

ImmunoCard STAT!® EHEC

Rapid test for Shiga toxins 1 and 2 in human stool

REF 751630

IVD

Rx Only

INTENDED USE

ImmunoCard STAT! EHEC is an immunochromatographic rapid test for the qualitative detection of Shiga toxins 1 and 2 (also called Verotoxins) produced by *E. coli* in cultures derived from clinical stool specimens. ImmunoCard STAT! EHEC is used in conjunction with the patient's clinical symptoms and other laboratory tests to aid in the diagnosis of diseases caused by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Among the *E. coli* human pathogens, Shiga toxin-producing strains of *E. coli* have gained importance in recent years.¹⁻¹¹ The group of EHEC, with their highly pathogenic serovars O157:H7, O26, O103, O111, O145, and other strains are of particular concern. Production of Shiga toxins is the most common criteria for the detection of this group of bacteria. Shiga toxins can be classified into two main categories: Shiga toxin 1 (ST1) and Shiga toxin 2 (ST2). EHEC strains may produce ST1 or ST2 only or both ST1 and ST2 simultaneously. EHEC are capable of initiating life-threatening illnesses, particularly in young children, the elderly or patients with immune deficiency. The main sources of infection are contaminated, raw or insufficiently heated foods of animal origin, eg, meat and dairy products. The reservoirs for EHEC are cattle, sheep and goats and is spread through their feces. These microorganisms can enter food during the processing of meat and dairy products if hygienic conditions are inadequate. The incidence of food infection caused by Shiga toxin-producing *E. coli* demands reliable and rapid methods of detection. In addition to traditional culture methods, immunological techniques are becoming more useful due to their improved specificity and sensitivity. ImmunoCard STAT! EHEC is an immunological diagnostic test based on the immunochromatographic lateral flow principle.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

ImmunoCard STAT! EHEC is an immunochromatographic rapid test utilizing monoclonal antibodies labeled with red-colored gold particles. The test device has a circular sample port and an oval-shaped test (Toxin 1, Toxin 2) and control (Control) window.

1. The sample is applied to the chromatography paper via the circular sample port (Sample).
2. The sample is absorbed through the pad to the reaction zone containing colloidal, gold-labeled antibodies specific to Shiga toxins.
3. Any Shiga toxin (ST1 and ST2) antigen present complexes with the gold-labeled antibody and migrates through the pad until it encounters the binding zones in the test (Toxin 1, Toxin 2) area.
4. The binding zones (Toxin 1 and Toxin 2) contain another anti-ST1 or -ST2 antibody, which immobilizes any Shiga toxin-antibody complex present. Due to the gold labeling, a distinct red line is then formed.
5. The remainder of the sample continues to migrate to another binding reagent zone within the control zone, and also forms a further distinct red line (positive control). Regardless of whether any Shiga toxin is present or not, a distinct red line should always be formed in the control zone and confirms that the test is working correctly.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

1. ImmunoCard STAT! EHEC Test Devices, containing immobilized monoclonal anti-ST1 and anti-ST2 antibodies. The devices are packaged in individual foil pouches with desiccants. Store at 2-8 C when not in use.
2. Sample Diluent/Negative Control, a buffered diluent containing 0.094% sodium azide as a preservative. The reagent is supplied in a plastic dropper vial. Use as supplied. Store at 2-8 C when not in use.
3. Positive Control, a solution of formalin-treated ST1 and ST2 toxins in a buffered diluent containing 0.094% sodium azide as a preservative. The reagent is supplied in a plastic dropper vial. Use as supplied. Store at 2-8 C when not in use.
4. 50 µL/175 µL disposable plastic transfer pipettes

MATERIALS NOT PROVIDED

All methods:

1. Incubators, 35-39 C
2. Vortex
3. Interval timer
4. Autoclave
5. Disposable latex gloves

SMAC Agar Method:

1. Sorbitol-MacConkey agar plate **without** tellurite or cefixime
2. Polymyxin B solution
3. Small test tube (eg, 10 x 75 mm or 12 x 75 mm)
4. Wooden applicator sticks
5. Distilled or deionized water
6. Disposable plastic transfer pipettes, or micropipettes and disposable tips capable of dispensing 200 µL
7. Disposable inoculation loops

Broth Method:

1. Gram Negative (GN) or MacConkey broth (Broth with neutral red indicator may obscure the readability of the test.)
2. Modified Cary-Blair medium (optional)

PRECAUTIONS

1. All reagents are for in vitro diagnostic use only.
2. The Positive Control reagent contains formalin-treated (inactivated) shiga toxins ST1 and ST2. It should be handled, however, as a potentially hazardous material.
3. Some reagents contain the preservative sodium azide which is a skin irritant. Avoid contact with reagents. Disposal of reagents containing sodium azide into drains consisting of lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal oxides. Eliminate the build-up of oxides by flushing drains with large volumes of water during disposal.
4. Do not use kit or components beyond their assigned expiration dates.
5. Test devices are packaged in foil pouches that exclude moisture during storage. Inspect each foil pouch before opening. Do not use test devices from pouches that have holes in the foil or where the pouch has not been completely sealed. False negative reactions may result if test components and reagents are improperly stored.
6. Do not use the Sample Diluent/Negative Control or Positive Control if it is discolored or turbid. Discoloration or turbidity may be a sign of microbial contamination.
7. Directions should be read and followed carefully.
8. This is not a direct stool test. Stool specimens must be cultured on SMAC agar plates or in GN or MacConkey broth before testing. Failure to enrich samples before testing will cause erroneous results.
9. Low levels of toxins may deteriorate and become undetectable in broth samples that are stored frozen before testing. Best results will be obtained if broth samples are tested fresh. Multiple freeze-thaw cycles should be avoided.
10. Dispose of stool specimens as potentially biohazardous materials. Inactivate cultures by autoclaving for a minimum of 15 minutes at 121 C before disposal.
11. Pipettes that are supplied with the kit should be marked at the intervals shown in the pipette diagram in PROCEDURE NOTES. When instructed to use the pipette supplied with the kit, do not use transfer pipettes with markings that differ from the diagram.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

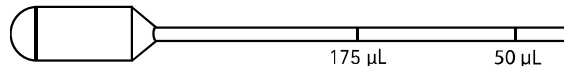
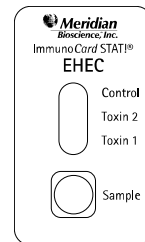
There are no known hazards associated with this product.

SHELF LIFE AND STORAGE

ImmunoCard STAT! EHEC is stable until the expiration date printed on the box when stored at 2 to 8 C. The Test Device should be used within 15 minutes after removal from the sealed foil pouch.

PROCEDURAL NOTES

Diagrams of the ImmunoCard STAT! EHEC Test Device and the 50 µL/175 µL transfer pipette supplied with the kit are shown below.



PROCEDURE – BROTH METHOD

SPECIMEN COLLECTION – BROTH METHOD

1. Stool specimen storage and handling for the culture of EHEC organisms: The appropriate stool specimen should either be frozen (≤ -70 C) or placed at 2-8 C immediately after collection. The refrigerated specimens should be cultured within 2 hours. If culturing cannot be performed within 2 hours, the specimen should be placed in a Modified Cary-Blair-based transport media. Samples in Modified Cary-Blair transport media can be stored at 2-8 C if they are cultured within two to three days. If culturing cannot be performed within this time, the specimens should be frozen at ≤ -70 C immediately upon receipt. Specimens in Modified Cary-Blair transport medium should not be refrigerated then frozen.
2. Storage of broth showing growth prior to ImmunoCard STAT! EHEC testing: Broths with growth may be held for up to seven days at 2-8 C before testing with ImmunoCard STAT! EHEC. If testing is not performed within this time period, the broth should be frozen at ≤ -20 C for up to 21 days. (See section on PRECAUTIONS.)
3. **Note:** Stool in transport media (with the exception of Cary-Blair), swabs, or preservatives have not been validated for use by this method.

SPECIMEN PREPARATION / ENRICHMENT – BROTH METHOD

1. Use an applicator stick to mix stool thoroughly regardless of consistency.
2. Using a pipettor or transfer pipette (supplied with the kit):
 - a. Unpreserved specimen: Add 50 µL of unpreserved specimen (first mark from tip of pipette) to a culture tube containing 8 mL of GN broth or 5 mL of MacConkey broth.
 - b. Specimen collected in Modified Cary Blair Medium: Add 175 µL of the preserved specimen (second mark from tip of pipette) to a culture tube containing 8 mL GN broth or 5 mL MacConkey broth.
 - c. Non-pipetable stool: Use a wooden applicator stick to transfer a 3-4 mm round pellet of stool into either 8 mL of GN or 5 mL of MacConkey broth.
3. Incubate inoculated broth with caps loose at 35-39 C for 16-24 hours. (Visually observe the broth tubes for growth).
4. DO NOT PROCEED WITH TESTING if the broth tube does not exhibit growth after incubation as falsely negative results may occur. Repeat the broth enrichment using the same stool sample or with a new sample collected from the patient. If the original broth enrichment was performed with GN broth, GN broth can be used in the second attempt or alternatively, Mac broth can be used instead and vice versa. The sample can also be recultured using the SMAC plate method. If agar cultures are used proceed with instructions provided in the SMAC PLATE METHOD BELOW. Use only broth cultures that exhibit growth in the following steps.
5. Using the dropper vial, add five drops (150 µL) of Sample Diluent Buffer to a small test tube.
6. Mix broth culture thoroughly by gently swirling the tube.
7. Using the transfer pipette supplied with the kit, add 175 µL of sample (second mark from tip of pipette) to the tube containing Sample Diluent/Negative Control.
8. Gently mix the contents of the tube with the transfer pipette by squeezing the pipette bulb 3 times. Alternatively, mix using a vortex for 10 seconds. Return the transfer pipette to the tube for later use.
9. The diluted stool broth culture can be stored for up to 30 minutes at 20-25 C before testing.

PROCEDURE – BROTH METHOD

TEST PROCEDURE

1. Bring all Test Devices, reagents and samples to room temperature (20-25 C) before testing.
2. Use one ImmunoCard STAT! EHEC Test Device for each patient sample.
3. Remove the ImmunoCard STAT! EHEC Test Device from its foil pouch. Label the device with the patient's identification.
4. Using the transfer pipette provided in the kit, slowly add 175 µL of the diluted specimen (second mark from tip of pipette) to the sample port of the device.
5. Incubate the test at 20-25 C for 20 minutes.
6. Read the results within 1 minute after the end of incubation.

PROCEDURE – SMAC AGAR PLATE METHOD

SPECIMEN COLLECTION --- SMAC PLATE METHOD

Collect stool specimens without preservative. Specimens may be held at controlled room temperature for up to 4 hours prior to preparing cultures. Stool specimens that cannot be cultured with 4 hours should be placed at 2-8 C and cultured within 24 hours. If the specimens cannot be cultured within 24 hours they should be frozen at ≤ -70 C as soon after receipt as possible.

SPECIMEN PREPARATION/ ENRICHMENT – SMAC PLATE METHOD

1. Use an applicator stick to mix stool thoroughly regardless of consistency.
2. Use a Dacron swab to inoculate stool samples onto SMAC agar plates **without** tellurite or cefixime. (NOTE: Tellurite and cefixime inhibit growth of non-O157:H7 *E. coli*.)
3. Incubate the inoculated plate for 18-24 hours at 35-39 C.
4. DO NOT PROCEED WITH TESTING if the agar plate does not exhibit growth after incubation as falsely negative results may occur. Repeat the agar enrichment using the same stool sample or with a new sample collected from the patient. Alternatively, reculture the sample using the broth enrichment method above. Use only agar cultures that exhibit growth in the following steps.
5. Prepare a solution of 50 µg/mL Polymyxin B in distilled water.
6. Dispense 0.5 mL of the 50 µg/mL Polymyxin B solution into a test tube.
7. Using a Dacron swab, sweep a few times across the confluent growth area of the plate, avoiding mucoid colonies. Mucoid colonies may interfere with migration of the sample.
8. Dip the swab carrying the colony sweep in the distilled water/Polymyxin solution and rotate the swab at least 3 times to enhance the release of Shiga toxins from the organisms.
9. Incubate the mixture for 30 minutes at 35 C.

TEST PROCEDURE – SMAC PLATE METHOD

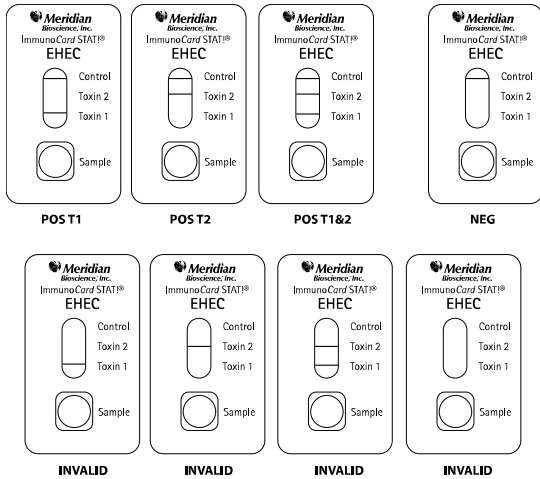
1. Bring all Test Devices, reagents and samples to room temperature (20-25 C) before testing.
2. Use one ImmunoCard STAT! EHEC Test Device for each patient sample and control.
3. Remove the ImmunoCard STAT! EHEC Test Device from its foil pouch and discard the pouch.
4. Place the Test Device on a flat surface and label with the name of the patient or control to be tested.
5. Mix the inoculated water/Polymyxin sample prepared in step 6 above (SPECIMEN PREPARATION) by gently swirling the tube.
6. Using a pipettor or transfer pipette (**NOT** supplied with kit), add 200 µL into the circular sample port on the Test Device.
7. Incubate the test at 20-25 C for 10 minutes.
8. Read the results within 1 minute after the end of incubation.

EXTERNAL CONTROL TESTS – SMAC AGAR OR BROTH METHOD

1. Bring all Test Devices and reagents to (20-25 C) before testing.
2. Use one ImmunoCard STAT! EHEC Test Device each for a Positive and Sample Diluent/Negative Control.

- Remove the ImmunoCard STAT! EHEC Test Device from its foil pouch. Label the device with the control to be tested.
- Add exactly 5 drops of the Positive Control reagent to the sample port of a device marked for the positive control.
- Add exactly 6 drops of the Sample Diluent/Negative Control to the sample port of a device marked for the negative control.
- Incubate the test at 20-25 C for 20 minutes.
- Read the results within 1 minute after the end of incubation.

INTERPRETATION OF RESULTS



Negative test: A PINK-RED band at the Control Line position. No other bands are present.

Positive test for Shiga toxin 1: PINK-RED bands at the Control and Toxin 1 line positions. No bands at the Toxin 2 test line. The appearance of a Toxin 1 test line, even if very weak, indicates the presence of Shiga toxin 1. The intensity of the test line can be less than that of the Control line.

Positive test for Shiga toxin 2: PINK-RED bands at the Control and Toxin 2 line positions. No bands at the Toxin 1 test line. The appearance of a Toxin 2 test line, even if very weak, indicates the presence of Shiga toxin 2. The intensity of the test line can be less than that of the Control line.

Positive test for Shiga toxins 1 and 2: PINK-RED bands at the Control, Toxin 2, and Toxin 1 line positions. The appearance of Toxin 2 and Toxin 1 test lines, even if very weak, indicates the presence of Shiga toxins 1 and 2. The intensity of the test lines can be less than that of the Control line.

Invalid Test Results:

- No band at the designated position for the Control line. The test is invalid since the absence of a control band indicates the test procedure was performed improperly or that deterioration of reagents has occurred.
- A PINK-RED band appearing at either the Toxin 1 or Toxin 2 Test Line position of the device after the defined incubation limit or a band of any color other than PINK-RED. Falsely positive results may occur if tests are incubated too long. Bands with colors other than PINK-RED may indicate reagent deterioration.

If any result is difficult to interpret, the test should be repeated with the same sample to eliminate the potential for error. Obtain a new sample and retest when the original sample repeatedly produces unreadable results.

QUALITY CONTROL

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

At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing, or leakage. Do not use contaminated or suspect reagents.

Internal controls: Internal controls are contained within the test strip and therefore are evaluated with each test.

- A PINK-RED band appearing at the Control line serves as a procedural control and indicates the test has been performed correctly, that proper flow occurred and that the test reagents were active at the time of use.
- A clean background around the Control or Test lines also serves as a procedural control. Control or test lines that are obscured by heavy background color may invalidate the test and may be an indication of reagent deterioration, use of an inappropriate sample or improper test performance.

External controls: External control reagents should be tested according to the requirements of the laboratory or those of applicable local, state or accrediting agencies.

The results expected with the controls are described in the INTERPRETATION OF RESULTS.

External positive and negative controls should be assayed with each new kit lot or new shipment. The number of additional tests performed with the external controls will be determined by the requirements of local, state or federal regulations or accrediting agencies. The external controls are used to monitor reagent reactivity and test performance. Failure of the controls to produce the expected results can mean that one of the reagents or components is no longer reactive at the time of use, the test was not performed correctly or that reagents or samples were not added. **If the expected control reactions are not observed, 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.** The kit should not be used if control tests do not produce the correct results.

EXPECTED VALUES

The positive rate for each laboratory will be dependent on several factors including the method of specimen collection, the handling and transportation of the specimen, the time of year or the presence of EHEC infection at the time of testing. A negative test should be expected in the absence of EHEC infection.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The test is qualitative and no quantitative interpretation should be made with respect to the intensity of the positive line when reporting the result.
- Test results are to be used in conjunction with information available from the patient clinical evaluation and other diagnostic procedures.
- Failure to add 175 µL of broth culture to the 5 drops of Sample Diluent/Negative Control (step 7 of SPECIMEN PREPARATION/ENRICHMENT – BROTH CULTURE) can lead to falsely negative results. As a visual aid it may be helpful to verify that the broth culture was added. Mark the side of the test tube with a marking pen to indicate the top of the Sample Diluent/Negative Control volume. Once broth culture is added, this line should appear in the middle of the diluted sample volume. The addition of more than 5 drops of Sample Diluent/Negative Control can also lead to falsely negative test results.
- Over incubation of tests may lead to false-positive test results. Incubating tests at reduced temperatures or times may lead to falsely negative results.
- The performance of ImmunoCard STAT! EHEC HAS NOT BEEN EVALUATED with direct stool samples. It has only been evaluated in SMAC plate culture or GN and MacConkey liquid cultures.
- NOTE:** Shiga toxin 1 produced by *E. coli* and the toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1 strains are nearly identical. Therefore, ImmunoCard STAT! EHEC may give a positive result with toxins from *S. dysenteriae* type 1 strains. The two organisms can be differentiated by plating on selective growth media coupled with biochemical analysis.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SMAC PLATE METHOD

Test Devices were evaluated in the United States using the SMAC method and 249 fresh stools and 41 Shiga-toxin positive frozen stools.

COMPARATIVE METHOD (Premier EHEC)			
SMAC Agar Method	Positive	Negative	Total
Positive	46	1*	47
Negative	0	243	243
Total	46	244	290
			CI
Positive agreement	46/46	100%	92.3% - 100%
Negative agreement	243/244	99.6%	97.7% - 100%
Overall agreement	289/290	99.7%	98.7% - 100%

* *E. coli* O157:H7 was recovered from the culture but was not detected by the reference method.

BROTH METHOD

This study was conducted with samples tested fresh or following frozen storage. Samples were obtained from patients in the United States, Canada and Argentina. Five US laboratories evaluated 469 samples using Mac and GN broths. (120 of the samples were solid stool specimens obtained from patients assumed to have gastroenteritis.) 448/469 samples produced growth in GN broth, while 449 produced growth in Mac broth. Three of the GN broth samples were excluded from evaluation with the comparative device due to insufficient volume. Seven of the 469 samples grew in Mac broth only while another three samples grew in GN broth only. Fourteen failed to grow in either broth. Stool specimens were collected from male and female patients of all ages. Samples producing discrepant results between Premier EHEC and ICS EHEC were further analyzed using cytotoxin assay. These samples generally produced weak reactions (< 0.300) in Premier EHEC.

COMPARATIVE METHOD (Premier EHEC)			
Mac Broth Method			
ICS EHEC	Positive	Negative	Total
Positive	60	1	61
Negative	4*	384	388
Total	64	385	449
			CI
Positive agreement	60/64	93.8%	84.8% - 98.3%
Negative agreement	384/385	99.7%	98.6% - 100%
Overall agreement	444/449	98.9%	97.4% - 99.6%

* Two ICS EHEC -, Premier EHEC + samples were negative by a reference cytotoxin method.

COMPARATIVE METHOD (Premier EHEC)			
GN Broth Method			
ICS EHEC	Positive	Negative	Total
Positive	57	1	58
Negative	7*	380	387
Total	64	381	445
			CI
Positive agreement	57/64	89.1%	78.8% - 95.5%
Negative agreement	380/381	99.7%	98.5% - 100%
Overall agreement	437/445	98.2%	96.5% - 99.2%

* Four ICS EHEC -, Premier EHEC + sample were negative by a reference cytotoxin method.

The results of each broth method are compared to each other in following table.

	Mac Positive	Mac Negative	Mac No Growth	Total
GN Positive	54	3	1	58
GN Negative	3	382	5	390
GN No growth	4	3	14	21
Total	61	388	20	469

ANALYTICAL SENSITIVITY

SMAC AGAR TEST

The SMAC agar method is capable of detecting toxin in one colony-forming unit or 25 ng/mL and 62.5 ng/mL for unpurified Shiga toxins 1 and 2, respectively.

GN or MAC BROTH TEST

The lower limits of detection are at 1.25 ng/mL for both ST1 and ST2 using purified toxin.

REPRODUCIBILITY

SM AGAR TEST

Three independent laboratories tested three samples in triplicate, on each of three different times in one day (intra-assay variability) and on three different days (inter-assay variability). Samples consisted of three negative, three low positive and three strong positive. The ImmunoCard STAT! EHEC test produced 100% reproducibility including control lines.

GN or MAC BROTH TEST

Three independent laboratories tested 12 samples (n=2 strong positive, n=4 weak positive, n=4 weak negative, n=2 strong negative) in duplicate on one day (intra-assay variability) and on three different days (inter-assay variability). The ImmunoCard STAT! EHEC test produced 100% reproducibility including control lines.

ASSAY REACTIVITY

SMAC AGAR TEST: The following 40 STEC stock cultures were cultivated on SMAC plates and followed by the polymyxin extraction. All of the isolates produced positive reactions on ImmunoCard STAT! EHEC.

O157:H7 (32 strains), O96:H9 (1), O111:NM (1), O26:H11 (2), O103:H2 (1), O145:NM (1), O45:H2 (1), O45:NM (1).

GN or MAC BROTH TEST: The following 39 STEC stock cultures were cultivated in GN or MacConkey broth. All of the isolates produced positive reactions on ImmunoCard STAT! EHEC.

O157:H7 (32 strains), O157:NM (1), O111:NM (2), O111:H21 (1), O126:H27 (1), O45:H2 (1).

CROSSREACTIVITY

SMAC AGAR TEST: None of the following organisms reacted with the ImmunoCard STAT! EHEC. (Microorganisms and number of strains tested): *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Klebsiella pneumoniae* (10), *Enterobacter species* (10), *Proteus species* (10), Non-ST-producing *E. coli* (10), *Aeromonas species* (3), *Serratia marcescens* (5), *Shigella species* (3).

GN OR MAC BROTH TEST: None of the following organisms crossreacted with the ImmunoCard STAT! EHEC: *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (2 nontoxicogenic strains), *Escherichia coli* O157:H7 (nontoxicogenic strain), *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Group B*, *Salmonella hiversum*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens* (2 strains), *Shigella boydii*, *Shigella flexeri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica* (2 strains), Adenovirus Type 14, Adenovirus Type 2, Adenovirus Type 41, Feline calicivirus, Coxsackie A9, Coxsackie B1, Enterovirus Type 69, Herpes Simplex Virus II, Parainfluenza Type 3, Rotavirus.

TESTS FOR INTERFERING SUBSTANCES (BROTH TESTS ONLY)

The following substances when introduced directly into stool samples, do not interfere with testing at the concentrations identified: Barium Sulfate (0.05 mg/mL), Priolsec OTC (5 ug/mL), Pepto-Bismol (1:2100), Tums (0.05 mg/mL), Tagamet (5 ug/mL), Mylanta (1:2100), Leukocytes (0.05% v/v), Mucin (0.03 mg/mL), Stearic/palmitic acid (0.04 mg/mL, whole blood (0.05% v/v).

ImmunoCard STAT!® EHEC

Test rapido per la ricerca di tossine Shiga 1 e 2 in campioni fecali umani

REF 751630

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

ImmunoCard STAT! EHEC è un test immunocromatografico rapido per la rilevazione qualitativa delle tossine Shiga 1 e 2 (note anche come Verotossine) prodotte da *E. coli* in colture derivate da campioni clinici fecali. ImmunoCard STAT! EHEC va usato, in concomitanza con altri test di laboratorio e in base all'analisi dei sintomi del paziente, per coadiuvare la diagnosi delle patologie causate da infezioni enteromorragiche prodotte da *E. coli* (EHEC).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Negli ultimi anni, tra i gli *E. coli* patogeni per gli esseri umani, hanno acquisito particolare importanza i ceppi di *E. coli* produttori di tossine Shiga.¹⁻¹¹ Il gruppo degli EHEC, con i sierogruppi altamente patogeni O157:H7, O26, O103, O111, O145, ed altri, risultano particolarmente pericolosi. La produzione di tossine Shiga è il criterio più comunemente usato per la rilevazione di questo gruppo di batteri. Le tossine Shiga possono essere raggruppate in due categorie principali: tossina Shiga 1 (ST1) e tossina Shiga 2 (ST2). I ceppi di EHEC possono produrre singolarmente ST1 o ST2 oppure entrambe le tossine ST1 e ST2 contemporaneamente. Gli EHEC possono causare patologie potenzialmente letali soprattutto nei bambini e negli anziani, o nei pazienti immunodepressi. Le principali fonti di infezione sono gli alimenti di origine animale contaminati, crudi o non sufficientemente cotti, ad esempio carne e prodotti caseari. I serbatoi di EHEC sono i bovini, le pecore e le capre. Esso si diffonde attraverso le loro feci. Questi microorganismi possono infiltrarsi negli alimenti durante la preparazione di carni, o prodotti caseari, svolta in condizioni igieniche non adeguate. L'incidenza di infezioni alimentari causate dai ceppi *E. coli* produttori di tossine Shiga richiede l'impiego di metodi di rilevazione rapidi e affidabili. In aggiunta ai tradizionali metodi basati sui brodi di coltura, le tecniche immunologiche stanno acquisendo maggiore efficacia grazie all'incremento della specificità e della sensibilità. ImmunoCard STAT! EHEC è un test diagnostico immunologico, basato sul principio della immunocromatografia a flusso laterale.

PRINCIPIO BIOLOGICI

ImmunoCard STAT! EHEC è un test immunocromatografico rapido a base di anticorpi monoclonali marcati con particelle d'oro di colore rosso. Il dispositivo è dotato di una porta campioni circolare e una finestra di analisi (Toxin 1, Toxin 2) e di controllo (Control) ovale.

- Il campione viene applicato sulla carta cromatografica attraverso la porta campione circolare (Sample).
- Il campione passa attraverso la membrana nella zona di reazione contenente anticorpi colloidali marcati con oro, specifici per le tossine Shiga.
- Gli antigeni delle tossine Shiga (ST1 e ST2) si combinano con gli anticorpi marcati con oro e migrano attraverso la membrana finché non incontrano siti di cattura nell'area di analisi (Toxin 1, Toxin 2).
- I siti di cattura (Toxin 1 e Toxin 2) contengono un altro anticorpo anti-ST1 o anti-ST2 in grado di immobilizzare i complessi tossina Shiga-anticorpo. Grazie alla marcatura con particelle d'oro appare quindi una linea rossa ben visibile.
- La porzione restante del campione continua a migrare verso un'altra area di reazione producendo un'ulteriore linea rossa ben visibile (controllo positivo). A prescindere dall'eventuale presenza di tossine Shiga, sull'area di controllo si formerà sempre una linea rossa a conferma di una corretta prestazione del test.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- Dispositivi di analisi ImmunoCard STAT! EHEC, contenenti anticorpi monoclonali immobilizzati anti-ST1 e anti-ST2. I dispositivi sono confezionati singolarmente in buste di alluminio contenenti agenti desiccanti. Conservare a 2-8 °C quando non in uso.
- Diluente per campioni/controllo negativo, una soluzione tamponata contenente sodio azide allo 0,094% come conservante. Il reagente viene fornito in una fiala di plastica con contagocce. Pronto per l'uso. Conservare a 2-8 °C quando non in uso.
- Controllo positivo, una soluzione di tossine ST1 e ST2 trattate con formalina in una soluzione tamponata contenente sodio azide allo 0,094% come conservante. Il reagente viene fornito in una fiala di plastica con contagocce. Pronto per l'uso. Conservare a 2-8 °C quando non in uso.
- Pipette di trasferimento di plastica da 50 µL/175 µL.

MATERIALI NON FORNITI

Tutti i metodi:

- Incubatori, 35-39 °C
- Vortex
- Timer
- Autoclave
- Guanti di lattice monouso

Metodo con terreno SMAC Agar:

- Piastre con terreno Sorbitol-MacConkey Agar **senza** tellurite o cefixime
- Soluzione di Polimixina B
- Provetta piccola per le analisi (ad esempio, 10 x 75 mm o 12 x 75 mm)
- Applicatori di legno a bastoncino
- Acqua distillata o deionizzata
- Pipette di trasferimento di plastica monouso, oppure micropipette e puntali monouso adatti a dispensare 200 µL
- Anse per inoculazione monouso

Metodo con brodo di coltura:

- Brodo Gram Negative (GN) o MacConkey (Brodo di coltura contenente Neutral Red come indicatore di pH, potrebbe interferire con la lettura del test)
- Terreno di trasporto Cary-Blair modificato (facoltativo)

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Il reagente Controllo Positivo contiene Tossine shiga ST1 ed ST2 inattivate con formalina. In ogni caso esso dovrebbe essere manipolato come materiale potenzialmente pericoloso.
- Alcuni reagenti contengono sodio azide, una sostanza irritante per la pelle. Evitare il contatto con i reagenti. L'eliminazione di reagenti contenenti sodio azide in scarichi costituiti da tubature di piombo o di rame può dare origine alla formazione di ossidi metallici esplosivi. Per evitare la formazione di tali composti è necessario far scorrere l'acqua abbondantemente durante l'operazione di smaltimento.
- Non utilizzare il kit o i suoi componenti dopo la data di scadenza.
- I dispositivi di analisi sono confezionati in buste di alluminio e pertanto sono protetti dall'umidità durante la conservazione. Controllare bene le buste di alluminio prima di aprirle. Non usare i dispositivi di analisi se le buste di alluminio presentano fori o non sono state completamente sigillate. L'inadeguata conservazione dei componenti e dei reagenti potrebbe produrre reazioni false negative.
- Non usare il diluente per campioni/controllo negativo o il controllo positivo se appaiono scoloriti o torbidi. Lo scolorimento o la torbidità potrebbero essere indici di contaminazione microbica.
- Leggere e seguire attentamente le istruzioni.
- Questo test non va usato direttamente sui campioni fecali. Prima dell'analisi, i campioni fecali vanno coltivati su piastra SMAC Agar o in brodo GN / MacConkey. Un mancato arricchimento dei campioni prima dell'analisi produrrà risultati errati.
- Tossine presenti in basse concentrazioni possono deteriorarsi e diventare non rilevabili nei campioni di brodo congelati per la conservazione prima del test. I risultati migliori si ottengono analizzando campioni di brodo freschi. Cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dovrebbero essere evitati.
- Smaltire i campioni fecali come qualsiasi altra sostanza biologicamente pericolosa. Inattivare le colture in autoclave per almeno 15 minuti a 121 °C prima dello smaltimento.

- Le pipette fornite con il kit devono essere contrassegnate secondo gli intervalli indicati nel disegno riprodotto nel paragrafo NOTE PROCEDURALI. Quando le istruzioni richiedono l'uso delle pipette fornite con il kit, non usare pipette di trasferimento che presentino tacche differenti da quelle illustrate nel disegno.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

ImmunoCard STAT! EHEC è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla confezione, purché conservato tra 2 e 8 °C. Il dispositivo di analisi va usato entro 15 minuti dall'apertura della busta di alluminio sigillata.

NOTE PROCEDURALI

Il dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC e la pipetta di trasferimento da 50 µL/175 µL forniti con il kit sono illustrati qui di seguito.

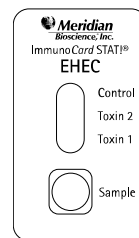
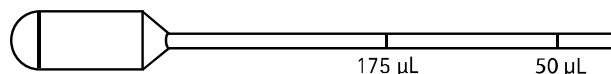


Diagramma della pipetta.



PROCEDURA – METODO CON BRODO DI COLTURA

RACCOLTA DEI CAMPIONI – METODO CON BRODO DI COLTURA

- Conservazione e manipolazione dei campioni fecali per la coltura di microorganismi EHEC: i campioni fecali adatti vanno congelati (≤ -70 °C) o conservati a 2-8 °C immediatamente dopo la raccolta. I campioni refrigerati devono essere sottoposti a coltura entro 2 ore. Se non è possibile eseguire la coltura entro 2 ore, i campioni devono essere conservati in mezzo di trasporto Cary-Blair modificato. I campioni in mezzo di trasporto Cary-Blair modificato possono essere conservati tra 2-8 °C purché sottoposti a coltura entro due o tre giorni. Se la coltura non può essere eseguita entro questo periodo di tempo, congelare i campioni a ≤ -70 °C immediatamente dopo averli ricevuti. I campioni conservati in mezzo di trasporto Cary-Blair modificato non possono essere prima refrigerati e successivamente congelati.
- Conservazione del brodo arricchito, prima dell'analisi con ImmunoCard STAT! EHEC: i brodi arricchiti, che mostrano evidenti segni di crescita batterica, possono essere conservati fino a sette giorni a 2-8 °C prima di essere analizzati con il dispositivo ImmunoCard STAT! EHEC. Se l'analisi non viene eseguita entro questo periodo di tempo, il brodo di coltura deve essere congelato a ≤ -20 °C fino a un massimo di 21 giorni. (Vedi la sezione PRECAUZIONI)
- Nota:** L'uso di campioni fecali in mezzi di trasporto (ad eccezione di Cary-Blair), tamponi o conservanti non è stato validato con questo metodo.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI / ARRICCHIMENTO – METODO CON BRODO DI COLTURA

- Usare un applicatore a bastoncino per miscelare bene il campione fecale a prescindere dalla consistenza.
- Usando un pipettatore o una pipetta di trasferimento (forniti con il kit):
 - Campioni freschi: Aggiungere 50 µL di campione fresco (prima tacca della pipetta) ad una provetta di coltura contenente 8 mL di brodo GN o 5 mL di brodo MacConkey.
 - Campioni conservati in mezzo di trasporto Cary Blair modificato: Aggiungere 175 µL di campione conservato (seconda tacca della pipetta) ad una provetta da coltura contenente 8 mL di brodo GN o 5 mL di brodo MacConkey.
 - Campioni di feci non pipettabili: utilizzare un applicatore in legno per trasferire un quantitativo di feci del diametro di 3-4 mm in una provetta da coltura contenente 8 mL di brodo GN o 5 mL di brodo MacConkey.
- Incubare il brodo inoculato con i tappi non completamente chiusi ad una temperatura compresa tra i 35 ed i 39 °C per 16-24 ore. (Osservare visivamente la crescita nelle provette di coltura).
- NON PROCEDERE CON IL TEST** se non è rilevabile crescita batterica nella provetta del brodo dopo l'incubazione: si otterrebbe un risultato falso-negativo. Ripetere l'arricchimento nel brodo usando lo stesso campione di feci o con un uovo campione ottenuto dal paziente. Se il primo tentativo di arricchimento è stato fatto in brodo GN, per il nuovo tentativo è possibile utilizzare ancora brodo GN oppure utilizzare MacConkey e viceversa. Il campione può essere anche re-inoculato su piastra SMAC. Procedere con i passaggi successivi solo per i campioni in brodo o piastra che hanno mostrato segni di crescita.
- Con la fiala contagocce aggiungere cinque gocce (150 µL) di diluente del campione in una provetta di analisi piccola.
- Miscelare bene il brodo di coltura agitando delicatamente la provetta.
- Con la pipetta di trasferimento fornita con il kit aggiungere 175 µL di campione (seconda tacca dalla punta della pipetta) nella provetta contenente il diluente del campione/controllo negativo.
- Miscelare delicatamente il contenuto della provetta premendo 3 volte il bulbo della pipetta di trasferimento. In alternativa, miscelare con il vortex per 10 secondi. Reinserire la pipetta di trasferimento nella provetta per un utilizzo successivo.
- Il brodo di coltura con campione fecale diluito può essere conservato per massimo 30 minuti a 20-25 °C prima di eseguire l'analisi.

PROCEDURA – METODO CON BRODO DI COLTURA

PROCEDURA DI ANALISI

- Prima dell'analisi, portare tutti i dispositivi di analisi, reagenti e campioni a temperatura ambiente (20-25 °C).
- Usare un dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC per ciascun campione.
- Estrarre il dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC dalla busta di alluminio. Identificare il dispositivo con il nome del paziente.
- Utilizzando la pipetta di trasferimento fornita nel kit, aggiungere lentamente 175 µL del campione diluito (seconda tacca dalla punta della pipetta) alla porta per il campione del dispositivo.
- Incubare il test a 20-25 °C per 20 minuti.
- Leggere i risultati entro 1 minuto dal termine dell'incubazione.

PROCEDURA – METODO CON PIASTRA SMAC AGAR

RACCOLTA DEI CAMPIONI – METODO CON PIASTRA SMAC

Raccogliere i campioni fecali senza conservanti. I campioni possono essere tenuti a temperatura ambiente controllata fino a un massimo di 4 ore prima di preparare le colture. I campioni fecali che non possono essere sottoposti a coltura entro 4 ore devono essere conservati tra 2-8 °C e sottoposti a coltura entro 24 ore. Se non è possibile sottoporre a coltura i campioni entro 24 ore, congelarli a ≤ -70 °C non appena possibile dopo la raccolta.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI / ARRICCHIMENTO – METODO CON PIASTRA SMAC

- Usare un applicatore a bastoncino per miscelare bene il campione fecale a prescindere dalla consistenza.
- Usare un tampone in Dacron per inoculare i campioni fecali nelle piastre SMAC Agar **senza** tellurite o cefixime (**NOTA:** tellurite e cefixime inibiscono la crescita degli *E. coli* non-O157:H7)
- Inoculare la piastra inoculata per 18-24 ore a 35-39 °C.
- NON PROCEDERE CON IL TEST** se non è rilevabile crescita batterica sulla piastra: si otterrebbe un risultato falso-negativo. Ripetere l'arricchimento usando lo stesso campione di feci o con un nuovo campione ottenuto dal paziente. In alternativa effettuare un re inoculo del campione utilizzando la metodica con brodo. Procedere con i passaggi successivi solo per i campioni in brodo o piastra che hanno mostrato segni di crescita.
- Preparare una soluzione di Polimixina B alla concentrazione di 50 µg/mL in acqua distillata;
- Dispensare 0.5 mL della soluzione di Polimixina B 50 µg/mL in una provetta

7. Passare un tampone Dacron diverse volte sull'area di crescita confluyente della piastra, evitando le colonie mucoidi. Le colonie mucoidi possono interferire con la migrazione del campione.
8. Intingere il tampone contenente il campione di colonia nella soluzione Polimixina B/acqua, ruotandolo almeno 3 volte per promuovere il rilascio delle tossine Shiga dai microorganismi.
9. Incubare la miscela per 30 minuti a 35 C.

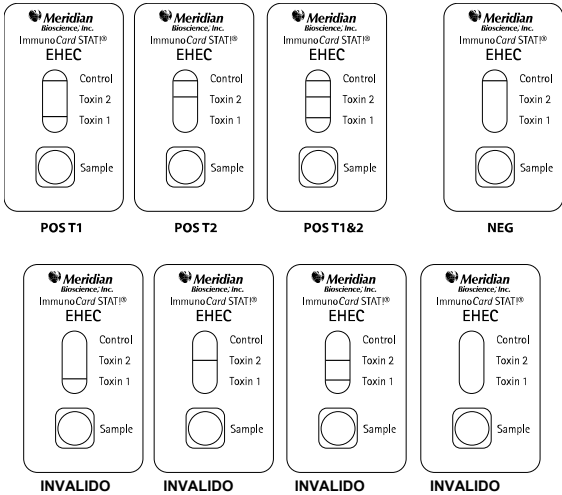
PROCEDURA DEL TEST – METODO CON PIASTRA SMAC

- Prima dell'analisi, portare tutti i dispositivi di analisi, reagenti e campioni a temperatura ambiente (20-25 C).
- Usare un dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC per ciascun campione di paziente e di controllo.
- Estrarre il dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC dalla busta di alluminio e gettar via la busta.
- Poggiare il dispositivo di analisi su una superficie piana e identificarlo con il nome del paziente o del controllo da analizzare.
- Misciare il campione inoculato con acqua/Polimixina, preparato nel corso del punto 6 di cui sopra (PREPARAZIONE DEI CAMPIONI), agitando delicatamente la provetta.
- Con un pipettatore o pipetta di trasferimento (**NON** forniti con il kit) aggiungere 200 µL nella porta per campione (sample) del dispositivo di analisi.
- Incubare il test a 20-25 C per 10 minuti.
- Leggere i risultati entro 1 minuto dal termine dell'incubazione.

ANALISI DI CONTROLLO ESTERNO – METODO CON PIASTRA SMAC AGAR O CON BRODO DI COLTURA

- Prima dell'analisi, portare tutti i dispositivi di analisi e reagenti a temperatura ambiente (20-25 C).
- Usare un dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC per il controllo positivo e uno per il diluente del campione/controllo negativo.
- Estrarre il dispositivo di analisi ImmunoCard STAT! EHEC dalla busta di alluminio. Identificare il dispositivo il nome del controllo corrispondente.
- Aggiungere esattamente 5 gocce del reagente di controllo positivo nella porta per il campione (sample) del dispositivo etichettato per il controllo positivo.
- Aggiungere esattamente 6 gocce del diluente per campioni/controllo negativo nella nella porta per il campione (sample) del dispositivo etichettato per il controllo negativo.
- Incubare il test a 20-25 C per 20 minuti.
- Leggere i risultati entro 1 minuto dal termine dell'incubazione.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



Risultato negativo: una linea ROSA–ROSSA nella posizione Control. Non sono presenti altre linee.

Risultato positivo per tossina Shiga 1: linee ROSA-ROSSE nelle posizioni Control e Toxin 1. Non sono presenti linee nella posizione Toxin 2. Una linea nella posizione Toxin 1, anche se molto debole, indica la presenza della tossina Shiga 1. L'intensità della linea può essere inferiore a quella della linea nella posizione Control.

Risultato positivo per tossina Shiga 2: linee ROSA-ROSSE nelle posizioni Control e Toxin 2. Non sono presenti linee nella posizione Toxin 1. Una linea nella posizione Toxin 2, anche se molto debole, indica la presenza della tossina Shiga 2. L'intensità della linea può essere inferiore a quella della linea nella posizione Control.

Risultato positivo per tossine Shiga 1 e 2: linee ROSA-ROSSE nelle posizioni Control, Toxin 1 e Toxin 2. Le linee nella posizione Toxin 2 e Toxin 1, anche se molto deboli, indicano la presenza delle tossine Shiga 1 e 2. L'intensità delle linee può essere inferiore a quella della linea nella posizione Control.

Risultati non validi:

- Nessuna linea appare nella posizione designata per la linea Control. Il test non è valido in quanto l'assenza della linea di controllo indica che la procedura di analisi è stata eseguita in maniera non corretta, oppure che si è verificato un deterioramento dei reagenti.
- Una linea ROSA-ROSSA appare nella posizione Toxin 1 o Toxin 2 del dispositivo dopo il termine massimo per la lettura dei risultati, oppure compare una linea di qualsiasi altro colore, ma non ROSA-ROSSO. Risultati falsamente positivi possono verificarsi se i test sono stati incubati troppo a lungo. Linee di colore diverso da ROSA-ROSSO possono indicare il deterioramento del reagente.

Nel caso in cui sia difficile interpretare il risultato, ripetere l'analisi utilizzando lo stesso campione per evitare erronee refertazioni. Procurarsi un nuovo campione e ripetere l'analisi nel caso in cui il campione originale produca ripetutamente risultati difficili da interpretare.

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

Al momento dell'uso, esaminare visivamente i componenti del kit per accertarsi che non presentino segni di contaminazione microbica, congelamento o perdite. Non usare reagenti contaminati o sospetti.

Controlli interni: i controlli interni sono contenuti all'interno della striscia di analisi e pertanto sono valutati nel corso di ciascun test.

- Una linea ROSA-ROSSA che appare nella posizione Control funge da controllo procedurale interno ed indica che il test è stato eseguito correttamente, che la migrazione è avvenuta correttamente e che i reagenti erano reattivi al momento dell'uso.
- Uno sfondo incolore intorno alle posizioni Control o di analisi funge da controllo procedurale interno. Uno sfondo che impedisce la lettura della linee test e di controllo rende il test non valido ed indica il deterioramento del reagente, l'uso di un campione non adatto o l'esecuzione non corretta del test.

Controlli esterni: i reagenti di controllo esterno devono essere testati conformemente ai requisiti del laboratorio o alle vigenti normative locali, statali o degli enti di controllo.

I risultati attesi con i controlli sono descritti nel paragrafo INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.

I controlli esterni Positivi e Negativi dovrebbero essere analizzati con ogni nuovo lotto o con ogni nuova spedizione del kit. Il numero di test eseguiti con i controlli esterni deve essere determinato in conformità a quanto stabilito dai competenti enti locali, regionali, nazionali o degli enti di accreditamento. I controlli esterni servono a controllare la reattività dei reagenti e le prestazioni delle analisi. Il mancato ottenimento dei risultati attesi indica che uno dei reagenti, o dei componenti, non era reattivo al momento dell'uso, che l'analisi non è stata eseguita correttamente o che i campioni non sono stati aggiunti. **Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, 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) o il Distributore Locale (Italia +390331433636).** Non usare il kit se i test di controllo non producono risultati corretti.

VALORI ATTESI

Il tasso di valori positivi per ciascun laboratorio dipende da vari fattori, fra cui il metodo di raccolta dei campioni, la manipolazione e il trasporto degli stessi, la stagione o la presenza di infezioni da EHEC al momento dell'analisi. In assenza di infezioni da EHEC si prevedono risultati negativi.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- Il test è qualitativo, pertanto non si devono formulare interpretazioni quantitative dei valori ottenuti in base all'intensità della linea positiva.
- I risultati del test devono essere utilizzati insieme alle informazioni ricavate dall'esame clinico del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Se alle 5 gocce di diluente del campione/controllo negativo non si aggiungono i 150 µL di brodo di coltura (Passaggio 7 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI / ARRICCHIMENTO – METODO CON BRODO DI COLTURA) si possono ottenere risultati falso negativi. Per aiutarsi è possibile verificare visivamente che il brodo è stato aggiunto. Sul lato della provetta tracciare una linea che indichi il livello superiore del diluente del campione/controllo negativo. Una volta aggiunto il brodo alla provetta, la linea dovrà trovarsi circa alla metà del volume totale diluente + brodo. L'aggiunta di più di 5 gocce di diluente del campione/controllo negativo può anche determinare a risultati falso-negativi del test.
- Un'incubazione dei test più lunga di quanto indicato nella metodica può produrre risultati falso positivi. Un'incubazione dei test a temperature ridotte, o per un periodo di tempo inferiore, può produrre risultati falso negativi.
- Le performance del test ImmunoCard STAT! EHEC NON SONO STATE VALUTATE per l'utilizzo diretto su feci ma solo su campioni pre-aricchiti su piastra SMAC e colture in liquido in GN o MacConkey.
- NOTA: la tossina Shiga 1 prodotta da E. coli e la tossina prodotta dai ceppi di tipo 1 di Shigella dysenteriae sono pressoché identiche. Perciò, ImmunoCard STAT! EHEC può dare un risultato positivo in caso di presenza di Shigella dysenteriae tipo 1. I due organismi possono essere differenziati mediante coltura su piastre selettive in associazione con analisi biochimiche.**

PRESTAZIONI SPECIFICHE

METODO CON PIASTRA SMAC

Il test ImmunoCard STAT! EHEC è stato valutato negli Stati Uniti utilizzando il metodo con SMAC su 249 campioni fecali freschi e 41 campioni fecali congelati contenenti positivi per la presenza di Shiga.

Metodo di Riferimento (Premier EHEC) Procedura su SMAC Agar			
ImmunoCard STAT! EHEC	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	46	1*	47
Negativi	0	243	243
Totali	46	244	290
			CI
Concordanza Positivi	46/46	100%	92,3% - 100%
Concordanza Negativi	243/244	99,6%	97,7% - 100%
Concordanza globale	289/290	99,7%	98,7% - 100%

* E. coli O157:H7 è stata rilevata dalla coltura ma non è stata rilevata dal metodo di riferimento.

METODO CON BRODO DI COLTURA

Questo studio di valutazione è stato condotto su campioni freschi o conservati mediante congelamento. I campioni sono stati ottenuti da pazienti residenti negli Stati Uniti, in Canada e in Argentina. Cinque laboratori statunitensi hanno analizzato 469 campioni usando i brodi MacConkey e GN. (120 dei campioni consistevano in feci solide ottenute da pazienti con gastroenterite.) 448/469 campioni hanno dato origine a crescita batterica in brodo GN, mentre 449 hanno dato origine a crescita batterica in brodo MacConkey. Tre dei campioni in brodo GN sono stati esclusi dalla valutazione con il dispositivo di confronto a causa del volume insufficiente. Sette dei 469 campioni si sono arricchiti solo in Mac, mentre tre si sono arricchiti solo in GN. Quattordici campioni hanno fallito l'arricchimento in entrambi i brodi. I campioni di feci sono stati ottenuti da pazienti maschi e femmine di tutte le età. I campioni che hanno dato origine a risultati discrepanti tra ImmunoCard STAT! EHEC e Premier EHEC sono stati successivamente analizzati utilizzando il test di citotossicità. Questi campioni hanno generalmente mostrato con Premier EHEC reazioni deboli (OD < 0,300).

Metodo di riferimento (Premier EHEC) Procedura con Brodo MacConkey			
ICS EHEC	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	60	1	61
Negativi	4*	384	388
Totali	64	385	449
			CI
Concordanza Positivi	60/64	93,8%	84,8% - 98,3%
Concordanza Negativi	384/385	99,7%	98,6% - 100%
Concordanza globale	444/449	98,9%	97,4% - 99,6%

* due campioni ICS EHEC -, Premier EHEC + sono risultati negativi quando analizzati con il metodo di riferimento, il test di citotossicità.

Metodo di riferimento (Premier EHEC) Procedura con Brod GN			
ICS EHEC	Positivi	Negativi	Totali
Positivi	57	1	58
Negativi	7*	380	387
Totali	64	381	445
			CI
Concordanza Positivi	57/64	89,1%	78,8% - 95,5%
Concordanza Negativi	380/381	99,7%	98,5% - 100%
Concordanza globale	437/445	98,2%	96,5% - 99,2%

* Quattro campioni ICS EHEC -, Premier EHEC + sono risultati negativi quando analizzati con il metodo di riferimento, il test di citotossicità.

I risultati ottenuti con ciascuno dei due metodi con brodo sono paragonati tra loro nella seguente tabella:

	Mac Positivo	Mac Negativo	Mac NO crescita	Totale
GN Positivo	54	3	1	58
GN Negativo	3	382	5	390
GN NO crescita	4	3	14	21
Totali	61	388	20	469

SENSIBILITÀ ANALITICA

TEST a partire da SMAC AGAR

Il test, con il metodo di analisi per SMAC Agar, è in grado di rilevare la tossina in 1 CFU (Unità Formante Colonia), in alternativa la sensibilità è 25 ng/mL e 62,5 ng/mL, rispettivamente per le tossine Shiga 1 e 2, non purificate.

TEST con BRODO GN o MAC

Il limite di rilevamento è di 1,25 ng/mL per entrambe ST1 e ST2, usando tossine purificate.

RIPRODUCIBILITÀ

TEST SM AGAR

Tre laboratori indipendenti hanno analizzato tre campioni in tre volte, a tre orari diversi, nello stesso giorno (variabilità intra-saggio) e in tre giorni diversi (variabilità inter-saggio). I risultati comprendevano tre campioni negativi, tre basso positivi e tre alto positivi. Il test ImmunoCard STAT! EHEC ha prodotto risultati corretti il 100% delle volte, compreso il rilevamento delle linee di controllo.

TEST con BRODO GN o MAC

Tre laboratori indipendenti hanno analizzato 12 campioni (n=2 alto positivo, n=4 basso positivo, n=4 basso negativo, n=2 alto negativo) due volte in un unico giorno (variabilità intra-saggio) e in tre giorni diversi (variabilità inter-saggio). Il test ImmunoCard STAT! EHEC ha prodotto risultati corretti il 100% delle volte, compreso il rilevamento delle linee di controllo.

REATTIVITÀ DEL SAGGIO

TEST SMAC AGAR: Le seguenti 40 colture STEC sono state eseguite su piastrine SMAC con successiva estrazione tramite polimixina. Tutte le sostanze isolate hanno prodotto reazioni positive con ImmunoCard STAT! EHEC. O157:H7 (32 ceppi), O96:H9 (1), O111:NM (1), O26:H11 (2), O103:H2 (1), O145:NM (1), O45:H2 (1), O45:NM (1).

TEST con BRODO GN o MAC: Le seguenti 39 colture STEC sono state eseguite in brodi GN o MacConkey. Tutte le sostanze isolate hanno prodotto reazioni positive con ImmunoCard STAT! EHEC. O157:H7 (32 ceppi), O157:NM (1), O111:NM (2), O111:H21 (1), O121:H19 (1), O126:H27 (1), O45:H2 (1),

CROSS-REATTIVITÀ

TEST SMAC AGAR: Nessuno dei seguenti organismi ha reagito con il test ImmunoCard STAT! EHEC. (Microorganismi e numero di ceppi analizzati): *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Klebsiella pneumoniae* (10), specie Enterobatterica (10), specie *Proteus* (10), *E. coli* non produttore ST (10), specie *Aeromonas* (3), *Serratia marcescens* (5), specie *Shigella* (3)

TEST con BRODO GN o MAC: Nessuno dei seguenti organismi ha evidenziato cross-reattività con il test ImmunoCard STAT! EHEC: *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (2 ceppi non-tossigenici), *Escherichia coli* O157:H7 (ceppo non-tossigenico), *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Group B, *Salmonella hiversum*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia lipofaciens* (2 ceppi), *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica* (2 ceppi), Adenovirus Tipo 14, Adenovirus Tipo 2, Adenovirus Tipo 41, calicivirus felino, Coxsackie A9, Coxsackie B1, Enterovirus Tipo 69, virus dell'Herpes Simplex II, virus della Parainfluenza Tipo 3, Rotavirus.

ANALISI DI SOSTANZE INTERFERENTI (SOLO PER ANALISI CON BRODI DI COLTURA)

Le seguenti sostanze, quando introdotte direttamente nel campione fecale, non interferiscono con il test alle concentrazioni indicate: solfato di bario (0,05 mg/mL), Priolsec OTC (5 µg/mL), Pepto-Bismol (1:2100), Tums (0,05 mg/mL), Tagamet (5 µg/mL), Mylanta (1:2100), leucociti (0,05% v/v), mucina (0,03 mg/mL), acido stearico/palmitico (0,04 mg/mL), sangue intero (0,05% v/v).

FRANÇAIS



Test rapide pour la détection des Shiga toxines 1 et 2 dans les échantillons de selles humaines

REF 751630

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC est un test immunochromatographique rapide utilisé pour la détection qualitative des shiga toxines 1 et 2 (aussi appelées vérotoxines) produites par l'*Escherichia coli* (*E. coli*) dans des cultures d'échantillons de selles cliniques. La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC, en conjonction avec les symptômes cliniques du patient et les autres tests de laboratoire, est utilisée pour diagnostiquer les maladies dues aux infections à *E. coli* entérohémorragiques (EHEC pour entérohémorrhagic *E. coli*).

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Parmi les *E. coli* pathogènes pour l'espèce humaine, les souches d'*E. coli* producteurs de shiga toxines ont, ces dernières années, pris de l'importance.¹⁻¹¹ Les EHEC, avec leurs sérotypes très pathogènes O157:H7, O26, O103, O111, O145 et les autres souches, sont particulièrement inquiétants. La production de shiga toxines est le critère le plus commun pour la détection de ce groupe de bactéries. Les shiga toxines peuvent être classées en deux catégories principales: la shiga toxine 1 (ST1) et la shiga toxine 2 (ST2). Les souches EHEC peuvent produire la ST1 ou la ST2 seulement, ou bien la ST1 et la ST2 simultanément. Les EHEC sont capables de provoquer des maladies mettant en danger la vie de la personne infectée, surtout chez les jeunes enfants, les personnes âgées ou les patients atteints d'un déficit immunitaire. Les principales sources d'infection sont les aliments contaminés, crus ou insuffisamment cuits d'origine animale, les œufs, la viande et les produits laitiers. Les bovins, les moutons et les chèvres sont les principaux réservoirs d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). Le mode de transmission se fait par contact avec leurs déjections. Ces micro-organismes peuvent contaminer les aliments durant la transformation de la viande et des produits laitiers si les conditions hygiéniques sont inadéquates. L'incidence d'infection alimentaire causée par l'*E. coli* producteur de shiga toxines demande l'utilisation de méthodes de détection sûres et rapides. En plus des méthodes de culture traditionnelles, les techniques immunologiques deviennent de plus en plus utiles grâce à leur meilleure spécificité et sensibilité. La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC est un test immunologique basé sur le principe du flux latéral.

PRINCIPE DU TEST

La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC est un test immunochromatographique rapide utilisant des anticorps monoclonaux marqués avec des particules d'or rouge. La carte de test est composée d'une fenêtre échantillon (Sample) circulaire, d'une fenêtre de tests (Toxin 1, Toxin 2) et de contrôle (Control) ovale.

- L'échantillon est introduit sur le papier chromatographique par la fenêtre échantillon circulaire (Sample).
- L'échantillon est absorbé par la membrane et migre à travers la zone de réaction contenant des anticorps marqués avec de l'or colloïdal spécifiques des shiga toxines.
- Tout antigène des shiga toxines (ST1 et ST2) se combine à l'anticorps marqué à l'or et migre à travers la membrane jusqu'à ce qu'il atteigne les sites de capture dans la zone Test (Toxin 1, Toxin 2).
- Les sites de capture (Toxin 1 et Toxin 2) contiennent un autre anticorps anti-ST1 ou anti-ST2 en mesure d'immobiliser tout complexe shiga toxine-anticorps présent. Grâce au marquage à l'or, une ligne rouge distincte se forme.
- Le reste de l'échantillon continue de migrer vers un autre site réactionnel à l'intérieur même de la zone de contrôle et y produit une autre ligne rouge distincte (contrôle positif). Que la shiga toxine soit présente ou non, une ligne rouge distincte doit toujours se former dans la zone de contrôle car elle confirme que le test fonctionne correctement.

MATERIEL FOURNI

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

- Cartes de test ImmunoCard STAT! EHEC contenant les anticorps monoclonaux anti-ST1 et anti-ST2 immobilisés. Les cartes sont emballées sous pochette aluminium individuelle avec un dessiccatif. Conserver entre 2 et 8 C entre les utilisations.
- Diluant pour échantillon/contrôle négatif, un diluant tamponné contenant 0,094 % d'azote de sodium comme conservateur. Le réactif est fourni dans un flacon compte-gouttes en plastique. Prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 C entre les utilisations.

- Contrôle positif, une solution de toxines ST1 et ST2 traitées au formol dans un diluant tamponné contenant 0,094 % d'azote de sodium comme conservateur. Le réactif est fourni dans un flacon compte-gouttes en plastique. Prêt à l'emploi. Conserver entre 2 et 8 C entre les utilisations.
- Pipettes de transfert en plastique jetables avec repères de mesure de 50 µL et 175 µL.

MATERIEL NON FOURNI

Pour toutes les méthodes:

- Incubateurs, 35-39 C
- Vortex
- Minuteur
- Autoclave
- Gants jetables en latex

Pour la méthode sur SMAC-agar:

- Plaque Sorbitol-MacConkey-Agar sans tellurite ou céfixime
- Solution de polymyxine B
- Petit tube pour test (p. ex. 10 x 75 mm ou 12 x 75 mm)
- Bâtonnets applicateurs
- Eau distillée ou désionisée
- Pipettes ou micropipettes de transfert jetables en plastique et embouts jetables pouvant distribuer 200 µL
- Anses d'ensemencement jetables

Pour la méthode du bouillon:

- Bouillon Gram Négatif (GN) ou MacConkey (Bouillon contenant du rouge neutre comme indicateur peut diminuer la lisibilité du test.)
- Milieu Cary-Blair modifié (optionnel)

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Le Contrôle Positif contient des shiga toxines 1 (ST1) et 2 (ST2) traitées (inactivées) par le formol. Manipuler toutefois ce contrôle comme du matériel potentiellement dangereux.
- Certains réactifs contiennent de l'azote de sodium comme conservateur. Ce composant est irritant pour la peau. Éviter le contact avec ces réactifs. L'élimination des réactifs contenant de l'azote de sodium dans les canalisations de plomb ou de cuivre peut entraîner la formation d'oxydes de métal explosifs. L'accumulation de ces oxydes est évitée en rinçant les canalisations à grandes eaux.
- Ne pas utiliser le coffret ou ses éléments si leur date d'expiration est dépassée.
- Les cartes de test sont emballées sous pochette aluminium qui exclut l'humidité durant le stockage. Inspecter chaque pochette avant de l'ouvrir. Ne pas utiliser les cartes de test dont la pochette est trouée ou n'a pas été complètement scellée. Des réactions faussement négatives peuvent survenir si les éléments du test et les réactifs sont incorrectement stockés.
- Ne pas utiliser le diluant pour échantillon/contrôle négatif ou le contrôle positif si a changé de couleur ou est trouble. La décoloration ou turbidité peut être un signe de contamination microbienne.
- Lire et suivre les instructions avec soin.
- Ceci n'est pas un test direct sur selles. Les échantillons de selles doivent être cultivés sur des plaques SMAC-agar ou dans un bouillon GN ou MacConkey avant d'être analysés. Si les échantillons ne sont pas enrichis avant le test, les résultats seront erronés.
- Les toxines peuvent se détériorer et, lorsqu'elles sont présentes en faibles quantités, être indétectables dans les bouillons de culture stockés congelés avant analyse. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque les bouillons sont testés frais. Des cycles de congélation/décongélation multiples sont à éviter.
- Éliminer les échantillons de selles en tant que matières biologiques potentiellement dangereuses. Inactiver les cultures en les autoclavant pendant un minimum de 15 minutes à 121 C avant de les éliminer.
- Les pipettes fournies avec le coffret doivent être marquées aux intervalles reportés dans le diagramme de la pipette dans REMARQUES SUR LA PROCÉDURE. Lorsqu'il est demandé d'utiliser la pipette fournie avec le coffret, ne pas utiliser les pipettes de transfert avec des repères qui diffèrent de ceux du diagramme.

DANGER ET MISES EN GARDE

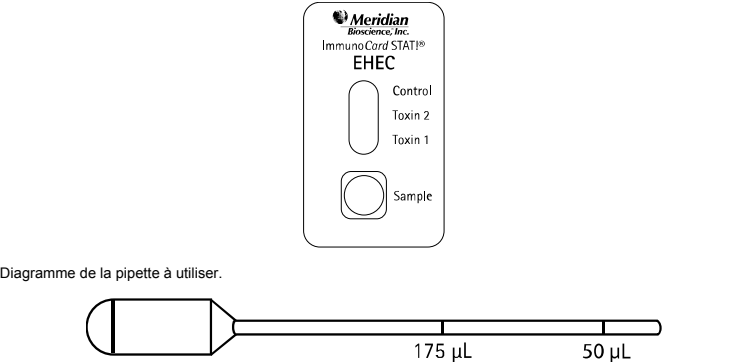
A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC, conservée entre 2 et 8 C, est stable jusqu'à la date d'expiration imprimée sur la boîte. La carte de test doit être utilisée dans les 15 minutes qui suivent son retrait de la pochette scellée.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

Les diagrammes de la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC et de la pipette de transfert fournie avec le coffret sont montrés ci-dessous.



**PROCEDURE POUR LA METHODE DU BOUILLON
PRELEVEMENT DE L'ECHANTILLON – METHODE DU BOUILLON**

- Conservation et manipulation de l'échantillon de selles pour la culture des organismes EHEC: l'échantillon de selles approprié doit être soit congelé (≤ -70 C) ou placé entre 2 et 8 C immédiatement après prélèvement. Les échantillons réfrigérés doivent être mis en culture dans les 2 heures. Si la mise en culture ne peut être effectuée dans les 2 heures, l'échantillon doit être placé dans un milieu de transport Cary-Blair modifié. Les échantillons placés dans un milieu de transport Cary-Blair modifié peuvent être conservés entre 2 et 8 C s'ils sont cultivés dans les 2 à 3 jours. Si la mise en culture ne peut se faire dans ces délais, les échantillons doivent être congelés à ≤ -70 degrés de réfrigération. Les échantillons placés dans le milieu de transport Cary-Blair modifié ne doivent pas être réfrigérés, puis congelés.
- Conservation du bouillon présentant une croissance avant le test ImmunoCard STAT! EHEC: les bouillons après enrichissement peuvent rester jusqu'à sept jours entre 2 et 8 C avant d'être analysés avec le test ImmunoCard STAT! EHEC. Si l'analyse n'est pas effectuée dans ce délai, le bouillon doit être congelé à ≤ -20 C pendant un maximum de 21 jours. (Voir la section PRECAUTIONS)
- Remarque:** les échantillons fécaux placés en milieu de transport (à l'exception de Cary-Blair), sur écouvillon ou mélangés à des conservateurs n'ont pas été validés pour être utilisés avec cette méthode.

PREPARATION DE L'ECHANTILLON/ENRICHISSEMENT – METHODE DU BOUILLON

- Utiliser un bâtonnet applicateur pour mélanger les selles, quelle que soit leur consistance.
- A l'aide d'une pipette ou une pipette de transfert (fournie avec le coffret):
 - Echantillon sans conservateur: ajouter 50 µL d'échantillon sans conservateur (premier repère à partir de l'extrémité de la pipette) à un tube pour culture contenant 8 mL de bouillon GN ou 5 mL de bouillon MacConkey.
 - Echantillon prélevé sur un milieu Cary-Blair modifié: ajouter 175 µL d'échantillon avec conservateur (second repère à partir de l'extrémité de la pipette) à un tube pour culture contenant 8 mL de bouillon GN ou 5 mL de bouillon MacConkey.

- c. Échantillon non-pipetable: transférer une portion de selle de 3-4 mm de diamètre à l'aide d'un bâtonnet applicateur en bois dans 8 mL de bouillon GN ou 5 mL de bouillon MacConkey.
3. Incuber le bouillon inoculé, bouchons non fermés, à 35-39 C pendant 16-24 heures. (Observer la croissance dans les tubes de bouillon visuellement).
4. **NE PAS PROCEDER A L'ANALYSE** lorsqu'aucune croissance n'est observée dans le bouillon après incubation car un résultat faussement négatif pourrait être reporté. Répéter la procédure d'enrichissement avec une nouvelle portion de la même selle ou avec un nouvel échantillon de patient. Si le bouillon GN a été utilisé initialement pour l'enrichissement, la deuxième tentative peut être réalisée dans le bouillon GN ou alternativement dans le bouillon MacConkey et vice-versa. L'enrichissement sur plaque Sorbitol-MacConkey (SMAC) peut aussi être réalisé. Ne tester que les bouillons ou les cultures sur plaque agar qui montrent une croissance.
5. À l'aide du flacon compte-gouttes, mettre cinq gouttes (150 µL) de tampon de diluant pour échantillon dans un petit tube.
6. Bien mélanger le bouillon de culture en agitant doucement le tube par rotation.
7. À l'aide d'une pipette de transfert fournie avec le coffret, ajouter 175 µL d'échantillon (second repère à partir de l'extrémité de la pipette) au tube contenant le diluant pour échantillon/contrôle négatif.
8. Mélanger doucement le contenu du tube avec la pipette de transfert en pressant trois fois sur la poire de la pipette. Sinon, mélanger à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes. Remettre la pipette de transfert dans le tube en vue d'une utilisation ultérieure.
9. Le bouillon de culture de selles dilué peut être conservé pendant un maximum de 30 minutes entre 20-25 C avant d'être analysé.

PROCEDURE POUR LA METHODE DU BOUILLON

PROCEDURE DU TEST

1. Amener toutes les cartes de test, les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-25 C) avant le test.
2. Utiliser une carte de test ImmunoCard STAT! EHEC pour chaque échantillon de patient.
3. Retirer la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC de sa pochette en aluminium. Inscrive sur la carte de test l'identification du patient.
4. À l'aide de la pipette de transfert fournie dans le coffret, déposer lentement 175 µL d'échantillon dilué (second repère à partir de l'extrémité de la pipette) dans la fenêtre échantillon de la carte de test.
5. Incuber le test entre 20-25 C pendant 20 minutes.
6. Lire les résultats dans la minute qui suit la fin de l'incubation.

PROCEDURE POUR LA METHODE SUR PLAQUE SMAC-AGAR

PRELEVEMENT DE L'ECHANTILLON - METHODE SUR PLAQUE SMAC-AGAR

Prélever les échantillons de selles sans conservateur. Les échantillons peuvent être maintenus à température ambiante contrôlée pendant un maximum de 4 heures avant de préparer les cultures. Les échantillons de selles qui ne peuvent pas être cultivés dans les 4 heures doivent être placés entre 2-8 C et cultivés dans les 24 heures. Si les échantillons ne peuvent pas être cultivés dans les 24 heures, ils doivent alors être congelés à ≤ -70 C aussitôt que possible après réception.

PREPARATION DE L'ECHANTILLON/ENRICHISSEMENT – METHODE DE LA PLAQUE SMAC

1. Utiliser un bâtonnet applicateur pour mélanger les selles, quelle que soit leur consistance.
2. Utiliser un écouvillon en Dacron pour inoculer les échantillons de selles sur les plaques SMAC-agar sans tellurite ou céfixime. (NOTE: Tellurite et céfixime inhibent la croissance de *E. coli* non-O157:H7)
3. Incuber la plaque inoculée pendant 18-24 heures à 35-39 C.
4. **NE PAS PROCEDER A L'ANALYSE** lorsqu'aucune croissance sur la plaque agar n'est observée après incubation car un résultat faussement négatif pourrait être reporté. Répéter la procédure d'enrichissement sur plaque avec une nouvelle portion de la même selle ou avec un nouvel échantillon de patient. Alternativement procéder à l'enrichissement de l'échantillon dans un bouillon. Ne tester que les bouillons ou les cultures sur plaque agar qui montrent une croissance.
5. Préparer une solution de Polymyxine B à la concentration de 50 µg/mL dans l'eau distillée.
6. Transférer 0,5 mL de solution de Polymyxine B à la concentration de 50 µg/mL dans le tube.
7. À l'aide d'un écouvillon en Dacron, balayer plusieurs fois en travers de la zone de croissance confluyente de la plaque, en évitant les colonies mucoïdes. Les colonies mucoïdes peuvent interférer avec la migration de l'échantillon.
8. Introduire l'écouvillon porteur du balayage des colonies dans la solution de polymyxine préparée et faire tourner au moins 3 fois l'écouvillon pour libérer les organismes.
9. Incuber le mélange pendant au moins 30 minutes à 35 C.

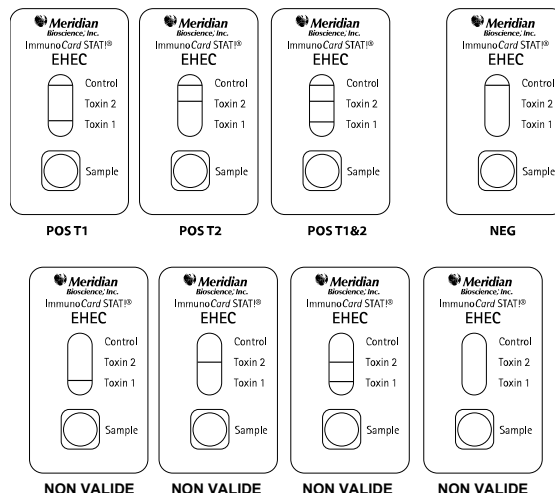
PROCEDURE DU TEST - METHODE SUR PLAQUE SMAC

1. Amener toutes les cartes de test, les réactifs et les échantillons à température ambiante (20-25 C) avant le test.
2. Utiliser une carte de test ImmunoCard STAT! EHEC pour chaque échantillon de patient et contrôle.
3. Retirer la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC de sa pochette aluminium et jeter la pochette.
4. Placer la carte de test sur une surface plane et l'étiqueter avec le nom du patient ou le contrôle à analyser.
5. Mélanger l'échantillon inoculé d'eau/polymyxine préparé à l'étape 6 ci-dessus (PREPARATION DE L'ECHANTILLON) en agitant le tube doucement par rotation.
6. À l'aide d'un pipetteur ou d'une pipette de transfert (**NON** fourni avec le coffret), ajouter 200 µL dans la fenêtre échantillon circulaire de la carte de test.
7. Incuber le test entre 20-25 C pendant 10 minutes.
8. Lire les résultats dans la minute qui suit la fin de l'incubation.

TESTS DE CONTROLE EXTERNE – METHODE SMAC-AGAR OU DU BOUILLON

1. Amener toutes les cartes de test et les réactifs à température ambiante (20-25 C) avant le test.
2. Utiliser une carte de test ImmunoCard STAT! EHEC pour chaque contrôle positif et le diluant pour échantillon/contrôle négatif.
3. Retirer la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC de sa pochette en aluminium. Inscrive sur la carte le nom du contrôle à doser.
4. Mettre exactement 5 gouttes du contrôle positif dans la fenêtre échantillon d'une carte marquée pour le contrôle positif.
5. Mettre exactement 6 gouttes du diluant pour échantillon dans la fenêtre échantillon d'une carte marquée pour le diluant pour échantillon/contrôle négatif.
6. Incuber le test entre 20-25 C pendant 20 minutes.
7. Lire les résultats dans la minute qui suit la fin de l'incubation.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS



Test négatif: une bande ROSE-ROUGE au niveau de la position «Control». Aucune autre bande n'apparaît.

Test positif pour la shiga toxine 1: des bandes ROSE-ROUGE apparaissent au niveau des positions «Control» et «Toxin 1». Aucune bande n'apparaît au niveau de la position «Toxin 2». L'apparition d'une bande au niveau de «Toxin 1», même si elle est très faible, indique la présence de la shiga toxine 1. L'intensité de la bande peut être moindre que celle au niveau de la position «Control».

Test positif pour la shiga toxine 2: des bandes ROSE-ROUGE apparaissent au niveau des positions «Control» et «Toxin 2». Aucune bande n'apparaît au niveau de la position «Toxin 1». L'apparition d'une bande au niveau de «Toxin 2», même si elle est très faible, indique la présence de la shiga toxine 2. L'intensité de la bande peut être moindre que celle au niveau de la position «Control».

Test positif pour les shiga toxines 1 et 2: des bandes ROSE-ROUGE apparaissent au niveau des positions «Control», «Toxin 2» et «Toxin 1». L'apparition d'une bande au niveau de «Toxin 2» et de «Toxin 1», même si elles sont très faibles, indique la présence des shiga toxines 1 et 2. L'intensité des bandes peut être moindre que celle au niveau de la position «Control».

Résultats de test non valides:

1. Aucune bande au niveau de la position «Control». Le test est non valide puisque l'absence de la bande au niveau de la position «Control» indique une réalisation incorrecte du test ou une détérioration des réactifs.
2. Une bande ROSE-ROUGE apparaît au niveau de la position «Toxin 1» ou «Toxin 2» une fois la durée d'incubation terminée, ou une bande d'une tout autre couleur que ROSE-ROUGE apparaît. Des résultats faussement positifs peuvent être obtenus si le test incube trop longtemps. Les bandes d'une couleur autre que ROSE-ROUGE peuvent indiquer une détérioration du réactif.

S'il est difficile d'interpréter un résultat, refaire le test avec le même échantillon pour éliminer le potentiel d'erreur. Prélever un nouvel échantillon et tester de nouveau si l'échantillon original donne de façon répétée des résultats non lisibles.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

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

À chaque utilisation, les éléments du coffret doivent être examinés visuellement pour tout signe évident de contamination microbienne, congélation ou fuite. Ne pas utiliser des réactifs contaminés ou suspects.

Contrôles internes : des contrôles internes sont contenus dans la bandelette du test et sont donc évalués à chaque test.

1. Une bande ROSE-ROUGE qui apparaît au niveau de la position «Control» sert de contrôle interne de procédure. Elle indique que le test a été effectué correctement, que l'échantillon a été ajouté, que la migration s'est réalisée correctement et que les réactifs étaient actifs au moment de leur utilisation.
2. Un fond propre autour des lignes de contrôle ou de test sert aussi de contrôle interne de procédure. Des lignes de fond ou de test rendues illisibles par un fond fortement coloré peut rendre le test non valide et indiquer une détérioration du réactif, l'utilisation d'une quantité inappropriée d'échantillon ou une exécution incorrecte du test.

Contrôles externes : les réactifs de contrôles externes doivent être testés selon les exigences du laboratoire ou celles des réglementations locales et/ou nationales ou des organismes d'accréditation.

Les résultats attendus pour les contrôles sont décrits sous la rubrique INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

Les contrôles externes positifs et négatifs doivent être testés à chaque nouveau lot de coffret livré ou à chaque nouvelle livraison. Le nombre de tests supplémentaires à effectuer avec les contrôles externes est déterminé d'après les exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation. Les contrôles externes sont utilisés pour surveiller la réactivité des réactifs et la performance du test. Si les contrôles ne produisent pas les résultats attendus, cela peut signifier qu'un des réactifs ou des éléments n'est plus réactif au moment de son utilisation, que le test n'a pas été effectué correctement ou que les réactifs ou échantillons n'ont pas été ajoutés. **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.** Ne pas utiliser le coffret si les tests du contrôle ne produisent pas les résultats corrects.

VALEURS ATTENDUES

Le taux de positivité de chaque laboratoire dépendra de plusieurs facteurs y compris la méthode de prélèvement de l'échantillon, la manipulation et le transport de l'échantillon, la période de l'année ou la présence d'une infection à EHEC au moment du test. Un test négatif doit être attendu en l'absence d'une infection à EHEC.

LIMITES DU TEST

1. Le test est de nature qualitative et ne permet pas d'interprétation quantitative. Aucune interprétation basée sur l'intensité de la ligne positive ne doit être faite lors du rapport des résultats.
2. Les résultats des tests doivent être interprétés en fonction des informations disponibles de l'évaluation clinique du patient et d'autres démarches diagnostiques.
3. L'oubli de l'ajout de 150 µL de bouillon de culture à 5 gouttes de diluant pour échantillon/contrôle négatif (étape 7 dans PREPARATION DE L'ECHANTILLON/ENRICHISSEMENT – METHODE DU BOUILLON) peut produire un résultat faussement négatif. Il est donc judicieux de vérifier que le bouillon de culture ait été transféré. Aussi repérer sur le tube, en surajoutant à l'aide d'un marqueur, le niveau supérieur du volume de diluant pour échantillon/contrôle négatif. Une fois le bouillon de culture ajouté, cette ligne doit apparaître au milieu du volume de l'échantillon dilué. L'addition de plus de 5 gouttes de diluant pour échantillon/contrôle négatif peut aussi produire un résultat faussement négatif.
4. L'incubation trop longue des tests peut produire des faux positifs. L'incubation des tests à une température trop froide ou pendant un temps insuffisant peut produire des faux négatifs.
5. Les performances du test ImmunoCard STAT! EHEC n'ont pas été évaluées sur échantillon de selles en direct. Le test a été évalué sur cultures de plaque SMAC ou sur bouillon de culture GN ou MacConkey.
6. **Remarque: la Shiga toxine 1 (ST1) produite par *E. coli* est proche de la toxine produite par les souches de *Shigella dysenteriae* de type 1. Aussi, l'ImmunoCard STAT! EHEC peut produire une réaction positive en présence de toxines de souches de *S. dysenteriae* de type 1. Les deux organismes se différencient par culture sur milieu sélectif, couplée à des analyses biochimiques.**

CARACTERISTIQUES SPECIFIQUES DE LA PERFORMANCE
METHODE SUR PLAQUE SMAC

Les cartes de tests ont été évaluées aux États-Unis par la méthode sur SMAC sur 249 selles fraîches et 41 selles congelées, positives pour la shiga toxine.

Méthode Comparative (Premier EHEC)			
Méthode SMAC Agar	Positif	Négatif	Total
Positif	46	1*	47
Négatif	0	243	243
Total	46	244	290
			IC
Concordance Pos	46/46	100%	92,3% - 100%
Concordance Neg	243/244	99,6%	97,7% - 100%
Corrélation	289/290	99,7%	98,7% - 100%

* *E. coli* O157:H7 a été recouvré de la culture mais n'a pas été détecté par la méthode de référence.

METHODE DU BOUILLON

Des échantillons frais ou stockés congelés ont été utilisés dans cette étude. Les échantillons provenaient de patients des Etats-Unis, Canada et Argentine. Cinq laboratoires des Etats-Unis ont évalués 469 échantillons sur bouillons de culture MacConkey et GN. (120 des échantillons sont des selles solides obtenues de patients avec suspicion de gastroentérite.) On a observé une croissance pour 448/469 échantillons dans le bouillon GN et une croissance pour 449 dans le bouillon MacConkey. Trois des échantillons par la méthode du bouillon GN ont été exclus de l'étude comparative dû à un volume insuffisant. Sept de ces 469 échantillons ne montraient une croissance que dans le bouillon MacConkey et trois autres échantillons que dans le bouillon GN. Aucune croissance n'a été observée pour 14 échantillons dans aucun des deux bouillons. La collection d'échantillons testés comprend des échantillons de selles d'hommes ou de femmes de tous âges. Les échantillons ayant produit des résultats discordants entre les tests Premier EHEC et l'ImmunoCard STAT! EHEC ont été analysés par cytotoxicité. Ces échantillons montraient généralement des réactions faibles (DO < 0,300) avec le test Premier EHEC.

METHODE COMPARATIVE (Premier EHEC)			
Méthode du bouillon MacConkey			
ICS EHEC			
	Positif	Négatif	Total
	60	1*	61
	4*	384	388
	64	385	449
			IC
Concordance Pos.	60/64	93,8%	84,8% - 98,3%
Concordance Nég.	384/385	99,7%	98,6% - 100%
Corrélation	444/449	98,9%	97,4% - 99,6%

* Deux échantillons ICS EHEC -, Premier EHEC + ont été trouvés négatifs avec la méthode de référence de la cytotoxine.

METHODE COMPARATIVE (Premier EHEC)			
Méthode du bouillon GN			
ICS EHEC			
	Positif	Négatif	Total
	57	1	58
	7*	380	387
	64	381	445
			IC
Concordance Pos.	57/64	89,1%	78,8% - 95,5%
Concordance Nég.	380/381	99,7%	98,5% - 100%
Corrélation	437/445	98,2%	96,5% - 99,2%

* Quatre échantillons ICS EHEC -, Premier EHEC + ont été trouvés négatifs avec la méthode de référence de la cytotoxine.

Dans le tableau ci-dessous sont reportés les résultats comparatifs pour chaque bouillon de culture.

	MacConkey Positif	MacConkey Négatif	MacConkey sans croissance	Total
GN Positif	54	3	1	58
GN Négatif	3	382	5	390
GN sans croissance	4	3	14	21
Total	61	388	20	469

SENSIBILITE ANALYTIQUE

TEST SMAC-AGAR

Le test, avec la méthode SMAC-agar, est capable de détecter une unité formant colonie (UFC) de toxine ou 25 ng/mL et 62,5 ng/mL pour les toxines 1 et 2 non purifiées, respectivement.

TEST DU BOUILLON GN ou MAC

En utilisant des toxines purifiées, les limites inférieures de détection se situent à 1,25 ng/mL pour les toxines ST1 et ST2.

REPRODUCTIBILITE

TEST SM-AGAR

Trois laboratoires indépendants ont testé trois échantillons en triple, à des heures différentes durant une journée (variabilité intradosage) et durant trois autres jours (variabilité interdosage). Les échantillons comportaient trois négatifs, trois faiblement positifs et trois fortement positifs. La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC a donné une reproductibilité à 100%, y compris les bandes de contrôle.

TEST DU BOUILLON GN ou MAC

Trois laboratoires indépendants ont testé 12 échantillons (n=2 fortement positif, n=4 faiblement positif, n=4 faiblement négatif, n=2 fortement négatif) en double un jour (variabilité intradosage) et durant trois autres jours (variabilité interdosage). La carte de test ImmunoCard STAT! EHEC a donné une reproductibilité à 100 %, y compris les bandes de contrôle.

REACTIVITE DU DOSAGE

TEST SMAC-AGAR:

les 40 cultures mères de STEC (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) suivantes ont été cultivées sur plaques SMAC, suivie par l'extraction à la polymyxine. Tous les isolats ont produit des réactions positives sur la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC.

O157:H7 (32 souches), O96:H9 (1), O111:NM (1), O26:H11 (2), O103:H2 (1), O145:NM (1), O45:H2 (1), O45:NM (1).

TEST DU BOUILLON GN ou MAC: les 39 cultures mères de STEC suivantes ont été cultivées dans un bouillon GN ou MAC. Tous les isolats ont produit des réactions positives sur la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC.

O157:H7 (32 souches), O157:NM (1), O111:NM (2), O111:H21 (1), O121:H19 (1), O126:H27 (1), O45:H2 (1).

REACTION CROISEE

TEST SMAC-AGAR:

aucun des organismes suivants n'a réagi avec la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC. (Micro-organismes et nombre de souches testés): *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Klebsiella pneumoniae* (10), espèce *Enterobacter* (10), espèce *Proteus* (10), *E. coli* non producteur de la shiga toxine (10), espèce *Aeromonas* (3), *Serratia marcescens* (5), espèce *Shigella* (3).

TEST DU BOUILLON GN ou MAC: aucun des organismes suivants n'a produit de réaction croisée avec la carte de test ImmunoCard STAT! EHEC. *Aeromonas hydrophila* *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (2 souches non-toxigéniques), *Escherichia coli* O157:H7 (souche non-toxigénique), *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella Group B*, *Salmonella hiversum*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens* (2 souches), *Shigella boydii*, *Shigella flexeri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica* (2 souches), Adenovirus Type 14, Adenovirus Type 2, Adenovirus Type 41, *Feline calicivirus*, *Coxsackie A9*, *Coxsackie B1*, *Enterovirus Type 69*, *Herpes Simplex Virus II*, *Parainfluenza Type 3*, *Rotavirus*.

TESTS POUR LES SUBSTANCES INTERFERENTES (TESTS DU BOUILLON UNIQUEMENT)

Les substances suivantes, lorsque présentes dans les selles, n'interfèrent pas avec le test aux concentrations indiquées: sulfate de baryum (0,05 mg/mL), Prilosec OTC (5 µg/mL), Pepto-Bismol (1:2100), Tums (0,05 mg/mL), Tagamet (5 µg/mL), Mylanta (1:2100), leucocytes (0,05 % v/v), mucine (0,03 mg/mL), acide stéarique/palmitique (0,04 mg/mL), sang total (0,05 % v/v).

ESPAÑOL



Prueba rápida para Shiga toxina 1 y 2 en heces humanas

REF 751630

IVD

Rx Only

USO INDICADO

ImmunoCard STAT! EHEC es una prueba inmunocromatográfica rápida para la detección cualitativa de las Shiga Toxinas 1 y 2 (también llamadas Verotoxinas) producidas por la *E. coli* en cultivos de muestras clínicas de materia fecal. ImmunoCard STAT! EHEC se utiliza en conjunto con los síntomas clínicos del paciente y otras pruebas de laboratorio necesarias para el diagnóstico de enfermedades causadas por infecciones por *E. coli* enterohemorrágica, ECEH (EHEC por sus iniciales en inglés).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Entre las *E. coli* patógenas para los humanos, las cepas de *E. coli* productoras de Shiga Toxina se han vuelto de gran importancia en los últimos años.¹⁻¹¹ El grupo de las ECEH, con sus serotipos extremadamente patógenos O157:H7, O26, O103, O111, O145, y otras cepas son de particular preocupación. La producción de Shiga Toxinas es el criterio más común utilizado para la detección de este grupo de bacterias. Las Shiga Toxinas pueden clasificarse en dos categorías principales: Shiga Toxina 1 (ST1) y Shiga Toxina 2 (ST2). Las cepas de ECEH pueden producir sólo ST1 o sólo ST2 o ambas de manera simultánea. Las ECEH pueden iniciar enfermedades fatales, especialmente en niños pequeños, ancianos o pacientes con inmunodeficiencia. Los alimentos contaminados, crudos o mal cocidos de origen animal, como huevos, carne o productos lácteos, constituyen las principales fuentes de infección. Los reservorios para ECEH son ganado vacuno, oveja y cabra, y se propaga a través de su materia fecal. Estos microorganismos pueden penetrar en los alimentos durante el procesamiento de la carne y de los productos lácteos si las condiciones de higiene no son las adecuadas. La incidencia de la infección de los alimentos causada por las cepas de *E. coli* productoras de Shiga Toxina exige métodos de detección rápidos y confiables. Además de los métodos de cultivo tradicionales, las técnicas inmunológicas son cada vez de mayor utilidad debido al mejoramiento en su especificidad y sensibilidad. ImmunoCard STAT! EHEC es una prueba diagnóstica de inmunoensayo, basado en inmunocromatografía de flujo lateral.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

ImmunoCard STAT! EHEC es una prueba rápida inmunocromatográfica que utiliza anticuerpos monoclonales marcados con partículas de oro de color rojo. El dispositivo de la prueba cuenta con un puerto circular para la muestra y una ventana de forma oval para la prueba (Toxin 1, Toxin 2) y el control (Control).

- La muestra se aplica al papel cromatográfico a través del puerto circular para la muestra (Sample).
- La muestra se absorbe a través de la almohadilla hacia la zona de reacción que contiene anticuerpos marcados con oro coloidal específicos de las Shiga Toxinas.
- Todo antígeno de Shiga Toxina (ST1 y ST2) presente forma complejos con el anticuerpo marcado con oro y migra a través de la almohadilla hasta encontrar las zonas de reacción en el área de prueba (Toxin 1, Toxin 2).
- Las zonas de reacción (Toxin 1 y Toxin 2) contienen otro anticuerpo anti-ST1 o anti-ST2, que inmoviliza todo complejo anticuerpo-Shiga Toxina presente. Debido al marcador con oro, se forma una línea definida roja.
- El resto de la muestra continúa migrando a otra zona de reacción al reactivo dentro de la zona de control, y forma también una línea definida roja adicional (control positivo). Se encuentre o no presente una Shiga Toxina, una línea roja definida debe siempre formarse en la zona de control, lo que confirma que la prueba está funcionando correctamente.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máxima de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

- Dispositivos de prueba ImmunoCard STAT! EHEC, contienen anticuerpos monoclonales anti-ST1 y anti-ST2 inmovilizados. Los dispositivos están empaquetados en bolsas de aluminio individuales con desecante. Almacénense a una temperatura de 2-8 C cuando no se estén usando.
- Diluyente para muestra/Control negativo, un diluyente tamponado que contiene 0,094% de azida de sodio como conservante. El reactivo se proporciona en un frasco gotero de plástico. Viene listo para usar. Almacénese a una temperatura de 2-8 C cuando no se esté usando.
- Control Positivo, una solución de toxinas ST1 y ST2 tratadas con formalina en un diluyente tamponado que contiene 0,094% de azida de sodio como conservante. El reactivo se proporciona en un frasco gotero de plástico. Viene listo para usar. Almacénese a una temperatura de 2-8 C cuando no se esté usando.
- Pipetas desechables plásticas de transferencia, de 50 µL/175 µL.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

Todos los métodos:

- Incubadoras a un rango de temperatura de 35-39 C
- Agitador mecánico (vórtex)
- Cronómetro para intervalos de tiempo
- Autoclave
- Guantes de látex desechables

Método con agar SMAC:

- Placa con agar MacConkey-Sorbtol **sin** telurito ni cefixima
- Solución de Polimixina B
- Tubo de ensayo pequeño (Ej., 10 x 75 mm o 12 x 75 mm)
- Palillos aplicadores de madera
- Agua destilada o desionizada
- Pipetas desechables plásticas de transferencia, o micropipetas y puntas de pipeta desechables de 200 µL
- Asas desechables para inoculación

Método en caldo:

- Gram Negativo (GN) o caldo MacConkey (Caldo con indicador rojo puede oscurecer la lectura de la prueba.)
- Medio Cary-Blair modificado (opcional)

PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
- El Control Positivo contiene shiga-toxina ST1 y ST2 que ha sido tratado con formalina (inactivado).
- Algunos reactivos contienen el preservativo azida de sodio el cual puede irritar la piel. Evite contacto con los reactivos. Depositar los reactivos que contienen azida de sodio en las tuberías que contienen plomo o cobre puede resultar en la formación de óxidos de metales explosivos. Para eliminar la acumulación de óxidos durante el proceso de eliminación asegúrese de fluir grandes volúmenes de agua por el drenaje.

- No use el kit ni sus componentes pasado la fecha de expiración asignada.
- Los dispositivos de prueba están encajados en bolsas de papel aluminio la cual excluye humedad durante el almacenamiento. Inspeccione cada bolsa antes de abrirla. No use dispositivos de prueba que estén en bolsas que tienen rotos o que no estén completamente selladas. Se pueden obtener resultados falsos negativos si los componentes y reactivos del kit no están almacenados apropiadamente.
- No use el Diluyente de Muestra/Control negativo o el Control Positivo si están descolorado o turbios. Descoloración y turbidez son signos de contaminación microbial.
- Lea y siga cuidadosamente las instrucciones.
- Esta no es una prueba de material fecal directa. Las muestras de materia fecal deben sembrarse en placas de agar MacConkey sorbitol (SMAC por sus iniciales en inglés) o en caldo GN o MacConkey antes de la prueba. Si no se enriquecen las muestras antes de la prueba se producirán resultados erróneos.
- Muestras de caldo que contienen bajos niveles de toxina si se guardan congeladas la toxina se puede deteriorar a niveles no detectables antes de correr la prueba. Los mejores resultados serán obtenidos si la muestra de caldo se corre fresca. Múltiples ciclos de congelar y descongelar deben ser evitados.
- Deseche las muestras de material fecal como material biológico potencialmente nocivo. Inactive los cultivos mediante el uso de autoclave durante un período mínimo de 15 minutos a 121 C antes de desecharlos.
- Las pipetas supliditas con el kit deben estar marcadas a los mismos intervalos que el diagrama de la pipeta que se enseña en NOTAS DE PROCEDIMIENTO. Cuando se pide que use la pipeta suplidita con el kit, no use pipetas que tengan marcas diferentes a la del diagrama.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

ImmunoCard STAT! EHEC es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la caja, si se conserva a temperaturas de 2 a 8 C. El dispositivo de la prueba debe utilizarse dentro de los 15 minutos luego de retirado de la bolsa de aluminio sellada.

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

Los diagramas del Dispositivo de la prueba ImmunoCard STAT! EHEC y la pipeta de transferencia de 50 µL/175 µL proporcionada se muestran abajo.

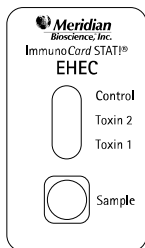
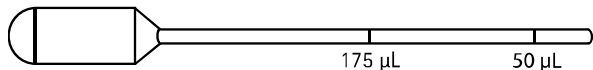


Diagrama de la pipeta que se necesita.



PROCEDIMIENTO – MÉTODO EN CALDO

RECOLECCION DE LA MUESTRA – MÉTODO EN CALDO

- Almacenamiento y manipulación de las muestras de materia fecal para el cultivo de organismos ECEH: La muestra de materia fecal apropiada debe congelarse (≤ -70 C) o bien guardarse a una temperatura de 2-8 C inmediatamente luego de su recolección. Las muestras refrigeradas deben cultivarse dentro de las 2 horas después de haberse recolectado. Si no puede llevarse a cabo el cultivo dentro de las 2 horas, el material debe guardarse en un medio de transporte tipo Cary-Blair modificado. Las muestras en este medio de transporte pueden almacenarse a una temperatura de 2-8 C si se cultivan dentro de los dos o tres días siguientes. Si el cultivo no puede realizarse en ese período, las muestras deben congelarse a una temperatura de ≤ -70 C inmediatamente después de recibirse. Las muestras en el medio de transporte Cary-Blair modificado no deben refrigerarse y luego congelarse.
- Almacenamiento de caldo que demuestra crecimiento previo a la prueba con ImmunoCard STAT! EHEC: Caldos con crecimiento pueden mantenerse durante un máximo de siete días a una temperatura de 2-8 C antes de la prueba con ImmunoCard STAT! EHEC. Si la prueba no se realiza dentro de dicho período, el caldo debe congelarse a ≤ -20 C, hasta un máximo de 21 días. (Vea la sección en PRECAUCIONES).
- Nota:** el uso de materia fecal en medio de transporte (excepto el Cary-Blair), hisopos, o conservantes, no ha sido validado para este método.

ENRIQUECIMIENTO/PREPARACIÓN DE LA MUESTRA – MÉTODO EN CALDO

- Utilice un palillo aplicador para mezclar la materia fecal cuidadosamente independientemente de su consistencia.
- Utilización de un pipeteador o pipeta de transferencia (no se incluye en el kit):
 - Muestra sin preservar: añada 50 µL de muestra sin preservar a un tubo de cultivo que contenga 8 mL de caldo GN o 5 mL de caldo MacConkey.
 - Muestra recolectada en el medio Cary Blair modificado: añada 175 µL de la muestra preservada a un tubo de cultivo que contenga 8 mL de caldo GN o 5 mL de caldo MacConkey.
 - Heces no-pipeteables: Usando un aplicador de madera transfiera una bolita de 3-4 mm de heces a 8 mL de caldo GN o a 5 mL de caldo MacConkey.
- Incuba los tubos con el caldo inoculado, con las tapas flojas, a una temperatura de 35-39 C durante 16 a 24 horas. Observe visualmente los tubos con caldo para detectar crecimiento.
- NO PROCEDA CON LA PRUEBA** si el tubo de caldo no demuestra crecimiento luego de la incubación, ya que resultados falsos negativos pueden ocurrir. Repita el paso de enriquecimiento de caldo con la misma muestra o con una nueva obtenida del paciente. Si el paso de enriquecimiento de caldo fue llevado a cabo con caldo GN, durante el segundo intento puede usar el caldo GN otra vez o puede tratar usar caldo MacConkey y vise versa. La muestra también puede ser reactivada usando el método de plato SMAC. En los siguientes pasos solamente use cultivos en caldo o plato de agar que exhiban crecimiento.
- Utilizando el vial de gotero añada 5 gotas (150 µL) de Diluyente de Muestra a un tubo de ensayo pequeño.
- Mezcle el caldo de cultivo cuidadosamente girando el tubo suavemente.
- Utilizando la pipeta de transferencia proporcionada con el kit, añada 175 µL de muestra (segunda marca desde la punta de la pipeta) al tubo que contiene el Diluyente de Muestra/Control negativo.
- Mezcle suavemente el contenido del tubo con la pipeta de transferencia apretando la bomba 3 veces. Como método alternativo, mezcle en un agitador mecánico (vórtex) durante 10 segundos. Coloque nuevamente la pipeta de transferencia en el tubo para su posterior utilización.
- El caldo de cultivo fecal diluido puede almacenado hasta 30 minutos a una temperatura de 20-25 C antes de correr de la prueba.

PROCEDIMIENTO – MÉTODO EN CALDO

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- Antes de la prueba, permita que todos los dispositivos de la prueba, reactivos y muestras alcancen temperatura ambiente; de 20-25 C.
- Use un dispositivo ImmunoCard STAT! EHEC para cada muestra de cada paciente.
- Retire el dispositivo de prueba ImmunoCard STAT! EHEC de la bolsa de aluminio. Rotule el dispositivo con la identificación del paciente.
- Utilizando la pipeta de transferencia proporcionada con el kit, lentamente añada 175 µL de la muestra diluida (segunda marca desde la punta de la pipeta) al puerto para la muestra del dispositivo.
- Incuba a una temperatura de 20-25 C durante 20 minutos.
- Lea los resultados dentro del minuto siguiente después de finalizada la incubación.

PROCEDIMIENTO – MÉTODO EN PLACA CON AGAR SMAC

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA – MÉTODO EN PLACA CON SMAC

Recolecte las muestras de materia fecal sin conservante. Las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente controlada hasta 4 horas previas a la preparación de los cultivos. Las muestras de materia fecal que no puedan cultivarse dentro de las 4 horas siguientes deberán guardarse a una temperatura de 2-8 C y cultivarse dentro de las siguientes 24 horas. Si no pueden cultivarse dentro de un plazo de 24 horas deberán congelarse a ≤ -70 C lo antes posible después de haberlas recibido.

ENRIQUECIMIENTO/PREPARACIÓN DE LA MUESTRA – MÉTODO EN PLACA CON SMAC

- Utilice un palillo aplicador para mezclar la materia fecal cuidadosamente cualquiera que sea la consistencia de esta.
- Utilice un hisopo de Dacrón para inocular las muestras de materia fecal, en las placas con agar SMAC **sin** telurito ni cefixima. (NOTA: Telurito y cefixima inhiben el crecimiento de cepas de *E. coli* no-O157:H7.)
- Incuba la placa inoculada durante 18 a 24 horas a una temperatura de 35-39 C.
- NO PROCEDA CON LA PRUEBA** si el tubo de caldo no demuestra crecimiento luego de la incubación, ya que resultados falsos negativos pueden ocurrir. Repita el paso de enriquecimiento de caldo con la misma muestra o con una nueva obtenida del paciente. Alternativamente puede reactivar la muestra usando el método de enriquecimiento de caldo. En los siguientes pasos solamente use cultivos en caldo o plato de agar que exhiban crecimiento.
- Prepare una solución de 50 µg/mL de Polimixina B en agua destilada.
- Dispense 0,5 mL de la solución de 50 µg/mL de Polimixina B en un tubo de prueba.
- Usando un hisopo de Dacrón, barra varias veces por la superficie del plato donde haya crecimiento bacteriano, evitando colonias mucoides. Colonias mucoides pueden interferir con el flujo de la muestra.
- Moje el hisopo que contiene las colonias del plato en la solución de agua destilada/Polimixina y rote el hisopo por lo menos 3 veces para ayudar a soltar la Shiga-toxina de los organismos.
- Incuba la mezcla durante 30 minutos a una temperatura de 35 C.

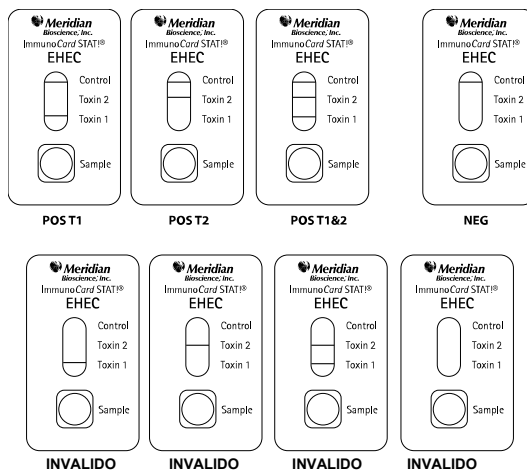
PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA – MÉTODO EN PLACA CON SMAC

- Antes de la prueba, permita que todos los dispositivos de la prueba, reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente; de 20-25 C.
- Use un dispositivo ImmunoCard STAT! EHEC para cada muestra y control de cada paciente.
- Retire el dispositivo ImmunoCard STAT! EHEC de la bolsa de aluminio en que viene y deseche la bolsa.
- Coloque el dispositivo de la prueba sobre una superficie plana y rotúelo con el nombre del paciente o control a analizarse.
- Mezcle la muestra inoculada en agua y Polimixina B preparada en el paso 6 descrito arriba (PREPARACIÓN DE LA MUESTRA) girando el tubo suavemente.
- Utilizando un pipeteador o pipeta de transferencia (**NO** se incluye en el kit), añada 200 µL en el puerto circular para la muestra del dispositivo de prueba.
- Incuba a una temperatura de 20-25 C durante 10 minutos.
- Lea los resultados dentro del minuto siguiente después de finalizada la incubación.

PRUEBAS DE CONTROL EXTERNO – AGAR SMAC O MÉTODO EN CALDO

- Antes de la prueba, permita que todos los dispositivos de la prueba y reactivos alcancen la temperatura ambiente; de 20-25 C.
- Use un dispositivo ImmunoCard STAT! EHEC para el control positivo y otro para el Diluyente de Muestra/Control negativo.
- Retire el dispositivo ImmunoCard STAT! EHEC de la bolsa de aluminio en que vino. Rotúelo con el control a analizarse.
- Añada exactamente 5 gotas del reactivo de Control Positivo al puerto para la muestra del dispositivo marcado para el Control Positivo.
- Añada exactamente 6 gotas del Diluyente de Muestra/Control negativo al puerto para la muestra del dispositivo marcado para el control negativo.
- Incuba la prueba a una temperatura de 20-25 C durante 20 minutos.
- Lea los resultados dentro del minuto siguiente después de finalizada la incubación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



Prueba negativa: Una banda de color ROSADO A ROJO en la posición de la línea de control. No se presentan otras bandas.

Prueba positiva para Shiga Toxina 1: Bandas de color ROSADO A ROJO en las posiciones de la línea de control y de Toxina 1. No se presentan bandas en la línea de Toxina 2. La aparición de una línea en la posición junto a Toxina 1, incluso si es débil, indica la presencia de Shiga Toxina 1. La intensidad de la línea de prueba puede ser menor que la de la línea de control.

Prueba positiva para Shiga Toxina 2: Bandas de color ROSADO A ROJO en las posiciones de las líneas de control y de Toxina 2. No se presentan bandas en la línea de prueba de Toxina 1. La aparición de una línea en la posición junto a Toxina 2, incluso si es débil, indica la presencia de Shiga Toxina 2. La intensidad de la línea de prueba puede ser menor que la de la línea de control.

Prueba positiva para Shiga Toxinas 1 y 2: Bandas de color ROSADO A ROJO en las posiciones de Control, Toxina 1 y Toxina 2. La aparición de líneas en las posiciones de Toxina 1 y Toxina 2, incluso si son débiles, indican la presencia de ambas Shiga Toxinas. La intensidad de las líneas de la prueba puede ser menor que la de las líneas de control.

Resultados inválidos:

- Ninguna banda aparece en la posición designada para la línea de control. La prueba se considera inválida ya que la ausencia de la banda de control indica que el procedimiento de la prueba se realizó de manera inadecuada o bien que los reactivos se encuentran deteriorados.
 - Después del límite de incubación definido, en la posición de la línea de Toxina 1 o Toxina 2 del dispositivo aparece una banda de color ROSADO A ROJO o bien una banda de otro color distinto. Se pueden producir resultados falsamente positivos si las pruebas se incuban demasiado tiempo. Las bandas con colores distintos de ROSADO A ROJO pueden indicar un deterioro de los reactivos.
- Cuando un resultado resulta difícil de interpretarse, la prueba debe repetirse con la misma muestra a fin de eliminar posibles errores. Si la muestra original produce resultados ilegibles de manera repetida, obtenga una nueva muestra y repita la prueba.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales. En el momento de cada uso, los componentes del kit deben examinarse visualmente para detectar signos obvios de contaminación microbiana, congelamiento o fuga. No use reactivos contaminados o dudosos.

Controles internos: los controles internos se encuentran en la tira reactiva y por lo tanto se evalúan con cada prueba.

- La banda ROSA-ROJA que aparece en la línea de Control sirve como control de procedimiento e indica que la prueba fue ejecutada correctamente, que fluyó apropiadamente y que los reactivos de la prueba estaban activos al momento de usarse.
- Un trasfondo limpio alrededor de la línea de Control y Test también sirve como control de procedimiento. Líneas de Control o Test que estén oscurecidas por un trasfondo con color pueden invalidar la prueba y puede ser una indicación de que los reactivos se han deteriorado, el uso de una muestra inapropiada o la ejecución incorrecta de la prueba.

Controles externos: los reactivos de control externo deben evaluarse de acuerdo con los requisitos del laboratorio, reglamentaciones locales o estatales o de las correspondientes agencias acreditadas. Los resultados esperados con los controles se describen en INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Controles externos Positivo y Negativo deben ser probados con cada lote nuevo o con cada embarque. El número de pruebas adicionales que se deben analizar con los controles externos debe ser determinado por los requisitos de las agencias locales, estatales o federales. Los controles externos se utilizan para monitorear la reactividad de los reactivos y el funcionamiento de la prueba. Si no se obtienen los resultados esperados con los controles, esto puede deberse a que uno de los reactivos o componentes ya no es reactivo en el momento de su uso, a que la prueba no se realizó correctamente o a que no se añadieron los reactivos o las muestras. Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-4858 (USA) o su distribuidor local. El kit no debe usarse si las pruebas de control no producen los resultados correctos.

VALORES ESPERADOS

La tasa de positividad de cada laboratorio dependerá de diversos factores; entre ellos, el método de recolección de la muestra, el manejo y transporte de la misma, el momento del año o la presencia de infección por ECEH al momento de la prueba. Debe esperarse una prueba negativa en caso de ausencia de infección por ECEH.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- La prueba es cualitativa y no debe hacerse ninguna interpretación cuantitativa con respecto a la intensidad de la línea positiva cuando se informan los resultados.
- Los resultados de la prueba deben utilizarse en conjunto con la información disponible a partir de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- Si no añadió los 150 µL de caldo de cultivo a las 5 gotas de Diluyente de Muestra/Control negativo (paso 7 de PREPARACION DE MUESTRA/ENRIQUECIMIENTO – CULTIVO DE CALDO) puede obtener resultados falsos negativos. Como ayuda visual puede verificar si el caldo de cultivo fue añadido marcando por fuera del tubo con un marcador el tope del volumen de Diluyente de Muestra/Control negativo. Una vez añada el caldo de cultivo la línea debe aparecer en el medio del volumen total. La adición de más de 5 gotas de Diluyente de Muestra/Control negativo también puede causar resultados falsos negativos.
- La incubación excesiva de las pruebas puede dar lugar a resultados positivos falsos. La incubación de las pruebas a temperaturas o tiempos reducidos puede causar resultados negativos falsos.
- La ejecución de ImmunoCard STAT! EHEC NO HA SIDO EVALUADA con muestras directas de heces. Solamente ha sido evaluado con muestras en platos de cultivo SMAC o caldo GN y MacConkey.
- NOTA: Shiga toxina 1 producida por *E. coli* y la toxina producida por la cepa *Shigella dysenteriae* tipo 1 son casi idénticas. De manera que, ImmunoCard STAT! EHEC puede dar resultados positivos con toxinas de *S. Dysenteriae* tipo 1. Los dos organismos pueden ser diferenciados usando platos de cultivo para crecimiento selectivo en combinación con análisis bioquímicos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

MÉTODO EN PLACA SM

La prueba fue evaluada en los Estados Unidos usando el método de SMAC y 249 muestras frescas y 41 muestras Shiga-toxina positivas congeladas.

METODO COMPARATIVO (Premier EHEC)			
Método SMAC Agar	Positivo	Negativo	Total
Positivo	46	1*	47
Negativo	0	243	243
Total	46	244	290
			CI
Concordancia Positivo	46/46	100%	92.3% - 100%
Concordancia Negativo	243/244	99.6%	97.7% - 100%
Concordancia General	289/290	99.7%	98.7% - 100%

* *E. coli* O157:H7 fue recuperado del cultivo pero no fue detectado por el método de referencia.

MÉTODO EN CALDO

Este estudio fue llevado a cabo usando muestras frescas y muestras luego de ser congeladas. Las muestras fueron obtenidas de pacientes en los Estados Unidos, Canadá y Argentina. Cinco laboratorios en los EU evaluaron 469 muestras usando caldo MacConkey y GN. (120 de las muestras eran heces sólidas obtenidas de pacientes asumiendo tener gastroenteritis.) 448/469 muestras produjeron crecimiento en caldo GN, mientras que 449 produjeron crecimiento en caldo MacConkey. Tres de las muestra de caldo GN fueron excluidas de la evaluación con el método comparativo dado que no había suficiente volumen. Siete de las 469 muestras crecieron en caldo MacConkey solamente, mientras otras tres muestras crecieron en caldo GN solamente. Catorce muestras no tuvieron crecimiento en ninguno de los dos caldos. Muestras fueron recogidas de pacientes masculinos y femeninos de todas las edades. Muestras discrepantes entre Premier EHEC e ICS EHEC fueron analizadas por el método de citotoxina. Estas muestras generalmente produjeron reacciones débiles (< 0,300) en Premier EHEC.

METODO COMPARATIVO (Premier EHEC)			
Método Caldo MacConkey			
ICS EHEC	Positivo	Negativo	Total
Positivo	60	1	61
Negativo	4*	384	388
Total	64	385	449
			CI
Concordancia Positivo	60/64	93.8%	84.8% - 98.3%
Concordancia Negativo	384/385	99.7%	98.6% - 100%
Concordancia General	444/449	98.9%	97.4% - 99.6%

* Dos muestras ICS EHEC -, Premier EHEC + dieron negativo por el método de referencia de citotoxina.

METODO COMPARATIVO (Premier EHEC)			
Método Caldo GN			
ICS EHEC	Positivo	Negativo	Total
Positivo	57	1	58
Negativo	7*	380	387
Total	64	381	445
			CI
Concordancia Positivo	57/64	89.1%	78.8% - 95.5%
Concordancia Negativo	380/381	99.7%	98.5% - 100%
Concordancia General	437/445	98.2%	96.5% - 99.2%

* Cuatro muestras ICS EHEC -, Premier EHEC + dieron negativo por el método de referencia de citotoxina.

Los resultados de cada método de caldo son comparados a cada otro en la tabla siguiente.

	Mac Positivo	Mac Negativo	Mac No Crecimiento	Total
GN Positivo	54	3	1	58
GN Negativo	3	382	5	390
GN No Crecimiento	4	3	14	21
Total	61	388	20	469

SENSIBILIDAD ANALÍTICA

PRUEBA EN AGAR SMAC

El método en agar SMAC detecta toxinas en una unidad formadora de colonias ó 25 ng/mL y 62.5 ng/mL para Shiga Toxinas 1 y 2 no purificadas, respectivamente.

PRUEBA EN CALDO GN o MAC

Los límites más bajos de detección son 1,25 ng/mL tanto para ST1 y ST2 utilizando toxinas purificadas.

REPRODUCIBILIDAD

PRUEBA EN AGAR SM

Tres laboratorios independientes analizaron tres muestras por triplicado, en distintos tiempos en un día (variabilidad dentro de la misma prueba) y en tres días diferentes (variabilidad entre prueba y prueba). Las muestras eran tres negativas, tres de positividad baja y tres de positividad intensa. La prueba ImmunoCard STAT! EHEC produjo una reproducibilidad de 100% incluyendo las líneas de control.

PRUEBA EN CALDO GN o MAC

Tres laboratorios independientes analizaron 12 muestras (n=2 positividad intensa, n=4 positividad débil, n=4 negatividad débil, n=2 fuerte negatividad) por duplicado en un solo día (variabilidad dentro de la misma prueba) y en tres días diferentes (variabilidad entre prueba y prueba). La prueba ImmunoCard STAT! EHEC produjo una reproducibilidad del 100% incluyendo las líneas de control.

REACTIVIDAD DE ENSAYO

PRUEBA EN AGAR SMAC:

Las siguientes 40 cepas de referencia de *Escherichia coli* productora de Shiga Toxina (STEC, por sus iniciales en inglés) se cultivaron en placas con SMAC. A continuación se realizó la extracción con polimixina B. Todas las cepas aisladas produjeron reacciones positivas con ImmunoCard STAT! EHEC.

O157:H7 (32 cepas), O96:H9 (1), O111: NM (1), O26:H11 (2), O103:H2 (1), O145: NM (1), O45:H2 (1), O45: NM (1).

PRUEBA EN CALDO GN o MAC: Las siguientes 39 cepas de referencia de STEC se cultivaron en caldo GN o MacConkey. Todas las cepas aisladas produjeron reacciones positivas con ImmunoCard STAT! EHEC.

O157:H7 (32 cepas), O157: NM (1), O111: NM (2), O111:H21 (1), O121:H19 (1), O126:H27 (1), O45:H2 (1).

REACTIVIDAD CRUZADA

PRUEBA EN AGAR SMAC: Ninguno de los siguientes organismos reaccionó en la prueba ImmunoCard STAT! EHEC. (Microorganismos y número de cepas analizadas): *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Klebsiella pneumoniae* (10), especies de *Enterobacter* (10), especies de *Proteus* (10), *E. coli* no productora de ST (10), especies de *Aeromonas* (3), *Serratia marcescens* (5), especies de *Shigella* (3).

PRUEBA EN CALDO GN o MAC: Ninguno de los siguientes organismos reaccionó en forma cruzada en la prueba ImmunoCard STAT! EHEC: *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Cándida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (2 cepas no toxinógenas), *Escherichia coli* O157:H7 (cepa no toxinógena), *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Grupo B, *Salmonella hiversum*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens* (2 cepas), *Shigella boydii*, *Shigella flexeri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica* (2 cepas), Adenovirus Tipo 14, Adenovirus Tipo 2, Adenovirus Tipo 41, calicivirus felino, Coxsackie A9, Coxsackie B1, Enterovirus Tipo 69, virus Herpes simplex tipo 2, Parainfluenza tipo 3, Rotavirus.

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES (PRUEBAS EN CALDO ÚNICAMENTE)

Las siguientes sustancias, cuando se introduce directamente en muestras de heces, no interfieren en la prueba en las concentraciones identificadas: Sulfato de bario (0,05 mg/mL), PriLOSEC de venta libre (5 µg/mL), Pepto-Bismol (1:200), Tums (0,05 mg/mL), Tagamet (5 µg/mL), Mylanta (1:2100), leucocitos (0,05% v/v), mucina (0,03 mg/mL), ácido esteárico o palmítico (0,04 mg/mL, sangre total (0,05% v/v).

DEUTSCH



Schnelltest zum Nachweis von Shiga Toxinen 1 und 2 in humanen Stuhlproben

REF 751630

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der ImmunoCard STAT! EHEC ist ein immunochromatographischer Test zum schnellen qualitativen Nachweis von Shiga Toxinen 1 und 2 (auch Verotoxine genannt), gebildet durch *E. coli*, in Kulturen aus klinischen Stuhlproben. Der ImmunoCard STAT! EHEC wird zusammen mit den klinischen Symptomen des Patienten und anderen Labortests betrachtet und soll die Diagnose von Krankheiten durch enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) Infektionen unterstützen.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Unter den humanen *E. coli* Pathogenen haben die Shiga Toxin produzierenden Stämme von *E. coli* in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.¹⁻¹¹ Besonders Besorgnis erregend sind die Gruppe der EHEC mit ihren hoch pathogenen Serovaren O157:H7, O26, O103, O111, O145, sowie andere Stämme. Die Produktion von Shiga Toxinen ist das am weitesten verbreitete Kriterium für den Nachweis von Bakterien dieser Gruppe. Die Shiga Toxine lassen sich in zwei Hauptkategorien aufteilen: Shiga Toxin 1 (ST1) und ShigaToxin 2 (ST2). EHEC Stämme können entweder nur ST1 bzw. ST2 oder ST1 und ST2 gleichzeitig produzieren. EHEC können lebensbedrohliche Krankheiten verursachen, besonders bei kleinen Kindern, der älteren Bevölkerung oder bei immungeschwächten Patienten. Die Hauptinfektionsquellen sind kontaminierte, rohe oder unzureichend erhitzte Nahrungsmittel tierischen Ursprungs wie z.B. Fleisch- und Milchprodukte. Das Haupterregereservoir für EHEC-Bakterien sind Rinder, Schafe und Ziegen. Die Kontaminationsquelle ist der Kot dieser Tiere. Der Erreger wird mit dem Kot dieser Tiere ausgeschieden. Bei mangelnder Hygiene können diese Mikroorganismen bei der Verarbeitung von Fleisch- und Milchprodukten in die Nahrungsmittel gelangen. Ein Auftreten von Nahrungsmittelinfektionen, die durch Shiga Toxin produzierende *E. coli* verursacht wurden erfordert zuverlässige und schnelle Nachweismethoden. Zusätzlich zu herkömmlichen Kulturmethoden werden immunologische Techniken aufgrund ihrer verbesserten Spezifität und Sensitivität immer hilfreicher. Der ImmunoCard STAT! EHEC Test ist ein immunologischer diagnostischer Test, der auf dem immunochromatographischen Lateral-Flow-Prinzip beruht.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der ImmunoCard STAT! EHEC ist ein immunochromatographischer Schnelltest, der monoklonale Antikörper verwendet, die mit rotgefärbten Goldpartikeln markiert sind. Die Testvorrichtung weist eine runde Probenöffnung sowie ein ovales Test- (Toxin 1, Toxin 2) und Kontrollfenster (Control) auf.

- Die Probe wird über die runde Probenöffnung (Sample) auf das Chromatographiepapier aufgetragen.
- Die Probe wird von der Testmembran absorbiert und gelangt an die Reaktionsstelle, die kolloid-goldmarkierte für Shiga Toxine spezifische Antikörper enthält.
- Jedes vorhandene Shiga Toxin-Antigen (ST1 und ST2) bildet mit dem goldmarkierten Antikörper einen Komplex und fließt durch die Testmembran, bis es an die Bindungsstellen im Testbereich (Toxin 1, Toxin 2) gelangt.

- Die Bindungsstellen (Toxin 1 und Toxin 2) enthalten einen weiteren Anti-ST1- oder -ST2-Antikörper, der sämtliche vorhandene Shiga Toxin-Antikörper-Komplexe immobilisiert. Aufgrund der Markierung mit Gold bildet sich eine deutliche rote Linie.
- Die übrige Probe fließt weiter an eine andere Bindungsstelle innerhalb des Kontrollbereichs und bildet eine weitere deutliche rote Linie (positive Kontrolle). Ungeachtet des Vorhandenseins von Shiga Toxinen muss sich im Kontrollbereich immer eine deutliche rote Linie bilden, um das korrekte Funktionieren des Tests zu bestätigen.

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

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

- ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtungen enthalten immobilisierte monoklonale Anti-ST1- und Anti-ST2-Antikörper. Die Vorrichtungen sind einzeln in Folie verpackt, die Trockenmittel enthalten. Bei 2-8 C lagern wenn nicht benutzt.
- Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle, ein gepuffertes Verdünnungsmittel, das 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Das Reagenz wird in einem Tropferfläschchen aus Kunststoff geliefert. Das Reagenz ist gebrauchsfertig. Bei 2-8 C lagern wenn nicht benutzt.
- Positive Kontrolle, eine Lösung aus formalinbehandelten ST1- und ST2-Toxinen in einem gepufferten Verdünnungsmittel, das 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Das Reagenz wird in einem Tropferfläschchen aus Kunststoff geliefert. Das Reagenz ist gebrauchsfertig. Bei 2-8 C lagern wenn nicht benutzt.
- Transferpipetten aus Kunststoff für den Einmalgebrauch mit Messungsabschnitten von 50 µL und 175 µL.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

Alle Methoden:

- Brutschränke, 35-39 C
- Vortex-Mixer
- Zeitgeber
- Autoklav
- Einweg-Gummihandschuhe

SMAC Agarmethode:

- Sorbitol-MacConkey Agarplatte **ohne** Tellurit oder Cefixim
- Polymyxin B Lösung
- Kleines Reagenzröhrchen (z.B., 10 x 75 mm oder 12 x 75 mm)
- Applikatorstäbchen aus Holz
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Einweg-Transferpipetten aus Kunststoff oder Mikropipetten und Einwegspitzen mit einem Fassungsvermögen von 200 µL
- Einweg-Impfösen

Bouillonmethode:

- Gram-negative (GN) oder MacConkey Bouillon (Anreicherungsbouillon mit Neutralrot-Indikator kann die Lesbarkeit des Tests verdunkeln und deshalb schwer interpretierbar machen.)
- Modifiziertes Cary-Blair Medium (optional)

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Die positive Kontrolle enthält formalinbehandelte inaktivierte ST1 und ST2 Toxine. Diese Kontrolle sollte als potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.
- Manche Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel, das die Haut reizt. Vermeiden Sie den Kontakt mit anderen Reagenzien. Während der Entsorgung von Komponenten, die Natriumazid enthalten, kann sich in Blei oder Kupfer-Laborabflussröhrchen ein potenziell explosives Metalloxid bilden. Daher müssen die Röhrchen reichlich mit Wasser nachgespült werden, um das Metalloxid herauszulösen.
- Kit oder Komponenten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Die Testvorrichtungen sind in Folie verpackt, die während der Lagerung Feuchtigkeit abweist. Vor dem Öffnen die Folie untersuchen. Die Testvorrichtung nicht verwenden, wenn die Folie Löcher aufweist oder nicht vollständig verschlossen ist. Die unsachgemäße Lagerung der Testkomponenten und Reagenzien kann zu falsch negativen Reaktionen führen.
- Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle oder positive Kontrolle nicht verwenden, wenn diese Verfärbungen oder Trübungen aufweisen. Verfärbungen und Trübungen können auf eine mikrobielle Kontamination hinweisen.
- Alle Hinweise lesen und genau befolgen.
- Die ist kein direkter Stuhltest. Stuhlproben müssen vor dem Testen auf SMAC Agarplatten oder in GN oder MacConkey Bouillon kultiviert werden. Werden die Proben vor dem Testen nicht angereichert, treten fehlerhafte Ergebnisse auf.
- Niedrige Werte von Toxinen, die sich für dem Testen in gefrorener angelegter Proben-Bouillon befinden, können verfallen und nicht mehr nachweisbar sein. Bessere Ergebnisse werden mit frischer angelegter Bouillon erhalten. Mehrere Gefrier- und Auftauzyklen sollten vermieden werden.
- Stuhlproben müssen als potenziell infektiöses Material entsorgt werden. Vor dem Entsorgen die Kulturen im Autoklaven mindestens 15 Minuten lang bei 121 C inaktivieren.
- Die im Kit enthaltenen Pipetten sind auf dem Pipettendiagramm im Abschnitt VERFAHRENSHINWEISE in gezeigten Abständen markiert. Wenn gemäß der Anleitung eine mit dem Kit mitgelieferte Pipette verwendet werden soll, keine Transferpipetten mit anderen als im Diagramm abgebildeten Markierungen verwenden.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Der ImmunoCard STAT! EHEC Test ist bis zu dem auf der Außenverpackung aufgedruckten Verfallsdatum stabil, wenn er bei 2 bis 8 C gelagert wird. Die Testvorrichtung muss innerhalb von 15 Minuten nach der Entnahme aus der Folie verwendet werden.

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG

Nachstehend folgen Abbildungen der ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung und der im Lieferumfang enthaltenen Transferpipette.

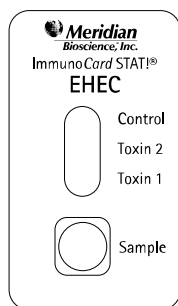
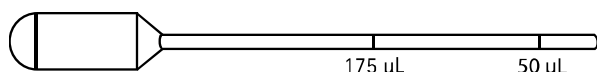


Abbildung der erforderlichen Pipette.



VERFAHREN – BOUILLONMETHODE

PROBENNÄHME – BOUILLONMETHODE

- Lagerung und Handhabung von Stuhlproben für die Kultur der EHEC Organismen: Geeignete Stuhlproben müssen unmittelbar nach der Probennahme eingefroren (≤ -70 C) oder gekühlt 2-8 C werden. Gekühlte Proben müssen innerhalb von 2 Stunden kultiviert werden. Falls die Kultivierung nicht innerhalb von 2 Stunden erfolgen kann, sollte die Probe in ein modifiziertes Cary-Blair Transportmedium gegeben werden. Proben in einem modifizierten Cary-Blair Transportmedium können bei 2-8 C gelagert werden, müssen jedoch innerhalb von 2 bis 3 Tagen kultiviert werden. Kann die Kultivierung innerhalb dieser Zeit nicht erfolgen, müssen die Proben unmittelbar nach der Probennahme bei ≤ -70 C eingefroren werden. Proben in modifiziertem Cary-Blair Transportmedium dürfen nicht zuerst gekühlt und dann eingefroren werden.
- Lagerung der Bouillonkultur mit Wachstum vor dem Testen mit dem ImmunoCard STAT! EHEC kit: Nach Anreicherung können die Bouillons bis zu sieben Tagen vor dem Testen mit dem ImmunoCard STAT! EHEC kit bei 2-8 C aufbewahrt werden. Falls der Test nicht innerhalb dieser Zeit erfolgen kann, kann die Bouillonkultur bis zu 21 Tage bei ≤ -20 C eingefroren werden. (siehe VORSICHTSHINWEISE)
- Hinweis:** Stuhl in Transportmedien (mit Ausnahme von Cary-Blair), Tupfer oder Konservierungsmitteln wurden nicht zur Verwendung mit dieser Methode bestätigt.

PROBENVORBEREITUNG / ANREICHERUNG - BOUILLONMETHODE

- Stuhl ungeachtet der Konsistenz mit einem Applikatorstäbchen gründlich mischen.
- Mit einem Pipettor oder einer Transferpipette (im Kit enthalten):
 - Nicht konservierte Probe: 50 µL der nicht konservierten Probe zu einem Kulturröhrchen hinzufügen (Erste Markierung von der Pipettenspitze aus), das 8 mL GN Bouillon oder 5 mL MacConkey Bouillon enthält.
 - Eine des modifizierten Cary Blair Mediums entnommene Probe: 175 µL der konservierten Probe (Zweite Markierung von der Pipettenspitze aus) zu einem Kulturröhrchen hinzufügen, das 8 mL GN Bouillon oder 5 mL MacConkey Bouillon enthält.
 - Nicht abnehmbare Probe: Ein Holzstäbchen benutzen, um einen kleinen runden Teil (3-4 mm) des Stuhlspeklets zu einem Kulturröhrchen hinzuzufügen, das 8 mL GN Bouillon oder 5 mL MacConkey Bouillon enthält.
- Die beimpfte Bouillon mit losen Deckeln bei 35-39 C 16-24 Stunden lang inkubieren. (Die Bouillonröhrchen visuell auf Wachstum überprüfen).
- Bitte den Test nicht durchführen, wenn kein Wachstum im Kulturröhrchen nach der Inkubationszeit vorliegt. Es kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Bouillon-Anreicherung mit der gleichen Probe oder einer neuen Probe des Patienten wiederholen. Wenn GN Bouillon zuerst zur Anreicherung benutzt wurde, kann beim zweiten Versuch eine andere GN Bouillon gebraucht werden. Ersatzweise kann auch eine MacConkey Bouillon verwendet werden und umgekehrt. Die Probe kann auch auf eine SMAC-Platte beimpft werden. Bitte benutzen Sie in den folgenden Testschritten die Bouillons oder Agar Kulturen, die Wachstum aufzeigen.
- Mit dem Tropferfläschchen zu einem kleinen Reagenzröhrchen fünf Tropfen (150 µL) des Probenverdünnungspuffers hinzufügen.
- Die Bouillonkultur durch vorsichtiges Schütteln des Röhrchens gründlich mischen.
- Mit der im Kit enthaltenen Transferpipette 175 µL der Probe (zweite Markierung der Pipette von der Spitze aus gesehen) zu dem Röhrchen mit dem Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle hinzufügen.
- Den Röhrcheninhalt sorgfältig mit der Transferpipette mischen, indem die Pipette 3 Mal zusammengedrückt wird. Alternativ kann auch mit einem Vortex-Mixer 10 Sekunden lang gemischt werden. Die Transferpipette für eine spätere Verwendung ins Röhrchen zurück stellen.
- Die verdünnte Stuhlproben-Bouillonkultur kann vor dem Testen bei 20-25 C bis zu 30 Minuten gelagert werden.

VERFAHREN – BOUILLONMETHODE

TESTVERFAHREN

- Vor dem Testen alle Testvorrichtungen, Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (20-25 C) bringen.
- Für jede Patientenprobe eine ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung verwenden.
- Die ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung aus der Folie nehmen. Die Vorrichtung mit der Patienten-ID kennzeichnen.
- Mit der im Kit enthaltenen Transferpipette 175 µL der verdünnten Probe (zweite Markierung von der Pipettenspitze aus gesehen) langsam in die Probenöffnung auf der Vorrichtung geben.
- Test bei 20-25 C 20 Minuten lang inkubieren.
- Die Ergebnisse innerhalb von 1 Minute nach beendeter Inkubation ablesen.

VERFAHREN – SMAC – AGARPLATTENMETHODE

PROBENNÄHME – SMAC PLATTENMETHODE

Stuhlproben ohne Konservierungsmittel entnehmen. Proben können bei kontrollierter Raumtemperatur bis zu 4 Stunden vor der Kulturvorbereitung aufbewahrt werden. Stuhlproben, die nicht innerhalb von 4 Stunden kultiviert werden können, müssen bei 2-8 C gelagert und innerhalb von 24 Stunden kultiviert werden. Wenn die Proben nicht innerhalb von 24 Stunden kultiviert werden können, müssen sie so bald wie möglich nach der Probennahme bei ≤ -70 C eingefroren werden.

PROBENVORBEREITUNG / ANREICHERUNG – SMAC PLATTENMETHODE

- Stuhl ungeachtet der Konsistenz mit einem Applikatorstäbchen gründlich mischen.
- Mit einem Dacron-Tupfer die Stuhlproben auf die SMAC Agarplatten **ohne** Tellurit oder Cefixim geben. (Hinweis: Tellurit und Cefixim verhindern das Wachstum von nicht O157:H7 E. Coli Stämmen).
- Die beimpfte Platte 18-24 Stunden lang bei 35-39 C inkubieren.
- Bitte den Test nicht durchführen, wenn die Agarplatte kein Wachstum nach der Inkubationszeit zeigt. Es kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Agar-Beimpfung mit der gleichen Probe oder einer neuen Probe des Patienten wiederholen. Alternativ kann die Probe mit Anreicherungsbouillon getestet werden. Bitte benutzen Sie in den folgenden Testschritten die Agar oder Bouillonkulturen die Wachstum aufzeigen.
- Eine Lösung mit 50 µg/mL Polymyxin B in destilliertem Wasser vorbereiten.
- 0,5 mL von der 50 µg/mL Polymyxin B Lösung in ein Teströhrchen geben.
- Mit einem Dacron-Tupfer mehrmals über den konfluenten Wachstumsbereich der Platte streichen, um mukoide Kolonien zu vermeiden. Mukoide Kolonien können die Migration der Probe verhindern.
- Den Tupfer mit den Kolonien in die Lösung aus destilliertem Wasser/Polymyxin tauchen und mindestens 3 Mal drehen, damit die Organismen freigesetzt werden.
- Das Gemisch 30 Minuten lang bei 35 C inkubieren.

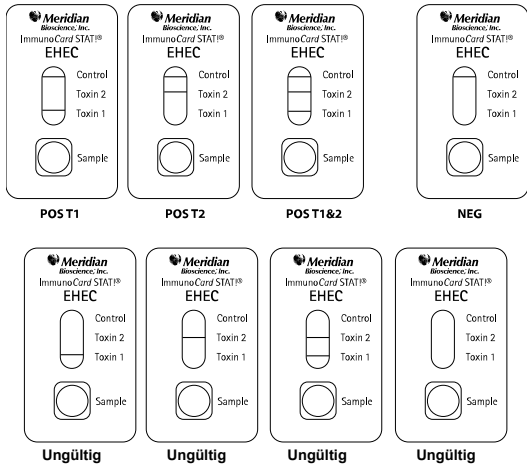
TESTVERFAHREN – SMAC PLATTENMETHODE

- Vor dem Testen alle Testvorrichtungen, Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (20-25 C) bringen.
- Für jede Patientenprobe und Kontrolle eine ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung verwenden.
- Die ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung aus der Folie nehmen und diese entsorgen.
- Die Testvorrichtung auf eine ebene Oberfläche stellen und mit dem Namen des getesteten Patienten oder der Kontrolle kennzeichnen.
- Die im Schritt 6 oben (PROBENVORBEREITUNG) vorbereitete beimpfte Wasser-/ Polymyxin-Probe durch vorsichtiges Schütteln des Röhrchens mischen.
- Mit einem Pipettor oder einer Transferpipette (im Kit **NICHT** enthalten) 200 µL in die runde Probenöffnung auf der Vorrichtung geben.
- Test bei 20-25 C 10 Minuten lang inkubieren.
- Die Ergebnisse innerhalb von 1 Minute nach beendeter Inkubation ablesen.

EXTERNE KONTROLLTESTS – SMAC AGAR- ODER BOUILLONMETHODE

- Vor dem Testen alle Testvorrichtungen und Reagenzien auf Raumtemperatur (20-25 C) bringen.
- Für jede positive und Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle je eine ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung verwenden.
- Die ImmunoCard STAT! EHEC Testvorrichtung aus der Folie nehmen. Die Vorrichtung mit der zu testenden Kontrolle kennzeichnen.
- Genau 5 Tropfen des positiven Kontrollreagenz in die Probenöffnung auf der als positive Kontrolle gekennzeichneten Vorrichtung geben.
- Genau 6 Tropfen des Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle in die Probenöffnung auf der als negative Kontrolle gekennzeichneten Vorrichtung geben.
- Test bei 20-25 C 20 Minuten lang inkubieren.
- Die Ergebnisse innerhalb von 1 Minute nach beendeter Inkubation ablesen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE



Negativer Test: Eine ROSA-ROTE Bande an der Kontrolllinienposition. Es sind keine weiteren Banden vorhanden.

Positiver Test für Shiga Toxin 1: Eine ROSA-ROTE Bande an den Linienpositionen für die Kontrolle und für Toxin 1. Keine Banden an der Testlinie für Toxin 2. Das Erscheinen einer Testlinie für Toxin 1, selbst wenn äußerst schwach, weist auf vorhandenes Shiga Toxin 1 hin. Die Intensität der Testlinie kann schwächer sein als die der Kontrolllinie.

Positiver Test für Shiga Toxin 2: Eine ROSA-ROTE Bande an den Linienpositionen für die Kontrolle und für Toxin 2. Keine Banden an der Testlinie für Toxin 1. Das Erscheinen einer Testlinie für Toxin 2, selbst wenn äußerst schwach, weist auf vorhandenes Shiga Toxin 2 hin. Die Intensität der Testlinie kann schwächer sein als die der Kontrolllinie.

Positiver Test für Shiga Toxin 1 und 2: Eine ROSA-ROTE Bande an den Linienpositionen für die Kontrolle und für Toxin 1 und Toxin 2. Das Erscheinen von Testlinien für Toxin 1 und Toxin 2, selbst wenn äußerst schwach, weist auf vorhandenes Shiga Toxin 1 und 2 hin. Die Intensität der Testlinien kann schwächer sein als die der Kontrolllinie.

Ungültige Testergebnisse:

- Keine Banden an der für die Kontrolllinie bestimmten Position. Der Test ist ungültig, da das Fehlen der Kontrollbande bedeutet, dass das Testverfahren nicht korrekt durchgeführt wurde oder dass ein Reagenzienzerfall auftrat.
- Eine ROSA-ROTE Bande an der Testlinienposition für entweder Toxin 1 oder Toxin 2 nach der bestimmten Inkubationszeit oder eine Bande von einer anderen Farbe als ROSA-ROT. Zu falsch-positiven Ergebnissen kann es kommen, wenn der Test zu lange inkubiert wird. Banden von anderen Farben als ROSA-ROT können auf einen Reagenzienzerfall hindeuten.

Lässt sich ein Ergebnis nur schwer auswerten, ist der Test mit der selben Probe zu wiederholen, um die Möglichkeit eines Fehlers auszuschließen. Eine neue Probe nehmen und erneut testen, falls die ursprüngliche Probe wiederholt nicht ablesbare Ergebnisse erbringt.

QUALITÄTSKONTROLLE

Führen Sie den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.

Bei jeder Verwendung sind die Kitkomponenten visuell auf offensichtliche Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Gefrieren oder undichte Stellen zu untersuchen. Keine kontaminierten oder verdächtigten Reagenzien verwenden.

Interne Kontrollen: Interne Kontrollen sind in den Teststreifen integriert und werden daher bei jedem Test durchgeführt.

- Das Erscheinen einer rosa-roten Bande an der Kontrolllinie dient als Verfahrenskontrolle und bedeutet, dass der Test korrekt durchgeführt wurde, dass der Probenfluss einwandfrei war und dass die Testreagenzien zum Gebrauchszeitpunkt aktiv waren.
- Ein farbloser Hintergrund um die Kontroll- oder Testlinie herum dient auch als Verfahrenskontrolle. Wenn die Kontroll- oder die Testlinie von einem stark farbigen Hintergrund verdunkelt wird, macht dies den Test ungültig. Dies ist ein Anzeichen von Reagenzienzerfall, inadäquater Probe oder fehlerhafter Testdurchführung.

Externe Kontrollen: Externe Kontrollreagenzien müssen entsprechend der Auflagen des Labors oder gemäß den örtlichen, landesweiten und staatlichen Stellen sowie Zulassungsbehörden getestet werden.

Die für die Kontrollen zu erwartenden Ergebnisse sind im Abschnitt AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE erläutert.

Jede neue Kitcharge oder jede neue Lieferung soll mit den externen positiven und negativen Kontrollen überprüft werden. Die Häufigkeit der durchzuführenden externen Kontrolltests richtet sich nach den entsprechenden bundesstaatlichen, städtlichen und kommunalen Richtlinien. Die externen Kontrollen werden zur Überwachung der Reaktivität der Reagenzien und der Testleistung verwendet. Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erzielt, bedeutet dies entweder, dass eines der Reagenzien oder eine der Komponenten zum Zeitpunkt der Verwendung nicht mehr reaktiv war, der Test nicht korrekt durchgeführt wurde oder dass keine Reagenzien oder Proben hinzugefügt wurden. **Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, wiederholen Sie zur Ermittlung der Fehlerquelle als Erstes die Kontrolltests. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.** Wiederholen Sie als ersten Schritt die Kontrolltests, um die Fehlerquelle zu ermitteln.

ERWARTETE WERTE

Die Positivitätsrate jedes einzelnen Labors ist abhängig von mehreren Faktoren, darunter der Methode bei der Probenahme, der Handhabung und des Transports der Probe, der Jahreszeit, und des Vorhandenseins von EHEC Infektionen zum Zeitpunkt der Testdurchführung. Liegt keine EHEC Infektion vor, ist ein negatives Testergebnis zu erwarten

EINSCHRÄNKUNGEN

- Es handelt sich um einen qualitativen Test, und es darf bei der Ergebnisfeststellung keine quantitative Auswertung anhand der Intensität der positiven Linien vorgenommen werden.
- Die Testergebnisse sind in Verbindung mit den verfügbaren Informationen aus der klinischen Untersuchung des Patienten und anderen Diagnostikverfahren heranzuziehen.
- Wenn beim Hinzufügen von 150 µL Kulturbouillon zu den 5 Tropfen des Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle Fehler begangen wurden (Schritt 7 von Part Probenvorbereitung/ANREICHERUNG Bouillon Methode) kann dies zu falsch negativen Ergebnissen führen. Als eine visuelle Hilfe wäre es hilfreich zu kontrollieren, ob die Bouillonkultur hinzugefügt wurde. Die Seite des Teströhrchens mit einem Strich markieren, um die Volumenoberfläche des Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle zu kennzeichnen. Wenn die Bouillonkultur in das Probenverdünnungspuffer gegeben wird, soll sich der Strich in der Mitte der verdünnten Probe befinden. Die Zugabe von mehr als 5 Tropfen Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle kann auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.
- Eine übermäßige Inkubation kann zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Die Inkubation des Tests bei niedrigeren Temperaturen oder für eine kürzere Zeit kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

- Die Leistungsmerkmale des ImmunoCard STAT! EHEC Tests wurden nicht direkt auf Stuhlproben evaluiert. Sie wurden nur auf SMAC Kultur-Platten oder GN und MacConkey Flüssigkulturen bewertet.

- HINWEIS:** Die Shiga Toxin 1 von *E. coli* und die Toxin von *Shigella dysenteriae* typ 1 Stämmen sind sehr ähnlich. Deshalb kann der ImmunoCard STAT! EHEC Test ein positives Ergebnis mit *Shigella dysenteriae* typ 1 Toxinen geben. Die zwei Organismen können durch Plattenkultur auf Selektiv-Anreicherungsmedium und mit einer biochemischen Analyse unterschieden werden.

LEISTUNGSMERKMALE

SMAC PLATTENMETHODE

Die Testvorrichtungen wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika mittels der SMAC Methode evaluiert. Zu den getesteten Proben gehörten 249 frische Stuhlproben und 41 gefrorene Shiga-Toxin positive Stuhlproben.

VERGLEICHSMETHODE (Premier EHEC)			
SMAC Agar Methode	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	46	1*	47
Negativ	0	243	243
Gesamt	46	244	290
			VI
Positive Übereinstimmung	46/46	100%	92,3% - 100%
Negative Übereinstimmung	243/244	99,6%	97,7% - 100%
Gesamte Übereinstimmung	289/290	99,7%	98,7% - 100%

* *E. Coli* O157:H7 wurde von der Kultur isoliert aber nicht von der Referenzmethode entdeckt.

BOUILLONMETHODE

Die Studie wurde mit frischen oder gefrorenen Proben durchgeführt. Die Proben stammten von Patienten aus den Vereinigten Staaten von Amerika, Kanada und Argentinien. Fünf U.S. amerikanische Labors führten alle Tests durch mit 469 Proben mittels MAC und GN Anreicherungs-Bouillons. (120 der Proben waren feste Stuhlproben von Patienten bei denen Verdacht auf eine Gastroenteritis bestand.) 448/469 der Proben hatten Wachstum im GN Bouillon, während 449 Wachstum im Mac Bouillon zeigten. Drei der GN-Anreicherungsproben wurden wegen unzureichendem Volumen von der Vergleichsstudie ausgeschlossen. Sieben der 469 Proben wuchsen nur im Mac Bouillon, während drei andere Proben nur im GN Bouillon wuchsen. Vierzehn der Proben sind in beiden Bouillons nicht gewachsen. Die Stuhlproben stammten von männlichen und weiblichen Patienten von jeden Alters. Abweichungen zwischen den Ergebnissen aus dem Premier EHEC Test und dem ICS EHEC Test wurden durch dem Zytotoxintest aufgelöst. Diese Proben gaben allgemein niedrige Ergebnisse (< 0,300) mit dem Premier EHEC Test.

Vergleichsmethode (Premier EHEC)			
Mac Bouillonmethode			
ICS EHEC	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	60	1	61
Negativ	4*	384	388
Gesamt	64	385	449
			VI
Positive Übereinstimmung	60/64	93,8%	84,8% - 98,3%
Negative Übereinstimmung	384/385	99,7%	98,6% - 100%
Gesamte Übereinstimmung	444/449	98,9%	97,4% - 99,6%

* Zwei ICS EHEC -, Premier EHEC + Proben waren negativ bei einer Referenz-Cytotoxin-Methode.

Vergleichsmethode (Premier EHEC)			
GN Bouillonmethode			
ICS EHEC	Positiv	Negativ	Gesamt
Positiv	57	1	58
Negativ	7*	380	387
Gesamt	64	381	445
			VI
Positive Übereinstimmung	57/64	89,1%	78,8% - 95,5%
Negative Übereinstimmung	380/381	99,7%	98,5% - 100%
Gesamte Übereinstimmung	437/445	98,2%	96,5% - 99,2%

* Vier ICS EHEC -, Premier EHEC + Proben waren negativ bei einer Referenz-Cytotoxin-Methode.

Die Ergebnisse von jeder Bouillon-Methode wurden zwischen untereinander verglichen in der folgenden Tabelle.

	Mac Positiv	Mac Negativ	Mac Kein Wachstum	Gesamt
GN Positiv	54	3	1	58
GN Negativ	3	382	5	390
GN Kein Wachstum	4	3	14	21
Gesamt	61	388	20	469

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

SMAC AGARTEST

Mit der SMAC Agarmethode kann Toxin in einer koloniebildenden Einheit oder in 25 ng/mL und 62,5 ng/mL für ungereinigete Shiga Toxine 1 bzw. 2 Nachgewiesen werden.

GN oder MAC BOUILLONTEST

Bei Verwendung von gereinigtem Toxin liegt die untere Nachweisgrenze für sowohl ST1 als auch ST2 bei 1,25 ng/mL.

REPRODUZIERBARKEIT

SMAC AGARTEST

Drei unabhängige Labors testeten drei Proben in dreifacher Ausführung zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten an demselben Tag (Intra-Assay-Variabilität) und an drei unterschiedlichen Tagen (Inter-Assay-Variabilität). Die Proben bestanden aus drei negativen, drei schwach positiven und drei stark positiven Proben. Der ImmunoCard STAT! EHEC Test zeigte eine Reproduzierbarkeit von 100% einschließlich der Kontrolllinien.

GN oder MAC BOUILLONTEST

Drei unabhängige Labors testeten 12 Proben (n=2 stark positiv, n=4 schwach positiv, n=4 schwach negativ, n=2 stark negativ) in zweifacher Ausführung an demselben Tag (Intra-Assay-Variabilität) und an drei unterschiedlichen Tagen (Inter-Assay-Variabilität). Der ImmunoCard STAT! EHEC Test zeigte eine Reproduzierbarkeit von 100% einschließlich der Kontrolllinien.

ASSAY-REAKTIVITÄT

SMAC AGARTEST: Die nachstehenden 40 STEC Stammkulturen wurden auf SMAC Platten kultiviert und anschließend mit Polymyxin extrahiert. Alle Isolate wiesen auf dem ImmunoCard STAT! EHEC Test positive Reaktionen auf.

O157:H7 (32 Stämme), O96:H9 (1), O111:NM (1), O26:H11 (2), O103:H2 (1), O145:NM (1), O45:H2 (1), O45:NM (1).

GN oder MAC BOUILLONTEST: Die nachstehenden 39 STEC Stammkulturen wurden in GN oder MacConkey Bouillon kultiviert. Alle Isolate wiesen auf dem ImmunoCard STAT! EHEC Test positive Reaktionen auf.

O157:H7 (32 Stämme), O157:NM (1), O111:NM (2), O111:H21 (1), O121:H19 (1), O126:H27 (1), O45:H2 (1).

KREUZREAKTIVITÄT

SMAC AGARTEST: Keine der nachstehenden Organismen reagierten mit dem ImmunoCard STAT! EHEC Test. (Getestete Mikroorganismen und Anzahl der Stämme): *Pseudomonas aeruginosa* (10), *Klebsiella pneumoniae* (10), *Enterobacter species* (10), *Proteus species* (10), Nicht-ST-produzierende *E. coli* (10), *Aeromonas species* (3), *Serratia marcescens* (5), *Shigella species* (3)

GN oder MAC BOUILLONTEST: Keine der nachstehenden Organismen wiesen Kreuzreaktivitäten mit dem ImmunoCard STAT1 EHEC Test auf: *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* (2 nicht toxische Stämme), *Escherichia coli* O157:H7 (nicht toxische Stämme), *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Gruppe B, *Salmonella hiversum*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens* (2 Stämme), *Shigella boydii*, *Shigella flexeri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (Cowan), *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia enterocolitica* (2 Stämme), Adenovirus Typ 14, Adenovirus Typ 2, Adenovirus Typ 41, Feline calicivirus, Coxsackie A9, Coxsackie B1, Enterovirus Typ 69, Herpes Simplex Virus II, Parainfluenza Typ 3, Rotavirus.

STÖRSUBSTANZEN-TESTS (NUR BOUILLONTESTS)

Die folgenden Substanzen die direkt in die Stuhlproben gegeben wurden beeinflussten in den angegebenen Konzentrationen die Ergebnisse nicht: Bariumsulfat (0,05 mg/mL), Prilosec OTC (5 µg/mL), Pepto-Bismol (1:2100), Tums (0,05 mg/mL), Tagamet (5 µg/mL), Mylanta (1:2100), Leukozyten (0,05% v/v), Mucin (0,03 mg/mL), Stearinsäure/Palminsäure (0,04 mg/mL), Vollblut (0,05% v/v).

REFERENCES

1. Karmali MB. Laboratory diagnosis of verotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Newsletter. 1987; 9:65-70.
2. Maniar AC, Williams T, Anand CM, Hammond, GW. Detection of verotoxin in stool specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28:134-135.
3. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and shiga-like toxins. Microbiol Reviews. 1987; 51:206-219.
4. Griffin PM, Ostroff S, Tauxe R, Green KD, Wells JG, Lewis JH, et al. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. Ann Intern Med. 1988; 109:705-712.
5. Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two year prospective study. J Infect Dis. 1988; 157:1054-1057.
6. Maniar AC, Williams T, Anand CM, Hammond GW. Detection of verotoxin in stool specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28:134-135.
7. Neill MA. *Escherichia coli* O157:H7. A pathogen of no small renown. Infect Dis Newsletter. 1991; 10:19-24.
8. Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Hessesmann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. J Clin Microbiol. 1993; 31:1200-1205.
9. Mariani-Kurkdjian P, Deamur E, Milan 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 Microbiol. 1993; 31:296-301.
10. Kay BA, Griffin PM, Stockbine VA, Wells JG. Too fast food: Bloody diarrhea and death from *Escherichia coli* O157:H7. Clin Microbiol Newsletter. 1994; 16:17-19.
11. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases, *E. coli* O157:H7, What the clinical microbiologist should know. 1994.



SN11169

REV. 10/18



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244 USA
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.com/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 símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice dell'lotto / Code du lot / Código de lote / chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	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 fulfils 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 / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero 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 Leistungsbeurteilung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per <n> saggi / Contenu suffisant pour <n> test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de température / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de prueba / testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampon de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	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
R. Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß

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.