.^{2, 11, 16}

Uno dei fattori di virulenza dei ceppi EHEC è rappresentato dalla capacità di produrre citotossine, chiamate tossine Shiga (ST) oppure verotossine (VT).^{5, 14} ST-I e ST-II sono le due tossine più comuni ed i singoli ceppi EHEC sono in grado di produrle entrambe, oppure una sola delle due, in quantità variabili. Pertanto, rispetto all'identificazione di un singolo sierotipo (O157:H7), la ricerca delle ST rappresenta un migliore approccio alla diagnosi delle infezioni sostenute da ceppi EHEC.^{7, 8, 16} La citotossina può essere identificata mediante uno specifico test di citotossicità descritto da Karmali.⁹ Tale test comunque richiede tempo, strumentazione per l'esecuzione di colture cellulari, non è stato standardizzato e può richiedere fino a 72h per confermare la presenza di citotossina.⁸

Premier EHEC è stato messo a punto per la rilevazione della presenza della ST-I e della ST-II nei campioni fecali, ma può essere utilizzato per rilevare la produzione di ST da parte di ceppi isolati in coltura.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test Premier EHEC utilizza anticorpi monoclonali anti-tossine Shiga adsorbiti su pozzetti microtitler.⁴ I campioni di feci diluiti vengono distribuiti nei pozzetti ed incubati a temperatura ambiente. Dopo lavaggio per allontanare l'eccesso di campione, si aggiunge un anticorpo policlonale anti-ST e si ripete l'incubazione a temperatura ambiente. Dopo ulteriore lavaggio per allontanare l'eccesso di anticorpo di ricerca, si aggiunge il coniugato enzimatico, costituito da anticorpi policlonali anti-IgG marcati con perossidasi, e si incuba a temperatura ambiente. In presenza di tossina si forma un complesso tra coniugato enzimatico ed anticorpo di ricerca. Dopo lavaggio per eliminare il coniugato in eccesso, si aggiunge il substrato e si incuba per 10 minuti a temperatura ambiente. In presenza di coniugato legato all'anticorpo si avrà uno sviluppo di colore. Alla fine si aggiunge la soluzione di arresto ed il risultato viene letto visivamente o mediante spettrofotometro.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- Premier EHEC pozzetti microtitler adsorbiti con anticorpi – Strisce di micropozzetti, frazionabili singolarmente, adsorbiti con anticorpi monoclonali specifici per le tossine Shiga I e II di *E. coli*.
- Premier EHEC Controllo Positivo – Tossine Shiga inattivate in soluzione proteica tamponata contenente conservante.
- Premier EHEC Controllo Negativo – Soluzione tampone contenente conservante.
- Premier EHEC Diluente del Campione. Soluzione proteica tamponata contenente conservante.
- Premier Tampone di Lavaggio II (20X) – Soluzione tampone 20 volte concentrata, contenente conservante.

- Premier EHEC Anticorpo di Ricerca** – Anticorpi policlonali specifici per le tossine Shiga diluiti in soluzione proteica tamponata contenente conservante.
- Premier EHEC Coniugato Enzimatico** – Anticorpi policlonali specifici anti-anticorpo di ricerca, marcati con perossidasi di rafano, in soluzione proteica tamponata contenente conservante.
- Premier Substrato II** – Soluzione tampone contenente perossido di urea.
- Premier Soluzione di Arresto II** – Acido solforico 2N. **ATTENZIONE:** evitare il contatto con la pelle. Risciacquare con acqua se si verifica contatto.
- Pipette monouso** – Ogni pipetta è marcata per indicare i volumi di 50 µL, 100 µL, 200 µL e 300 µL.
- Supporto per strip di micropozzetti**
- Fogli di pellicola adesiva per sigillare i pozzetti**

MATERIALI NON FORNITI

- Bastoncini di legno.
- Provette (12 x 75 mm) per allestire le diluizioni dei campioni.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Spruzzetta per i lavaggi.
- Cilindro graduato per preparare la soluzione di lavaggio diluita (1X)
- Lettore EIA per micropiastre dotato di filtri per la lettura a 450 nm oppure a 450/630 nm*
- Agitatore termostato STAT Fax™-2200 o equivalente (opzionale-solo per metodo da brodo)*
* è responsabilità dell'utilizzatore validare gli incubatori ed i lettori, prima di effettuare il test.

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- I campioni dei pazienti possono contenere agenti infettivi e dovrebbero essere trattati secondo le norme previste per il Biosafety Level 2 citato nel manuale "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" a cura del CDC/NIH.
- Tutti i reagenti devono essere mescolati delicatamente prima dell'uso.
- Non mischiare i pozzetti, l'anticorpo di rilevazione, il coniugato enzimatico ed il controllo positivo appartenenti a kit di lotti differenti; il Tampone dil lavaggio 20X II, il Diluente del Campione, il Substrato II e la Soluzione di Arresto II possono essere utilizzati indipendentemente dal lotto, purché utilizzati prima della scadenza.
- Lasciare che tutti i reagenti raggiungano temperatura ambiente prima dell'uso.
- Tenere i flaconcini in posizione verticale per assicurare l'erogazione dell'esatta quantità dei reagenti.
- Non utilizzare reagenti dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta.
- Richiedere ciascun flaconcino con il tappo colorato corrispondente.
- Il tampone di lavaggio utilizzato, i pozzetti usati, ecc. devono essere eliminati come materiale potenzialmente infettivo.
- Il Controllo Positivo contiene tossine Shiga inattivate, tuttavia deve essere trattato ed eliminato come materiale potenzialmente infetto.
- Evitare il contatto della Soluzione di Arresto II (acido solforico 2N) con la pelle: risciacquare immediatamente con acqua se tale contatto dovesse verificarsi.
- Non riutilizzare i pozzetti.
- I micropozzetti non utilizzati devono essere riposti immediatamente nella busta fornita che deve essere richiusa. È molto importante proteggere le strisce dall'umidità.**
- Le pipette monouso fornite con il kit possono essere usate per la preparazione e la distribuzione dei campioni. Utilizzare una pipetta diversa per ogni campione.
- Evitare schizzi mentre si distribuiscono i campioni nei pozzetti: per ottenere ciò si consiglia di introdurre il puntale della pipetta fino a metà circa della profondità del pozzetto e di indirizzare il flusso del liquido verso le pareti dello stesso.
- Eseguire i lavaggi come descritto nella procedura. Un lavaggio non corretto può falsare i risultati.
- Tutti i reagenti, ad eccezione del Tampone di Lavaggio II concentrato 20X sono forniti già pronti all'uso.
- I tempi di incubazione sono stati ottimizzati per ottenere la massima sensibilità. Evitare ogni variazione.
- Non utilizzare le strisce dei pozzetti se la busta di alluminio appare danneggiata (ad esempio se ci sono fori o tagli).

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

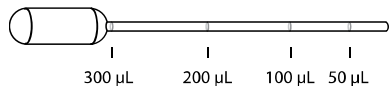
Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna. Conservare il kit a 2-8 C e reporre in frigorifero immediatamente dopo l'utilizzo.

NOTE PROCEDURALI

Il diagramma seguente mostra la pipetta di trasferimento Premier EHEC:



PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Lasciare che tutti i componenti del kit, busta dei micropozzetti inclusa, raggiungano temperatura ambiente prima di iniziare il test.
- Preparare la soluzione di lavaggio 1X Ad esempio, 4,0 mL di Premier Tampone di Lavaggio II (20X) + 76,0 mL di acqua distillata o deionizzata sono sufficienti per lavare 1 striscia di micropozzetti. Trasferire in una spruzzetta pulita per i lavaggi... Il tampone diluito può essere conservato a temperatura ambiente per un periodo massimo di tre mesi.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Le raccomandazioni del CDC (Centers for Disease Control) per la conservazione del campione fecale, ai fini dell'isolamento e dell'identificazione degli organismi EHEC sono le seguenti:
 - Il campione fecale deve essere esaminato non appena ricevuto dal laboratorio. Se non processato immediatamente, deve essere conservato a 2-8 C o congelato a ≤ -70 C.
 - I campioni refrigerati (2-8 C) devono essere esaminati entro 1-2 ore. Se le feci non possono essere esaminate in questo lasso di tempo, devono essere raccolte e conservate in un mezzo di trasporto Cary-Blair. I tamponi rettali devono essere sempre conservati in Cary-Blair fin dalla raccolta.
 - Se analizzati entro 2-3 giorni, i campioni in mezzo di trasporto possono essere refrigerati (2-8 C). Se non analizzati entro 2-3 giorni, devono essere congelati immediatamente a ≤ -70 C. I campioni in mezzo di trasporto non devono essere conservati refrigerati per giorni ed in seguito congelati o lasciati a temperatura ambiente.
- Conservazione del campione fecale o della brodocoltura (che ha mostrato crescita batterica) prima dell'esecuzione del test Premier EHEC. Il campione fecale e la brodocoltura possono essere conservati fino a sette giorni a 2-8 C prima dell'esecuzione del test. Se il test non è eseguito entro questo tempo, le feci e la brodocoltura deve essere congelata a ≤ -70 C. Dovrebbero essere evitati ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

A. TEST DIRETTO SULLE FECEI

 - Distribuire 200 µL di Diluente del campione in una provetta (12 x 75 mm) pulita. (NOTA: la terza tacca a partire dalla punta delle pipette monouso fornite indica un volume di 200 µL).
 - Mescolare molto bene i campioni di feci prima di prelevare il materiale.
 - Feci liquide, semisolide oppure conservate in terreno di trasporto: Usando una delle pipette fornite, prelevare 50 µL di feci (prima tacca a partire dalla punta). Trasferire tale campione nella provetta contenente il Diluente e mescolare accuratamente, aspirando ed espellendo gentilmente la sospensione di feci numerose volte, quindi agitare con un vortex per 15 secondi. Lasciare la pipetta all'interno della provetta per eventuali usi successivi.
 - Feci solide: Usando un bastoncino di legno, trasferire una porzione di feci (3-4 mm di diametro) nella corrispondente provetta 12 x 75 mm contenente il Diluente. Emulsionare le feci accuratamente usando il bastoncino, quindi agitare con un vortex per 15 secondi. Porre nella provetta una delle pipette fornite.

B. CEPPI ISOLATI IN SU PIASTRA DI COLTURA

 - Inoculare 20 µL di campione fecale su una piastra di terreno MacConkey o MacConkey/Sorbitolo e distribuirli con un'ansa sterile.
 - Incubare per 16-24 ore a 37 C.
 - Stemperare una a più colonie singole in 200 µL di Diluente per i campioni.

C. CEPPI IN BRODO DI COLTURA

- Inoculare 10-50 µL di campione fecale in 5 mL di terreno MacConkey liquido, o brodo GN. Agitare con un vortex per 10-15 secondi.
- Incubare per 16-24 ore a 37 C.
- Diluire 50 µL di brodocoltura in 200 µL di Diluente per i campioni.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: Se si esegue il test su un notevole numero di campioni, si possono utilizzare pipettrici multicanale per distribuire i reagenti.

- Dopo aver permesso alla busta con i pozzetti di raggiungere temperatura ambiente, preparare un numero di pozzetti sufficiente (1 pozzetto per ciascun campione, più 1 pozzetto per il Controllo Positivo ed 1 per il Controllo Negativo ogni volta che si esegue il test). Inserire i pozzetti nel supporto e registrare la posizione dei singoli campioni. I pozzetti non utilizzati devono essere rimessi immediatamente nella busta, che deve essere accuratamente richiusa.
- Distribuire 100 µL di campione diluito (seconda tacca a partire dalla punta della pipetta) nei pozzetti corrispondenti (introdurre il puntale della pipetta fino a metà circa della profondità del pozzetto e lasciare che il campione scorra lentamente lungo le pareti dello stesso).
- Distribuire 2 gocce di Controllo Positivo e di Controllo Negativo nei pozzetti corrispondenti. Mescolare agitando delicatamente la piastra per 30 secondi.
- Tagliare una porzione di plastica adesiva adatta al numero di pozzetti e sigillarli accuratamente. Incubare la piastra per 1 ora a temperatura ambiente (22-27 C). Solo per il protocollo da Brodocoltura: in alternativa, i laboratori equipaggiati con un agitatore di piastrer termostato (STAT Fax™-2200) possono effettuare l'incubazione con rotazione a 1000 rpm per 30 minuti a 25 C (setting 5).
- Delicatamente, togliere la pellicola adesiva e lavare i pozzetti:
 - Eliminare i campioni da ciascun pozzetto mediante aspirazione oppure capovolgendo i pozzetti su un recipiente contenente disinfettante.
 - Scuotere energicamente la piastra su carta assorbente.
 - Riempire i pozzetti con soluzione di lavaggio diluita 1X (circa 300 µL).
 - Ripetere questa operazione di lavaggio 4 volte. Dopo l'ultimo lavaggio, scuotere energicamente la piastra su carta assorbente pulita per eliminare il più possibile ogni residuo di tampone di lavaggio, ma evitare che i pozzetti si asciughino completamente.
- Distribuire 2 gocce di Anticorpo di ricerca ad ogni pozzetto. Mescolare agitando delicatamente la piastra per 30 secondi.
- Sigillare i pozzetti ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22-27 C). Solo per il protocollo da Brodocoltura: in alternativa incubare la piastra in agitazione per 15 minuti sullo STAT Fax™ a 25 C a 1000 rpm (setting 5).
- Ripetere il lavaggio seguendo le istruzioni fornite al punto 5.
- Distribuire 2 gocce di Coniugato enzimatico in ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente la piastra per 30 secondi.
- Sigillare i pozzetti ed incubare per 30 minuti a temperatura ambiente (22-27 C). Solo per il protocollo da Brodocoltura: in alternativa incubare la piastra in agitazione per 15 minuti sullo STAT Fax™ a 25 C a 1000rpm (setting 5).
- Ripetere il lavaggio seguendo le istruzioni fornite al punto 5.
- Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un tovagliolo di carta.
- Distribuire 2 gocce di Substrato II in ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente per 30 secondi. Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiungere 2 gocce di Soluzione di arresto II a ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente per 30 secondi. **NOTA:** inizialmente si ha sviluppo di colore blu, che vira al giallo dopo l'aggiunta della Soluzione di arresto II.
- Osservare la reazione:
 - Letture visiva – Leggere il risultato entro 15 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto II.
 - Letture spettrofotometrica – Azzerare il lettore EIA contro aria. Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un tovagliolo di carta. Leggere l'assorbanza a 450 nm oppure a 450/630 nm entro 30 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto II.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Letture visiva**
Negativo = Incolore
Positivo = Giallo ben definito
Usare un lettore EIA se ci sono problemi nella definizione del colore giallo
NOTA: Considerando l'importanza di ottenere isolati batterici per scopi epidemiologici, si consiglia che tutti i campioni positivi per la tossina siano sottoposti all'isolamento colturale. Si suggerisce che i laboratori di batteriologia eseguano tale isolamento in accordo alle regolamentazioni locali.
- Letture spettrofotometrica a singola lunghezza d'onda (450 nm)**
Negativo = OD₄₅₀ < 0,180
Positivo = OD₄₅₀ ≥ 0,180
- Letture spettrofotometrica a doppia lunghezza d'onda (450/630 nm)**
Negativo = OD_{450/630} < 0,150
Positivo = OD_{450/630} ≥ 0,150
NOTA: Un risultato Positivo indica la presenza di Tossine Shiga. Un risultato negativo può indicare l'assenza di tossine Shiga nel campione o che il livello di tossine nel campione è al di sotto del limite di rilevazione del test.
NOTA: Fare riferimento al punto 5 della sezione Controllo di Qualità per l'interpretazione dei risultati deboli positivi. Reazioni molto forti possono dare un precipitato color porpora entro pochi minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto II: tali reazioni devono essere considerate positive.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

- Il Controllo Positivo e Negativo devono essere usati ogni volta che si esegue il test, per avere un costante controllo delle prestazioni del kit.
- L'assorbanza del Controllo Positivo deve essere > 0,500 sia a 450 nm che a 450/630 nm. In caso di lettura visiva, il Controllo Positivo deve mostrare un colore giallo ben definito.
- Il valore di assorbanza del Controllo Negativo deve essere < 0,180 a 450 nm e < 0,150 a 450/630 nm, ma deve essere in ogni caso maggiore di 0,00. Se l'assorbanza del Controllo Negativo è < 0,00, riazzerare il lettore e ripetere la lettura. Il Controllo Negativo deve risultare incolore alla lettura visiva.
- Se i valori di assorbanza non corrispondono ad uno sviluppo di colore, pulire il fondo esterno dei pozzetti, controllare l'allineamento sul supporto e ripetere la lettura.
- Una percentuale di campioni che risultino deboli positivi (OD compresa tra 0,150 e 0,200 con la lettura a doppia lunghezza d'onda, oppure tra 0,180 e 0,230 con la lettura a singola lunghezza d'onda) superiore al 5% dei campioni analizzati indica un lavaggio inadeguato. In questo caso si consiglia un lavaggio più energico oppure di aumentare fino a 7 i cicli di lavaggio indicati al punto 5 della Metodica.
- Qualora si ottengano risultati diversi da quelli previsti ed i reagenti non siano scaduti, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) e il Distributore Locale, (Italia +390331433636).
- Ogni volta che si usa il kit occorre esaminare ciascun flacone di reagenti per verificare che non presenti segni evidenti di contaminazione microbiologica, di congelamento o di perdite.
- Si consiglia di trascrivere i risultati di ciascun controllo di qualità in un apposito registro, per mantenere un elevato standard qualitativo e per ottemperare alle norme degli Enti preposti ai controlli.

VALORI ATTESI

Premier EHEC è un test immunoenzimatico (EIA) rapido per la ricerca delle Tossine Shiga-like I e II (Verotossine) in campioni fecali. I valori attesi in una determinata popolazione devono essere stabiliti da ciascun laboratorio. La percentuale di risultati positivi può variare in base all'età, alla localizzazione geografica, al metodo utilizzato per il prelievo, al trattamento ed al trasporto del campione, al tipo di test utilizzato, nonché alle condizioni generali di salute della popolazione esaminata.^{4, 5, 9, 10}

Solamente *Campylobacter* e *Salmonella* sp. risultavano superiori ad *E. Coli* O157:H7 quali enteropatogeni più frequentemente isolati da coprocolture negli stati di Washington e Minnesota negli anni 1984-1987. Dati simili furono ottenuti nello stesso periodo di tempo in Alberta, British Columbia ed Ontario (Canada).^{2, 12, 13, 15, 17-19} I test diretti sulle feci per la ricerca della citotossina hanno dimostrato che un'ulteriore percentuale di campioni pari al 10% può contenere ceppi EHEC non diagnosticati. I risultati dei nostri studi clinici suggeriscono l'ipotesi che tale numero sia sottostimato.^{3, 7, 10, 11, 16}

La percentuale di isolamento del ceppo O157:H7 raggiunge i valori massimi durante i mesi estivi (Giugno, Luglio ed Agosto), mentre rimane da determinare quella dei ceppi non-O157:H7 produttori di SLT.^{2, 12}

LIMITAZIONI DELLA METODICA

- Il Premier EHEC è in grado di rilevare la presenza di tossine Shiga nei campioni di feci, melle brodocolture o negli isolati su piastra. Il quantitativo di tossine nel campione non risulta essere correlato alla severità della patologia. I risultati ottenuti dovrebbero essere valutati dal medico curante, come per tutti gli altri test *in vitro*, alla luce del quadro clinico del paziente e del risultato di tutti gli altri esami eseguiti.
- La tossina ST-I e la tossina prodotta dai ceppi di tipo 1 di *Shigella dysenteriae* sono pressoché identiche. Pertanto, il test Premier EHEC fornirà risultato positivo in presenza di livelli rilevabili di tale tossina prodotta da altro microorganismo...
- Un risultato positivo non esclude l'eventuale presenza di altri agenti infettivi.
- L'espansione delle Tossine può essere persa dopo diversi passaggi in coltura. Il test eseguito su un pool di colonie aumenta la probabilità di identificare gli organismi produttori di tossina.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il Test Premier EHEC è stato valutato con campioni ottenuti da tre laboratori ospedalieri e da un laboratorio statale negli Stati Uniti. In ogni laboratorio sono stati testati campioni di routine all'esame colturale per i patogeni enterici. Ogni campione fecale è stato testato direttamente e dopo arricchimento in brodo con il test Premier EHEC. Su tutti i campioni è stato eseguito presso Meridian Bioscience anche un test specifico di citotossicità SLT. I risultati ottenuti con il test diretto e con il test da brodocoltura sono riportati nella seguente tabella:³

	Premier EHEC			
	Esame diretto del campione fecale		Esame della brodocoltura	
Citotossina	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivo	15	4	22	0
Negativo	17	391	5	236
Indeterminato	2	17	0	3

Sensibilità relativa =	78,9% (56,6-91,5%)*	100% (85,1-100%)
Specificità relativa =	95,8% (93,4-97,4%)	97,9% (95,2-99,1%)
Concordanza relativa =	95,1% (92,6-96,8%)	98,1% (95,6-99,2%)

E. coli enteroemorragici produttori di citotossina sono stati isolati da due dei 17 campioni fecali risultati positivi con il test Premier EHEC e negativi con il test di citotossicità: un campione è risultato positivo per O157:H7 e l'altro per O6:H non tipizzabile. Inoltre l'esame mediante PCR** ha confermato la presenza del gene per SLT in due campioni positivi con il test Premier EHEC e negativi con il test di citotossicità e in un altro campione positivo con il test Premier EHEC e indeterminato con il test di citotossicità. Quindici campioni fecali risultati positivi sia con il test Premier EHEC sia con il test di citotossicità comprendevano i seguenti sierotipi: nove O157:H7, due O6:H non tipizzabili, un O non tipizzabile :H12, 41w o 51 e due O111:NM. Dal rimanente campione fecale non è stato ottenuto nessun isolato.

E. coli enteroemorragici produttori di citotossina sono stati isolati da due delle cinque brodocolture positive con il test Premier EHEC e negative con il test di citotossicità: un O157:H7 e un O111:NM. Dai 22 campioni positivi sia con il test Premier EHEC sia con il test di citotossicità sono stati isolati 13 O157:H7, tre O6:H non tipizzabili, un O non tipizzabile: H12, 41w o 51 e un O111:NM tutti produttori di SLT. Dalle rimanenti 4 brodocolture non è stato ottenuto nessun isolato.

Intervalli di confidenza (*95%) calcolati mediante il metodo normale come indicato in parentesi

** PCR è un test utilizzato per scopi di ricerca e non per "uso diagnostico in vitro".

Vari ceppi di *E. Coli* produttori di SLT sono stati testati per la produzione di tossine partendo sia da colonie isolate su piastra sia da brodocolture (vedi sezione Preparazione dei campioni, Paragrafi B e C). Ciascun ceppo è stato isolato da campioni clinici ed è stato successivamente testato mediante PCR e mediante ricerca della citotossina, per confermare la presenza di SLT. Tutti i ceppi sono risultati positivi. Il numero tra parentesi rappresenta il numero di ceppi del singolo sierotipo sottoposti al test. La tabella indica anche quale tipo di tossina veniva prodotta da ciascun ceppo:³

Sierotipo	SLT	Sierotipo	SLT
O157:H7 (3)	I	O91:H21 (1)	II
O157:H7 (7)	II	O146:H21 (1)	I
O157:H7 (9)	I & II	O137:H41 (1)	I & II
O111:NM (3)	I & II	O111:H8 (1)	I & II
OX3:H21 (1)	II	O50:H7 (1)	I
O4:NM (1)	I & II	O145:NM (2)	II
O165:H25 (1)	II	O103:H2 (1)	I
O165:H25 (1)	I & II	O125:NM (2)	I
O45:H2 (1)	I	O26:H11 (1)	I
O126:H27 (1)	I	O5:NM (3)	I
O121:H19 (1)	I & II	O171:NM (1)	II
O121:H19 (1)	II	O83:H1 (1)	I & II

RIPRODUCIBILITÀ

Variabilità intra-test – Dieci repliche di due campioni di feci e di due brodocolture sicuramente positive sono state esaminate nel corso di un singolo test per valutare la riproducibilità intra-esame dei risultati.³

Campione	Assorbanza media _{450/630}	DS	% C.V.
Brodocoltura 1	0,362	0,013	3,5
Brodocoltura 2	1,920	0,094	4,9
Camp. fecale 1	0,317	0,010	3,1
Camp. fecale 2	0,774	0,032	4,2

Variabilità inter-test - Dieci repliche di due brodocolture sicuramente positive e una negativa sono state ripetutamente testate per tre giorni per valutare la riproducibilità inter-esame dei risultati. Questo protocollo è stato ripetuto usando un campione fecale negativo e due campioni positivi.

Campione	Assorbanza media _{450/630}	DS	% C.V.
Brodocoltura 1	0,369	0,032	8,7
Brodocoltura 2	1,546	0,293	18,9
Brodocoltura 3	0,074	0,007	9,2
Camp. fecale 1	0,335	0,027	8,1
Camp. fecale 2	0,818	0,079	9,6
Camp. fecale 3	0,058	0,007	11,4

CROSS-REATTIVITÀ

La specificità del test Premier EHEC è stata valutata utilizzando i seguenti microrganismi isolati da pazienti (CI) o di collezione (ATCC). Ogni ceppo è stato testato con il test Premier EHEC partendo dalle colonie isolate in piastra (vedi sezione Preparazione dei campioni, Paragrafo B). Tutti i microrganismi hanno dato risultato negativo. Nel corso di un altro studio, un campione negativo di feci ed uno positivo per SLT sono stati artificialmente inoculati con sospensioni (pari a circa 2,4 x 10⁸ UFC/mL) dei suddetti microrganismi. Tutti i microrganismi hanno dato risultato negativo quando inoculati nel campione negativo. Inoltre, non è stata notata alcuna interferenza con il risultato del campione positivo.³

Microrganismo

<i>Campylobacter coli</i>	CI
<i>Campylobacter fetus</i>	CI
<i>Campylobacter jejuni</i>	CI
<i>Campylobacter lari</i>	CI
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 14810
<i>Enterococcus faecalis</i>	CI
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13048
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637
<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469
<i>Escherichia hermannii</i>	ATCC 33650
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CI
<i>Helicobacter pylori</i>	CI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CI
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CI
<i>Nocardia asteroides</i>	ATCC 3308

Fonte

Microorganismo

<i>Prevotella bivia</i>	ATCC 29303
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380
<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 9886
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 33672
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6570
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6571
<i>Salmonella Group B</i>	CI
<i>Salmonella hilversum (Grp N)</i>	ATCC 15784
<i>Salmonella minnesota</i>	ATCC 9700
<i>Serratia liquefaciens</i>	CI
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 11456
<i>Shigella flexneri</i>	CI
<i>Shigella sonnei</i>	CI
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus (Cowan I)</i>	ATCC 12598
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CI
<i>Streptococcus faecalis</i>	CI
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CI
<i>Yersinia enterocolitica O:9</i>	ATCC 55075

SENSIBILITÀ ANALITICA

Il limite di sensibilità del test Premier ehEC per la ST-I e per la ST-II è rispettivamente circa 7 e 15 pg/pozzetto.

FRANÇAIS

**PREMIER®
EHEC**

Méthode immuno-enzymatique pour la détection des toxines produites par *E. coli* entérohémorragique dans les échantillons de selles ou les systèmes de culture

REF 608096

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

Le test Premier EHEC est un test in vitro, rapide, en micropuits ELISA pour la détection des Shiga toxines I et II (vérotoxines) dans les échantillons de selles, les bouillons de culture, provenant de colonies individuelles ou d'étalement de colonies sur plaques géloses. Le test Premier EHEC est destiné à être utilisé comme une aide au diagnostic des infections à *E. coli* entérohémorragique.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) ont été isolées de patients présentant des colites hémorragiques et des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU)^{5, 8, 14}. A ce jour, O157:H7 est la souche EHEC la plus fréquemment rencontrée dans les selles de ces patients.^{9, 13} Ceci est probablement dû au fait que les stratégies de diagnostic conventionnelles, comme le test d'agglutination au latex O157, sont basées sur la fermentation négative du sorbitol, propriété unique de cette souche.^{2, 9, 13, 14} L'inconvénient majeur de cette approche est que au moins 50 autres sérotypes EHEC ont été rapportés comme étant associés au développement des colites hémorragiques et des SHU.^{7-11, 16}

Un facteur de virulence commun à toutes les souches EHEC est la capacité à produire des cytotoxines appelées Shiga toxines (ST) ou vérotoxines (VT)^{9, 14}. ST-I et ST-II sont les deux toxines les plus communes et chaque souche EHEC a la capacité de produire l'une et/ou l'autre en quantité variable. De plus, comparée à l'identification individuelle des sérotypes (O157:H7), la production de ST est une meilleure stratégie diagnostique pour la détermination des maladies associées à l'EHEC.^{7, 8, 16} Les cytotoxines peuvent être identifiées par un test cytotoxique spécifique décrit par Karmali.⁵ Cependant, le test cytotoxique requiert un travail intensif, nécessite un équipement pour la culture de tissus, n'est pas standardisé et peut demander plus de 72h pour confirmer la présence de cytotoxines.⁵

Utilisant la propriété des EHEC à produire ces toxines, le Premier EHEC a été développé pour la détection directe des souches produisant les ST à partir d'échantillons de selles et de systèmes de culture.

PRINCIPE DU TEST

Le Premier EHEC utilise des anticorps de capture monoclonaux anti-Shiga toxine absorbés sur les micropuits.⁴ Les échantillons dilués sont ajoutés dans les puits et incubés à température ambiante. Un lavage est effectué afin d'éliminer le matériel non lié. Pour la détection, des anticorps polyclonaux anti-shiga toxine sont ajoutés et incubés à température ambiante. Un autre lavage est effectué afin d'éliminer les anticorps non liés. Un anticorps polyclonal anti-IgG conjugué à une enzyme est ajouté et incubé à température ambiante. Si la toxine est présente, un complexe réactif anticorps-enzyme se forme. Après un lavage permettant d'éliminer le conjugué non lié, le substrat est ajouté et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Une coloration se développe en présence de l'enzyme liée. La solution d'arrêt est ajoutée et les résultats sont interprétés visuellement ou spectrophotométriquement.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisé à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

- Premier EHEC Micropuits recouverts d'anticorps** - Puits sécables en plastique recouverts d'anticorps monoclonaux spécifiques des Shiga toxine I et toxine II d'*E. coli*.
- Premier EHEC Contrôle positif** - Shiga toxine inactivée dans une solution protéique tamponnée contenant un conservateur.
- Premier EHEC Contrôle négatif** - Solution tamponnée contenant un conservateur.
- Premier EHEC Diluant pour échantillons** - Solution de protéine tamponnée contenant un conservateur.
- Solution de lavage concentrée 20X (Premier 20X Wash Buffer II)** - Tampon de lavage concentré contenant un conservateur.
- Premier EHEC Anticorps de détection** - Anticorps de lapin spécifiques des Shiga toxines dans une solution protéique tamponnée contenant un conservateur.
- Premier EHEC Conjugué enzymatique** - Anticorps de chèvre anti-lapin conjugués à la peroxydase du raifort dans une solution protéique tamponnée contenant un conservateur.
- Substrat (Premier Substrate II)** - Solution tamponnée contenant du peroxyde d'urée.
- Solution d'arrêt (Premier Stop Solution II)** - Acide sulfurique 2N. **ATTENTION:** Eviter tout contact avec la peau. Rincer abondamment à l'eau en cas de contact.
- Pipettes de transfert** - Chaque pipette présente des marques correspondant respectivement aux volumes de 50 µL, 100 µL, 200 µL et 300 µL.
- Support de puits**
- Films adhésifs**

MATERIEL NON FOURNI

- Bâtonnets d'application en bois
 - Tubes à essai (12 x 75 mm) pour la dilution des échantillons
 - Eau distillée ou désionisée
 - Flacon laveur (Pissette)
 - Epruvette graduée pour faire la solution de lavage 1X
 - Lecteur de plaque ELISA pour lire l'absorbance à 450 nm ou à 450/630 nm*
 - Optionnel (pour la méthode des bouillons de culture uniquement) Agitateur de plaque chauffant (STAT Fax™-2200)*
- * REMARQUE: Il est de la responsabilité de l'opérateur de valider les lecteurs et agitateurs de microplaque avant utilisation de ces appareils avec ce produit.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Les échantillons de patient peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés avec un niveau 2 de sécurité comme il est recommandé dans le manuel CDC/NIH «*Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories*».
- Tous les composants du coffret doivent être mélangés doucement avant utilisation.
- Ne pas interchanger les micropuits, l'anticorps de détection, le conjugué enzymatique ou le contrôle positif provenant de lots de coffrets différents. Le diluant pour échantillon, la solution de lavage concentrée 20X (Premier 20X Wash Buffer II), le substrat (Premier Substrate II) et la solution d'arrêt (Premier Stop Solution II) sont interchangeables lorsque ces réactifs n'ont pas dépassé leur date de péremption respective au moment du dosage.
- Tous les réactifs doivent être ramenés à température ambiante avant de commencer le test.
- Tenir les flacons des réactifs verticalement à une distance convenable des puits pour assurer un dépôt correct.
- Utiliser les composants du coffret avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Replacer les bouchons colorés sur le flacon correspondant après usage.
- Éliminer les déchets dans des conteneurs appropriés au matériel potentiellement infectieux.
- Le contrôle positif contient la Shiga toxine inactivée. Cependant, il doit être manipulé comme du matériel potentiellement infectieux.
- Éviter le contact de la solution d'arrêt Premier Stop Solution II (acide sulfurique 2N) avec la peau. En cas de contact, rincer immédiatement à grande eau.
- Ne pas réutiliser les micropuits.
- Conserver les barrettes de micropuits non utilisées dans le sachet d'origine, à 2-8 C. Il est important de protéger les barrettes de l'humidité.**
- Les pipettes de transfert fournies doivent être utilisées pour la préparation et le transfert de l'échantillon. Utiliser une pipette par échantillon.
- Éviter les projections lors de la distribution des échantillons dans les micropuits en plaçant la pointe de la pipette de transfert à environ la moitié du puits et en déposant lentement le long de la paroi du puits.
- Le lavage des micropuits doit être réalisé avec précision comme décrit dans la procédure de test. Une procédure de lavage inadéquate peut causer un bruit de fond élevé.
- Tous les réactifs, à l'exception de la solution de lavage 20X (Premier 20X Wash Buffer II), sont fournis déjà dilués à la concentration adéquate.
- Toute modification (en plus ou en moins) des temps d'incubation peut affecter la sensibilité et la spécificité et doit donc être évitée.
- Ne pas utiliser les micropuits dont le sachet de conservation est endommagé (ie, ouvertures ou trous).

DANGER ET MISES EN GARDE

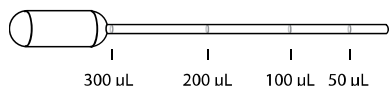
Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian bioscience. [www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version)]

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de la boîte. Conserver le coffret à 2-8 C et le remettre rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

Ci-dessous, un schéma de la pipette de transfert Premier EHEC:



PREPARATION DES REACTIFS

- Ramener tous les composants du coffret, y compris le sachet contenant les micropuits, à température ambiante avant utilisation.
- Préparer le tampon de lavage 1X selon les besoins. Par exemple: 4,0 mL de solution de lavage concentrée 20X (Premier 20X Wash Buffer II) + 76,0 mL d'eau distillée ou désionisée est une quantité suffisante pour laver une barrette. Mettre la solution préparée dans une flacon laveur (pissette) propre. Le tampon de lavage 1X peut être conservé à température ambiante jusqu'à trois mois.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Les recommandations du CDC (Centers for Disease Control) pour la conservation des échantillons de selles, l'isolement et l'identification des organismes EHEC sont les suivants:
 - Les échantillons de selles doivent être examinés dès réception au laboratoire. Si le dosage ne peut être effectué immédiatement, les échantillons de selles doivent être réfrigérés à 2-8 C ou congelés à ≤ -70 C.
 - Les échantillons de selles réfrigérés doivent être examinés dans les une à deux heures après réception. Si l'examen ne peut se faire dans les deux heures, les échantillons doivent être placés dans un milieu Cary-Blair. Tous les prélèvements rectaux doivent être placés immédiatement dans un milieu de transport de type Cary-Blair.
 - Les échantillons dans un milieu de transport doivent être conservés à 2-8 C s'ils ne peuvent être examinés dans les deux à trois jours. Si le dosage ne peut se faire dans ce laps de temps, les échantillons doivent être congelés à ≤ -70 C. Les échantillons en milieu de transport ne doivent pas être réfrigérés pendant des jours, ensuite congelés ou laissés à température ambiante quelque soit la durée.
- Conservation des échantillons de selles et de bouillons de culture avant la réalisation du test Premier EHEC: les échantillons de selles et de bouillons peuvent être conservés jusqu'à 7 jours à 2-8 C avant de procéder au test ELISA. Si le test n'est pas réalisé dans ce laps de temps, les échantillons de selles et/ou bouillons doivent être congelés à ≤ -70 C. Des cycles répétés de congélation/décongélation doivent être évités.

A. Test direct sur selles:

- Ajouter 200 µL de diluant échantillons dans un tube à essai (12 x 75 mm) propre (Remarque: la troisième graduation sur la pipette de transfert correspond à 200 µL).
- Mélanger les selles aussi soigneusement que possible avant de pipeter.
 - Selles liquides ou semi-liquides ou selles en milieu de transport: en utilisant une pipette de transfert, aspirer les selles jusqu'au trait de jauge de 50 µL (première graduation à partir de l'embout de la pipette). Déposer les selles dans le diluant échantillons. En utilisant la même pipette aspirer et refouler doucement la suspension de selles à plusieurs reprises puis vortexer 15 secondes. Laisser la pipette de transfert dans le tube pour les manipulations suivantes.
 - Selles solides: en utilisant un bâtonnet applicateur en bois, transférer une petite quantité (3-4 mm de diamètre) de selles soigneusement mélangées dans le diluant échantillons. Emulsifier les selles à l'aide du bâtonnet applicateur en bois puis vortexer 15 secondes. Placer une pipette de transfert dans le tube. Procéder immédiatement au dosage.

B. Culture sur boîte de pétri:

- Ajouter 20 µL de selles ou d'échantillon sur boîte de pétri MacConkey ou sorbitol/MacConkey et étaler avec une anse d'inoculation.
- Incuber 16-24 heures à 37 C.
- Les colonies individuelles ou étalées peuvent être prélevées avec l'anse et placées dans 200 µL de diluant échantillons pour le test ELISA.

C. Bouillons:

- Ajouter 10-50 µL de selles à 5 mL de bouillon MacConkey ou bouillon GN. Vortexer 10-15 secondes.
- Incuber 16-24 heures à 37 C.
- Ajouter 50 µL de bouillon de culture à 200 µL de diluant pour échantillons pour le test ELISA.

PROCEDURE DU TEST

Remarque: pour un nombre important d'échantillons, une pipette à répétition ou multicanaux peut être utilisée pour la distribution des réactifs.

- Après avoir ramené le sachet à température ambiante, détacher le nombre de micropuits nécessaires (1 puits par échantillon plus 1 puits pour le contrôle positif et 1 puits pour le contrôle négatif par série). Mettre les micropuits dans le support de barrettes et noter la position de tous les puits. Les puits inutilisés doivent être immédiatement remis dans le sachet.

- Ajouter 100 µL d'échantillon dilué (deuxième graduation de la pipette) dans le puits approprié (placer la pipette à mi-hauteur dans le puits et déposer très lentement l'échantillon dilué le long de la paroi du puits).
- Ajouter 2 gouttes de contrôle positif et négatif dans les puits appropriés. Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes.
- Recouvrir les barrettes à l'aide du film adhésif et laisser incuber la plaque 1 heure à température ambiante (22-27 C). Pour la méthode des bouillons de culture uniquement: alternativement, les laboratoires équipés d'un agitateur de plaque chauffant (STAT Fax™-2200) peuvent incuber les échantillons dilués en agitant la plaque pendant 30 minutes à 25 C à 1000 rpm (programmation 5).
- Enlever **avec précaution le film adhésif de la plaque et procéder au lavage des puits:**
 - Éliminer d'un geste ferme le contenu des puits dans un récipient pour déchets biologiques.
 - Retourner la plaque et la taper sur du papier absorbant propre.
 - Remplir complètement les puits de tampon de lavage 1X. Éviter la formation de mousse dans les puits en dirigeant le flux du tampon sur la paroi du puits.
 - Répéter le cycle de lavage (vider, taper sur du papier propre, remplir) 4 fois. Après le dernier remplissage, vider et taper les plaques suffisamment fort sur du papier absorbant propre pour éliminer l'excès de tampon de lavage, mais ne laisser à aucun moment les puits sécher complètement.
- Ajouter 2 gouttes d'anticorps de détection dans chaque puits. Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes.
- Recouvrir les barrettes à l'aide du film adhésif et laisser incuber la plaque 30 minutes à température ambiante (22-27 C). Pour la méthode des bouillons de culture uniquement: alternativement, laisser incuber en agitant la plaque pendant 15 minutes à 25 C à 1000 rpm à l'aide du STAT Fax™ (programmation 5).
- Répéter la procédure de lavage (étape 5).
- Ajouter 2 gouttes de conjugué enzymatique dans chaque puits. Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes.
- Recouvrir les barrettes à l'aide du film adhésif et laisser incuber la plaque 30 minutes à température ambiante (22-27 C). Pour la méthode des bouillons de culture uniquement: alternativement, laisser incuber en agitant la plaque pendant 15 minutes à 25 C à 1000 rpm à l'aide du STAT Fax™ (programmation 5).
- Répéter la procédure de lavage (étape 5).
- Essuyer le dessous de la plaque à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- Ajouter 2 gouttes de substrat (Premier Substrate II) dans chaque puits. Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes. Incuber 10 minutes à température ambiante.
- Ajouter 2 gouttes de solution d'arrêt (Premier Stop Solution II) dans chaque puits. Bien homogénéiser la plaque par mouvement circulaire pendant 30 secondes. **Remarque:** la couleur bleue initiale d'une réaction positive vire au jaune après addition de la solution d'arrêt (Premier Stop Solution II).
- Observer les réactions:
 - Lecture visuelle: lire dans les 15 minutes après addition de la solution d'arrêt.
 - Lecture spectrophotométrique: faire le zéro de l'ELISA sur l'air. Essuyer le dessous des puits avec un tissu non pelucheux. Lire l'absorbance à 450 nm ou à 450/630 nm dans les 30 minutes après addition de la solution d'arrêt.

INTERPRETATION DES RESULTATS

- Lecture visuelle**
Négatif = incolore
Positif = couleur jaune marquée
Une couleur jaune faible doit être analysée au spectrophotomètre.
- Remarque:** Etant donnée l'importance épidémiologique d'obtenir des isolats bactériens, il est recommandé que tous les échantillons qui se révèlent positifs en toxine soient soumis à l'isolement d'organismes positifs pour les Shiga toxines. Il est souhaitable que les laboratoires de microbiologie coordonnent l'isolement des bactéries, en accord avec les agences sanitaires publiques locales.
- Lecture spectrophotométrique à une double longueur d'onde (450 nm)**
Négatif = $DO_{450} < 0,180$
Positif = $DO_{450} \geq 0,180$
- Lecture spectrophotométrique à une double longueur d'onde (450/630 nm)**
Négatif = $DO_{450/630} < 0,150$
Positif = $DO_{450/630} \geq 0,150$

Remarque: un résultat positif indique la présence de Shiga toxines. Un résultat négatif indique l'absence de Shiga toxines, ou que le taux de toxine est en-dessous de la limite de détection du test.

Remarque: Se référer à la section « Contrôle de Qualité » (voir point 5) concernant les résultats faiblement positifs. Les réactions fortement positives peuvent donner un précipité violet dans les minutes qui suivent l'arrêt de la réaction.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Les contrôles positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque série de test afin de garantir la qualité des réactifs.
- Le contrôle positif doit être $> 0,500$ à 450 nm ou à 450/630 nm. Le contrôle positif doit avoir une coloration jaune bien définie en lecture visuelle.
- Le contrôle négatif doit être $< 0,180$ à 450 nm et $< 0,150$ à 450/630 nm mais supérieur à 0,00. Si le contrôle est $< 0,00$, refaire le zéro sur l'air et relire la plaque. Le contrôle négatif doit être incolore en lecture visuelle.
- Un puits positif ne montrant pas de couleur visible doit être essuyé sur sa face inférieure, repositionné et lu à nouveau.
- Si la fréquence de résultats faiblement positifs (DO entre 0,150 et 0,200 à double longueur d'onde ou DO entre 0,180 et 0,230 à simple longueur d'onde) est supérieure à 5% des échantillons testés, ceci indique un lavage insuffisant. Il est recommandé d'effectuer un lavage plus vigoureux ou d'augmenter le nombre de lavages à 7 lavages lors de l'étape 5.
- Si les réactions attendues ne sont pas observées la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.
- Lors de chaque utilisation, les composants du coffret doivent être examinés visuellement à la recherche de signes visibles de contamination, de congélation ou de fuites.
- Il est recommandé de consigner les résultats de chaque contrôle qualité dans un cahier de laboratoire afin de maintenir une qualité élevée des procédures du test.

VALEURS ATTENDUES

Le test Premier EHEC détecte la présence de Shiga toxines. Les valeurs attendues pour une population donnée doivent être déterminées par chaque laboratoire. Le taux de positivité peut varier en fonction de l'âge du patient, de la localisation géographique, de la méthode de prélèvement de l'échantillon, de la manipulation et du transport, du test employé et de la santé générale de la population de patients étudiée.^{4, 5, 9, 16}

Parmi les pathogènes isolés de selles dans les états de Washington et du Minnesota entre les années 1984-1987, seuls *Campylobacter* et *Salmonella* se placent au dessus de *E. coli* O157:H7. Des résultats similaires ont été obtenus au cours de la même période en Alberta, Colombie Britannique et Ontario, Canada.^{2, 12, 13, 15, 17-19} Les tests cytotoxiques directs ont montré que 10% d'échantillons supplémentaires contiendraient des organismes EHEC non diagnostiqués. Nos études cliniques ont montré que ce chiffre était prudent.^{3, 7, 10, 11, 16}

Il a été montré que le taux d'isolement de O157:H7 était plus important pendant les mois d'été (Juin, Juillet, Août). Le taux de souches non-O157 productrices de ST reste à déterminer.^{3, 7, 12}

LIMITES DU TEST

- Le test Premier EHEC permet de détecter la présence des toxines Shiga à partir de selles, de bouillons ou d'isolats de culture. Il n'a pas été démontré que le taux de toxine était corrélé avec la présence ou la gravité de la maladie. Comme avec toutes les procédures de diagnostic in vitro, les résultats du test doivent être interprétés par un praticien conjointement aux autres informations cliniques.
- La Shiga Toxine I et la toxine produite par la souche de *Shigella dysenteriae* type 1 (shiga toxine) sont pratiquement identiques. De ce fait, le Premier EHEC donnera un résultat positif lorsque la shiga toxine est présente en quantité détectable dans l'échantillon.
- Un résultat positif n'exclut pas la présence d'autres organismes infectieux.
- L'expression de la toxine peut être perdue après des passages en série. L'utilisation d'étalement de colonies peut augmenter la probabilité de détection de la production de ST.

- Todos los reactivos, excepto la solución tampón de lavado 20X II, ya vienen diluidos a la concentración apropiada.
- Cualquier desviación por debajo o por encima de los tiempos de incubación establecidos puede afectar a la sensibilidad y a la especificidad y deberá evitarse.
- No use micropocillos que tengan la bolsa dañada (ej. rotos o perforados).

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

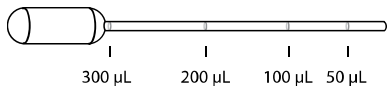
Se debe referir a los SDS, disponibles en www.meridianbioscience.com (US versión) / www.meridianbioscience.eu (EU versión) para las Frases de Peligro y Precaución.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta del kit. Guardar el kit a 2-8 C y colocarlo de nuevo en el refrigerador inmediatamente después de cada utilización.

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

A continuación se muestra un diagrama de la pipeta de transferencia que viene con el kit Premier EHEC:



PREPARACION DE REACTIVOS

- Antes de utilizarlo, dejar que todo el kit, incluyendo la bolsa de los micropocillos, alcance la temperatura ambiente.
- Preparar el volumen necesario de solución tampón de lavado 1X. Por ejemplo: 4.0 mL de solución tampón de lavado 20X II + 76.0 mL de agua destilada o desionizada son suficientes para lavar una tira. Colocarlo en una botella surtidora de enjuague. La solución tampón de lavado 1X puede guardarse a temperatura ambiente por un máximo de tres meses.

RECOLECCIÓN Y PREPARACION DE LA MUESTRA

- Las Recomendaciones De La CDC Para El Almacenamiento, Aislamiento E Identificación De Muestras De Materia Fecal Para Los Organismos EHEC:
 - Las muestras fecales frescas deben ser examinadas tan pronto llegan al laboratorio. Si no se procesan inmediatamente, deben ser almacenadas a 2-8 C o congeladas a ≤ -70 C.
 - Las muestras fecales frescas que han sido refrigeradas deben ser procesadas dentro de 1-2 horas. Si la muestra no puede ser procesada en este tiempo, deben ser puestas en medio de transporte Cary-Blair. Todos los hisopos de muestras rectales deben ser puestos inmediatamente en medio de transporte Cary-Blair. Si las muestras en medio de transporte van a ser examinadas en 2-3 días, deben ser refrigeradas. Si las muestras en medio de transporte no van a ser examinadas en 2-3 días, deben ser congeladas inmediatamente a ≤ -70 C. Muestras en medio de transporte no deben ser refrigeradas por días y luego ser congeladas o permitir que estén a temperatura ambiente por ningún tiempo.
- Almacenamiento de la materia fecal y los medios de cultivo antes de realizar el ensayo Premier EHEC: Las muestras de materia fecal y los medios de cultivo pueden almacenarse a 2-8 C hasta siete días antes de procesar el EIA. Si el análisis no se realiza dentro de este plazo, el medio deberá congelarse a (≤ -70 C). Evitar la congelación y descongelación repetida.

A. Materia fecal directa:

- Añadir 200 μ L del diluyente de muestra a un tubo de ensayo limpio de 12 x 75 mm. (NOTA: La tercera marca desde la punta de la pipeta de transferencia representan 200 μ L.)
- Antes de pipetear, mezclar la materia fecal lo mejor posible.
 - Materia fecal líquida, semisólida o en medio de transporte: Usando una pipeta de transferencia, tomar la materia fecal hasta el punto de calibración de 50 μ L (primera marca desde la punta de la pipeta). Dispensar la materia fecal en el diluyente de muestra. Usando la misma pipeta, aspirar y expulsar suavemente la suspensión de materia fecal varias veces, luego mezclar con un vórtex durante 15 segundos. Dejar la pipeta de transferencia en el tubo para su uso posterior.
 - Materia fecal que no puede pipetearse: Usando un aplicador de madera, transferir una porción pequeña (3-4 mm de diámetro) de materia fecal bien mezclada al diluyente de muestra. Emulsionar la materia fecal usando un aplicador de madera, luego mezclar con un vórtex durante 15 segundos. Colocar una pipeta de transferencia en el tubo.

B. Método en placa:

- Añadir 20 μ L de materia fecal o de la muestra a una placa MacConkey o Sorbitol/MacConkey y extender con una asa de inoculación.
- Incubar 16-24 horas a 37 C.
- Las colonias individuales o los barridos de colonias pueden retirarse con una asa y colocarse en 200 μ L de diluyente de muestra para procesar el EIA.

C. Método en medio de cultivo líquido:

- Añadir 10-50 μ L de materia fecal a 5 mL de Caldo MacConkey, Caldo GN o Caldo E-Z-Coli (Laboratorios Difco). Mezclar con vórtex durante 10-15 segundos.
- Incubar 16-24 horas a 37 C.
- Añadir 50 μ L del crecimiento bacteriano a 200 μ L del diluyente de muestra para procesar el EIA.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Cuando se tiene un gran número de muestras, pueden usarse pipetas repetitivas o múltiples para dispensar los reactivos.

- Después de que la bolsa haya alcanzado la temperatura indicada, separar el número de micropocillos requeridos (1 pocillo para cada muestra, más 1 pocillo para el control positivo y 1 para el control negativo por serie). Colocar los micropocillos en el soporte de la tira de micropocillos y registrar la posición de todos ellos. Guardar los micropocillos no utilizados en la bolsa sellable inmediatamente.
- Añadir 100 μ L de muestra diluida (segunda marca desde la punta de la pipeta) al pocillo apropiado, (colocar la punta de la pipeta en la mitad del pocillo y permitir que la muestra corra lentamente hacia abajo por la pared del mismo).
- Añadir 2 gotas del control positivo y negativo a los pocillos apropiados, permitiendo que las gotas caigan libremente. Mezclar los pocillos moviendo/agitando la placa en forma circular durante 30 segundos.
- Cortar el sellador de placa del tamaño apropiado y presionar firmemente sobre la tapa de los micropocillos para sellar la placa. Incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente (22-27 C). Método de Caldo Solamente: Como alternativa los laboratorios que están equipados con agitador de placa-incubador (STAT Fax™-2200) pueden incubar y agitar el plato por 30 minutos a 25 C y 1000 rpm (nivel 5).
- Cuidadosamente**, quitar el sellador de la placa y lavar los pocillos:
 - Deshechar los contenidos de la placa en un recipiente para materiales biológicos peligrosos.
 - Golpear la placa invertida sobre una pila de toallas de papel limpias.
 - Llenar todos los pocillos con la solución tampón de lavado 1X. Se recomienda el uso de una botella surtidora de enjuague.
 - Repetir el ciclo de lavado (deshechar, golpear sobre toallas limpias, llenar) otras 4 veces. Después del último llenado, deshechar y golpear las placas sobre toallas de papel limpias, lo suficientemente fuerte como para retirar toda la solución tampón de lavado posible, pero sin dejar que los pocillos se sequen completamente en ningún momento.
- Añadir 2 gotas del anticuerpo de detección a cada pocillo, permitiendo que las gotas caigan libremente. Agitar/mezclar la placa con movimientos circulares durante 30 segundos.
- Presionar el sellador de placa firmemente sobre la tapa de los micropocillos para sellarla. Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-27 C). Método de Caldo Solamente: Como alternativa incube y agite el plato por 15 minutos en el STAT Fax™ a 25 C y a 1000 rpm (nivel 5).
- Repetir el procedimiento de lavado (Paso No. 5).
- Añadir 2 gotas del conjugado enzimático a cada pocillo, permitiendo que las gotas caigan libremente. Mover/agitar la placa con movimientos circulares durante 30 segundos.
- Presionar el sellador de la placa firmemente sobre la tapa de los micropocillos para sellarla. Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-27 C). Método de Caldo Solamente: Como alternativa incube y agite el plato por 15 minutos en el STAT Fax™ a 25 C y a 1000 rpm (nivel 5).
- Repetir el procedimiento de lavado (Paso No. 5).
- Limpia la parte inferior de los pocillos con un pañuelo de papel sin hilas.
- Añadir 2 gotas de la solución de sustrato a cada pocillo, permitiendo que las gotas caigan libremente. Agitar/mezclar la placa con movimientos circulares durante 30 segundos. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Añadir 2 gotas de la solución de parada a cada pocillo, permitiendo que las gotas caigan libremente. Agitar/mezclar la placa con movimientos circulares durante 30 segundos. **NOTA:** El color inicial de la reacción positiva es azul, cambiando a amarillo al añadir la solución de parada.
- Observas las reacciones:
 - Determinación visual – Leer dentro de los 15 primeros minutos después de añadir la solución de parada.
 - Determinación espectrofotométrica – Realizar el cero en aire en el lector EIA. Limpiar la parte inferior de los pocillos con un pañuelo de papel sin hilas. Leer la absorbancia a 450 nm ó 450/630 nm dentro de los primeros 30 minutos después de añadir la solución de parada.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- Lectura visual**
Negativo = incoloro
Positivo = color amarillo definido
Un color amarillo poco visible debe evaluarse espectrofotométricamente.
NOTA: A la vista de la importancia epidemiológica en cuanto a la obtención de aislados de bacterias, se recomienda que todas las muestras toxina-positivas sean procesadas para el aislamiento de organismos Shigatoxina-positivos. Sugerimos que cada laboratorio de microbiología en particular coordine el aislamiento de bacterias con su correspondiente laboratorio local de salud pública.
- Longitud de onda única espectrofotométrica (450 nm)**
Negativo = OD₄₅₀ < 0,180
Positivo = OD₄₅₀ \geq 0,180
- Longitud de onda dual espectrofotométrica (450/630 nm)**
Negativo = OD_{450/630} < 0,150
Positivo = OD_{450/630} \geq 0,150
NOTA: Un resultado positivo indica la presencia de Shiga toxinas. Un resultado negativo indica la ausencia de Shiga toxinas, o que el nivel de toxina es inferior al que el ensayo puede detectar.
NOTA: Ver la sección de Control de Calidad (punto no. 5) referente a los resultados bajos positivos. Las reacciones extremadamente positivas pueden dar un precipitado de color púrpura a los pocos minutos de parar la reacción.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

- Los controles positivos y negativos deben utilizarse con cada ejecución del ensayo para asegurar la calidad de los reactivos.
- La lectura del control positivo deberá ser > 0,500, ya sea a 450 nm ó 450/630 nm. La lectura visual del control positivo deberá ser de color amarillo bien definido.
- La lectura del control negativo deberá ser < 0,180 a 450 nm y < 0,150 a 450/630 nm, pero mayor de 0,00. Si el control negativo es < 0,00, hacer de nuevo el blanco en aire y leer la placa nuevamente. En la lectura visual, el control negativo deberá ser incoloro.
- Cualquier pocillo positivo que no teng color visible, deberá ser reubicado, su parte inferior limpiada y leído nuevamente.
- Si la frecuencia de resultados bajos positivos (DO entre 0,150 y 0,200 con longitud de onda dual o EO entre 0,180 y 0,230 con longitud de onda única) es mayor del 5% de las muestras analizadas, nos indica que el lavado ha sido insuficiente. Se recomienda un lavado más vigoroso o aumentar el número de lavados a siete en el paso 5 del Procedimiento.
- Si no se observan las reacciones esperadas y los reactivos aún no han alcanzado la fecha de caducidad, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.
- Los componentes del kit deberán examinarse visualmente en cada utilización, observando si existen signos obvios de contaminación microbiana, congelación o disminución de volumen debido a derrame.
- Se sugiere que los resultados de cada control de calidad sean registrados en un libro apropiado para mantener registros de alta calidad de la prueba.

VALORES ESPERADOS

El test Premier EHEC detecta la presencia de Shiga Toxina. Los valores esperados en una población específica deben ser determinados para cada laboratorio. La tasa de positividad puede variar dependiendo de la edad del paciente, la localización geográfica, el método de recolección, almacenamiento y transporte de la muestra, el test empleado y la salud en general de la población de pacientes que están siendo estudiados.^{4, 5, 9, 10}

Únicamente *Campylobacter* y *Salmonella* superaron la incidencia de *E. Coli* serotipo O157:H7 como el patógeno más frecuentemente aislado en la materia fecal, en los estados de Washington y Minnesota (EE. UU.) durante los años de 1984 a 1987. Datos similares fueron obtenidos durante este mismo período en las regiones canadienses de Alberta, British Columbia y Ontario.^{2, 12, 13, 15, 17-19} Las pruebas directas para detectar la presencia de citotoxinas en la materia fecal han demostrado que un 10% adicional de todas las muestras pueden contener organismos de EHEC no diagnosticados. Nuestros estudios clínicos demuestran que aún este número puede ser conservador.^{4, 5, 9, 10, 7, 10, 11, 16}

Las tasas de aislamiento del serotipo O157:H7 se ha ido demostrando lentamente que son las mayores durante los meses de verano, junio, julio y agosto. Las tasas de las cepas no productoras del serotipo O157 SLT aún necesitan ser determinadas.^{2, 12}

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El ensayo Premier EHEC detecta la presencia de Shiga toxinas en la materia fecal, caldos o cultivos de aislamiento. No se ha demostrado que el nivel de toxina esté correlacionado con la presencia o la severidad de la enfermedad. Al igual que con todos los procedimientos de diagnóstico *in vitro*, los resultados del ensayo deberán ser interpretados por un médico, en conjunto con otra información clínica.
- La Shiga toxina I y la toxina producida por las cepas tipo 1 de *Shigella dysenteriae* (toxina Shiga) son casi idénticas. Por lo tanto, el ensayo Premier EHEC generará una señal positiva cuando la toxina Shiga esté presente en la muestra en cantidades detectables.
- Un resultado positivo no excluye la presencia de otros organismos infecciosos.
- La expresión de la toxina puede perderse durante episodios seaídos. Los barridos de colonias pueden incrementar la probabilidad de detectar organismos que producen ST.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El test Premier EHEC fue evaluado en tres centros médicos reconocidos, y en un laboratorio de salud estatal de los EE.UU. En cada sitio donde se realizó el estudio, se analizaron muestras de materias fecales diarreas sometidas a cultivos de rutina para patógenos entéricos. Cada muestra de materia fecal fue analizada directamente y a partir de cultivos en caldos nutritivos con el test Premier EHEC. Una prueba específica de neutralización de citotoxina ST fue realizada con estas muestras en Meridian Bioscience. Los resultados obtenidos en el análisis directo de muestras de materia fecal y de caldo de cultivo están resumidos en la tabla presentada a continuación.³

	Test Premier EHEC			
	Prueba directa de materia fecal		Prueba de materia fecal en caldo de cultivo	
Citotoxina	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Positiva	15	4	22	0
Negativa	17	391	5	236
Indeterminada	2	17	0	3

Sensibilidad Relativa = 78,9% (56,6-91,5%)* 100% (85,1-100%)
Especificidad Relativa = 95,8% (93,4-97,4%) 97,9% (95,2-99,1%)
Concordancia Relativa = 95,1% (92,6-96,8%) 98,1% (95,6-99,2%)

Cepas de EHEC productoras de citotoxina ST fueron aisladas a partir de dos de las 17 muestras con resultado positivo en el test Premier EHEC, y negativo para citotoxina en la prueba directa de materia fecal: una O157:H7 y otra O6:H no tipificable. Además, la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR**) confirmó la presencia del gen ST en dos muestras de materia fecal con resultado indeterminado: Premier EHEC Positivo/citotoxina negativa y Premier EHEC positivo/citotoxina indeterminada. Las 15 muestras directas de materia fecal con resultado Premier EHEC positivo/citotoxina positiva comprendían nueve – O157:H7, dos – O6:H no tipificables, una – una no tipificable: H12, 41w ó 51, y dos cepas EHEC O111:NM. No pudo aislarse ningún organismo en la muestra de materia fecal restante.

Cepas de EHEC productoras de citotoxina ST fueron aisladas a partir de dos de cinco de las muestras de caldo con resultado Premier EHEC positivo/citotoxina negativa: una O157:H7 y una O111:NM. Las 22 muestras con resultado Premier EHEC positivo/citotoxina positiva (cepas productoras de EHEC) comprendieron 13 muestras O157:H7, tres O6:H6 no tipificables, una O no tipificable :H12, 41w 6 51, y una O111:NM productora de citotoxina ST. En las cuatro muestras restantes de cultivo en caldo no se aisló ningún organismo.

*Los intervalos de Confianza del 95% fueron calculados por el método normal como se indica entre paréntesis.
** La prueba PCR es una herramienta diagnóstica que no está indicada para uso diagnóstico *in vitro*.

Varios organismos productores de enterotoxina *E. coli* ST fueron analizados en el test EUA; éstos fueron procesados por el método de cultivo en agar y en caldo nutritivo (ver Preparación de la Muestra parte B y parte C). Cada cepa ha sido aislada a partir de una muestra clínica, y cada una fue analizada por un ensayo para citotoxina y por una eracción en cadena de la polimerasa (PCR), con el objeto de confirmar la presencia del gen ST. Todos los organismos que fueron analizados de esta manera generaron resultados positivos. El número entre paréntesis representa el número de cepas diferentes analizadas dentro de ese tipo de grupo. Además, el tipo de toxina producida por cada cepa como es indicado.³

Tipo de Cepa	Tipo ST	Tipo de Cepa	Tipo ST
O157:H7 (3)	I	O91:H21 (1)	II
O157:H7 (7)	II	O146:H21 (1)	I
O157:H7 (9)	I & II	O137:H41 (1)	I & II
O111:NM (3)	I & II	O111:H8 (1)	I & II
OX3:H21 (1)	II	O50:H7 (1)	I
O4:NM (1)	I & II	O145:NM (2)	II
O165:H25 (1)	II	O103:H2 (1)	I
O165:H25 (1)	I & II	O125:NM (2)	I
O45:H2 (1)	I	O26:H11 (1)	I
O126:H27 (1)	I & II	O5:NM (3)	I
O121:H19 (1)	I & II	O171:NM (1)	II

REPRODUCIBILIDAD

Variabilidad dentro de la misma prueba - diez réplicas de dos muestras positivas de caldos de cultivo, y dos muestras conocidas de materia fecal positiva fueron analizadas en una prueba.

Muestra	Abs. Media _{450/630}	D.E.	CV %
Caldo #1	0,362	0,013	3,5
Caldo #2	1,920	0,094	4,9
Materia fecal #1	0,317	0,010	3,1
Materia fecal #2	0,774	0,032	4,2

Variabilidad entre prueba y prueba – diez réplicas de dos muestras positivas y conocidas de caldos de cultivo, y una muestra negativa de caldo de cultivo fueron corridas en tres días separados. Este protocolo fue repetido utilizando una muestra de materia fecal negativa y dos positivas.

Muestra	Abs. Media _{450/630}	D.E.	CV %
Caldo # 1	0,369	0,032	8,7
Caldo #2	1,546	0,293	18,9
Caldo #3	0,074	0,007	9,2
Materia fecal #1	0,335	0,027	8,1
Materia fecal #2	0,818	0,079	9,6
Materia fecal #3	0,058	0,007	11,4

REACTIVIDAD CRUZADA

La especificidad del test EUA Premier EHEC fue analizada utilizando los aislados clínicos (AC) o cepas ATCC aquí anotados. Cada cepa fue analizada directamente en el test EIA mediante el método en plato utilizando el procedimiento de colonia aislada (ver Preparación de la Muestra parte B). Cada una de las cepas dio un resultado negativo al ser analizadas de esta manera. En un estudio adicional, las cepas bacterianas fueron añadidas ya sea a una sola muestra de materia fecal positiva para EHEC, o a una sola muestra de materia fecal negativa para EHEC, a una concentración aproximada de 2,4 x 10⁸ UFC/mL. Todos los aislados clínicos (AC) o cepas ATCC listados a continuación dieron un resultado negativo en el análisis directo de la muestra. Además, las siguientes cepas no alteraron los resultados esperados cuando fueron añadidas a una muestra de materia fecal positiva o negativa para EHEC.³

Descripción		Descripción	
<i>Campylobacter coli</i>	CI	<i>Prevotella bivia</i>	ATCC 29303
<i>Campylobacter fetus</i>	CI	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380
<i>Campylobacter jejuni</i>	CI	<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 9886
<i>Campylobacter lari</i>	CI	<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 33672
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6570
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6571
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 14810	Salmonella Group B	CI
<i>Enterococcus faecalis</i>	CI	<i>Salmonella hilversum</i> (Grp N)	ATCC 15784
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13048	<i>Salmonella minnesota</i>	ATCC 9700
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	<i>Serratia liquefaciens</i>	CI
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 11456
<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469	<i>Shigella flexneri</i>	CI
<i>Escherichia hermannii</i>	ATCC 33650	<i>Shigella sonnei</i>	CI
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CI	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Helicobacter pylori</i>	CI	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I)	ATCC 12598
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CI
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CI	<i>Streptococcus faecalis</i>	CI
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CI	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CI
<i>Nocardia asteroides</i>	ATCC 3308	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	ATCC 55075

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

Los límites de detección para ST-I y ST-II son 7 y 15 pg/pocillo respectivamente.

DEUTSCH



Enzymimmunoassay zum Nachweis von Toxinen, die von enterohämorrhagischen *E. Coli* in Stuhlproben oder Kulturen produziert werden

REF 608096

IVD In-Vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der Premier EHEC-Test ist ein schneller *in vitro* Mikrotiter-ELISA zum Nachweis von Shiga Toxinen I und II (Verzotoxinen) aus Stuhlproben, aus Flüssig-Nährböden oder aus Einzelkolonien oder Kolonieausstrichen von Agarplatten. Der Premier EHEC-Test soll die Diagnosestellung bei Infektionen mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Enterohämorrhagische *E. Coli* (EHEC) wurden aus Patienten mit hämorrhagischer Kolitis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) isoliert.^{5,8,14} Bis heute ist der *E. coli* Serotyp O157:H7 der am häufigsten gefundene EHEC-Stamm im Stuhl dieser Patienten.^{9,13} Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, daß die herkömmlichen diagnostischen Strategien wie die O157-Latex-Agglutinationstests auf der einzigartigen Fähigkeit dieses Stammes Ur Sorbit-negativen Fermentation beruhen.^{2,9,13,14} Das Hauptproblem dieses Ansatzes ist, daß mindestens 50 weitere EHEC-Serotypen mit der hämorrhagischen Kolitis und dem HUS in Zusammenhang gebracht werden.^{7,11,16}

Eine virulente Eigenschaft haben alle EHEC-Stämme gemeinsam: die Fähigkeit zur Produktion eines oder mehrerer Zytotoxine, den sogenannten Shiga Toxinen (ST) oder Verotoxinen (VT).¹⁴ ST-I und ST-II sind die häufigsten Toxine, und einzelne EHEC Stämme haben die Fähigkeit, eines oder beide in unterschiedlichen Mengen zu produzieren. Die Messung der ST-Produktion ist daher der individuellen (O157:H7) Serotyp-Identifikation als diagnostische Strategie zur Diagnose EHEC-assoziiierter Erkrankungen überlegen.^{7,8,16} Zytotoxine können durch den spezifischen Zytotoxintest nach Karmali identifiziert werden.⁸ Dieser Zytotoxin-Test ist jedoch arbeitsintensiv, bedarf der Ausrüstung zur Zellkultivierung, wurde bisher nicht standardisiert und kann bis zu 24 Stunden dauern, um das Vorkommen des Zytotoxins zu bestätigen.⁸

Premier EHEC nutzt die Eigenschaft der EHEC zur Produktion dieser Toxine aus und wurde für den direkten Nachweis ST-produzierender Stämme aus Stuhlproben oder Kulturen entwickelt.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der Premier EHEC-Test verwendet monoklonale Anti-Shiga-Toxin-Erfassungs-Antikörper, die an Mikrotiterkavitäten gebunden sind.⁴ Verdünnte Proben werden in die Kavitäten gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Material wird in einem Waschschritt entfernt. Polyklonale Anti-Shiga-Toxin-Antikörper werden zum Nachweis hinzugefügt und bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper werden durch einen weiteren Waschschritt entfernt. Enzymkonjugierte, polyklonale anti-IgG-Antikörper werden zugesetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn Toxin in der Probe vorhanden ist, entsteht ein reaktiver Antikörper-Enzym-Komplex. Nach dem Waschschritt um ungebundenen Konjugat zu entfernen, wird Substrat zugefügt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. In der Gegenwart von gebundenem Enzym entwickelt sich Farbe. Nach der Zugabe von Stopp-Lösung werden die Ergebnisse mit bloßem Auge oder photometrisch abgelesen.

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

- Premier EHEC Antikörper-beschichtete Mikrotiterkavitäten Plastikavitäten** – zum Auseinanderbrechen, beschichtet mit monoklonalen Antikörpern spezifisch gegen *E. Coli* Shiga Toxin I und II.
- Premier EHEC Positiv-Kontrolle** – inaktiviertes Shiga Toxin in einer gepufferten Proteinlösung mit Konservierungsmittel.
- Premier EHEC Negativ-Kontrolle** – gepufferte Lösung mit Konservierungsmittel.
- Premier EHEC Probenverdünnungspuffer** – gepufferte Proteinlösung mit Konservierungsmittel.
- 20X Waschwuffer (Premier 20X Wash Buffer II)** – konzentrierter Waschwuffer mit Konservierungsmittel.
- Premier EHEC Nachweis-Antikörper** – Kaninchen-Antikörper spezifisch gegen Shiga Toxine in gepufferter Proteinlösung mit Konservierungsmittel.
- Premier EHEC Enzym-Konjugat** – Ziege anti-Kaninchen Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase in gepufferter Proteinlösung mit Konservierungsmittel.
- Substrat (Premier Substrate II)** – gepufferte Lösung mit Hornstoffperoxid.
- Stopplösung (Premier Stop Solution II)** – 2N Schwefelsäure. **Achtung:** Hautkontakt vermeiden, bei Kontakt mit Wasser spülen.
- Transfer-Pipetten** - Jede Pipette ist gekennzeichnet um die 50 µL, 100 µL, 200 µL und 300 µL Volumen anzuzeigen.
- Halter für Mikrotiter-Streifen**
- Klebefolie zum Verschließen der Mikrotiter-Streifen**

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Holzspatel
- Reagenzröhrchen (12 x 75 mm) zur Probenverdünnung
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Spritzflasche
- Meßzylinder zur Herstellung des Arbeits-Waschwuffers (1fach konzentriert)
- ELISA-Plattenphotometer für Extinktionsmessungen bei 450 nm oder 450/630 nm*
- STAT Fax™ 2200 Plattenrüttler oder gleichwertig (Optional nur für Nährboden-Methode)
* HINWEIS: Der Benutzer ist dafür verantwortlich, die Messgeräte und die Plattenrüttler vor ihrem Einsatz mit diesem Produkt zu bestätigen.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Patientenproben können infektiös sein und sollten nach den Biosafety Level 2-Empfehlungen des CDC/NH Handbuchs "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" gehandhabt werden.
- Alle Reagenzien sollten vor dem Gebrauch vorsichtig durchmischt werden.
- Kavitäten, Nachweisantikörper, Enzymkonjugat oder Positivkontrolle aus Testkits unterschiedlicher Chargennummer nicht austauschen. Der Probenverdünnungspuffer, der 20X Waschwuffer (Premier 20X Wash Buffer II), der Substrat (Premier Substrate II) und die Stopplösung (Premier Stop Solution II) sind chargenübergreifend verwendbar solange das Verfallsdatum nicht abgelaufen ist.
- Die Reagenzien sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Halten Sie die Tropfflaschen der Reagenzien in geeignetem Abstand über der Kavität senkrecht, um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen der richtigen Größe zu erzielen.
- Die Test-Kit-Bestandteile nicht nach dem Ablauf des Haltbarkeitsdatums verwenden.
- Die Flaschen mit den richtigen farbigen Deckeln verschließen.
- Waschwuffer und alle Testmaterialien in geeigneten Behältern entsorgen. Sie sollten als potentiell pathogen behandelt werden.
- Die Positivkontrolle enthält inaktiviertes Shiga Toxin. Es sollte dennoch als potentiell pathogenes Material gehandhabt werden.
- Hautkontakt mit der Stopp-Lösung (2N Schwefelsäure) sollte vermieden werden. Bei Kontakt sofort mit Wasser spülen.
- Die Mikrotiterkavitäten nicht wiederverwenden.
- Unbenutzte Kavitäten in den wiederverschließbaren Beutel zurücklegen. Die Streifen müssen vor Feuchtigkeit geschützt werden.**
- Zur Vorbereitung und zur Übertragung der Proben müssen die mitgelieferten Transferpipetten benutzt werden. Verwenden Sie eine pro Probe.
- Ein Verspritzen der verdünnten Proben beim Einfüllen in die Kavität wird vermieden, wenn die Spitze der Transferpipette halb in die Kavität eingebracht und die Probe langsam an der Seite der Kavität nach unten laufen gelassen wird.
- Das Auswaschen der Kavitäten sollte exakt nach der Testanleitung durchgeführt werden. **Unzureichendes Waschen kann zu erhöhten Hintergrund-Extinktionen und falsch positiven Ergebnissen führen.**
- Alle Reagenzien außer dem Waschwuffer-Konzentrat werden in der fertigen Arbeitskonzentration geliefert.
- Jede Abweichung von den vorgegebenen Inkubationszeiten nach oben oder unten beeinflusst die Sensitivität und Spezifität und sollte vermieden werden.
- Mikrotiterkavitäten nicht verwenden wenn der Folienbeutel beschädigt ist. (dh Löcher oder Einstich).

GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

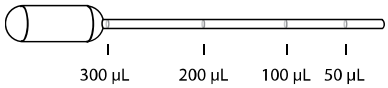
Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Haltbarkeitsdatum wird auf dem Etikett des Test-Kits angegeben. Das Test-Kit sollte bei 2-8 C gelagert werden und nach jedem Gebrauch sofort wieder in den Kühlschrank gelegt werden.

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

Die Premier EHEC-Transferpipette ist im Folgenden abgebildet:



VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Der gesamte Test-Kit einschließlich dem Beutel mit den Mikrotiterplatten sollte vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Stellen Sie soviel einfach konzentrierten Arbeits-Waschpuffer her wie nötig; z.B. 4,0 mL des Waschpuffer-Konzentrats II + 76,0 mL destilliertes oder deionisiertes Wasser reichen aus, um einen Streifen zu waschen. Geben Sie den Arbeitspuffer in eine saubere Spritzflasche, er kann bei Raumtemperatur bis zu drei Monate lang aufbewahrt werden.

PROBENNAHME UND-VORBEREITUNG

- CDC (Centers for Disease Control) Empfehlungen für die Lagerung der Stuhlproben, die Isolierung und die Identifizierung der EHEC Organismen:
 - Stuhlproben sollten sobald wie möglich getestet werden, wenn sie ins Labor kommen. Falls nicht gleich getestet, sollten die Proben bei 2-8 C oder bei $\leq 70C$ eingefroren werden.
 - Gekühlte Stuhlproben sollten innerhalb von ein bis zwei Stunden kultiviert werden. Wenn dies nicht möglich ist, sollten sie in ein Cary-Blair-Transport-Medium überführt werden. Rektale Abstrichpuffer sollten sofort in Cary-Blair-Transport-Medium gebracht werden.
 - Proben in Transport-Medien sollten bei 2-8 C gelagert werden, wenn sie innerhalb von 2-3 Tagen untersucht werden können. Wenn eine Kultivierung innerhalb dieser Zeit nicht möglich ist, sollten die Proben sofort nach Erhalt bei $\leq 70 C$ eingefroren werden. Proben in Transport-Medium sollten nicht zuerst Tage gekühlt und dann eingefroren werden oder einige Zeit bei Raumtemperatur gelassen werden.
- Lagerung von Stuhl und Flüssig-Nährböden bis zur Durchführung des Premier EHEC-Tests: Stuhlproben und Flüssig-Nährböden können bis zu sieben Tage bei 2-8 C bis zur Durchführung des ELISA aufbewahrt werden. Wenn der Test nicht innerhalb dieser Zeitspanne durchgeführt werden kann, sollten die Stuhlproben und/oder die Flüssigmedien bei ($\leq -70 C$) eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

A. Direkte Stuhlprobe

- 200 µL des Probenverdünnungspuffers in ein trockenes 12 x 75 mm Reagenzröhrchen geben (Achtung: die dritte Markierung auf der Transferpipette von der Spitze gesehen markiert 200 µL).
- Den Stuhl so sorgfältig wie möglich vor dem Pipettieren durchmischen:
 - Flüssige, halbflüssige Stühle oder Stühle in Transport-Medien: Mit der Transfer-Pipette 50 µL der Stuhlprobe (bis zur ersten Markierung der Pipettenspitze) aufziehen und in den vorbereiteten Probenverdünnungspuffer geben. Die Stuhlsuspension mit derselben Pipette vorsichtig mehrere Male aufziehen und wieder ausdrücken, das Röhrchen 15 Sekunden lang mit dem Rüttler durchmischen. Die Transferpipette zum späteren Gebrauch in dem Röhrchen lassen.
 - Nicht abnehmbare Stühle: Kleine Portion (3-4 mm Durchmesser) des sorgfältig vermischten Stuhls mit einem Holzspatel in den Probenverdünnungspuffer überführen. Emulgieren Sie den Stuhl mit dem Holzspatel, dann 15 Sekunden lang mit dem Rüttler durchmischen. Eine Transferpipette in das Röhrchen stecken.

B. Plattenmethode

- 20 µL der Stuhlprobe auf eine MacConkey oder Sorbitol/MacConkey Platte geben und mit einer Impfose ausstreichen.
- 16-24 Stunden bei 37 C inkubieren.
- Einzelne Kolonien oder Koloniausstriche können mit einer Öse abgenommen und in 200 µL Probenverdünnungspuffer für die ELISA-Durchführung gegeben werden.

C. Flüssig-Nährboden-Methode

- Fügen Sie 10-50 µL Stuhl zu 5 mL MacConkey's Bouillon, GN Bouillon. 10-15 Sekunden mit dem Rüttler durchmischen.
- 16-24 Stunden bei 37 C inkubieren.
- 50 µL des bebrüteten Nährbodens zu 200 µL Probenverdünnungspuffer für die ELISA-Durchführung hinzufügen.

TESTDURCHFÜHRUNG

Achtung: bei einer großen Zahl von Proben können Mehrfach- oder Mehrkanalpipetten zum Pipettieren der Reagenzien eingesetzt werden.

- Nachdem sich der Beutel auf Raumtemperatur erwärmt hat, die benötigte Anzahl von Mikrotiter-Kavitäten abbrechen (1 Kavität für jede Probe plus 1 Positiv- und 1 Negativ-Kontrolle pro Testlauf). Kavitäten in den Halter für Mikrotiter-Streifen setzen und die Plätze aller Kavitäten notieren. Unbenutzte Mikrotiter-Kavitäten müssen sofort wieder in dem Beutel verschlossen werden.
- 100 µL verdünnte Probe (zweite markierung von der Spitze der Pipette) in die entsprechende Kavität füllen (die Pipettenspitze halb in die Kavität einbringen und die Probe langsam an der Seite der Kavität hinunterlaufen lassen).
- Je 2 frei fallende Tropfen der Positiv- und Negativ-Kontrolle in die jeweiligen Kavitäten hinzugeben. Die Kavitäten 30 Sekunden lang durch Schütteln der Platte mischen.
- Ein passendes Stück Klebefolie zuschneiden und fest auf die Kavitäten drücken, um sie zu verschließen. Inkubieren Sie die Platte eine Stunde lang bei Raumtemperatur (22-27 C). Nur für die Nährboden-Methode: Alternativ, dazu können Labors, die mit einem heizbaren Plattenrüttler (STAT Fax™-2200) ausgestattet sind, die Platte 30 Minuten lang bei 25 C und 1000 rpm (Einstellung 5) inkubieren und rotieren lassen.
- Klebefolie vorsichtig entfernen und die Kavitäten waschen:
 - Die Platteninhalte in einen Abfallbehälter für pathogene Materialien kippen.
 - Die umgedrehte Platte auf einem Stapel sauberer Papiertücher ausklopfen.
 - Alle Kavitäten mit dem Arbeits-Waschpuffer füllen. Die Benutzung einer Spritzflasche wird empfohlen.
 - Den Waschzyklus (Auskippen, auf frischen Tüchern Ausklopfen, Füllen) 4 weitere Male wiederholen. Nach dem letzten Füllen, sollten die Platten ausgekippt und fest genug auf frischen Tüchern ausgeklopft werden, um soviel überschüssigen Waschpuffer wie möglich zu entfernen, die Kavitäten jedoch nie ganz austrocknen lassen.
- Zwei frei fallende Tropfen des Nachweis-Antikörpers in jede Kavität geben. Die Platte 30 Sekunden lang schütteln.
- Zum Verschließen die Klebefolie fest auf die Mikrokavitäten drücken. Die Platte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (22-27 C) inkubieren. Nur für die Nährboden-Methode: Alternativ, können Sie die Platte auf dem STAT Fax™-2200 Plattenrüttler 15 Minuten lang bei 25 C und 1000 rpm (Einstellung 5) inkubieren und rotieren lassen.
- Den Waschvorgang (Schritt 5) wiederholen.
- Zwei frei fallende Tropfen des Enzym-Konjugats in jede Kavität geben. Die Platte 30 Sekunden lang schütteln.
- Die Klebefolie zum Verschließen fest auf die Mikrotiter-Kavitäten drücken. Die Platte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur (22-27 C) inkubieren. Nur für die Nährboden-Methode: Alternativ, können Sie die Platte auf dem STAT Fax™-2200 Plattenrüttler 15 Minuten lang bei 25 C und 1000 rpm (Einstellung 5) inkubieren und rotieren lassen.
- Den Waschgang (Schritt 5) wiederholen.
- Die Unterseite aller Kavitäten mit einem fusselfreien Tuch reinigen.
- Zwei frei fallende Tropfen der Substrat-Lösung II in jede Kavität geben. Die Platte 30 Sekunden lang schütteln. 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zwei frei fallende Tropfen der Stopp-Lösung II in jede Kavität geben. Die Platte 30 Sekunden lang schütteln. **Achtung:** die anfängliche Farbe bei einer positiven Reaktion ist blau, sie geht in gelb über, wenn die Stopp-Lösung II zugesetzt wird.
- Reaktion ablesen:
 - Mit dem bloßen Auge: innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung II.
 - Spektrophotometrische Bestimmung: das Photometer gegen Luft abgleichen. Die Unterseite der Kavitäten mit einem fusselfreien Tuch abwischen. Die Extinktion bei 450 nm oder 450/630 nm innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung II ablesen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Ablesen mit bloßem Auge

Negativ = farblos
Positiv = deutliche gelbe Farbe
Eine schwache Gelbfärbung muß spektrophotometrisch ausgewertet werden

AUHTUNG: Im Hinblick darauf, daß Bakterien-Isolate eine epidemiologische Bedeutung haben, wird empfohlen, alle Toxin-positiven Proben für die Isolierung von Shiga Toxin positiven Organismen zur Verfügung zu stellen. Wir schlagen daher vor, dass die einzelnen mikrobiologischen Labore die Bakterienisolierung mit dem entsprechenden Referenzlabor koordinieren.

2. Spektrophotometrische Messung bei einfacher Wellenlänge (450 nm)

Negativ = $OD_{450} < 0,180$
Positiv = $OD_{450} \geq 0,180$

3. Spektrophotometrische Messung bei dualer Wellenlänge (450/630 nm)

Negativ = $OD_{450/630} < 0,150$
Positiv = $OD_{450/630} \geq 0,150$

Achtung: Ein positives Ergebnis bedeutet, daß Shiga Toxine anwesend sind. Ein negatives Ergebnis bedeutet, daß Shiga Toxine nicht vorhanden sind, oder daß die Toxin-Spiegel unter der Nachweisgrenze des Tests liegen.

Achtung: Bezüglich schwach positive Ergebnisse lesen Sie bitte den Abschnitt "Qualitätskontrolle (Punkt 5)". Bei sehr stark positiven Reaktionen kann es zur Bildung eines purpurnen Niederschlags innerhalb weniger Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung II kommen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- In jedem Testlauf müssen Positiv- und Negativ-Kontrolle mitlaufen, um die Qualität der Reagenzien zu überprüfen.
- Der Extinktionswert der Positiv-Kontrolle sollte bei 450 nm oder 450/630 nm $> 0,500$ sein. Die Positiv-Kontrolle sollte bei Ablesen mit dem bloßen Auge deutlich gelb sein.
- Der Extinktionswert der Negativ-Kontrolle sollte bei 450 nm $< 0,180$ und bei 450/630 nm $< 0,150$ aber größer als 0,00 sein. Wenn die Negativ-Kontrolle einen Wert $< 0,00$ hat, sollte das Photometer erneut gegen Luft abgegleichen werden und die Platte erneut gemessen werden. Die Negativ-Kontrolle sollte bei Ablesen mit dem bloßen Auge farblos sein.
- Jede positive Kavität ohne sichtbare Farbe sollte an der Unterseite der Kavität abgewischt werden, erneut in Position gebracht werden und abgelesen werden.
- Wenn die Häufigkeit schwach positiver Ergebnisse (OD zwischen 0,150 und 0,200 bei dualer Wellenlänge oder OD zwischen 0,180 und 0,230 bei einfacher Wellenlänge) höher als 5% der untersuchten Proben liegt, deutet dies auf unzureichendes Waschen hin. Kräftigeres Waschen oder eine Erhöhung der Anzahl der Waschgänge bis Schritt 5 des Testvorgangs auf sieben wird empfohlen.
- Wenn die erwarteten Reaktionen nicht beobachtet werden und das Haltbarkeitsdatum der Reagenzien noch nicht abgelaufen ist, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.
- Vor jedem Gebrauch sollten die Testbestandteile auf offensichtliche Zeichen mikrobiellen Befalls, auf Vereisung und auf Undichtigkeiten überprüft werden.
- Die Ergebnisse einer jeden Qualitätskontrolle sollten in einem geeigneten Labor-Journal aufgezeichnet werden, um eine hohe Dokumentations-Qualität zu erreichen.

ERWARTETE WERTE

Der Premier EHEC Test weist das Vorkommen von Shiga Toxinen nach. Erwartungswerte für eine gegebene Bevölkerung sollten für jedes Labor bestimmt werden. Die Positivrate hängt von dem Alter des Patienten, der geographischen Lage, der Methode der Probenahme, -handhabung und des -transports, von dem angewandten Test und den allgemeinen Gesundheitsbedingungen der untersuchten Patientenbevölkerung ab.^{4, 5, 9, 16}

In den Washington und Minnesota Staaten, während den Jahren 1984-1987 wurde der *E. coli* O157:H7 Serotyp als häufigster Enteritiserreger in Stuhlproben nach *Campylobacter* und *Salmonella* isoliert. Ähnliche Ergebnisse wurden während der selben Zeit in Alberta, in British Columbia und in Ontario, Kanada erhalten.^{2, 12, 13, 15, 17-19}

Direkt fäkal Zytotoxin Tests zeigten, dass 10 % zusätzliche Proben nicht diagnostizierte EHEC Organismen enthalten können. Dieser Prozentsatz stammt von unseren klinischen Studien und soll mit Bedacht beobachtet werden.^{3, 7, 10, 11, 16}

Es wurde gezeigt, dass dieser Serotyp *E. coli* O157:H7 am häufigsten während der Sommermonate (Juni, Juli, August) isoliert wird. Die Rate der Shiga Toxin produzierende, nicht O157 Stämme, bleibt noch zu bestimmen.^{2, 12}

EINSCHRÄNKUNGEN

- Der Premier EHEC-Test weist Shiga Toxine aus Stuhl, Flüssig-Nährböden oder angezüchteten Isolaten nach. Die Toxinmenge konnte bisher nicht mit dem Auftreten oder dem Schweregrad der Krankheit in Zusammenhang gebracht werden. Wie bei allen *in vitro* Testmethoden sollten die Testergebnisse zusammen mit anderen klinischen Informationen betrachtet werden.
- Shiga Toxin I und das Toxin, das von *Shigella dysenteriae* Typ 1 Stämmen (Shiga-Toxin) produziert wird, sind nahezu identisch. Daher zeigt der Premier EHEC Test bei Anwesenheit des Shiga-Toxins in nachweisbaren mengen eine positive Reaktion an.
- Ein positives Ergebnis schließt nicht das Vorkommen anderer infektiöser Organismen aus.
- Die Toxin-Produktion kann nach mehreren Stuhlentleerungen hintereinander verloren gehen. Bei Koloniausstrichen ist die Wahrscheinlichkeit, ST-produzierende Organismen zu entdecken, erhöht.

LEISTUNGSMERKMALE

Der Premier EHEC-Test wurde in drei Kliniken und einem staatlichen Gesundheitslabor in den USA bewertet. Jedes Studienzentrum analysierte Diarrhoe-Stuhlproben, die für die Routine-Kultivierung von enteralen Erregern eingeschickt worden waren. Jeder Stuhl wurde sowohl direkt als auch nach der Flüssig-Nährboden-Methode mit dem Premier EHEC-Test analysiert. Ein spezifischer ST-Zytotoxin-Neutralisationstest wurde bei Meridian Bioscience mit diesen Proben durchgeführt. Die Ergebnisse aus der direkten Analyse und dem Flüssig-Nährboden-Test sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.³

	Premier EHEC			
	Direkte Stuhlprobe		Flüssig-Nährboden-Methode	
Zytotoxin	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Positiv	15	4	22	0
Negativ	17	391	5	236
Grenzwertig	2	17	0	3

Relative Sensitivität = 78,9% (56,6-91,5%)*
Relative Spezifität = 95,8% (93,4-97,4%)
Relative Übereinstimmung = 95,1% (92,6-96,8%)
100% (85,1-100%)
97,9% (95,2-99,1%)
98,1% (95,6-99,2%)

Aus zwei der 17 direkten Stuhlproben wurden ST-produzierende EHEC isoliert, die mit dem Premier EHEC positiv und Zytotoxin-negativ waren: in einer Probe der Stamm O157:H7 und in einer ein Stamm O6:H nicht typisierbar. Die PCR** bestätigte das Vorkommen von ST-Genen in zwei Premier EHEC positiven/Zytotoxin-negativen Proben und in einer Probe, die mit dem Premier EHEC positiv und im Zytotoxin-Test grenzwertig war. Die 15 Premier EHEC positiven/Zytotoxin-positiven direkten Stuhlproben umfassten: neun mal den EHEC-Stamm O157:H7, zweimal einen EHEC-Stamm O6:H-nicht typisierbar, einmal einen EHEC-Stamm O-nicht typisierbar :H12, 41w oder 51 und zweimal den EHEC-Stamm O111:NM. Aus den übrigen Stuhlproben konnten keine Isolate gewonnen werden.

ST-produzierende EHEC wurden aus zwei von fünf Premier EHEC-positiven/Zytotoxin-negativen Nährböden isoliert: ein Stamm O157:H7 und ein Stamm O111:NM. Die 22 Premier EHEC-positiven/Zytotoxin-positiven Proben umfassten folgende ST-produzierenden EHEC-Stämme: 13 O157:H7, dreimal O6:H nicht typisierbar, einmal O nicht typisierbar :H12, 41w oder 51 und einmal O111:NM. Aus den übrigen vier Proben von Nährböden konnten keine EHEC-Stämme isoliert werden.

*95% Vertrauensintervall berechnet nach der üblichen Methode wie in Klammern angegeben
**PCR ist eine Forschungsmethode und nicht für die In-vitro-Diagnostik geeignet.

Verschiedene *E. Coli* ST-produzierende Organismen wurden mit dem EIA sowohl nach der Platten- als auch der Flüssig-Nährboden-Methode untersucht (siehe "Vorbereitung der Proben" Abschnitt B und C). Jeder Stamm ist ein Isolat aus klinischem Material und jeder wurde mit einem Zytotoxin-Test und mit einem Polymerase-Chain-Reaktion (PCR)-Test analysiert um das Vorkommen von ST-Genen zu bestätigen. Alle Organismen zeigten bei einer solchen Analyse positive Ergebnisse. Die Zahl in Klammern gibt die Zahl der verschiedenen Stämme an, die durch den Test der jeweiligen Gruppe zugeordnet wurden. Die Toxinart, die von jedem Stamm produziert wird, wird ebenfalls angegeben.³

Stamm	ST-Art	Stamm	ST-Art
O157:H7 (3)	I	O91:H21 (1)	II
O157:H7 (7)	II	O146:H21 (1)	I
O157:H7 (9)	I & II	O137:H41 (1)	I & II
O111:NM (3)	I & II	O111:H8 (1)	I & II
OX3:H21 (1)	II	O50:H7 (1)	I
O4:NM (1)	I & II	O145:NM (2)	II
O165:H25 (1)	II	O103:H2 (1)	I
O165:H25 (1)	I & II	O125:NM (2)	I
O45:H2 (1)	I	O26:H11 (1)	I
O126:H27 (1)	I	O5:NM (3)	I
O121:H19 (1)	I & II	O171:NM (1)	II
O121:H19 (1)	II	O83:H1 (1)	I & II

REPRODUZIERBARKEIT

Variabilität innerhalb eines Testlaufs (Intra-assay Variability) – Jeweils 10 Aliquots von zwei bekanntermaßen positiven Nährboden-Proben und von zwei bekanntermaßen positiven Stuhlproben wurden in einem Testlauf untersucht.

Probe	Mittlere Extinktion 450/630 _{nm}	SD	VI %
Nährboden Nr. 1	0,362	0,013	3,5
Nährboden Nr. 2	1,920	0,094	4,9
Stuhl Nr. 1	0,317	0,010	3,1
Stuhl Nr. 2	0,774	0,032	4,2

Variabilität zwischen den Testläufen (Inter-assay Variability) – Jeweils 10 Aliquots von zwei bekanntermaßen positiven und einer bekanntermaßen negativen Nährboden-Proben wurden an drei verschiedenen Tagen analysiert. Dieses Protokoll wurde mit einem negativen und zwei positiven Stuhlproben wiederholt.

Probe	Mittlere Extinktion 450/630 _{nm}	SD	VI %
Nährboden Nr. 1	0,369	0,032	8,7
Nährboden Nr. 2	1,546	0,293	18,9
Nährboden Nr. 3	0,074	0,007	9,2
Stuhl Nr. 1	0,335	0,027	8,1
Stuhl Nr. 2	0,818	0,079	9,6
Stuhl Nr. 3	0,058	0,007	11,4

KREUZREAKTIVITÄT

Der Premier EHEC-EIA wurde mit Isolat aus klinischem Material (CI) oder mit ATCC-Stämmen wie unten aufgelistet auf seine Spezifität überprüft. Jeder Stamm wurde direkt im EIA mit der Plattenmethode unter Verwendung des Kolonie-Isolierungsverfahrens getestet (siehe Vorbereitung der Proben Abschnitt B). Alle Stämme waren bei dieser Analyse negativ. In einer weiteren Studie wurden die Bakterienstämme entweder in einen einfach-positiven EHEC-Stuhl oder einen einfach-negativen EHEC-Stuhl in einer Konzentration von ungefähr 2,4 x 10⁸ cfu/mL überimpft. Die folgenden Isolate aus klinischem Material (CI) oder ATCC-Stämme waren im direkten Test alle negativ. Zudem zeigten die folgenden Stämme bei Überimpfung in einen EHEC-positiven oder negativen Stuhl³ keine von den erwarteten Ergebnissen abweichenden Resultate.

Beschreibung	CI	Beschreibung	ATCC
<i>Campylobacter coli</i>	CI	<i>Prevotella bivia</i>	ATCC 29303
<i>Campylobacter fetus</i>	CI	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 6380
<i>Campylobacter jejuni</i>	CI	<i>Providencia alcalifaciens</i>	ATCC 9886
<i>Campylobacter lari</i>	CI	<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 33672
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 8090	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6570
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 3624	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 6571
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 14810	<i>Salmonella Group B</i>	CI
<i>Enterococcus faecalis</i>	CI	<i>Salmonella hilversum</i> (Grp N)	ATCC 15784
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13048	<i>Salmonella minnesota</i>	ATCC 9700
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	<i>Serratia liquefaciens</i>	CI
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 11456
<i>Escherichia fergusonii</i>	ATCC 35469	<i>Shigella flexneri</i>	CI
<i>Escherichia hermanii</i>	ATCC 33650	<i>Shigella sonnei</i>	CI
<i>Gardnerella vaginalis</i>	CI	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Helicobacter pylori</i>	CI	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I)	ATCC 12598
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CI
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CI	<i>Streptococcus faecalis</i>	CI
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	CI	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CI
<i>Nocardia asteroides</i>	ATCC 3308	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9	ATCC 55075

TESTEMPFLINDLICHKEIT

Die Nachweisgrenze für ST-I und ST-II liegt bei 7 bzw. 15 pg/Kavität.

REFERENCES

- Brian, MJ., Frosolono, M., Murray, BE., Miranda, A., et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection and hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Micro.* 1992;30:1801-1806.
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases, *E. Coli* O157:H7, What the clinical microbiologist should know. 1994.
- Data on file, Meridian Bioscience, Inc.
- Donohue-Rolfe, A., Acheson, DWK., Kane, AV. and GT. Keusch. 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. *Infect. Immun.* 1989;57:3888-3893.
- Griffin, PM., Ostroff, SM., Tauxe, RV., Green, KD., Wells, JG., Lewis, JH. and PA. Blake. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 1988;109:705-712.
- Hull, AE., Acheson, DWK., Echeverria, P., Donohue-Rolfe, A., and GT. Keusch. Mitomycin immunoblot colony assay for detection of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in fecal samples: comparison with DNA probes. *J. Clin. Micro.* 1993;31:1167-1172.
- Karch, H., Böhm, J., Schmidt, J., Gunzer, F., Aleksic, S., and J. Heesemann. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Micro.* 1993;31:1200-1205.
- Karmali, MB. Laboratory diagnosis of verotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Micro. Newsletter.* 1987;9:65-70
- Kay, BA., Griffin, PM., Stockbine, VA. and JG. Wells. Too fast food: Bloody diarrhea and death from *Escherichia coli* O157:H7. *Clin. Micro. Newsletter.* 1994;16:17-19.
- Mariani-Kurkdjian, P., Deamur, E., Mialn, A., Picard, B., et al. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Micro.* 1993;31:296-301.
- Maniar, AC., Williams, T., Anand, CM. and GW. Hammond. Detection of verotoxin in stool specimens. *J. Clin. Micro.* 1990;28:134-135.
- Martin, DL., MacDonald, KL., White, KE., Sober, JT. and MT. Osterholm. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *New Engl. J. Med.* 1990;323:1161-1167.
- Neill, MA. *Escherichia coli* O157:H7. A pathogen of no small renown. *Infect. Dis. Newsletter.* 1991;10:19-24.
- O'Brien, AD. and RK. Holmes. Shiga and shiga-like toxins. *Micro Reviews.* 1987;51:206-219.
- Ostroff, SM., Kobayashi, JM. and JH. Lewis. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. *JAMA.* 1989;262:355-359.
- Pai, CJ., Ahmed, N., Lior, J., Johnson, WM., Sims, HV., and DE. Woods. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. A two year prospective study. *J. Infect. Dis.* 1988;157:1054-1057.

- Ritchie, M., Partington, S., Jessop, J., and MT. Kelly. Comparison of a direct fecal shiga-like toxin assay and sorbitol-MacConkey Agar culture for laboratory diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *J. Clin. Micro.* 1992;30:461-464.
- Rowe, PG., Ornbine, E., Lior, J., Wells, GA., McLaine, PN., et al. A prospective study on exposure to verotoxin-producing *Escherichia coli* among Canadian children with haemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Infect.* 1993;110:1-7.
- Wick, PD., Hamacher, ME., Archer, JR. and JS. Wintheiser. Relative incidence of *Escherichia coli* O157:H7 from stool specimens for routine culture in Wisconsin. Abstract. Americana Society for Microbiology, 1991 Annual Meeting.



SN11151

REV. 01/15

Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: 513.271.3700
Orders/Customer Service:
800.543.1980
Technical Support Center:
800.343.3858
Information Fax: 513.272.5432
Ordering Fax: 513.271.0124

Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe S. r. l.
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese, Milano
ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
BELGIUM
Tel: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
Email: info.bn@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
FRANCE
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.
Postbus 301 - 5460 AH Veghel
NETHERLANDS
Tel: +31 (0) 411 62 11 66
Fax: +31 (0) 411 62 48 41
Email: info.bn@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Apareto para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para "<n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stoplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
	Serial number / Numero di serie / Número de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Date di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Washpuffer
	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenza / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluent échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

For technical assistance, call Technical Support Services at (800) 343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at (800) 543-1980.