

# ImmunoCard STAT!® *E. coli* O157 Plus

Szybki Test Immunologiczny do wykrywania bakterii *E. coli* O157 wytwarzającej toksynę Shiga w próbkach kału ludzkiego oraz hodowlach

REF 750530

Wyrób medyczny do diagnostyki *In Vitro*.

## PRZEZNACZENIE

Test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus to szybki test do wykrywania antygenów bakterii *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga, pomocny w diagnostyce zakażenia *E. coli* O157:H7. Test może być stosowany do bezpośredniego badania próbek kału, kału w zmodyfikowanej pożywkę Cary-Blair lub potwierdzających kultur wyhodowanych w bulionie MacConkey, na płytkach z sorbitolem MacConkey (SMAC).

W Stanach Zjednoczonych ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus nie jest przeznaczony do użytku w gabinecie lekarskim. To urządzenie jest przeznaczone dla średnio rozbudowanych laboratoriów. W Kanadzie to urządzenie nie jest przeznaczone do użytku w gabinecie lekarskim.

## STRESZCZENIE I WYJAŚNIENIE ZASADY DZIAŁANIA TESTU

*Escherichia coli* to pospolity mikroorganizm występujący w prawidłowej ludzkiej florze. Chociaż zidentyfikowano wiele różnych serotypów, niektóre szczepy nabyły geny toksyn z innych gatunków bakterii poprzez plazmidy bakteriofagowe. *E. coli* O157 wytwarzające toksynę Shiga zwykle kolonizują badane wszystkich stoliców przedłożonych do rutynowych posiewów znanych jako enterokrwotoczne *E. coli* wytwarzające toksynę Shiga (Shiga toxin-producing enterohemorrhagic *E. coli* - STEC). Szczepy *E. coli* STEC wywołują szerokie spektrum chorób u ludzi, w tym biegunkę krwawą, krwotoczne zapalenie jelita grubego, niewydolność nerek, zespół hemolityczno-mocznicowy (hemolityc uremic syndrome - HUS) i zgon<sup>1-4</sup>. Szczególnie wysokie są współczynniki zachorowalności i śmiertelności wśród dzieci, niemowląt i osób starszych. Ponadto wiele stanów i instytucji wymaga ujemnego wyniku testu przed ponownym przyjęciem zakażonych dzieci do szkół lub przedszkoli. Najczęściej występujące ogniska *E. coli* O157 są związane z niedogotowaną wolowiną i produktami mlecznymi, ale można je również powiązać z sałatą listkową, kiełkami rzodkiewki, kiełkami lucerny, niepasteryzowanym cydrem jabłkowym<sup>5-8</sup> i zanieczyszczoną wodą.<sup>9,10</sup>

Do chwili obecnej, *E. coli* O157:H7 jest najczęściej opisywanym serotypem STEC<sup>4, 11, 12</sup>. Centra Kontroli Chorób (Centers for Disease Control - CDC) zalecają, aby wszystkie krwawe stolce przedłożone do rutynowej hodowli kału były badane na obecność *E. coli* O157:H7<sup>8</sup>. Niektórzy badacze zalecają badanie wszystkich stoliców przedłożonych do rutynowych posiewów kału na obecność *E. coli* O157:H7<sup>4</sup>. Większość *E. coli* O157 niefermentujących sorbitolu jest ruchliwa i zawiera antygen H7. Jednak ruchliwość może być trudna do wywołania, co skutkuje brakiem wykrycia antygenu H7. Czasami szczep *E. coli* O157 niefermentujący sorbitolu jest nieruchliwy (O157:NM) lub ruchliwy z nietypowym antygenem rzęskowym (O157:H-). Kliniczna ocena laboratoryjna szczepu nie musi obejmować oznaczenia antygenu H7<sup>4</sup>. *E. coli* O157 niefermentującą sorbitolu należy uznać za patogenną, niezależnie od tego, czy antygen H7 został wykryty<sup>4</sup>. Określenie H7 może być pomocne epidemiologicznie lub do celów raportowania stanowego i federalnego.

Obecne metody wykrywania szczepów *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga obejmują 1) hodowlę na płytkach SMAC, a następnie wykonanie testów potwierdzających, 2) testy immunoenzymatyczne na antygeny O157 lub toksyny oraz 3) amplifikację bulionu, a następnie EIA, lateks lub subkulturowanie. Metody EIA zajmują około jednej godziny czasu do ukończenia i wymagają wysokiego poziomu umiejętności pracy z wieloma etapami procesu. Metody hodowlane wymagają przynajmniej jednej calonocnej inkubacji i umiejętności identyfikacji kolonii ujemnych pod względem sorbitolu, a także identyfikacji biochemicznej i/lub immunologicznej. Jednak metody hodowlane zwiększają liczbę obecnych organizmów do poziomów wykrywalnych w próbkach z małą liczbą bakterii *E. coli* O157. Test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus został zaprojektowany do szybkiego i dokładnego wykrywania bakterii *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga. Dokładne i szybkie wykrycie bakterii *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga jest konieczne, aby zapobiec dalszemu rozprzestrzenianiu się mikroorganizmu, uniknąć niepotrzebnych zabiegów, takich jak operacja, oraz aby ułatwić podjęcie decyzji dotyczących leczenia.

## BIOLOGICZNE ZASADY DZIAŁANIA

Kał lub materiał hodowlany jest przygotowywany/rozcieńczany i dodawany do portu pobierania próbek w urządzeniu. Próbką mobilizuje cząsteczki złota, pokryte przeciwciałem monoklonalnym specyficznym dla lipopolisacharydu *E. coli* O157 i migruje wzdłuż membrany przez strefę testową i kontrolną. Strefa testowa zawiera unieruchomione przeciwciała monoklonalne specyficzne dla epitopu wspólnego dla bakterii *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga. Po 10 minutach, strefy testową i kontrolną sprawdza się pod kątem obecności czerwonych/fioletowych linii na powierzchni membrany. Jeżeli w próbce obecne są szczepy *E. coli* O157 wytwarzające toksynę Shiga, powstaje kompleks pomiędzy przeciwciałem wychytującym, szczepem *E. coli* O157 wytwarzającym toksynę Shiga i koniugatem przeciwciała monoklonalne-złoto, co można zaobserwować wizualnie jako czerwoną/fioletową linię w strefie testowej. Brak czerwonej/fioletowej linii w strefie testowej oznacza wynik ujemny. Linia kontrolna służy jako kontrola proceduralna w celu upewnienia się, że próbka przemieściła się na odpowiednią odległość wzdłuż membrany.

## ODCZYNNIKI/MATERIAŁ DOSTARCZONY Z ZESTAWEM

**Maksymalna liczba testów uzyskanych z tego zestawu testowego jest podana na opakowaniu zewnętrznym.**

1. Testy ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus – testy pakowane pojedynczo w torebki foliowe, zawierające unieruchomione przeciwciała monoklonalne specyficzne dla epitopu wspólnego dla bakterii *E. coli* wytwarzających toksynę Shiga (strefa testowa), kozie przeciwciała antymyśie IgG (strefa kontrolna) i przeciwciała monoklonalne, specyficzne dla lipopolisacharydu *E. coli* O157 sprzężone z cząsteczkami złota.
2. Kontrola dodatnia – inaktywowane *E. coli* O157:H7 w roztworze zawierającym 0,094% azydku sodu jako środka konserwującego.
3. Kontrola ujemna – inaktywowane *E. coli* O157:H12 w roztworze zawierającym 0.094% azydku sodu jako środka konserwującego.
4. Rozcieńczalnik do próbek – roztwór zawierający 0,094% azydku sodu jako środka konserwującego.
5. Pipety transferowe

## MATERIAŁY NIE DOSTARCZANE W ZESTAWIE

1. Probówki 12 x 75 mm
2. Stoper

## MATERIAŁY OPCJONALNE NIE DOSTARCZANE W ZESTAWIE

1. Bulion MacConkey (5,0 mL/probówka)
2. Agar MacConkey w/Sorbitol (SMAC)
3. Inkubator
4. Wymazówki
5. Standardy McFarlanda (#2 do #4)
6. Modyfikowana pożywka Cary-Blair

## ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

1. Wszystkie odczynniki służą wyłącznie do użytku diagnostycznego *in vitro*.
2. Należy przeczytać i przestrzegać instrukcji obsługi.
3. Stężenie odczynnika, czas inkubacji i temperatura (21–27°C) zostały zoptymalizowane pod kątem czułości i specyficzności. Najlepsze wyniki uzyskuje się przestrzegając tych specyfikacji. Po rozpoczęciu testu wszystkie kolejne kroki należy wykonywać bez przerywania pracy.
4. Wszystkie odczynniki należy delikatnie wymieszać i przechowywać w temperaturze 21–27°C przed użyciem.
5. Flakli z kontrolą dodatnią i ujemną należy trzymać w pozycji pionowej, w odpowiedniej odległości nad studzienką aby zapewnić odpowiedni rozmiar kropli i sposób dostarczenia.
6. Końcówka flakli lub pipety nie może dotykać portu do pobierania próbek.
7. Wszystkie odczynniki zostały dostarczone jako rozcieńczone do odpowiednich stężeń. Nie rozcieńczać ponownie.
8. Pipety dostarczone z zestawem powinny być oznaczone w odstępach przedstawionych na schemacie dot. pipet w UWAGACH PROCEDURALNYCH. Po otrzymaniu instrukcji użycia pipety dostarczonej z zestawem nie należy używać pipet transferowych z oznaczeniami innymi niż na schemacie. Użyć jednej na próbkę.
9. Nie zamieniać składników odczynników pochodzących z różnych serii.
10. Testy są pakowane w torebki foliowe, które podczas przechowywania chronią przed wilgocią. Przed otwarciem należy sprawdzić każdą torebkę foliową. Nie należy używać testów z torebek, które mają otwory w folii lub w których torebka nie została szczelnie zamknięta. Jeśli składniki testu i odczynniki są nieprawidłowo przechowywane mogą wystąpić reakcje fałszywie ujemne.
11. Odczynniki do kontroli dodatniej i ujemnej zawierają inaktywowane bakterie *E. coli*. Pomimo tego, należy obchodzić się z nimi jak z materiałami mogącymi powodować zagrożenie biologiczne.
12. Nie należy używać zestawu lub składników zestawu po upływie ich terminów ważności.
13. Nie należy używać fiolek, które nie posiadają etykiety, numeru serii lub daty ważności.
14. Należy wymienić kolorowe nakrętki na odpowiednich fiolkach.

15. Probki od pacjentów i zużyte testy ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus mogą zawierać czynniki zakaźne i należy obchodzić się z nimi na poziomie bezpieczeństwa biologicznego 2, zgodnie z zaleceniami zawartymi w podręczniku CDC/NIH „Bezpieczeństwo biologiczne w pracowniach mikrobiologicznych i biomedycznych”.
16. Niektóre odczynniki jako środek konserwujący zawierają azydki sodu, który działa drażniąco na skórę. Unikać kontaktu z odczynnikami. Usuwanie odczynników zawierających azydki sodu do odpływów składających się z ołowianej lub miedzianej kanalizacji może spowodować tworzenie się wybuchowych tlenków metali. Należy wyeliminować gromadzenie się tlenków poprzez przepłukiwanie kanalizacji dużą ilością wody podczas usuwania.
17. Probki kału należy użytyzować jako materiały potencjalnie niebezpieczne biologicznie. Przed usunięciem inaktywować kultury w autoklawie przez co najmniej 15 minut w temperaturze 121°C.
18. Wszelkie odchylenia poniżej lub powyżej ustalonych czasów inkubacji mogą wpłynąć na czułość i specyficzność, dlatego należy ich unikać.
19. Kał niezależnie od konsystencji należy dokładnie wymieszać, aby zapewnić reprezentatywną próbkę przed pipetowaniem.

## ZAGROŻENIA I UWAGI DOT. ŚRODKÓW OSTROŻNOŚCI

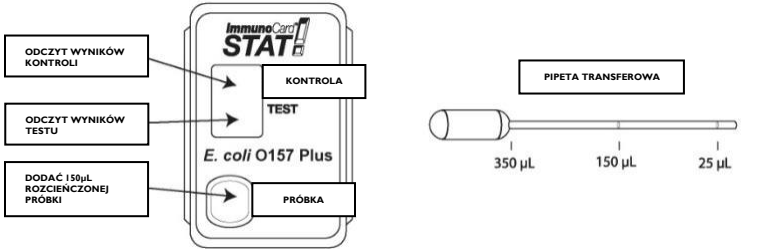
Nie są znane żadne zagrożenia związane z tym produktem.

## OKRES UŻYTKOWANIA I PRZECHOWYWANIE

Data ważności znajduje się na etykiecie zestawu. Kiedy zestaw nie jest używany, należy przechowywać go w temperaturze 2–8°C.

## UWAGI PROCEDURALNE

1. Budowa testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus została przedstawiona poniżej.
2. Serijne przetwarzanie próbek lub kontroli jest możliwe pod warunkiem zachowania prawidłowego czasu inkubacji dla każdego testu.
3. Strefa kontrolna każdego testu to kontrola proceduralna mająca na celu zapewnienie, że próbka migrowała w tęście wystarczająco, aby umożliwić odczytanie ważnego wyniku testu.



## PRZYGOTOWYWANIE ODCZYNNIKA

1. Wszystkie odczynniki są gotowe do użyciu (dalsze rozcieńczenie nie jest konieczne).
2. Przed użyciem składniki zestawu powinny osiągnąć temperaturę 21–27°C.
3. Przed użyciem delikatnie wymieszać płynne odczynniki.

## POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK

Kał uzyskany ze zmodyfikowanej pożywki Cary-Blair można badać bezpośrednio, lub po hodowli w bulionie MacConkey/na płycie SMAC. Probki kału należy umieścić w hermetycznym pojemniku i przed badaniem lub hodowlą można je przechowywać do 72 godzin w temperaturze 2–8°C. Jeżeli badanie nie może być przeprowadzone w ciągu 72 godzin, należy zamrozić próbki natychmiast po otrzymaniu. W celu potwierdzenia posiewu bulion MacConkey lub płytkę SMAC należy przygotować jak najszybciej po otrzymaniu próbki kału. Zamrożenie próbek przed hodowlą może wpłynąć na odzyskanie żywych organizmów.

1. **WZBOGACENIE BULIONEM:** Dodac około 50 µL kału do 5 mL bulionu MacConkey Broth i inkubować w 42°C ± 1°C przez 16-24 godziny.
2. **HODOWLA NA PŁYTKACH:** Posiać kał, bulion lub izolat z hodowli na płytkę SMAC i inkubować w 35°C ± 1°C przez 16-24 godziny.

## PROCEDURA BADANIA

### A. KAŁ STAŁY:

1. Dodać 350 µL rozcieńczalnika do próbek do probówki używając kropliczera.
2. Przed pipetowaniem wymieszać kał tak dokładnie, jak to możliwe:
  - a. W przypadku stolca płynnego lub półstałego pobrać wymieszaną próbkę stolca do pierwszego znacznika (25 µL) na pipecie transferowej. Dodać do rozcieńczalnika do próbek i wymieszać. Uwaga: Nie pipetować więcej niż 25 µL stolca. Nadmierna inkubacja stolcem może spowodować nieprawidłowe wyniki. Pozostawić pipetę transferową w probówce do wykorzystania w przyszłości.
  - b. W przypadku stolca, którego nie można pipetować, użyć drewnianego aplikatora i przenieść niewielką część (o średnicy 2 mm) dokładnie wymieszanego stolca do rozcieńczalnika do próbek i dokładnie zemulgować stolec za pomocą aplikatora. Pozostawić pipetę transferową w probówce do wykorzystania w przyszłości.
3. Otworzyć torebkę foliową i wyjąć test. Rozcieńczoną próbkę worteksować przez 10 sekund, a następnie dodać 150 µL (drugie oznaczenie na pipiecie transferowej) rozcieńczonego stolca do portu pobierania próbek w urządzeniu.
4. Inkubować przez 10 minut w temperaturze 21–27°C. Ważne: podczas 10 minutowej inkubacji, rozcieńczona próbka musi przejść poza linię kontrolną.
5. Sprawdzić wizualnie strefy kontrolną i testową pod kątem obecności lub braku czerwonej/fioletowej linii pod koniec okresu inkubacji.

### B. WZBOGACONY BULION lub PRÓBKA CARY-BLAIR:

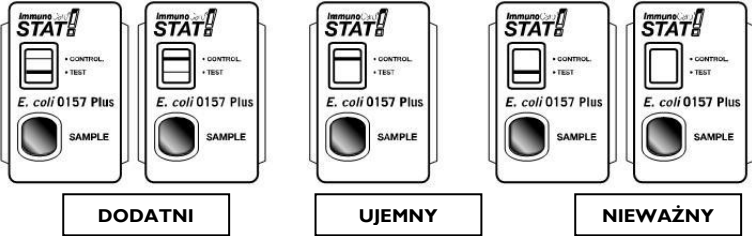
1. Dodać 350 µL rozcieńczalnika do próbek do probówki używając kropliczera.
2. Pobrać kulturę bulionową do podstawy gruszki pipety transferowej (około 350 µL), dodać ją do rozcieńczalnika do próbek i wymieszać. W przypadku próbki Cary-Blair, pobrać zaszczeponą pożywkę Cary-Blair do drugiej linii pipety transferowej (około 150 µL), dodać do rozcieńczalnika do próbek i wymieszać. Pozostawić pipetę transferową w probówce do wykorzystania w przyszłości.
3. Otworzyć torebkę foliową i wyjąć test. Rozcieńczoną próbkę worteksować przez 10 sekund, a następnie dodać 150 µL (drugie oznaczenie na pipiecie transferowej) rozcieńczonej próbki do portu pobierania próbek w urządzeniu.
4. Inkubować przez 10 minut w temperaturze 21–27°C. Ważne: podczas 10 minutowej inkubacji, rozcieńczona próbka musi przejść poza linię kontrolną.
5. Sprawdzić wizualnie strefy kontrolną i testową pod kątem obecności lub braku czerwonej/fioletowej linii pod koniec okresu inkubacji.

### C. HODOWLA NA PŁYTKACH:

1. Dodać 700 µL (2 x 350 µL) rozcieńczalnika do próbek do probówki używając kropliczera.
2. Za pomocą wymazówki sporządzić gęstą zawiesinę (standard McFarlanda 2-4) podejrzewanego wzrostu z płytki SMAC w rozcieńczalniku do próbek. Delikatnie wymieszać.
3. Otworzyć torebkę foliową i wyjąć test. Delikatnie wymieszać rozcieńczoną próbkę, a następnie dodać 150 µL (drugie oznaczenie na pipiecie transferowej) do portu pobierania próbek w urządzeniu.
4. Inkubować przez 10 minut w temperaturze 21–27°C. Ważne: podczas 10 minutowej inkubacji, rozcieńczona próbka musi przejść poza linię kontrolną.
5. Sprawdzić wizualnie strefy kontrolną i testową pod kątem obecności lub braku czerwonej/fioletowej linii pod koniec okresu inkubacji.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

WAŻNE: Wyniki testu należy odczytać natychmiast po 10 minutowym okresie inkubacji. Wyniki nie mogą zostać odczytane po kolejnych 10 minutach.



**Dodatni Wynik Testu:** Widoczne czerwone/fioletowe linie testowe i kontrolne. Wynik dodatni wskazuje na obecność antygenów z bakterii *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga.  
**UWAGA:** Ze względu na epidemiologiczne znaczenie uzyskiwania izolatów bakterii, zaleca się, aby wszystkie próbki dodatnie pod względem toksyny były przekazywane do izolacji organizmów dodatnich pod względem toksyny Shiga. Sugerujemy, aby poszczególne laboratoria mikrobiologiczne koordynowały izolację bakterii z lokalnymi państwowymi laboratoriami zdrowia.

**Ujemny Wynik Testu:** Widoczna czerwona/fioletowa linia kontrolna. Brak czerwonej/fioletowej linii testowej. Wynik ujemny wskazuje brak antygenów *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga lub ilość poniżej progu detekcji.

**Nieważny Wynik Testu:** Brak widocznej czerwonej/fioletowej linii kontrolnej, z lub bez widocznej czerwonej/fioletowej linii testowej. Nieważne wyniki testu mogą wynikać z problemu z odczytnikiem/testem, błędu proceduralnego (należy powtórzyć test) lub nadmiernej inokulacji kału w rozcieńczalniku do próbek (ponownie rozcieńczyć stolec i powtórzyć test).

KONTROLA JAKOŚCI

Niniejszy test należy przeprowadzić zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi, stanowymi, federalnymi lub zgodnie z agencjami akredytującymi.

Kontrolę dodatnie i ujemne należy oznaczać zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i federalnymi. Twoje laboratorium mogło ustalić wymagania dotyczące testów kontrolnych wykraczające poza to zalecenie.

Chociaż w tym teście nie zaobserwowano interferencji z matrycą próbki, dostarczone odczynniki kontrolne znajdują się w matrycy z roztworem wodnym i mogą nie zapewniać odpowiedniej kontroli matrycy próbki. Wytyczne C24-A National Committee for Clinical Laboratory Standards wskazują, że dla każdego testu diagnostycznego należy użyć materiałów do kontroli matrycy, jeśli są dostępne. Aby zachować zgodność z tymi wytycznymi, może być konieczne dostarczenie przez użytkownika materiału kontrolnego w matrycy próbki.

BADANIE ODCZYNNIKA KONTROLNEGO

- Dodać trzy krople kontroli dodatniej lub ujemnej bezpośrednio do dolnego portu osobnych testów.
- Kontrola dodatnia po 10 minutach inkubacji w temperaturze 21-27°C powinna spowodować pojawienie się widocznych czerwonych/fioletowych linii testowych i kontrolnych.
  - Kontrola ujemna po 10 minutach inkubacji w temperaturze 21-27°C powinna spowodować pojawienie się widocznej czerwonej/fioletowej linii kontrolnej przy braku linii testowej.
- Przed każdym użyciem elementy zestawu należy poddać oględzinom pod kątem widocznych oznak zanieczyszczenia mikrobiologicznego, zamazania lub wycieku.

Jeżeli nie pojawiają się oczekiwane reakcje, a termin ważności odczynników jeszcze nie upłynął, pierwszym krokiem w określaniu przyczyny niepowodzenia powinno być powtórzenie testów kontrolnych. Jeśli niepowodzenie kontroli będzie się powtarzać, wartości skontaktować się z działem obsługi technicznej firmy Meridian pod numerem telefonu 1-800-343-3858 (USA) lub z lokalnym dystrybutorem.

OCEKIWANE WARTOŚCI

*E. coli* O157 wytwarzająca toksynę Shiga powoduje zarówno sporadyczne, jak i epidemiczne wybuchy choroby. Podczas gdy szczyt zachorowań występuje w miesiącach letnich, przypadki występują przez cały rok. Ze względu na ogniskowy charakter choroby, wartości zapadalności wahają się w szerokim zakresie w zależności od lokalizacji geograficznej, od zera do 3-4% w przypadku ostрых ognisk. Z tego powodu wartości predykcyjne dla testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus podlegają zmianom. Poniższe tabele przedstawiają oczekiwane wartości predykcyjne oparte na częstości występowania.

O157:H7 Częstość występowania	Próbki Kału		Bulion MacConkey		Płytki SMAC	
	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
4,0%	75,5%	99,2%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
3,0%	69,6%	99,4%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
2,0%	60,2%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
1,0%	42,8%	99,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,5%	27,1%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,2%	12,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,1%	6,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

OGRA NICZENIA PROCEDURY

- Wyniki testu należy wykorzystywać w połączeniu z informacjami uzyskanymi z oceny klinicznej pacjenta i innych procedur diagnostycznych.
- Próg detekcji określono stosując *E. coli* O157:H7 rozcieńczoną solą fizjologiczną. Próg detekcji szczepów *E. coli* O157:H7 ATCC 43888 i 43895 wynosił odpowiednio 8,3 x 10<sup>5</sup> cfu/mL i 7,67 x 10<sup>5</sup> cfu/mL.
- Ujemny wynik testu wskazuje na brak antygenów *E. coli* O157 wytwarzających toksynę Shiga lub na poziom antygenów niższy od tego, który można wykryć za pomocą tego testu. Dalsze testy należy przeprowadzić na próbkach ujemnych, aby określić przyczynę biegunki. Optymalną czułość uzyskuje się metodami potwierdzającymi hodowlę.
- Wiele stanów wymaga ujemnego wyniku testu STEC lub *E. coli* O157, zanim dziecko, które doświadczyło zakażenia STEC *E. coli* O157, może wrócić do szkoły lub przedszkola. W tym celu, aby zmniejszyć ryzyko wysłania zakażonych dzieci z powrotem do tych środowisk, należy zastosować metodę potwierdzającą hodowlę.
- Laboratoria powinny przestrzegać wszystkich przepisów lokalnych, stanowych i federalnych dotyczących zgłaszania STEC choroby *E. coli* O157.

CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

Test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus oceniano w sześciu lokalizacjach.<sup>9, 10, 13-16</sup> Ośrodki te obejmowały cztery szpitale dziecięce i dwa szpitale ogólne. Test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus badano na kale stałym (n = 299 świeżych, 483 zamrożonych), 24-godzinnych hodowach bulionowych (n=277) i na koloniach ujemnych pod względem sorbitolu z płytek SMAC (n=52).

W poniższej tabeli porównano wyniki testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus z testami lateksowymi kolonii ujemnych pod względem sorbitolu z płytki SMAC.

O157:H7 Wyniki Hodowli	Wyniki testu ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus					
	Kał Stały		Bulion MacConkey		Płytki SMAC	
	Dod.	Uj.	Dod.	Uj.	Dod.	Uj.
Dodatnie	341	77	17	0	20	0
Ujemne	5	359	0	261	0	32
Czułość	82%	78%-85%	100%	81%-100%	100%	83%-100%
Specyficzność	99%	97%-100%	100%	99%-100%	100%	89%-100%

Test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus wykazał 82% czułości i 99% specyficzności, gdy był testowany bezpośrednio na próbkach kału. Czułość testu była większa, gdy zastosowano metody potwierdzania hodowli. Czułość i specyficzność testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus wynosiła 100%, gdy testowano bulion MacConkey i kolonie z płytek SMAC.

BADANIE PRÓBEK ZMODYFIKOWANEJ POŻYWKI CARY-BLAIR

Próbki w zmodyfikowanej pożywce transportowej Cary-Blair oceniano za pomocą testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Do czasu badania próbki należy przechowywać w temperaturze 4°C. Probki najlepiej przebadac w ciągu 24 godzin, ale nie później niż w ciągu 72 godzin.

BADANIE PRÓBEK W ZMODYFIKOWANEJ POŻYWKIE CARY-BLAIR

Test ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus	HODOWLA		
	Dodatnia	Ujemna	Ogółem
Dodatni	33	3	36
Ujemny	6	400	406
Ogółem	39	403	442

POWTARZALNOŚĆ

Trzy laboratoria gabinetów lekarskich przebadaly sześć próbek i dwie kontrole, trzykrotnie, w każdym z trzech różnych dni. Linia testowa testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus wykazała 100% powtarzalności z dwoma wynikami ujemnymi, dwoma słabo dodatnimi i dwoma średnio dodatnimi stolcami. Powtarzalność linii kontrolnej wyniosła 100% dla wszystkich próbek.

SPECYFICZNOŚĆ TESTU

Specyficzność testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus testowano przy użyciu następujących szczepów bakterii lub wirusów. Kał dodatni i ujemny wzbogacono o ≥ 1 x 10<sup>8</sup> organizmów/mL i zbadano za pomocą testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Testy *E. coli* O157:H7 dały wynik dodatni. Stwierdzono, że wszystkie inne organizmy były ujemne po dodaniu do ujemnego stolca. Ponadto nie wpływały one na próbki dodatnie<sup>17</sup>.

Mikroorganizm lub wirus (# badane szczepy)

*Adenovirus* 40 & 41 (2)  
*Campylobacter coli* (1)  
*Campylobacter fetus* (1)  
*Campylobacter jejuni* (1)  
*Candida albicans* (1)  
*Citrobacter freundii* (1)  
*Clostridium difficile* (2)  
*Clostridium perfringens* (1)  
*Enterobacter cloacae* (1)  
*Enterobacter agglomerans* (1)  
*Escherichia coli* non-O157:H7 (13)  
*Escherichia fergusonii* (1)  
*Escherichia hermannii* (1)  
*Haefnia alvei* (1)  
*Helicobacter pylori* (1)  
*Klebsiella pneumoniae* (1)  
*Providencia stuartii* (1)  
*Proteus vulgaris* (1)

*Pseudomonas aeruginosa* (1)  
*Pseudomonas fluorescens* (2)  
*Rotavirus* (1)  
*Salmonella dublin* (1)  
*Salmonella typhimurium* (1)  
*Salmonella urbana* (1)  
*Serratia liquefaciens* (3)  
*Shigella dysenteriae* (1)  
*Shigella flexneri* (1)  
*Shigella sonnei* (1)  
*Staphylococcus aureus* (1)  
*Staphylococcus aureus* (Cowan I) (1)  
*Staphylococcus epidermidis* (1)  
*Streptococcus faecalis* (1)  
*Xanthomonas maltophilia* (1)  
*Yersinia enterocolitica* (1)

Zidentyfikowano trzy bakterie reagujące krzyżowo: *Salmonella hilversum*, *E. coli* O157:H38 i *E. coli* O157:H1. *Salmonella hilversum* nie występuje u ludzi. *E. coli* O157:H38 i H1 są rzadkimi izolatami ludzkimi.

Za pomocą testu ImmunoCard STAT poprawnie wykazano, że dwadzieścia jeden znanych laboratoryjnych izolatów *E. coli* O157:H7 jest dodatnich! Żadne izolaty *E. coli* O157:H7 nie zostały określone jako ujemne.

Kliniczne badania kału wykazały, że test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus nie reaguje krzyżowo z wieloma innymi patogenami kału. Poniżej znajduje się lista patogenów zawartych w stolcu, które nie reagowały krzyżowo z testem ImmunoCard.

Patogeny kału nie reagujące krzyżowo (liczba stolców)

*Aeromonas* (1)  
*Campylobacter* (34)  
*E. coli* O103:H2 (1)  
*E. coli* O103:NM (1)  
*E. coli* O111:NM (1)  
*E. coli* O113:H21 (1)  
*E. coli* O121:NM (1)  
*E. coli* O145:NM (1)  
*E. coli* O157:H19 (ujemne pod względem toksyny) (1)  
*E. coli* O18:H7 (1)  
*E. coli* O26:H11 (4)  
*E. coli* O69:H47 (1)  
*Plesiomonas shigelloides* (1)  
*Salmonella* spp. (18)  
*Shigella* (7)  
*Yersinia* (1)

Następujące szczepy *E. coli* O157 nie wytwarzające toksyny Shiga i *E. coli* nie-O157 dodano do kału dodatniego i ujemnego i przebadano przy użyciu testu ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus przy ≥ 6 x 10<sup>8</sup> komórek/mL. U żadnego nie stwierdzono reakcji krzyżowej ani wpływu na wynik dodatni.

*E. coli* O157:H44  
*E. coli* O157:H3  
*E. coli* O157:H12  
*E. coli* O126:H27  
*E. coli* O45:H2  
*E. coli* ETEC LT  
*E. coli* O121:H19  
*E. coli* O26:H11  
*E. coli* O111:NM  
*E. coli* O112:NM  
*E. coli* O125:NM  
*E. coli* O55:B5:H-  
*E. coli* #8739  
*E. coli* #9637

Tłumaczenie:  
dystrybutor Argenta Sp. z o. o. Sp. K.  
ul. Polska 114  
60-401 Poznań

dn. 26.08.2020

ITALIANO



Test Rapido Immunologico per la Ricerca *E. coli* O157 Produttore di Tossine Shiga da Campione Fecale e da Coltura

REF 750530

MD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

Il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus è un test rapido per la ricerca degli antigeni di *E. coli* O157 produttore di tossine Shiga. Tale test rappresenta un ausilio nella diagnosi di infezioni da *E. coli* O157:H7. Il test può essere utilizzato per esaminare direttamente campioni di feci fresche, feci in terreno di trasporto Cary-Blair modificato o da colture confirmative di feci inoculate in brodo MacConkey o su piastre Sorbitolo-MacConkey (SMAC).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

*E. coli* è un organismo comunemente ritrovato nella normale flora batterica umana. Sono stati identificati numerosi sierotipi e alcuni ceppi hanno acquisito geni per la produzione di tossine da altre specie batteriche per mezzo di plasmidi veicolati da batteriofagi. *E. coli* produttore di tossine Shiga di solito possiede uno o più geni per la produzione di tali tossine, per questo motivo appartiene a quella categoria di patogeni noti come *E. coli* enteromorragici produttori di Tossine Shiga (STEC). Tali ceppi patogeni di *E. coli* causano un ampio spettro di sintomi come diarrea e diarrea sanguinolenta, colite emorragica, compromissione della funzionalità renale, sindrome uremica emolitica (HUS) e morte.<sup>1-5</sup> Nei bambini, neonati e anziani, i tassi di mortalità sono elevati.

Inoltre in molte istituzioni quali scuole, asili nido viene richiesto un risultato negativo per la riammissione del bambino. Le epidemie attribuite ad *E. coli* O157 sono state associate più comunemente al consumo di carne poco cotta, ma sono anche causate dal consumo di insalata e altri vegetali, latte sidro di mele non pastorizzato.<sup>6-8</sup> e dall'ingestione di acqua contaminata.<sup>9, 10</sup>

Attualmente *E. coli* O157:H7 è il sierotipo di STEC più frequentemente descritto.<sup>6, 11, 12</sup> Il CDC (Centers for Disease Control) raccomanda che tutte le feci ematiche, sottoposte a coprocultura di routine, siano esaminate per la presenza di *E. coli* O157:H7.<sup>6</sup> Alcuni ricercatori raccomandano che tutte le feci sottoposte a coprocultura di routine siano esaminate per *E. coli* O157:H7.<sup>4</sup> La maggior parte degli *E. coli* O157 non fermentanti il sorbitolo sono mobili e possiedono l'antigene H7. La mobilità però può essere difficile da evidenziare impendendo così l'identificazione dell'antigene H7. Occasionalmente ceppi di *E. coli* O157 non fermentanti il sorbitolo possono non essere mobili (O157:NM) o possono essere mobili con un antigene flagellare non tipizzabile (O157:H-). I test di laboratorio non sempre permettono di evidenziare ceppi con antigene H7.<sup>4</sup> La determinazione dell'antigene H7 può essere utile a scopo epidemiologico e di segnalazione alle autorità competenti.

I metodi attualmente disponibili per l'identificazione di *E. coli* tossinogenici includono: 1) coltura su piastre SMAC e test di conferma da colonia, 2) test immunoenzimatico per la determinazione dell'antigene O157 o delle tossine, 3) brodcultura seguita da un test EIA, test al lattice o subcoltura. I metodi EIA richiedono tempi di esecuzione di circa una ora e esperienza nell'esecuzione di tale metodica. I metodi culturali richiedono incubazioni di una notte ed esperienza nell'identificazione di colonie sorbitolo negative e nell'identificazione biochimica e/o immunologica. I metodi culturali consentono di isolare gli organismi anche in quei campioni contenenti un basso numero di O157 ma presenti a livelli ancora identificabili. Il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus è stato messo a punto per l'identificazione rapida ed accurata di *E. coli* O157 tossinogenici. In questo modo è possibile prevenire l'ulteriore diffusione dell'infezione, evitare al paziente ulteriori indagini o interventi chirurgici ed aiutare il clinico nella scelta della corretta terapia da adottare.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il campione fecale o il materiale ottenuto da coltura vengono diluiti e aggiunti al pozzetto per il campione della card. L'aggiunta del campione permette che le particelle di oro colloidale coattate con anticorpo monoclonale specifico per il lipopolisaccaride di *E. coli* O157 migrino lungo la membrana verso le zone Test e Controllo. Nella zona Test è presente un anticorpo monoclonale immobilizzato sulla membrana specifico per un epitopo comune a tutti i ceppi di *E. coli* produttori di tossine Shiga. Dopo 10 minuti dall'aggiunta del campione le zone Test e Controllo vengono osservate per la presenza di bande rosso/rosa sulla membrana. Se nel campione è presente *E. coli* O157 produttore di tossine Shiga si forma un complesso tra anticorpo di cattura, *E. coli* O157 produttore di tossine Shiga e le particelle d'oro colloidale coattate con l'anticorpo monoclonale dando origine ad una banda visibile rosso/rosa nella zona Test. L'assenza di tale banda nella zona Test indica un risultato negativo. La banda nella zona Controllo serve come Controllo procedurale interno, assicurando la corretta migrazione del campione lungo la membrana.

REAGENTI/MATERIE PRIME

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

- 1. **Dispositivo di Analisi ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus** - Ciascuna card contiene una striscia di membrana sulla quale sono adsorbiti: un anticorpo monoclonale specifico per un epitopo comune a tutti i ceppi di *E. coli* produttori di tossine Shiga (immobilizzato in zona Test); un anticorpo di capra anti-IgG di topo (immobilizzato in zona Controllo); un anticorpo monoclonale specifico per il lipopolisaccaride di *E. coli* O157, coniugato a particelle di oro colloidale.
- 2. **Controllo Positivo** - *E. coli* O157:H7 inattivato in una soluzione contenente sodio azide allo 0,094% come conservante.
- 3. **Controllo Negativo** - *E. coli* O157:H12 inattivato in una soluzione contenente sodio azide allo 0,094% come conservante.
- 4. **Diluente del campione** - Soluzione contenente sodio azide allo 0,094% come conservante.
- 5. **Pipette monouso**

MATERIALE NON FORNITO

- 1. Provette da 12 x 75 mm
- 2. Timer

MATERIALI OPZIONALI NON FORNITI

- 1. Brodo MacConkey (5.0 mL/provetta)
- 2. Sorbitolo MacConkey Agar (SMAC)
- 3. Incubatore Termostato
- 4. Tamponi
- 5. Standard McFarland (dal #2 al #4)
- 6. Terreno di trasporto Cary-Blair modificato

PRECAUZIONI

- 1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- 2. Seguire attentamente le istruzioni per l'uso.
- 3. La concentrazione dei reagenti, i tempi e la temperatura di incubazione (21-27 C) sono stati ottimizzati per garantire massima sensibilità e specificità. Una volta iniziato il test occorre portare a termine tutti i passaggi senza interruzioni.
- 4. Tutti i reagenti devono essere miscelati delicatamente prima dell'uso. Assicurarsi che abbiano raggiunto temperatura ambiente (21-27 C) prima di eseguire il test.
- 5. Durante la dispensazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo mantenere i flaconi in posizione verticale ed ad una distanza adeguata al fine di garantire una corretta dispensazione del liquido.
- 6. Non toccare la porta del campione con la punta della pipetta o del flacone.
- 7. Tutti i reagenti sono forniti pronti all'uso. Non diluire.
- 8. Le pipette fornite nel kit sono dotate di tacche che indicano il volume, come riportato nel disegno. Non utilizzare pipette provenienti da kit differenti che possono avere tacche differenti. Utilizzare una pipetta pulita per ogni campione.
- 9. Non scambiare i reagenti e i dispositivi di analisi appartenenti a kit con lotti differenti.
- 10. I dispositivi di analisi sono racchiusi in buste di alluminio per proteggerli dall'umidità. Ispezionare le buste prima dell'uso. Non utilizzare i dispositivi se le buste presentano fori o non sono sigillate correttamente. Se i componenti del kit non sono conservati in modo corretto si possono ottenere risultati falsamente negativi.

- 11. Il Controllo Positivo e il Controllo Negativo contengono *E. coli* inattivato. In ogni caso essi devono essere manipolati come materiale potenzialmente infetto.
- 12. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- 13. Non utilizzare componenti del kit senza etichette o con etichette che non mostrino numero di lotto e data di scadenza.
- 14. Riposizionare i tappi colorati sui flaconi corrispondenti.
- 15. I campioni dei pazienti analizzati con ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus possono contenere agenti patogeni e devono essere quindi manipolati con la massima cautela, come previsto per il livello di sicurezza 2 descritto nel manuale del CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories."
- 16. Evitare il contatto con i reagenti. Alcuni reagenti contengono sodio azide, che è irritante. Lo smaltimento di reagenti contenenti sodio azide deve essere fatto con cautela in caso di tubature contenenti piombo. La sodio azide in presenza di piombo può dare origine ad azidi metallici esplosivi. Per evitare la formazione di tali composti, far scorrere abbondante acqua durante lo smaltimento nelle tubature.
- 17. Smaltire i campioni di feci come materiale potenzialmente infetto. Inattivare le colture mediante autoclavaggio per un minimo di 15 minuti a 121 C prima dello smaltimento.
- 18. Ogni deviazione rispetto ai tempi di incubazione indicati può determinare un peggioramento di sensibilità e specificità del test.
- 19. Al fine di garantire che il campione analizzato sia sufficientemente rappresentativo, prima di prelevare in quantitativo destinato all'analisi, miscelare le feci molto accuratamente, indipendentemente dalla consistenza.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

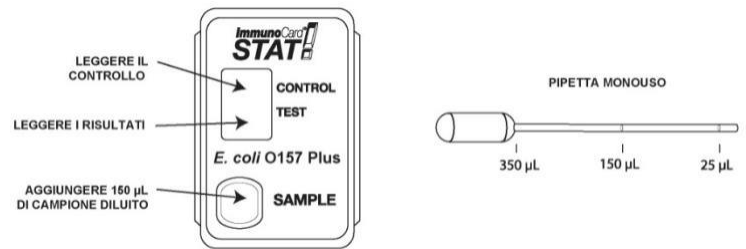
Per le nostre attuali conoscenze, non ci sono rischi associati a questo prodotto.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a 2-8 C quando non in uso.

NOTE PROCEDURALI

- 1. La card del kit ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus è rappresentata in figura.
- 2. E' possibile analizzare diversi campioni alla volta purché vengano rispettati i corretti tempi di incubazione.
- 3. La zona Controllo di ogni card serve come Controllo Procedurale e consente di verificare che il campione migri correttamente e che quindi il risultato sia valido.



PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- 1. Tutti i reagenti sono pronti all'uso (non diluirli ulteriormente).
- 2. Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura di 21-27 C prima dell'uso.
- 3. Mescolare i reagenti delicatamente prima dell'uso.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEE CAMPIONI

Le feci possono essere esaminate sia direttamente, sia su un campione ottenuto dal mezzo di trasporto Cary-Blair modificato o dopo coltura in un brodo MacConkey o su piastra SMAC. I campioni di feci dovrebbero essere raccolti in un contenitore pulito e conservati fino a 72 ore a 2-8 C prima di eseguire, il test o la coltura. Se il test non può essere eseguito entro questo tempo si consiglia di congelare i campioni al ricevimento. Il congelamento dei campioni prima dell'esecuzione della coltura può limitare l'isolamento di organismi vitali.

- 1. **ARRICCHIMENTO IN BRODO:** inoculare circa 50 µL di campione di feci in 5 mL di brodo MacConkey ed incubare a 42 C ± 1 C per 16-24 ore.
- 2. **PIASTRE:** Seminare il campione di feci, il brodo o gli isolati su SMAC e incubare a 35 C ± 1 C per 16-24 ore.

PROCEDURA DEL TEST

A. CAMPIONE FECAL:

- 1. Aggiungere 350 µL di Diluente del campione ad una provetta pulita utilizzando il contagocce.
- 2. Mescolare il campione fecale prima di prelevare:
  - a. Feci liquide o semi-solide: aspirare il campione fecale fino alla prima tacca (25 µL) della pipetta di plastica monouso. Aggiungere il campione al Diluente del campione e mescolare. Nota: non pipettare più di 25 µL di campione di feci. Un volume troppo elevato di campione può dare origine a risultati non validi. Lasciare la pipetta di plastica nella provetta per l'uso successivo.
  - b. Feci solide: utilizzando un bastoncino di legno trasferire una piccola quantità di campione fecale (2 mm di diametro) nel Diluente del campione e mescolare accuratamente. Porre una pipetta di plastica nella provetta per l'uso successivo.
- 3. Aprire l'involucro della card ed estrarre la card. Passare al vortex il campione diluito per 10 secondi, quindi aggiungere 150 µL (seconda tacca della pipetta di plastica) di campione fecale diluito nel pozzetto per il campione della card.
- 4. Incubare per 10 minuti a 21-27 C. Nota: Durante i 10 minuti di incubazione il campione deve migrare fino alla zona Controllo.
- 5. Al termine del periodo di incubazione verificare la comparsa delle bande di reazione colorate in rosso-rosa nella zona Test e Controllo.

B. Campione ARRICCHITO IN BRODO o CAMPIONE in CARY-BLAIR:

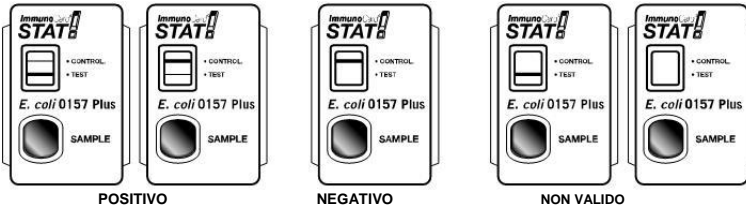
- 1. Aggiungere 350 µL di Diluente del campione ad una provetta pulita utilizzando il contagocce.
- 2. Aspirare il bordo di coltura verso la base del bulbo di una pipetta di trasferimento (circa 350 µL), aggiungerlo al diluente e mescolare. Per i campioni Cary-Blair, aspirare il terreno Cary-Blair inoculato fino alla seconda tacca della pipetta di trasferimento (circa 150 µL), aggiungerlo al diluente e mescolare. Lasciare la pipetta di trasferimento nella provetta per uso futuro.
- 3. Aprire l'involucro della card ed estrarre la card. Agitare con vortex il campione diluito per 10 secondi, quindi aggiungere 150 µL (seconda tacca della pipetta di plastica ) di campione diluito nel pozzetto per il campione della card.
- 4. Incubare per 10 minuti a 21-27 C. Nota: Durante i 10 minuti di incubazione il campione deve migrare fino alla zona Controllo.
- 5. Al termine del periodo di incubazione verificare la comparsa delle bande di reazione colorate in rosso-rosa nella zona Test e Controllo.

C. COLONIE SU PIASTRA:

- 1. Aggiungere 700 µL (2 x 350 µL) di Diluente del campione ad una provetta pulita utilizzando il contagocce.
- 2. Utilizzare un tampone per preparare una sospensione di colonie sospette (Standard McFarland 2-4) prelevandole dalla piastra di SMAC e diluendole nel diluente del campione. Mescolare delicatamente.
- 3. Aprire l'involucro e estrarre la card. Mescolare delicatamente il campione diluito, quindi aggiungere 150 µL (seconda tacca della pipetta di plastica) di campione diluito nel pozzetto per il campione della card.
- 4. Incubare per 10 minuti a 21-27C. Nota: durante i 10 minuti di incubazione il campione deve migrare fino alla zona Controllo.
- 5. Al termine del periodo di incubazione verificare la comparsa delle bande di reazione colorate in rosso-rosa nella zona Test e Controllo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nota: I risultati devono essere letti immediatamente al termine dei 10 minuti di incubazione.



**RISULTATO POSITIVO:** Due bande colorate in rosso-rosa. Una delle bande compare in corrispondenza della zona Controllo e l'altra in corrispondenza della zona Test. Un risultato positivo indica la presenza di antigeni di *E. coli* O157 produttore di tossine Shiga.

**NOTA:** Considerando l'importanza di ottenere isolati batterici per scopi epidemiologici, si consiglia che tutti i campioni positivi per la tossina siano sottoposti all'isolamento culturale. Si suggerisce che i laboratori di batteriologia eseguano tale isolamento in accordo alle regolamentazioni locali.

**RISULTATO NEGATIVO:** Una sola banda colorata in rosso-rosa in corrispondenza della zona Controllo. Nessuna banda rosso-rosa in corrispondenza della zona Test. Un risultato negativo indica l'assenza di antigeni di *E. coli* O157 produttore di tossine Shiga o che il livello di antigeni è inferiore al limite di rilevazione del test.

**RISULTATO NON VALIDO:** Nessuna banda rosso-rosa indipendentemente dalla presenza di bande nella zona Test. Un risultato non valido può essere causato da problemi dei reagenti/Card, da errori procedurali (si consiglia di ripetere il test) oppure dall'aggiunta al diluente di un quantitativo troppo elevato di feci (si consiglia di diluire nuovamente le feci e ripetere il test).

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

I Controlli Positivo e Negativo devono essere analizzati in accordo con le regolamentazioni locali. Oltre a tali raccomandazioni il laboratorio può stabilire un proprio programma di Controllo Qualità.



Sebbene per questo test non siano state messe in evidenza interferenze con la matrice del campione, i controlli del kit sono in soluzione acquosa e possono non essere considerati un controllo significativo della matrice del campione. Per ogni test diagnostico, le Linee guida del Comitato Nazionale per gli Standard di Laboratorio (NCCLS C24-A) suggeriscono l'utilizzo di controlli della stessa matrice dei campioni qualora questi siano disponibili.

#### REAGENTI DI CONTROLLO

Dispensare tre gocce di Controllo Positivo o tre gocce di Controllo Negativo direttamente nel pozzetto per il campione.

- Il controllo Positivo deve dare origine a due bande colorate in rosso-rosa, una in corrispondenza della zona Test e l'altra in corrispondenza della zona Controllo dopo 10 minuti di incubazione a 21-27 °C.
- Il controllo Negativo deve dare origine ad una sola banda colorata in rosso-rosa nella zona Controllo e nessuna banda nella zona Test dopo 10 minuti di incubazione a 21-27 °C.

Prima dell'uso i componenti del kit dovrebbero essere esaminati per eventuali problemi di contaminazione microbica o congelamento.

Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, prima della scadenza dei reagenti, 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).

#### VALORI ATTESI

*E. coli* O157 produttore di tossine Shiga può causare sia infezioni sporadiche sia episodi epidemici. Nonostante l'incidenza dell'infezione sia maggiore nei mesi estivi, alcuni casi di infezione si verificano durante tutto il corso dell'anno. I valori di incidenza variano da 0 a 3-4% nelle epidemie più gravi. Per questo motivo i valori predittivi per il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus sono soggetti a variazione. La tabella sottostante mostra i valori predittivi attesi in funzione dell'incidenza.

Incidenza di O157:H7	Campioni fecali		Brodo MacConkey		Piastra SMAC	
	VPP	VPN	VPP	VPN	VPP	VPN
4,0%	75,5%	99,2%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
3,0%	69,6%	99,4%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
2,0%	60,2%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
1,0%	42,8%	99,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,5%	27,1%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,2%	12,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,1%	6,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

#### LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- I risultati dei test devono essere utilizzati in associazione alle informazioni cliniche sul paziente e ad altri test diagnostici.
- Il limite di identificazione è stato determinato utilizzando *E. coli* 157:H7 diluito in soluzione fisiologica. Il limite di identificazione di *E. coli* O157:H7 ceppo ATCC 43888 e 43895 è risultato rispettivamente 8,3 x 10<sup>5</sup> cfu/mL e 7,67 x 10<sup>5</sup> cfu/mL.
- Un risultato negativo indica l'assenza di antigeni di *E. coli* O157 produttore di tossine Shiga o che il livello di antigeni nel campione è inferiore al limite di rilevazione del test. Sui campioni negativi dovrebbero essere eseguiti ulteriori test per determinare la causa della diarrea. Valori più elevati di sensibilità sono ottenuti quando il kit viene utilizzato come conferma da colonia.
- Alcune istituzioni, prima di riammettere a scuola un bambino che è stato infettato da STEC o *E. coli* O157 richiedono un risultato negativo per tali patogeni. A questo scopo per evitare di riammettere a scuola un paziente infetto si dovrebbe eseguire un test di conferma da colonia.
- I laboratori dovrebbero fare riferimento alle regolamentazioni locali per riportare alle autorità competenti un'infezione da STEC o *E. coli* O157.

#### PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus è stato valutato presso sei laboratori.<sup>9, 10, 13-16</sup> I centri dove sono stati eseguite le valutazioni comprendevano quattro ospedali pediatrici e due ospedali generici. Con il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus sono stati esaminati campioni fecali (299 freschi, 483 congelati), brodoculture dopo 24 ore di arricchimento (277) e colonie sorbitolo negative su piastra SMAC (n=52).

Nella tabella di seguito riportata, I risultati di ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus sono stati paragonati a test al lattice eseguiti su colonie sorbitolo-negative ottenute da piastre SMAC.

Risultati della coltura di O157:H7	Risultati del test ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus					
	Campioni fecali		Brodo MacConkey		Piastra SMAC	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Pos.	341	77	17	0	20	0
Neg.	5	359	0	261	0	32
Sensibilità	82%	78%-85%	100%	81%-100%	100%	83%-100%
Specificità	99%	97%-100%	100%	99%-100%	100%	89%-100%

Il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus eseguito direttamente su campione fecale ha mostrato una sensibilità pari a 82% ed una specificità pari a 99%. Si sono ottenuti valori più elevati di sensibilità quando il test è stato eseguito come conferma da coltura. La sensibilità e specificità del test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus sono risultate entrambe 100% quando è stato esaminato il campione arricchito in brodo MacConkey o su piastra SMAC.

#### ESAME DEL CAMPIONE in CARY-BLAIR MODIFICATO

ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus è stato utilizzato per l'analisi di campioni conservati in di trasporto Cary-Blair modificato. I campioni devono essere comuniche conservati a 4 °C fino all'esame. Il campioni vanno esaminati preferibilmente entro le 24 ore, ma non più tardi di 72 ore.

ESAME DEI CAMPIONI CARY-BLAIR MODIFICATI				VALUTAZIONE CARY-BLAIR DELLA SENSIBILITÀ E SPECIFICITÀ		
ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus	COLTURA			INTERVALLO DI CONFIDENZA DEL 95% USANDO IL METODO ESATTO	Sensibilità	Specificità
	Positivo	Negativo	Totale			
Positivo	33	3	36		70%-93%	70%-93%
Negativo	6	400	406		98%-100%	98%-100%
Totale	39	403	442			

#### RIPRODUCIBILITÀ

In tre laboratori sono stati esaminati sei campioni e due controlli in triplicato per tre diversi giorni. Il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus ha evidenziato una riproducibilità per la banda Test del 100% con due campioni fecali negativi, due bassi positivi e due positivi medi. La riproducibilità per la banda Controllo è risultata 100% con tutti i campioni.

#### SPECIFICITÀ DEL TEST

La specificità del test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus è stata valutata utilizzando i ceppi batterici e virali elencati di seguito. Campioni fecali positivi e negativi sono stati inoculati con un numero di organismi  $\geq 10^8$  /mL e testati con il kit ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. I campioni contenenti *E. coli* O157:H7 hanno dato un risultato positivo. Tutti gli altri organismi hanno dato un risultato negativo quando sono stati inoculati in feci negative. Inoltre tali organismi non hanno causato interferenze con i campioni positivi.<sup>17</sup>

Microorganismi o virus (n° dei ceppi testati)

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	Rotavirus (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Salmonella dublin</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Salmonella typhimurium</i> (1)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	<i>Salmonella urbana</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> (2)	<i>Serratia liquefaciens</i> (3)
<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Enterobacter agglomerans</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Escherichia coli</i> non-O157:H7 (13)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Escherichia fergusonii</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)
<i>Escherichia hermannii</i> (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)
<i>Hafnia alvei</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Helicobacter pylori</i> (1)	<i>Xanthomonas maltophilia</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
<i>Providencia stuartii</i> (1)	
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	

Tre microorganismi si sono dimostrati cross-reattivi: *Salmonella hilversum*, *E. coli* O157:H38 e *E. coli* O157:H1. *Salmonella hilversum* non infetta l'uomo mentre *E. coli* O157:H38 e H1 sono isolati raramente nell'uomo.

Ventuno isolati di *E. coli* O157:H7 sono risultati correttamente positivi al test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Nessuno degli isolati di *E. coli* O157:H7 ha dato un risultato negativo.

L'esame diretto del campione fecale ha mostrato che il test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus non dà cross-reazioni con altri batteri fecali. Di seguito è riportato un elenco di organismi patogeni che quando erano presenti nel campione di feci non hanno mostrato cross-reazione:

Patogeni fecali che non hanno evidenziato cross-reazione (numero di campioni di feci)	
<i>Aeromonas</i> (1)	<i>E. coli</i> O157:H19 (non tossigenico) (1)
<i>Campylobacter</i> (34)	<i>E. coli</i> O18:H7 (1)
<i>E. coli</i> O103:H2 (1)	<i>E. coli</i> O26:H11 (4)
<i>E. coli</i> O103:NM (1)	<i>E. coli</i> O69:H47 (1)
<i>E. coli</i> O111:NM (1)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (1)
<i>E. coli</i> O113:H21 (1)	<i>Salmonella</i> spp. (18)
<i>E. coli</i> O121:NM (1)	<i>Shigella</i> (7)
<i>E. coli</i> O145:NM (1)	<i>Yersinia</i> (1)

I sottoelencati ceppi di *E. coli* O157 non produttori di tossine Shiga e *E. coli* non O157 sono stati inoculati in campioni di feci positivi e negativi e testati alla concentrazione di  $\geq 6 \times 10^8$  organismi/mL. Nessuno di questi microorganismi ha dato cross-reazione o interferenza con i campioni positivi.

<i>E. coli</i> O157:H44	<i>E. coli</i> O26:H11
<i>E. coli</i> O157:H3	<i>E. coli</i> O111:NM
<i>E. coli</i> O157:H12	<i>E. coli</i> O125:NM
<i>E. coli</i> O126:H27	<i>E. coli</i> O55:B5:H-
<i>E. coli</i> O45:H2	<i>E. coli</i> #8739
<i>E. coli</i> ETEC LT	<i>E. coli</i> #9637
<i>E. coli</i> O121:H19	

## FRANÇAIS



Test Immuno-enzymatique Rapide pour la Détection des *E. coli* O157 à Shiga Toxines, dans des Echantillons de Selles Humaines Ou Culture

REF 750530

MD Dispositif médical de diagnostic in vitro

#### BUT DE LA METHODE

Le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus est un test rapide pour la détection des antigènes d'*E. coli* O157 à Shiga toxines, pour le diagnostic des infections à *E. coli* O157:H7. On peut utiliser cet essai pour tester directement des échantillons de selles, des selles dans un milieu Cary-Blair modifié ou des coprocultures de confirmation réalisées dans du bouillon MacConkey ou sur des plaques de gélose de MacConkey au sorbitol.

#### RESUME ET EXPLICATION DU TEST

*Escherichia coli* est un microorganisme commun que l'on retrouve dans la flore humaine normale. Alors que différents sérotypes ont été identifiés, certaines souches ont acquis des gènes spécifiques de toxines appartenant à d'autres espèces bactériennes via des plasmides de bactériophages. La souche *E. coli* O157 à Shiga toxines véhicule généralement un ou plusieurs gènes spécifiques des Shiga toxines, la plaçant dans la catégorie d'agent pathogène connue sous le nom de *E. coli* entérohémorragiques à Shiga toxine (STEC). Les souches STEC d'*E. coli* sont la cause d'un large spectre de maladies regroupant les diarrhées hémorragiques ou non, les colites hémorragiques, des insuffisances rénales, le syndrome hémolytique urémiques (SHU), jusqu'au décès.<sup>1-5</sup> Les taux de morbidité et de mortalité chez les enfants, les nourrissons et les personnes âgées sont tout particulièrement élevés. De plus, plusieurs Etats et Institutions demandent que le test soit négatif avant toute réadmission d'enfants infectés dans les écoles ou les garderies. Les cas d'infections attribués à *E. coli* O157 ont été le plus souvent associés à de la viande de bœuf pas suffisamment cuite et aux produits laitiers, mais ont été également retrouvés dans des feuilles de laitue, les germes de radis, les germes de luzerne, du cidre non pasteurisé<sup>6-8</sup> et l'eau contaminée.<sup>9, 10</sup>

A ce jour, *E. coli* O157:H7 est le sérotype de STEC le plus communément décrit.<sup>6, 11, 12</sup> Le Centre épidémiologique d'Atlanta aux Etats-Unis (CDC ou Centers for Disease Control) recommande que toutes les selles sanguinolentes soumises pour une coproculture systématique soient examinées pour dépister la présence éventuelle d'*E. coli* O157:H7.<sup>6</sup> Certains investigateurs recommandent que toutes les selles soumises pour une coproculture systématique soient examinées pour dépister la présence éventuelle d'*E. coli* O157:H7.<sup>4</sup> La plupart des souches d'*E. coli* à fermentation négative du sorbitol sont mobiles et possèdent l'antigène H7. Cependant la mobilité peut être difficile à mettre en évidence, ce qui entraîne l'échec de la détection de l'antigène H7. Occasionnellement, une souche d'*E. coli* à fermentation négative du sorbitol peut être immobile (O157:NM) ou mobile avec un antigène flagellaire non typé (O157:H-). L'évaluation d'une souche en laboratoire clinique n'a pas besoin d'inclure la détermination de l'antigène H7.<sup>4</sup> *E. coli* O157 à fermentation négative du sorbitol doit être considérée comme pathogène avec ou sans la détection de l'antigène H7.<sup>4</sup> L'identification de l'antigène H7 est une aide d'un point de vue épidémiologique, ou pour les rapports aux structures nationales et/ou fédérales.

Les méthodes classiques de détection d' *E. coli* O157 à Shiga toxines comprennent 1) les cultures sur milieu SMAC suivies par un test de confirmation, 2) les réactions immuno-enzymatiques pour la détection des antigènes O157 ou des toxines, et 3) l'amplification en bouillon de culture suivie par un test ELISA, un test au latex ou une culture. Les méthodes en ELISA demandent approximativement une heure de manipulation avec une procédure à multiples étapes, et nécessitent un niveau élevé de compétence. Les méthodes de culture demandent au moins une nuit d'incubation et des compétences pour identifier les colonies négatives à la fermentation du sorbitol, et enfin une identification biochimique et/ou immunologique. Cependant, les méthodes de cultures permettent l'amplification du nombre de microorganismes présents à des taux détectables dans des échantillons contenant un faible taux d' *E. coli* O157. Le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus est destiné à une détection rapide et sûre d' *E. coli* O157 à Shiga toxines. Une détection rapide et sûre d' *E. coli* O157 à Shiga toxines est nécessaire pour empêcher une plus grande dispersion de l'organisme, éviter des procédures inutiles comme la chirurgie et guider dans le choix du traitement.

PRINCIPE DU TEST

Les échantillons de selles ou le matériel en culture sont préparés et dilués puis ajoutés dans le puits échantillon du système. L'échantillon se fixe sur les particules d'or, recouvertes de l'anticorps monoclonal spécifique du lipopolysaccharide d' *E. coli* O157, et migre le long de la membrane de la zone Test à la zone Contrôle. La zone Test contient un anticorps monoclonal immobilisé spécifique d'un épitope commun aux *E. coli* à Shiga toxines. Après 10 minutes, la présence de lignes colorées en rouge/violet est contrôlée à la surface de la membrane dans les zones Test et Contrôle. Si la souche *E. coli* à Shiga toxines est présente dans l'échantillon, un complexe s'est formé entre l'anticorps de capture, *E. coli* O157 à Shiga toxines et l'anticorps monoclonal conjugué à l'or, qui peut être visualisé par la présence d'une ligne rouge/violet dans la zone Test. Un résultat négatif se traduit par l'absence de ligne rouge/violet dans la zone Test. La ligne Contrôle sert d'indicateur de bon fonctionnement de la procédure afin de s'assurer que l'échantillon ait migré à distance appropriée sur la membrane.

MATERIEL FOURNI

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

- 1. ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus Dispositifs de test - sous sachet métallisé individuel, contenant l'anticorps monoclonal immobilisé spécifique de l'épitope commun aux *E. coli* à Shiga toxines (région Test), l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris (région Contrôle) et l'anticorps monoclonal spécifique du lipopolysaccharide d' *E. coli* O157 conjugué aux particules d'or.
- 2. Contrôle Positif - *E. coli* O157:H7 inactivée dans un tampon contenant 0,094% d'azide de sodium comme conservateur.
- 3. Contrôle Négatif - *E. coli* O157:H12 inactivée dans un tampon contenant 0,094% d'azide de sodium comme conservateur.
- 4. Diluant d'échantillon - Solution contenant 0,094% d'azide de sodium comme conservateur.
- 5. Pipettes de transfert

MATERIEL NON FOURNI

- 1. Tubes à essai (12 x 75mm)
- 2. Minuteur

MATERIEL FACULTATIF NON FOURNI

- 1. Bouillon MacConkey (5 mL/tube)
- 2. Gélose MacConkey au Sorbitol (SMAC)
- 3. Incubateur
- 4. Ecouillons
- 5. Standards McFarlands (#2 à #4)
- 6. Milieu Cary-Blair modifié

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- 1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- 2. Bien lire et suivre les instructions du test avant d'effectuer l'analyse.
- 3. La concentration des réactifs, les temps d'incubation et les températures (21-27 °C) ont été optimisés en rapport avec la sensibilité et la spécificité. Les meilleurs résultats sont obtenus en adhérant à ces spécifications. Une fois le test commencé, terminer toutes les étapes subséquentes sans interruption.
- 4. Tous les réactifs doivent être doucement mélangés et être à température (21-27 °C) avant utilisation.
- 5. Tenir le flacon de contrôle positif et de contrôle négatif à la verticale à une distance convenable des puits pour assurer une taille de gouttes et une distribution régulières.
- 6. Ne pas toucher le puits échantillon avec l'embout du flacon de réactif ou la pipette.
- 7. Tous les réactifs sont fournis déjà dilués à la bonne concentration. Inutile de diluer.
- 8. Les pipettes de transfert fournies dans le kit doivent être marquées aux intervalles comme sur le schéma dans la rubrique 'Notes de Procédure'. Ne pas utiliser des pipettes de transfert dont le marquage est autre que celui représenté. Utiliser une pipette de transfert par échantillon.
- 9. Ne pas interchanger les réactifs provenant de différents numéros de lot de coffret.
- 10. Les dispositifs de test sont emballés dans des sachets métallisés empêchant toute humidité pendant le stockage. Inspecter chaque sachet métallisé avant de l'ouvrir. Des réactions faussement négatives peuvent se produire si les composants du test et les réactifs sont stockés dans de mauvaises conditions.
- 11. Le contrôle positif et le contrôle négatif contiennent des bactéries *E. coli* inactivées. Ils doivent cependant être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- 12. Ne pas utiliser les éléments du coffret si la date de péremption indiquée est dépassée.
- 13. Ne pas utiliser les flacons qui n'ont pas d'étiquette, de numéro de lot ou de date de péremption.
- 14. Replacer les bouchons colorés sur leurs flacons respectifs.
- 15. Les échantillons de patients et les dispositifs de test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus utilisés peuvent contenir des agents infectieux. Ils doivent donc être manipulés avec un niveau 2 de sécurité comme il est recommandé dans le CDC/NIH manuel 'Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories'.
- 16. Certains réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium qui est un irritant pour la peau. Eviter tout contact avec la peau. L'élimination de réactifs contenant de l'azide de sodium dans des canalisations en cuivre ou en plomb peut provoquer la formation d'azides métalliques explosifs. Ceci peut être évité en rinçant à grandes eaux lors de l'élimination.
- 17. Eliminer les échantillons de selles comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Inactiver toute culture en autoclavant pendant un minimum de 15 minutes à 121 °C avant élimination.
- 18. Toute modification des temps d'incubation peut affecter la sensibilité et la spécificité de ce test et doit donc être évitée.
- 19. Tous les échantillons de selles doivent être mélangés avec soin, sans tenir compte de la consistance, afin d'assurer un échantillon représentatif avant le transfert.

DANGER ET MISES EN GARDE

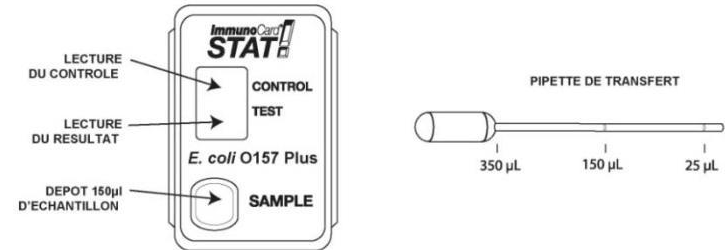
A notre connaissance, il n'y a pas de risque connu associé à ce produit.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du coffret. Stocker le coffret à une température de 2 à 8 °C lorsqu'elle n'est pas utilisée.

REMARQUES SUR LA PROCEDURE

- 1. La présentation de la carte ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus est donnée dans le schéma ci-dessous.
- 2. Une série de tests d'échantillons ou de contrôles doit être réalisée en s'assurant que le temps d'incubation sera identique pour chaque dispositif.
- 3. La zone Contrôle de chaque carte représente un contrôle de la procédure pour s'assurer que l'échantillon ait migré suffisamment sur la membrane afin d'obtenir un résultat de test valide.



PREPARATION DES REACTIFS

- 1. Tous les réactifs sont prêts à l'emploi (ne pas diluer à nouveau)
- 2. Laisser le coffret revenir à une température de 21-27 °C avant utilisation.
- 3. Mélanger doucement les réactifs liquides avant utilisation.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les selles peuvent être testées soit directement, soit dans un milieu Cary-Blair modifié, soit après leur culture dans du bouillon MacConkey ou sur une plaque de gélose de MacConkey au sorbitol. Les échantillons de selles doivent être reçus dans un conteneur hermétiquement fermé et peuvent être conservés jusqu'à 72 heures à une température de 2-8 °C avant d'être testés ou mis en culture. Congeler les échantillons immédiatement après réception si la procédure ne peut pas être effectuée dans les 72 heures. Pour une confirmation par culture, le bouillon MacConkey ou la boîte de milieu SMAC doit être préparé le plus tôt possible après réception des échantillons de selles. La congélation des échantillons avant la mise en culture peut affecter la récupération d'organismes viables.

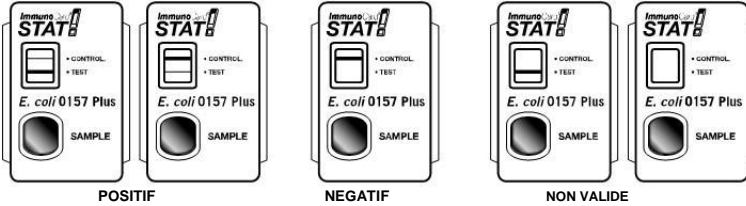
- 1. BOUILLON D'ENRICHISSEMENT: ajouter approximativement 50 µL de selles à 5 mL de bouillon MacConkey et incubé à 42 ± 1 °C pendant 16-24 heures.
- 2. BOITE DE CULTURE: Déposer les selles, le bouillon ou l'isolat de culture sur le milieu SMAC de la boîte de culture, en faisant des stries, et incubé à 35 ± 1 °C pendant 16-24 heures.

PROCEDURE DE TEST

- A. TEST DIRECT SUR SELLES:
  - 1. Ajouter 350 µL de diluant d'échantillon dans un tube à essai en utilisant le compte-gouttes.
  - 2. Mélanger le plus minutieusement possible avant le transfert:
    - a) Pour des selles liquides ou semi-solides, aspirer l'échantillon de selles bien mélangées à l'aide d'une pipette de transfert, jusqu'à hauteur du premier repère (25 µL). Ajouter au diluant d'échantillon et mélanger.
    - b) Pour des selles solides, utiliser un bâtonnet d'application en bois et transférer une petite portion (2 mm de diamètre) de selles minutieusement mélangées, dans le diluant d'échantillon, et émulsifier soigneusement les selles avec le bâtonnet d'application. Placer une pipette de transfert dans le tube pour une utilisation ultérieure.
  - 3. Ouvrir un sachet métallisé et retirer la carte. Mélanger au vortex l'échantillon dilué pendant 10 secondes, puis ajouter 150 µL (deuxième repère à partir de l'embout de la pipette de transfert) de l'échantillon dilué dans le puits échantillon de la carte.
  - 4. Incuber pendant 10 minutes à 21-27 °C. Remarque: durant les 10 minutes d'incubation, l'échantillon dilué doit migrer au-delà de la ligne Contrôle.
  - 5. Visualiser la présence ou l'absence de lignes colorées en rouge/violet dans les régions Contrôle et Test à la fin du temps d'incubation.
- B. ECHANTILLON DANS UN BOUILLON ENRICHI ou DANS UN MILIEU CARY-BLAIR:
  - 1. Ajouter 350 µL de diluant d'échantillon à une éprouvette en utilisant la pipette compte-gouttes.
  - 2. Faire aspirer le bouillon enrichi vers le fond de la poire d'une pipette de transfert (environ 350 µL) l'ajouter au diluant d'échantillon et mélanger. Pour les échantillons Cary-Blair, faire aspirer le milieu Cary-Blair ensemencé jusqu'au deuxième repère de la pipette de transfert (environ 150 µL), l'ajouter au diluant d'échantillon et mélanger. Laisser la pipette de transfert dans l'éprouvette pour utilisation ultérieure.
  - 3. Ouvrir un sachet métallisé et retirer la carte. Mélanger au vortex l'échantillon dilué pendant 10 secondes, puis ajouter 150 µL (deuxième repère à partir de l'embout de la pipette de transfert) de l'échantillon dilué, dans le puits échantillon de la carte.
  - 4. Incuber pendant 10 minutes à 21-27 °C. Remarque: durant les 10 minutes d'incubation, l'échantillon dilué doit migrer au-delà de la ligne Contrôle.
  - 5. Visualiser la présence ou l'absence de lignes colorées en rouge/violet dans les régions Contrôle et Test à la fin du temps d'incubation.
- C. TEST SUR BOITES DE CULTURE:
  - 1. Ajouter 700 µL (2 x 350 µL) de diluant d'échantillon dans un tube à essai en utilisant le compte-gouttes.
  - 2. Utiliser un écouillon pour faire une suspension lourde (Standard McFarland 2-4) de bactéries qui se sont développées sur une plaque SMAC dans le diluant d'échantillon. Mélanger doucement.
  - 3. Ouvrir un sachet métallisé et retirer la carte. Mélanger doucement l'échantillon dilué et ajouter 150 µL (deuxième repère à partir de l'embout de la pipette) dans le puits échantillon de la carte.
  - 4. Incuber pendant 10 minutes à 21-27 °C. Remarque: durant les 10 minutes d'incubation à 21-27 °C, l'échantillon dilué doit migrer au-delà de la ligne Contrôle.
  - 5. Visualiser la présence ou l'absence de lignes colorées en rouge/violet dans les régions Contrôle et Test à la fin du temps d'incubation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

REMARQUE: Les résultats du test doivent être lus immédiatement après les 10 minutes d'incubation. Les résultats ne doivent pas être lus au-delà de 10 minutes après la période d'incubation.



**Test Positif:** Apparition de deux lignes colorées en rouge/violet: une dans la région Contrôle, et une autre dans la région Test. Un résultat positif démontre la présence de l'antigène d' *E. coli* O157 à Shiga toxines.

**REMARQUE:** Etant donnée l'importance épidémiologique d'obtenir des isolats bactériens, il est recommandé que tous les échantillons qui se révèlent positifs en toxine soit soumis à l'isolement d'organismes positifs pour les Shiga toxines. Il est souhaitable que les laboratoires de microbiologie coordonnent l'isolement des bactéries, en accord avec les agences sanitaires publiques locales.

**Test Négatif:** Apparition d'une seule ligne colorée en rouge/violet dans la région Contrôle. Aucune ligne n'est apparente dans la région Test. Un résultat négatif démontre que l'antigène d' *E. coli* O157 à Shiga toxines est absent, ou en dessous du seuil de détection.

**Test non valide:** aucune ligne colorée n'est apparente dans la région Contrôle, avec ou sans ligne colorée dans la zone Test. L'obtention de résultats non valides peut être due à un problème de la carte/des réactifs, une erreur de procédure (répéter le test) ou d'une sur-inoculation en selles dans le diluant d'échantillon (préparer une nouvelle dilution de selles et refaire le test).

CONTROLE DE QUALITE

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

Les contrôles Positif et Négatif doivent être testés selon les réglementations locales, nationales, ou fédérales. Votre laboratoire devra établir les tests de contrôles nécessaires selon cette réglementation.

Bien qu'aucune interférence de la matrice de l'échantillon n'a été observée, les contrôles fournis ont été préparés dans une matrice aqueuse et ne peuvent pas servir de contrôle pour la matrice des échantillons. Pour tout test de diagnostic, le Comité National des Indications Standards des Laboratoires Cliniques, guide C24-A, indique que des contrôles de matrice doivent être utilisés lorsqu'ils sont disponibles. Afin de suivre ces instructions, il est nécessaire pour l'utilisateur d'inclure un contrôle dans une matrice identique aux échantillons.

TEST DES REACTIFS CONTROLES

Ajouter trois gouttes de contrôle positif ou négatif directement dans le puits échantillon approprié de deux cartes séparées.

- 1. Le Contrôle Positif doit produire des lignes colorées en rouge/violet visuellement observables dans les régions Test et Contrôle après 10 minutes d'incubation à 21-27 °C.
- 2. Le Contrôle Négatif doit produire une ligne colorée en rouge/violet visuellement observable dans la région Contrôle, et aucune ligne ne doit être présente dans la région Test après 10 minutes d'incubation à 21-27 °C.

A chaque utilisation, les réactifs du coffret doivent être examinés pour déceler tous signes évidents de contaminations microbiennes, de congélation ou de fuite.

Si les réactions attendues ne sont pas observées et que les réactifs ne sont pas périmés, 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.

VALEURS ATTENDUES

Les souches *E. coli* O157 à Shiga toxines entraînent des cas d'infection sporadiques ou épidémiques. L'incidence de la maladie atteint un pic pendant les mois d'été, mais des cas se produisent toute l'année. Du fait de la nature focale de la maladie, les valeurs d'incidence varient largement avec la localisation géographique, de 0 à 3-4% dans les cas d'infection sévères. Pour cette raison, les valeurs prédictives du Test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus sont soumises à des variations. Le tableau ci-dessous donne les valeurs prédictives attendues en fonction de l'incidence.

Incidence de O157:H7	Echantillons de selles		Bouillons MacConkey		Boîtes de SMAC	
	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
4,0%	75,5%	99,2%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
3,0%	69,6%	99,4%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
2,0%	60,2%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
1,0%	42,8%	99,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,5%	27,1%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,2%	12,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,1%	6,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

LIMITES DU TEST

- Les résultats du test doivent être utilisés en association avec les informations provenant de l'évaluation clinique du patient et d'autres procédures de diagnostic.
- Le seuil de détection a été déterminé en utilisant *E. coli* O157:H7 diluée dans une solution saline. Les seuils de détection pour les souches 43888 et 43895 ATCC d'*E. coli* O157:H7 étaient respectivement de 8,3 x 10<sup>2</sup> cfu/mL et 7,67 x 10<sup>2</sup> cfu/mL.
- Un résultat de test négatif indique l'absence des antigènes d'*E. coli* à Shiga toxines, ou que les taux d'antigènes sont en dessous du seuil de détection. D'autres tests devront être réalisés avec les échantillons négatifs afin de déterminer la cause des diarrhées. La sensibilité optimale est obtenue par les méthodes de confirmation en culture.
- Certains états demandent que le test pour STEC ou pour *E. coli* O157 soit négatif, avant qu'un enfant ayant déjà eu une infection à STEC ou à *E. coli* O157 puisse retourner à l'école. Pour réduire le risque de renvoyer des enfants infectés dans leur environnement, la méthode de confirmation par culture devra être utilisée.
- Les laboratoires doivent être en accord avec les réglementations locales et nationales pour la notification des infections à STEC ou à *E. coli* O157.

PERFORMANCES DU TEST

Le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus a été évalué dans six sites.<sup>9, 10, 13-16</sup> Ces sites comprenaient quatre hôpitaux pour enfants et deux centres hospitaliers. Le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus a été testé par la méthode directe sur des selles (fraîches n=299, congelées n=483), en bouillon de culture de 24 heures (n=277) et sur des colonies négatives au Sorbitol cultivées sur milieu SMAC (n=52).

Dans le tableau présenté ci-dessous, les résultats du test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus ont été comparés au test latex réalisé sur colonies négatives au sorbitol, isolées de boîtes SMAC.

Résultats de culture O157:H7	Résultats du test ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus					
	Test direct sur selles		Bouillon MacConkey		Culture sur milieu SMAC	
	Pos.	Nég.	Pos.	Nég.	Pos.	Nég.
Positif	341	77	17	0	20	0
Négatif	5	359	0	261	0	32
Sensibilité	82%	78%-85%	100%	81%-100%	100%	83%-100%
Spécificité	99%	97%-100%	100%	99%-100%	100%	89%-100%

Le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus a montré une sensibilité de 82% et une spécificité de 99% lorsqu'il a été utilisé directement sur des selles. La sensibilité du test était plus grande lorsque la méthode de confirmation en culture était utilisée. La sensibilité et la spécificité du test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus étaient de 100% lorsque des bouillons MacConkey et des colonies de culture sur SMAC ont été évalués.

ESSAIS SUR DES ECHANTILLONS DANS UN MILIEU CARY-BLAIR MODIFIÉ

Les échantillons dans le milieu de transport Cary-Blair modifié ont été évalués à l'aide du test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Il convient de garder les échantillons à une température de 4 C avant ces essais. Il est préférable d'effectuer ces essais dans les 24 heures et de ne pas dépasser les 72 heures.

ESSAIS SUR DES ECHANTILLONS DANS UN MILIEU CARY-BLAIR MODIFIÉ

ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus	CULTURE		
	Positif	Négatif	Total
Positif	33	3	36
Négatif	6	400	406
Total	39	403	442

EVALUATION DE LA SENSIBILITE ET DE LA SPECIFICITE CARY-BLAIR

INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% EN UTILISANT LA METHODE EXACTE		
Sensibilité	70%-93%	70%-93%
Spécificité	98%-100%	98%-100%

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Trois laboratoires ont testé en triplicate six échantillons et deux contrôles, et sur trois jours différents pour chacun. Le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus a montré 100% de reproductibilité dans la région Test du système pour deux des échantillons de selles négatifs, deux positifs faibles et deux positifs intermédiaires. La reproductibilité dans la région Contrôle était de 100% pour tous les échantillons.

SPECIFICITE DU TEST

La spécificité du test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus a été contrôlée en utilisant les souches bactériennes et virales décrites ci-dessous. Les selles positives et négatives ont été inoculées avec plus de 1 x 10<sup>8</sup> microorganismes/mL et testées par le système ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. La souche *E. coli* O157:H7 a donné des résultats positifs au test. Tous les autres microorganismes ont été trouvés négatifs lorsqu'ils étaient inoculés dans des selles négatives. De plus, ils n'interfèrent pas avec les échantillons positifs.<sup>17</sup>

Microorganismes ou virus (nombre de souches testées).

Adenovirus 40 & 41 (2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)
<i>Campylobacter coli</i> (1)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (2)
<i>Campylobacter fetus</i> (1)	Rotavirus (1)
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	<i>Salmonella dublin</i> (1)
<i>Candida albicans</i> (1)	<i>Salmonella typhimurium</i> (1)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	<i>Salmonella urbana</i> (1)
<i>Clostridium difficile</i> (2)	<i>Serratia liquefaciens</i> (3)
<i>Clostridium perfringens</i> (1)	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	<i>Shigella flexneri</i> (1)
<i>Enterobacter agglomerans</i> (1)	<i>Shigella sonnei</i> (1)
<i>Escherichia coli</i> non-O157:H7 (13)	<i>Staphylococcus aureus</i> (1)
<i>Escherichia fergusonii</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan I) (1)
<i>Escherichia hermannii</i> (1)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (1)
<i>Hafnia alvei</i> (1)	<i>Streptococcus faecalis</i> (1)
<i>Helicobacter pylori</i> (1)	<i>Xanthomonas maltophilia</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)
<i>Providencia stuartii</i> (1)	
<i>Proteus vulgaris</i> (1)	

Trois bactéries donnant une réaction croisée ont été identifiées: *Salmonella hilversum*, *E. coli* O157:H38 et *E. coli* O157:H1. *Salmonella hilversum* n'est pas trouvée chez l'homme. *E. coli* O157:H38 et H1 sont rares dans les isolats d'origine humaine.

Vingt et un isolats d'*E. coli* O157:H7 de laboratoire connus ont été montré correctement positifs avec le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Aucun isolat *E. coli* O157:H7 n'a été trouvé négatif.

Des tests cliniques sur selles ont montré que le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus ne donne pas de réaction croisée avec une variété d'autres pathogènes présents dans les selles. Une liste est donnée ci-dessous:

Agents pathogènes d'échantillons de selles ne donnant pas de réaction croisée (nombre d'échantillons de selles)

<i>Aeromonas</i> (1)	<i>E. coli</i> O157:H19 (toxine négative) (1)
<i>Campylobacter</i> (34)	<i>E. coli</i> O18:H7 (1)
<i>E. coli</i> O103:H2 (1)	<i>E. coli</i> O26:H11 (4)
<i>E. coli</i> O103:NM (1)	<i>E. coli</i> O69:H47 (1)
<i>E. coli</i> O111:NM (1)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (1)
<i>E. coli</i> O113:H21 (1)	<i>Salmonella</i> spp. (18)
<i>E. coli</i> O121:NM (7)	<i>Shigella</i> (7)
<i>E. coli</i> O145:NM (1)	<i>Yersinia</i> (1)

Les souches suivantes d'*E. coli* O157 ne produisant pas de Shiga toxines, et d'*E. coli* non-O157, ont été inoculées dans des selles positives et négatives et contrôlées avec le test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus à une concentration supérieure ou égale à 6 x 10<sup>8</sup> cellules/mL. Toutes ont été trouvées comme ne donnant aucune réactivité croisée et n'interférant pas avec un résultat positif.

<i>E. coli</i> O157:H44	<i>E. coli</i> O26:H11
<i>E. coli</i> O157:H3	<i>E. coli</i> O111:NM
<i>E. coli</i> O157:H12	<i>E. coli</i> O125:NM
<i>E. coli</i> O126:H27	<i>E. coli</i> O55:B5:H-
<i>E. coli</i> O45:H2	<i>E. coli</i> #8739
<i>E. coli</i> ETEC LT	<i>E. coli</i> #9637
<i>E. coli</i> O121:H19	

ESPAÑOL



Un Inmunoensayo Rápido para la Detección de *E. coli* O157 Productora de Shiga Toxinas en Muestras de Materia Fecal Humana y en Cultivo

REF 750530

MD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

La prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus es un test rápido para la detección de antígenos producidos por *E. coli* O157, que ayuda a diagnosticar la infección por *E. coli* O157:H7. La prueba se puede utilizar para realizar un examen directo de las muestras fecales, las heces en un medio modificado Cary-Blair, o los cultivos de heces con fines de confirmación que se preparan en un caldo MacConkey o placas MacConkey de sorbitol (SMAC).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La *Escherichia coli* es un microorganismo común que hace parte de la flora normal del cuerpo humano. A pesar de que se han identificado muchos serotipos diferentes, ciertas cepas han adquirido los genes correspondientes a toxinas de otras especies bacterianas, a través de plásmidos bacteriófagos. La *E. coli* O157 productora de Shiga Toxina generalmente tiene uno o más genes que codifican para la Shiga Toxina; éstos la colocan en una categoría de parógenos que se conocen con el nombre de *E. coli* enterohemorragica productora de Shiga Toxina (STEC). Las cepas de *E. coli* STEC causan un amplio espectro de enfermedades humanas, entre las cuales se encuentran la diarrea con sangre y diarrea sin sangre, colitis hemorrágica, falla renal, síndrome hemolítico urémico (HUS) y la muerte.<sup>1-5</sup> La incidencia de morbilidad y mortalidad es especialmente alta en niños, infantes y ancianos. Además, muchos estados e instituciones requieren un resultado negativo en el test antes de volver a admitir a los niños infectados en colegios o guarderías. Las epidemias atribuidas a *E. coli* O157 han sido asociadas más comúnmente con carnes de res mal cocidas, y productos lácteos que no se han procesado bien; pero también han sido originadas a partir de hojas de lechuga, retoños de alfalfa y de rábanos, dicra de manzana no pasteurizada<sup>6-8</sup> y agua contaminada.<sup>9, 10</sup>

Hasta la fecha, la *E. coli* O157:H7 ha sido el serotipo de STEC más comúnmente descrito.<sup>6, 11, 12</sup> El CDC recomienda que se examine por la presencia de *E. coli* O157:H7<sup>6</sup> a todas las heces sanguinolentas que se presenten para un cultivo fecal rutinario. Algunos investigadores recomiendan que se examine por *E. coli* O157:H7<sup>4</sup> a todas las heces que se presenten para un cultivo fecal rutinario. La mayoría de *E. coli* O157:H7, no fermentadora de sorbitol, es móvil y posee el antígeno H7. Sin embargo, la movilidad puede ser difícil de determinar, lo cual resulta en la falla para detectar el antígeno H7. Ocasionalmente, una cepa de *E. coli* O157:H7 no fermentadora de sorbitol es inmóvil (O157:NM), o móvil con un antígeno flagelar no tipificable (O157:H-). La evaluación en el laboratorio clínico de una cepa no incluye la determinación del antígeno H7.<sup>4</sup> Las cepas de *E. coli* O157:H7 no fermentadoras de sorbitol deben considerarse patógenas, ya sea que el antígeno H7 pueda o no pueda ser detectado.<sup>4</sup> La identificación de H7 puede ser útil en la determinación epidemiológica, o con el fin de hacer reportes estatales o federales.

Los métodos actualmente usados para la determinación de *E. coli* O157:H7, productora de Shiga Toxina incluyen: 1) el cultivo en placas de agar SMAC seguido de análisis confirmatorio, 2) inmunoensayos enzimáticos (EIA), ya sea para antígenos O157 ó toxinas; y 3) cultivo en caldos de enriquecimiento seguido ya sea de tests de EIA, látex o subcultivos. Los métodos de EIA requieren por lo menos de una hora para ser completados y un alto nivel de destreza en varios pasos del procedimiento. Los métodos de cultivo requieren por lo menos de una incubación de un día para otro, y de destreza para identificar colonias sorbitol negativas, al igual que para la identificación mediante pruebas bioquímicas y / o inmunológicas. Sin embargo, los métodos de cultivo incrementan el número de microorganismos presentes hasta niveles detectables en muestras con números bajos de *E. coli* O157. El test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus fue diseñado para la detección rápida y precisa de *E. coli* O157:H7, productora de Shiga Toxina. La detección rápida y precisa de *E. coli* O157:H7, productora de Shiga Toxina, es necesaria para prevenir una mayor dispersión del microorganismo, evitar procedimientos innecesarios como la cirugía, y como guía para decisiones relacionadas con el tratamiento.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS

Las heces o el material proveniente de cultivo es diluido y añadido al puerto de la Muestra en la tarjeta. La muestra moviliza las partículas de oro recubiertas con anticuerpos monoclonales específicos para el lipopolisacárido de la *E. coli* O157:H7, y migra a lo largo de la membrana a través de las zonas de Test y de Control. La zona de test contiene anticuerpo monoclonal inmovilizado específico para un epítipo común en la *E. coli* productora de Shiga Toxina. Después de diez minutos las zonas de Test y de Control son observadas para determinar la presencia de líneas rojas o violetas a través de la superficie de la membrana. En caso de que una cepa de *E. coli* O157 productora de Shiga Toxina esté presente en la muestra, se forma un complejo entre el anticuerpo de captura, la *E. coli* O157 productora de Shiga Toxina, y el conjugado de anticuerpo monoclonal-oro, el cual puede demostrarse visualmente como una línea roja o violeta en la zona de Test. La ausencia de una línea roja o violeta en la línea de Test es indicativa de un resultado negativo. La línea de Control sirve como un control interno del procedimiento, para asegurar que la muestra ha migrado la distancia apropiada a lo largo de la membrana.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- 1. Tarjetas ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus - Tarjetas individualmente empacadas que contienen anticuerpo monoclonal específico para un epítipo común de la E. coli productora de Shiga Toxina (zona de Test), anticuerpo IgG anti-murino (caprino) (zona de Control), y anticuerpo monoclonal específico para el lipopolisacárido de la E. coli O157 conjugado con partículas de oro.
- 2. Control Positivo - E. coli O157:H7 inactivada en una solución que contiene azida de sodio al 0,094% como conservante.
- 3. Control Negativo - E. coli O157:H12 inactivada en una solución que contiene azida de sodio al 0,094% como conservante.
- 4. Diluyente para Muestras - Solución que contiene azida de sodio al 0,094% como conservante.
- 5. Pipetas de Transferencia

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- 1. Pipetas de Transferencia
- 2. Cronómetro

MATERIALES OPCIONALES NO PROPORCIONADOS

- 1. Caldo de MacConkey (5,0 mL por tubo)
- 2. Agar MacConkey con Sorbitol (SMAC)
- 3. Incubadora
- 4. Hisopos de algodón
- 5. Estándares de McFarland (#2 al #4)
- 6. Medio modificado Cary-Blair

PRECAUCIONES

- 1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
- 2. Las direcciones se deben leer y seguir cuidadosamente.
- 3. La concentración de los reactivos, los tiempos de incubación y las temperaturas (21-27 C) han sido optimizados para garantizar la sensibilidad y especificidad del procedimiento. Cifándose a estas especificaciones se obtienen mejores resultados. Una vez que el ensayo ha comenzado, los pasos subsiguientes deben ser completados sin interrupción.
- 4. Antes de ser usados, todos los reactivos deben ser mezclados suavemente y atemperados entre 21-27 C.
- 5. Sujete los viales de los Controles Positivos y Negativos verticalmente sobre el pozillo para asegurarse de que se dispensen gotas de tamaño adecuado.
- 6. No permita que las puntas de los viales o de la pipeta toquen los puertos de la Muestra.
- 7. Todos los reactivos ya vienen diluidos a la concentración adecuada y no deben diluirse más.
- 8. Las pipetas de transferencia que son suplidas con el equipo deben estar marcadas con intervalos según el diagrama en NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO. Cuando las instrucciones pida que use la pipeta de transferencia suplida con el equipo, no use la pipeta con marcas que son diferentes a las del diagrama. Use una por muestra.
- 9. No deben intercambiarse reactivos provenientes de distintos lotes de kit.
- 10. Las tarjetas de prueba vienen en bolsas de aluminio que excluyen la humedad durante el almacenamiento. Revise las bolsas de aluminio antes de abrir. No use la tarjeta de prueba si la bolsa aparece tener rotos o no fue sellada apropiadamente. Resultados falsos negativos pueden resultar si los componentes y reactivos del equipo no se almacenan adecuadamente.
- 11. Los reactivos del Control Positivo y Negativo contienen E. coli inactivadas. Pero de todas maneras deben ser manejados como si fueran elementos biológicos nocivos.
- 12. No utilice componentes del kit después de la fecha de expiración de éstos, la cual se encuentra marcada en sus rótulos.
- 13. No use reactivos que no tengan etiqueta, número de lote o fecha de expiración.
- 14. Asegúrese de colocar correctamente las tapas de color en los viales que les corresponden.
- 15. Tanto las muestras de los pacientes como las Tarjetas ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus pueden contener agentes infecciosos y deberán manejarse a un nivel de Bioseguridad 2 tal y como se recomienda en el manual CDC/NIH (Centro para el Control de Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud de los EE.UU.) "Seguridad Biológica en Laboratorios de Microbiología y Biomedicina."
- 16. Algunos reactivos presentes en este kit contienen azida de sodio que resulta irritante para la piel. Por favor, evite el contacto con estos reactivos. Al desechar reactivos que contienen azida de sodio en tuberías de plomo o de cobre, pueden formarse compuestos explosivos de azidas metálicas. Esto puede evitarse enjuagando con cantidades copiosas de agua los desagües, durante el momento en que se desechan estos reactivos.
- 17. Deseche las muestras de heces como material nocivo. Inactive los cultivos usando un autoclave a 121 C por 15 min antes de desecharlos.
- 18. Cualquier desviación que esté por encima o por debajo de los tiempos de incubación indicados puede afectar la sensibilidad y especificidad de la prueba, y debe ser evitada.
- 19. Las muestras de materia fecal deben mezclarse concienzudamente, sin importar cual fuere su consistencia, con el objeto de que la muestra que va a ser pipeteada sea representativa de la materia feca.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

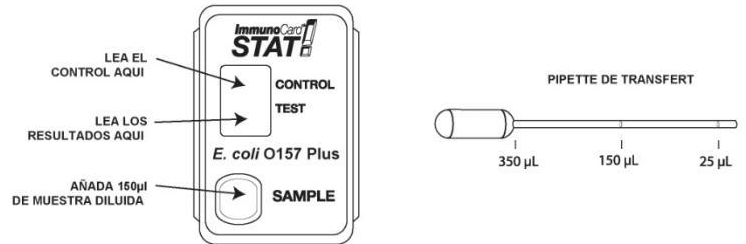
No se conoce ningún riesgo asociado con este producto.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de vencimiento aparece en la etiqueta del paquete. Almacene el paquete a 2-8 C cuando no está en uso.

NOTAS PARA EL PROCEDIMIENTO

- 1. El diagrama que se muestra arriba corresponde al formato de la Tarjeta de Test ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus.
- 2. Es posible correr una serie de muestras o controles siempre y cuando se mantenga precisión en la secuencia de adición de los reactivos y los tiempos de incubación, y en la lectura de cada tarjeta.
- 3. La zona Control de cada Tarjeta de Test constituye un control interno del procedimiento para asegurar que la muestra ha migrado suficientemente dentro de la tarjeta, lo cual posibilita que la lectura de la prueba sea válida.



PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- 1. Todos los reactivos vienen listos para ser usados y no requieren de diluciones adicionales.
- 2. Permita que los componentes del kit se aclimaten entre 21-27 C antes de usarlos.
- 3. Mezcle suavemente los reactivos líquidos antes de usarlos.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las heces se pueden examinar ya sea directamente, como se obtienen del medio modificado Cary- Blair o luego de ser cultivadas en un caldo MacConkey o en una placa SMAC. Las muestras de heces deben ser recibidas en un recipiente cerrado y que no deje penetrar aire, y éstas pueden almacenarse por un término hasta de 72 horas entre 2- 8 C antes de ser analizadas o cultivadas. En caso de que las muestras no puedan ser analizadas en un término de 72 horas, éstas deben congelarse. Para hacer la confirmación mediante cultivo, después de ser recibidas en el laboratorio, las muestras de materia fecal deben sembrarse tan pronto como sea posible en caldo de MacConkey o en placas de agar SMAC. El congelamiento de las muestras antes de cultivarse puede afectar la recuperación de organismos viables.

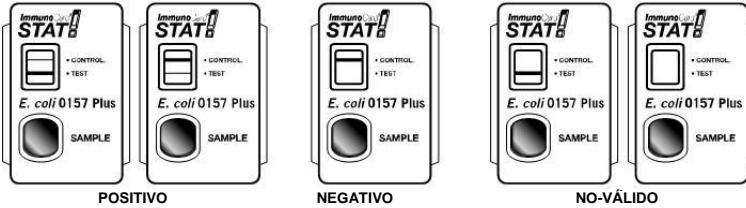
- 1. CALDO DE ENRIQUECIMIENTO: Añada aproximadamente 50 mL de materia fecal a 50 mL de caldo MacConkey, e incube a 42 ± 1 C durante 16-24 horas.
- 2. CULTIVO EN PLACA DE AGAR: Siembre la materia fecal o el aislado de cultivo en una placa de agar SMAC, e incube a 35 ± 1 C durante 16-24 horas.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- A. DIRECTO CON MATERIAL FECAL:
  - 1. Añada 350 mL de Diluyente para Muestras a un tubo de ensayo utilizando el ensamble con gotero.
  - 2. Mezcle la materia fecal concienzudamente antes de pipetearla:
    - a. Para muestras de Materia Fecal Líquida o Semi-sólida, aspire la muestra mezclada hasta la primer marca de la pipeta (25 mL) de transferencia. Añada el aspirado al diluyente para Muestras y mezcle. Nota: no pipetee más de 25 mL de materia fecal, pues la inoculación con mayor cantidad de muestra puede producir resultados inválidos. Deje la pipeta de transferencia dentro del tubo para usar luego.
    - b. En aquellas muestras que resultan imposibles de pipetear por su consistencia, utilice un aplicador de madera y transfiera una porción pequeña (2 mm de diámetro) de materia fecal muy bien mezclada al tubo con el Diluyente para Muestra, emulsificando las neces concienzudamente con el aplicador. Coloque una pipeta de transferencia dentro del tubo para usar luego.
  - 3. Abra una de las bolsas de papel aluminio y extraiga la Tarjeta. Mezcle en un vórtex la muestra diluida durante 10 segundos. Luego añada 150 mL (segunda marca en la pipeta de transferencia) de materia fecal diluida en el puerto de Muestra de la Tarjeta.
  - 4. Incube durante 10 minutos entre 21-27 C. Nota: durante la incubación de 10 minutos, la muestra diluida debe migrar por encima de la línea de Control.
  - 5. Observe y lea las zonas de Control y de Test determinando la presencia o ausencia de una línea roja a violeta al final del período de incubación.
- B. ENRIQUECIMIENTO DEL CALDO o ESPECIMEN CARY-BLAIR:
  - 1. Agrege 350 µL del Diluyente de muestra a un tubo de ensayo usando el conjunto del gotero.
  - 2. Extraiga un cultivo del caldo de la base del bulbo a una pipeta de transferencia (aproximadamente 350 µL) y agréguela al diluyente muestra, mézclelos. Para los especímenes Cary-Blair, extraiga un medio Cary-Blair inoculado hasta la segunda línea de la pipeta de transferencia (aproximadamente 150 µL) y agréguelo al diluyente muestra, mézclelos. Deje la pipeta de transferencia en el tubo para usar más adelante.
  - 3. Abra una de las bolsas de papel aluminio y extraiga la Tarjeta de Test. Mezcle en un vórtex la muestra diluida durante diez segundos. Luego añada 150 mL (segunda marca en la pipeta de transferencia) de muestra diluida en el puerto de Muestra de la Tarjeta de Test.
  - 4. Incube durante diez minutos entre 21-27 C. Nota: durante la incubación de 10 minutos, la muestra diluida debe migrar por encima de la línea de Control.
  - 5. Observando y leyendo las zonas de Control y de Test determine la presencia o ausencia de una línea roja a violeta al final del período de incubación.
- C. CULTIVO EN PLACA DE AGAR:
  - 1. Añada 700 mL (2 x 350 mL) de Diluyente para Muestras a un tubo de ensayo utilizando el ensamble con gotero provisto.
  - 2. Utilice un hisopo para hacer una suspensión bastante concentrada (estándar de McFarland de 2-4) de las colonias sospechosas que han crecido en el plato de agar SMAC con Diluyente para Muestras. Mezcle ligeramente.
  - 3. Abra una de las bolsas de papel aluminio y extraiga la Tarjeta de Test. Mezcle suavemente en un vórtex la muestra diluida. Luego añada 150 mL (segunda marca en la pipeta de transferencia) en el puerto de Muestra de la Tarjeta.
  - 4. Incube durante diez minutos entre 21-27 C. Nota: durante la incubación de 10 minutos, la muestra diluida debe migrar por encima de la línea de Control.
  - 5. Observando y leyendo las zonas de Control y de Test, determine la presencia o ausencia de una línea roja a violeta al final del período de incubación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Nota: Los resultados del test deben leerse inmediatamente después de que se completen los 10 minutos del período de incubación. Los resultados no deben ser leídos después de 10 minutos adicionales.



**Resultado Positivo del test:** Líneas de color rojo a violeta, visualmente detectables, en las zonas de Control y de Test. Un resultado positivo indica la presencia de antígenos provenientes de *E. coli* O157 productora de Shiga Toxina.

**NOTA:** A la vista de la importancia epidemiológica en cuanto a la obtención de aislados de bacteria, se recomienda que todas las muestras toxina-positivas sean procesadas para el aislamiento de organismos Shigatoxina -positivos. Sugerimos que cada laboratorio de microbiología en particular coordine el aislamiento de bacterias con su correspondiente laboratorio local de salud pública.

**Resultado Negativo del test:** línea fácilmente detectable y de color rojo a violeta en la zona de Control. No hay una línea de color rojo a violeta presente en la zona de Test. Un resultado negativo indica que no hay antígenos provenientes de *E. coli* O157 productora de Shiga Toxina, o que la cantidad que hay es menor que el nivel de detección del test.

**Resultado No-válido del test:** no hay una línea de color rojo a violeta que se pueda detectar visualmente en la zona de Control, ya sea con un a línea detectable o no, de color rojo a violeta en la línea de Test. Los resultados no-válidos en el test pueden deberse a problemas con los reactivos o la Tarjeta de Prueba, problemas en el procedimiento (repetir la prueba), o a la inoculación excesiva de materia fecal en el Diluyente para Muestras (vuelva a diluir la materia fecal y repita el test).

CONTROL DE CALIDAD

**Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.** Los controles Positivo y Negativo deben ser probados de acuerdo con los requerimientos de las entidades reguladoras locales. Es posible que para el control del análisis su laboratorio hay establecido requerimientos adicionales a las recomendaciones de estas entidades.

A pesar de que no se ha establecido interferencia por parte de la matriz en este test, los reactivos control están suministrados en una matriz en solución acuosa; por lo tanto, es posible que no sean un control adecuado para la matriz de la muestra. Para cualquier prueba diagnóstica, el Comité nacional para la Estandarización de Laboratorios Clínicos, en su guía C24-A, indica que deben usarse materiales de control de materia cuando éstos se hallen disponible. Para poder cumplir con esta guía, puede ser necesario que el usuario proporcione material de control en la matriz de la muestra.



ANÁLISIS DE LOS REACTIVOS DE CONTROL

Añada tres gotas de Control Positivo o Negativo al puerto inferior de dos tarjetas separadas.

- El Control Positivo deberá mostrar dos líneas fáciles de distinguir, de color rojo o violeta: una en la zona de Control, y otra en la de Test, después de ser incubado durante diez minutos entre 21-27 C.
- El Control Negativo deberá mostrar una línea fácil de distinguir, de color rojo a violeta en la zona de Control, y no deberá exhibir una línea en la zona de Test.

Los componentes del kit deben ser examinados en el momento de ser usados para determinar la presencia de signos de contaminación, congelamiento o derrame.

Si los resultados esperados para el control no son observadas, y los reactivos todavía no hayan expirado, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

VALORES ESPERADOS

La *E. coli* O157 productora de Shiga toxina causa enfermedad en brotes epidémicos y esporádicos. Mientras que la incidencia de enfermedad aumenta en los meses de verano, los casos se presentan durante todo el año. Debido a la naturaleza focal de la enfermedad, los valores de la incidencia varían ampliamente de acuerdo con la localización geográfica; desde cero hasta 3- 4% durante brotes severos. Por esta razón, los valores predictivos del test ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus están sujetos a variación. Las tablas que se muestran más abajo dan los valores predictivos en base de la incidencia.

O157:H7 Incidencia	Muestras de Materia fecal		Caldo MacConkey		Plato de agar SMAC	
	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
4,0%	75,5%	99,2%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
3,0%	69,6%	99,4%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
2,0%	60,2%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
1,0%	42,8%	99,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,5%	27,1%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,2%	12,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,1%	6,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados del test deben ser usados en conjunto con la información disponible al respecto de la evaluación clínica del paciente, y con los resultados de otros procedimientos diagnósticos.
- El límite de detección fue determinado utilizando *E. coli* O157:H7 diluida en solución salina. El límite de detección para *E. coli* O157:H7 cepas ATCC 43888 y 43895 fue de 8,3 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, y de 7,67 x 10<sup>5</sup> UFC/mL, respectivamente.
- Un resultado negativo en el test indica la ausencia de antígenos provenientes de *E. coli* O157, o que los niveles de antígenos están por debajo del límite de detección de este test. Análisis adicionales deben ser realizados en muestras negativas para determinar la causa de la diarrea. Mediante métodos confirmatorios de cultivo, se puede obtener una sensibilidad óptima.
- Varios estados requieren un resultado negativo para *E. coli* entero hemorrágica productora de Shiga Toxina (STEC), o en un test para *E. coli* O157, antes de permitir que un niño que ha tenido infección por *E. coli* O157 STEC pueda regresar al colegio, o a una guardería. Con este objeto, y para disminuir el riesgo de regresar a estos ambientes a niños que puedan resultar infectando a otros, un método confirmatorio de cultivo debe ser usado.
- Los laboratorios deben cumplir con todos los reglamentos locales y gubernamentales para reportar los casos de STEC o enfermedad por *E. coli* O157.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

La prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus fue evaluado en seis lugares.<sup>9, 10, 13-16</sup> Los lugares incluyeron cuatro hospitales para niños y dos hospitales generales. La prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus fue realizado en muestras directas de materia fecal (n=299 frescas, 483 congeladas), cultivos de 24 hr. En caldo (n=277) y en colonias sorbitol negativas obtenidas a partir de platos de agar SMAC (n=52).

En la table que se muestra abajo, los resultados obtenidos con la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus son comparados con análisis de pruebas de aglutinación de látex de colonias sorbitol negativas, obtenidas a partir de palcos de agar SMAC.

Resultados del cultino de O157:H7	Resultados la prueba ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus					
	Materia Fecal Directa		Caldo MacConkey		Plato de agar SMAC	
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.
Pos.	341	77	17	0	20	0
Neg.	5	359	0	261	0	32
Sensibilidad	82%	78%-85%	100%	81%-100%	100%	83%-100%
Especificidad	99%	97%-100%	100%	99%-100%	100%	89%-100%

Al analizar muestras directas de materia fecal con la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus, la sensibilidad y especificidad encontradas fueron de 82% y 99%, respectivamente. La sensibilidad del test aumentó cuando se utilizaron métodos de confirmación mediante cultivo. Cuando se analizaron colonias obtenidas a partir de caldo MacConkey y de palcos de agar SMAC, la sensibilidad y especificidad la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus fue de 100%.

PRUEBAS DEL ESPÉCIMEN CARY-BLAIR MODIFICADO

Se evaluaron especímenes en medio de transporte Cary-Blair modificado usando la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Se debe mantener los especímenes a 4 C hasta realizar la prueba. Se debe realizar preferiblemente la prueba de los especímenes dentro de 24 horas, pero no más tarde de 72 horas.

PRUEBAS DEL ESPÉCIMEN CARY-BLAIR MODIFICADO

ImmunoCard STAT! <i>E. coli</i> O157 Plus	CULTIVO		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	33	3	36
Negativo	6	400	406
Total	39	403	442

REPRODUCIBILIDAD

Tres laboratorios de consultorios médicos analizaron seis muestras y dos controles por triplicado, y en tres días distintos. La línea de la zona de Test de la Tarjeta ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus demostró una reproducibilidad del 100% con dos muestras negativas, dos positivas bajas y dos positivas medias de materias fecales. La línea de Control demostró una reproducibilidad del 100% con todas las muestras.

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA

La especificidad la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus fue estudiada utilizando las cepas bacterianas o virales que están anotadas a continuación. Muestras Positivas y Negativas de materia fecal fueron adicionadas con  $\geq 1 \times 10^8$  organismos/mL y analizadas con la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. Cuando las cepas de *E. coli* O157:H7 fueron analizadas, éstas dieron resultado positivo. Todos los demás organismos dieron resultado negativo al ser adicionados a las muestras negativas de materia fecal. Además, ellos no interfirieron con la muestra positiva.<sup>17</sup>

Microorganismos o virus (# de cepas probadas)

*Adenovirus* 40 & 41 (2)  
*Campylobacter coli* (1)  
*Campylobacter fetus* (1)  
*Campylobacter jejuni* (1)  
*Candida albicans* (1)  
*Citrobacter freundii* (1)  
*Clostridium difficile* (2)  
*Clostridium perfringens* (1)  
*Enterobacter cloacae* (1)  
*Enterobacter agglomerans* (1)  
*Escherichia coli* non-O157:H7 (13)  
*Escherichia fergusonii* (1)  
*Escherichia hermannii* (1)  
*Haflnia alvei* (1)  
*Helicobacter pylori* (1)  
*Klebsiella pneumoniae* (1)  
*Providencia stuartii* (1)  
*Proteus vulgaris* (1)

*Pseudomonas aeruginosa* (1)  
*Pseudomonas fluorescens* (2)  
*Rotavirus* (1)  
*Salmonella dublin* (1)  
*Salmonella typhimurium* (1)  
*Salmonella urbana* (1)  
*Serratia liquefaciens* (3)  
*Shigella dysenteriae* (1)  
*Shigella flexneri* (1)  
*Shigella sonnei* (1)  
*Staphylococcus aureus* (1)  
*Staphylococcus aureus* (Cowen I) (1)  
*Staphylococcus epidermidis* (1)  
*Streptococcus faecalis* (1)  
*Xanthomonas maltophilia* (1)  
*Yersinia enterocolitica* (1)

Se han identificado tres bacterias que presentan reactividad cruzada: *Salmonella hilversum*, *E. coli* O157:H38 y *E. coli* O157:H1 . La *Salmonella hilversum* no es aislada en humanos. *E. coli* O157:H38 y H1 son rara vez aisladas en humanos.

Veintiuna cepas conocidas de *E. coli* O157:H38 y aisladas en laboratorio fueron correctamente identificadas como positivas en la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus. No se sabe de ningún aislado de *E. coli* O157:H7 que dé resultado negativo.


El análisis clínico con muestras de materia fecal demostró que la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus no daba reacciones de reactividad cruzada con una variedad de microorganismos patógenos presentes en materia fecal. A continuación están anotados los pató genos presentes en materia fecal y que no presentaron raecciones de reactividad cruzada en el test Immunocard:

Patógenos fecales que no presentan reactividad cruzada Microorganismo (número de materias fecales)	
<i>Aeromonas</i> (1)	<i>E. coli</i> O157:H19 (toxina negativa) (1)
<i>Campylobacter</i> (34)	<i>E. coli</i> O18:H7 (1)
<i>E. coli</i> O103:H2 (1)	<i>E. coli</i> O26:H11 (4)
<i>E. coli</i> O103:NM (1)	<i>E. coli</i> O69:H47 (1)
<i>E. coli</i> O111:NM (1)	<i>Plesiomonas shigelloides</i> (1)
<i>E. coli</i> O113:H21 (1)	<i>Salmonella</i> spp. (18)
<i>E. coli</i> O121:NM (1)	<i>Shigella</i> (7)
<i>E. coli</i> O145:NM (1)	<i>Yersinia</i> (1)

Las siguientes cepas de *E. coli* O157 no productoras de Shiga Toxina al igual que las siguientes cepas de *E. coli* O157 fueron adicionadas a muestras de materia fecal positiva y negativa, y luego analizadas con la Tarjeta la prueba ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus a una concentración  $\geq 6 \times 10^8$  células/mL. Los resultados del análisis demostración que ninguna de estas cepas daba reacción de reactividad cruzada, ni tampoco interfería con un resultado positivo en la prueba.

<i>E. coli</i> O157:H44	<i>E. coli</i> O26:H11
<i>E. coli</i> O157:H3	<i>E. coli</i> O111:NM
<i>E. coli</i> O157:H12	<i>E. coli</i> O125:NM
<i>E. coli</i> O126:H27	<i>E. coli</i> O55:B5:H-
<i>E. coli</i> O45:H2	<i>E. coli</i> #8739
<i>E. coli</i> ETEC LT	<i>E. coli</i> #9637
<i>E. coli</i> O121:H19	

DEUTSCH



# STAT! *E. coli* O157 Plus

Immunchromatographischer Schnelltest zum Nachweis von Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* O157 in menschlichen Stuhlproben und in Kulturen

REF

750530

IVD

In-Vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus-Immunoassay ist ein Schnelltest zum Nachweis von Antigenen des Shiga-Toxin produzierenden *E. coli* O157 in humanem Stuhl und unterstützt die Diagnosestellung bei *E. coli* O157:H7 –Infektionen. Der Test kann zur Untersuchung von unbehandelten Stuhlproben, von Stuhl in modifiziertem Cary-Blair-Transportmedium und bestätigenden Stuhlkulturen in MacConkey-Bouillon bzw. auf Sorbitol-MacConkey-(SMAC)-Platten verwendet werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

*Escherichia coli* ist ein in der normalen menschlichen Flora weit verbreiteter Mikroorganismus. Viele verschiedene Serotypen sind bisher identifiziert, manche Stämme haben die Gene zur Toxinbildung von anderen Bakterienspezies durch Bakteriophagen-Plasmide erworben. Das Shiga -Toxin produzierende *E. coli* O157 besitzt normalerweise ein oder mehrere Gene für das Shiga-Toxin, so dass es zu der Erregerkategorie der Shiga-Toxin produzierenden enterohämorrhagischen *E. coli* (STEC) zu zählen ist. STEC-Stämme von *E. coli* verursachen ein breites Spektrum menschlicher Erkrankungen, einschließlich blutiger und nicht-blutiger Darierhnen, hämorrhagischer Kolitis, Nierenversagen, hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) und sie können auch zum Tod führen.<sup>1-5</sup> Die Morbiditäts- und Mortalitätsraten bei Kleinkindern, Kindern und älteren Menschen sind besonders hoch. Hinzu kommt, dass viele Länder und Institutionen ein negatives Testergebnis verlangen, bevor infizierte Kinder wieder zu Schule gehen. Epidemien, die mit dem *E. coli* O157 verbunden sind, wurden assoziiert mit unzureichend gekochtem Rindfleisch, Milchprodukten, ebenso mit Kopfsalat, Rettich-Sprossen, Alfalfa-Sprossen, nicht pasteurisierten Apfelmost<sup>6-8</sup> und verunreinigtes Wasser zurückzuführen.<sup>9, 10</sup>

Bis jetzt ist der *E. coli* O157:H7 der am häufigsten beschriebene STEC Serotyp.<sup>6, 11, 12</sup> Das US-amerikanische Center for Disease Control (CDC) empfiehlt, alle blutigen Stuhlproben routinemäßig mittels Kultur auf *E. coli* O157:H7 zu untersuchen.<sup>6</sup> Einige Autoren schließen sich dieser Empfehlung an.<sup>4</sup> Die meisten *E. coli* O157, die nicht zu den Sorbit-abbauenden gehören, sind beweglich und besitzen das H7-Antigen. Die Mobilität ist jedoch unter Umständen schwierig zu erkennen, so dass das H7-Antigen nicht entdeckt wird. Gelegentlich ist ein nicht-Sorbit-abbauender Stamm von *E. coli*O157 entweder unbeweglich (O157:NM) oder beweglich mit einem untypischen Flagellum-Antigen (O157:H-). Die klinische Laborbewertung eines Stammes muss nicht die H7-Antigen-Bestimmung beinhalten.<sup>4</sup> Der nicht-Sorbit-abbauende *E. coli* O157 sollte als pathogen eingestuft werden, unabhängig davon, ob ein H7-Antigen gefunden wurde oder nicht.<sup>4</sup> Die Bestimmung von H7 kann epidemiologisch von Nutzen sein oder für Berichte an Länder- und staatliche Behörden dienen.

Die gegenwärtigen Methoden zum Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 umfassen: 1) die Kultivierung auf SMAC-Platten mit einem anschließenden bestätigenden Test, 2) Enzymimmuno-Tests auf O157-Antigene oder Toxine und 3) Anreicherung in einer Bouillon mit einem anschließenden EIA, Latex-Test oder einer Subkultur. Die EIA-Methoden benötigen wegen ihrer vielen Arbeitsschritte ungefähr eine Stunde zur Durchführung sowie ein hohes Maß an Erfahrung. Bei den Kultur-Methoden ist mindestens eine Inkubation über Nacht und Erfahrung in der Identifizierung von Sorbit-negativen Kolonien sowie in der biochemischen und/oder immunologischen Identifizierung notwendig. Allerdings vervielfachen die Kulturmethoden die Anzahl der Organismen auf nachweisbare Konzentrationen in Proben mit kleiner Anzahl an *E. coli* O157. Der ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus Test wurde für den schnellen und exakten Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 entwickelt. Ein exakter und schneller Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 ist notwendig, um eine weitere Ausbreitung des Organismus oder auch um unnötige Maßnahmen wie Operationen zu vermeiden und um die richtigen Therapiemöglichkeiten zu finden.

**BIOLOGISCHE PRINZIPIEN**

Stuhl- oder Kulturmateriale werden vorbereitet bzw. verdünnt und in das Probenfenster der Karte gegeben. Die Probe fixiert Goldpartikel, die mit monoklonalen Antikörpern gegen *E. coli* O157 Lipopolysaccharid beschichtet sind, und wandert entlang der Membran durch die Test- und die Kontrollzonen. Die Testzone enthält fest gebundene monoklonale Antikörper, die spezifisch für ein Epitop sind, das die Shiga-Toxin bildenden *E. coli* gemeinsam haben. Nach 10 Minuten wird mit bloßem Auge überprüft, ob sich in den Test- und Kontrollzonen rote bis purpurne Linien quer über der Membranoberfläche gebildet haben. Wenn die Probe Shiga- Toxin bildende *E. coli* O157 enthält, bildet sich ein Komplex zwischen dem Capture- Antikörper, dem Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 und dem monoklonalen Antikörper-Gold-Konjugat, der als rote bis purpurne Linie in der Testzone zu erkennen ist. Wenn keine rote bis purpurne Linie in der Testzone zu sehen ist, liegt ein negatives Ergebnis vor. Die Kontrolllinie dient als Verfahrenskontrolle und stellt so sicher, dass die Probe über eine ausreichende Entfernung entlang der Membran gewandert ist.

**REAGENZIE/MITGELIEFTE MATERIALIEN**

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

1. ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus Testvorrichtungen - Einzeln in Folie verpackte Karten mit folgenden Bestandteilen: fest gebundene monoklonale Antikörper spezifisch für ein Epitop, das die Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 gemeinsam haben (in der TESTzone), Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (in der KONTROLLzone) und monoklonale Antikörper gegen *E. coli* O157 Lipopolysaccharide konjugiert mit Goldpartikeln.
2. Positiv-Kontrolle - inaktiviertes *E. coli* O157:H7 in einem Puffer mit 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel.
3. Negativ-Kontrolle - inaktiviertes *E. coli* O157:H12 in einem Puffer mit 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel.
4. Proben-Verdünnungspuffer - Puffer mit 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel.
5. Transfer-Pipetten

**ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN**

1. 12 x 75 mm Reagenzröhrchen
2. Stoppuhr

**BEI BEDARF ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN**

1. MacConkey Bouillon (5,0 mL/Reagenzröhrchen)
2. MacConkey Agar mit Sorbit (SMAC)
3. Brutschrank
4. Tupfer
5. McFarland Standards (Nr.2 bis Nr.4)
6. Modifizierter Cary-Blair-Medium

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Die Testanweisungen sind vor jeder Testdurchführung gründlich durchzulesen.
3. Die Reagenzienkonzentrationen, die Inkubationszeiten und Temperaturen (21–27 C) wurden im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn diese Vorgaben eingehalten werden. Sobald Sie den Test anfangen, alle nachfolgende Testschritte ohne Unterbrechung abschließen.
4. Die Reagenzien des Testkits sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-27 C) gebracht werden und vorsichtig gemischt werden.
5. Die Kontrollfläschchen senkrecht halten, um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen der richtigen Größe zu erzielen.
6. Die Spitze des Fläschchens oder die Pipette darf das Testgerät nicht berühren.
7. Alle Reagenzien werden in der fertigen Arbeitskonzentration geliefert. Nicht weiter verdünnen.
8. Die im Kit enthaltenen Pipetten sind auf dem Pipettendiagramm im Abschnitt VERFAHRENSHINWEISE in geeigneten 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. Eine Pipette pro Probe verwenden.
9. Reagenzien verschiedener Kit-Chargennummern nicht gegeneinander austauschen.
10. 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.
11. Die positive Kontrolle und die negative Kontrolle enthalten inaktivierte *E. coli* Bakterien. Diese Kontrollen sollten als potenziell infektiöse Materialien gehandhabt werden.
12. Kit oder Komponenten nicht über das Verfallsdatum hinaus verwenden.
13. Keine Fläschchen ohne Etikett, Chargennummer oder Verfallsdatum verwenden.
14. Die Fläschchen mit den richtigen farbigen Deckeln verschließen
15. Patientenproben und ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus Testkarten können infektiös sein und sollten nach den Biosafety Level 2-Empfehlungen des CDC/NIH Handbuchs "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" gehandhabt werden.
16. 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 Metalloxyd bilden. Daher müssen die Röhrchen reichlich mit Wasser nachgespült werden, um das Metalloxyd herauszulösen.
17. Stuhlproben müssen als potenziell infektiöses Material entsorgt werden. Vor dem Entsorgen die Kulturen im Autoklaven mindestens 15 Minuten lang bei 121 C inaktivieren.
18. Alle Abweichungen (nach oben oder unten) von den festgelegten Inkubationsdauern können sich auf die Empfindlichkeit und die Spezifität auswirken und sind zu vermeiden.
19. Der Stuhl ist ungeachtet seiner Konsistenz vor dem Pipettieren gut zu mischen, um eine repräsentative Probe zu gewährleisten.

**GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE**

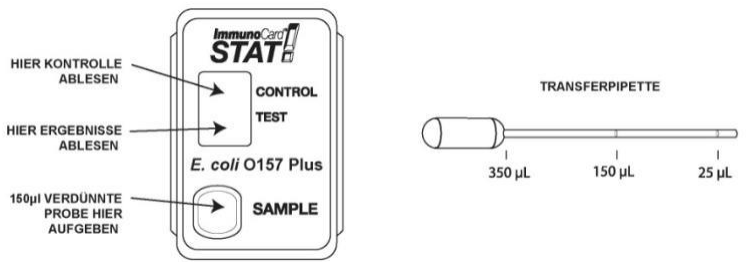
Es gibt keine bekannten Gefahren die mit diesem Produkt verbunden sind.

**HALTBARKEIT UND LAGERUNG**

Das Verfallsdatum finden Sie auf dem Etikett des Kits. Wenn nicht verwendet, das Kit bei 2-8 C aufbewahren.

**HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG**

1. Die ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus-Testkarte ist unten abgebildet.
2. Die Analyse einer großen Serie von Proben oder Kontrollen ist möglich, vorausgesetzt, dass die Inkubationszeiten für jede Karte eingehalten werden.
3. Die KONTROLLzone jeder Karte dient als Verfahrenskontrolle, die sicherstellt, dass die Probe ausreichend weit in der Karte gewandert ist und so ein gültiges Testresultat abgelesen werden kann.



**VORBEREITUNG DER REAGENZIE**

1. Alle Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert und müssen nicht verdünnt werden.
2. Alle Bestandteile des Testkits vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-27 C) bringen.
3. Flüssige Reagenzien vor Gebrauch vorsichtig durchmischen.

**PROBENNAHME UND- VORBEREITUNG**

Stuhl kann unbehandelt, im Cary-Blair-Medium, in MacConkey-Bouillon oder auf einer SMAC-Platte untersucht werden. Stuhlproben sollten in einen luftdichten Behälter abgenommen werden, sie können bis zu 72 Stunden vor der Analyse bei 2 -8 C oder vor dem Anzüchten gelagert werden. Die Proben sofort nach Abnahme einfrieren, wenn die Analyse nicht innerhalb von 72 Std. abgeschlossen werden kann. Zur Bestätigung von Ergebnissen aus Kulturen sollten die MacConkey Bouillon oder die SMAC-Platte so bald wie möglich nach der Abnahme der Stuhlprobe angesetzt werden. Das Einfrieren der Stuhlproben vor dem Anzüchten kann das Feststellen von lebenden Organismen beeinträchtigen.

1. Anreicherung in der Bouillon: 50 µL Stuhl zu 5 mL MacConkey Bouillon geben und bei 42 ± 1 C 16-24 Stunden lang inkubieren.
2. Plattenkulturen: Stuhl, Bouillon-oder Kultur-Isolate auf SMAC-Platten ausstreichen und bei 35 ± 1 C 16-24 Stunden lang inkubieren.

**TESTDURCHFÜHRUNG**

- A. DIREKTE STUHLPROBE:

1. 350 µL Probenverdünnungspuffer mit der Pipettenmontur in ein Reagenzröhrchen geben.

2. Stuhl so sorgfältig wie möglich vor dem Pipettieren durchmischen:

a. Bei flüssigen oder halbfesten durchgemischten Stuhlproben bis zur ersten Markierung (25 µL) der Transferpipette aufziehen. Zum Probenverdünnungspuffer geben und mischen.
**Achtung:** nicht mehr als 25 µL Stuhl pipettieren. Ein Animpfen mit zuviel Stuhlmateriale kann ungültige Resultate erzeugen. Die Transferpipette im Reagenzröhrchen zum weiteren Gebrauch belassen.

b. Bei nicht pipettierbaren Stuhlproben mit einem Holzspatel eine kleine Portion (2 mm Durchmesser) von sorgfältig gemischtem Stuhl in den Probenverdünnungspuffer geben und den Stuhl mit dem Holzspatel sorgfältig aufemulgieren. Eine Transferpipette in das Reagenzröhrchen geben und zum weiteren Gebrauch belassen.
3. Einen Folienbeutel öffnen und die Testkarte entnehmen. Die verdünnte Probe 10sek. lang auf dem Vortex mischen, dann 150 µL (zweite Markierung auf der Transferpipette) der verdünnten Probe in das Probenfenster der Testkarte geben.
4. 10 Minuten lang bei 21-27 C inkubieren. Achtung: während der zehnminütigen Inkubation muss die verdünnte Probe die Kontrolllinie passieren.
5. Am Ende der Inkubationszeit mit bloßem Auge das Auftreten von roten bis purpurnen Linien in der Kontroll- und der Testzone ablesen.

B. ANREICHERUNG IN BOUILLON oder PROBEN IN CARY-BLAIR-MEDIUM:

1. Mit einer Tropfer-Einheit 350 µL Probenverdünnungsmittel in ein Teströhrchen übertragen.

2. Die Bouillon mit Wachstum in den unteren Teil der Erweiterung der Transferpipette (ca. 350 µL) aufziehen, dem Probenverdünnungsmittel beifügen und mischen. Bei Untersuchung von Cary-Blair-Proben den beimpften Cary-Blair-Medium bis zur zweiten Linie der Transferpipette aufziehen (ca. 150 µL), dem Probenverdünnungsmittel beifügen und mischen. Die Transferpipette im Röhrchen lassen so dass sie wieder verwendet werden kann.

3. Einen Folienbeutel öffnen und die Testkarte entnehmen. Die verdünnte Probe 10sek. lang auf dem Vortex mischen, dann 150 µL (zweite Markierung auf der Transferpipette) der verdünnten Probe in das Probenfenster der Testkarte geben.

4. 10 Minuten lang bei 21-27 C inkubieren. Achtung: während der zehnminütigen Inkubation muss die verdünnte Probe die Kontrolllinie passieren.

5. Am Ende der Inkubationszeit mit bloßem Auge das Auftreten von roten bis purpurnen Linien in der Kontroll- und der Testzone ablesen.

C. PLATTENKULTUR:

1. 700 µL (2 x 350 µL) Probenverdünnungspuffer mit der Pipettenmontur in ein Reagenzröhrchen geben.

2. Mit einem Tupfer verdächtige Kolonien der SMAC-Platte abnehmen um eine stark konzentrierte Suspension (McFarland Standard 2-4) im Probenverdünnungspuffer herstellen. Vorsichtig mischen.

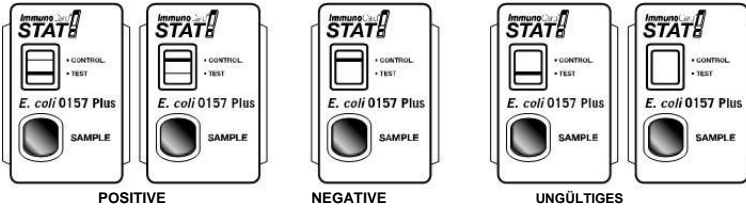
3. Einen Folienbeutel öffnen und die Testkarte entnehmen. Die verdünnte Probe vorsichtig mischen, dann 150 µL (zweite Markierung auf der Transferpipette) der verdünnten Probe in das Probenfenster der Testkarte geben.

4. 10 Minuten lang bei 21-27 C inkubieren. Achtung: während der zehnminütigen Inkubation muss die verdünnte Probe die Kontrolllinie passieren.

5. Am Ende der Inkubationszeit mit bloßem Auge das Auftreten von roten bis purpurnen Linien in der Kontroll- und der Testzone ablesen.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

**ACHTUNG:** Testergebnisse sollten sofort nach der 10 minütigen Inkubationszeit abgelesen werden. Die Ergebnisse sind eventuell nach weiteren 10 Minuten nicht mehr abzulesen.



**Positives Testergebnis:** mit bloßem Auge sichtbare rote bis purpurne Test- und Kontrolllinien. Ein positives Ergebnis zeigt das Vorkommen von Antigenen von Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 an.

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

**Negatives Testergebnis:** mit bloßem Auge sichtbare rote bis purpurne Kontrolllinie. Keine rote bis purpurne Testlinie. Ein negatives Ergebnis zeigt an, dass keine Antigene von Shiga-Toxin bildenden *E. coli* O157 vorhanden sind oder in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze vorkommen.

**Ungültiges Testergebnis:** keine mit bloßem Auge erkennbare rote bis purpurne Kontrolllinie, mit oder ohne einer mit bloßem Auge erkennbaren roten bis purpurnen Testlinie. Ungültige Testergebnisse können auf Probleme mit den Reagenzien und/oder Testkarten, auf Fehler in der Testdurchführung (den Test wiederholen) oder auf den Einsatz von zuviel Stuhlmateriale im Probenverdünnungspuffer (den Stuhl nochmals verdünnen und den Test wiederholen) zurückzuführen sein.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

Die Positiv- und Negativ-Kontrollen sollten in Übereinstimmung mit Richtlinien von regionalen, Länder- und Bundesbehörden überprüft werden. Die einzelnen Labors haben eventuell über diese Empfehlungen hinausgehende Anforderungen an die Testkontrollen aufgestellt.

Für diesen Test wurden keine Proben-Matrix-Wechselwirkungen festgestellt, die Kontrollreagenzien sind jedoch in einer wässrigen Matrix gelöst und stellen eventuell keine ausreichende Kontrolle für die Probenmatrix dar. Das U.S. National Committee for Clinical Laboratory Standards empfiehlt für jeden diagnostischen Test, sofern verfügbar, die Verwendung von Kontrollmaterialien in der Probenmatrix (Richtlinie C24-A). Um dieser Richtlinie zu entsprechen kann es notwendig sein, dass der Anwender Kontrollmaterial in der Probenmatrix herstellt.

TESTEN DER KONTROLLREAGENZIEN

Jeweils drei Tropfen der Positiv- und Negativkontrolle direkt in den unteren Teil von verschiedenen Karten geben.

- Die Positiv-Kontrolle sollte mit bloßem Auge erkennbare rote bis purpurne Test- und Kontrolllinien nach zehnminütiger Inkubation bei 21-27 C aufweisen.
- Die Negativ-Kontrolle sollte eine mit bloßem Auge erkennbare rote bis purpurne Kontrolllinie, aber keine Testlinie nach zehnminütiger Inkubation bei 21-27 C aufweisen.

Bei jedem Gebrauch sollten die Testkit -Bestandteile auf offensichtliche Zeichen von mikrobiellem Befall, Vereisungen oder Undichtigkeiten überprüft werden.

Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden und die Reagenzien noch innerhalb der Haltbarkeitsdauer liegen, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihre zuständigen Auslieferer.

ERWARTETE WERTE

Shiga-toxin bildende E. coli O157 verursachen sowohl sporadische Erkrankungsfälle als auch Epidemien. Die Inzidenz der Erkrankung hat zwar ein Maximum in den Sommermonaten, es treten jedoch das ganze Jahr über Fälle auf. Aufgrund des punktuellen Auftretens der Erkrankung schwanken die Inzidenzraten stark. Um der geographischen Lage: von 0 bis 3- 4% bei großen Epidemien. Aus diesem Grund variieren die prädiktiven Werte für den ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test stark. Die folgenden Tabellen ergeben die prädiktiven Werte auf der Basis der Inzidenz.

O157:H7 Inzidenz	Stuhlproben		MacConkey Bouillon		SMAC-Platte	
	PPV	NPV	PPV	NPV	PPV	NPV
4,0%	75,5%	99,2%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
3,0%	69,6%	99,4%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
2,0%	60,2%	99,6%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
1,0%	42,8%	99,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,5%	27,1%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,2%	12,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
0,1%	6,9%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

EINSCHRÄNKUNGEN

- Testergebnisse sollten im Zusammenhang mit den verfügbaren klinischen Informationen über den Patienten und anderen diagnostischen Maßnahmen bewertet werden.
- Die Nachweisgrenze wurde mit E. coli O157:H7, verdünnt in Kochsalzlösung, bestimmt. Die Nachweisgrenze für die E. coli O157:H7 ATCC-Stämme 43888 und 43895 lag bei 8,3 x 10<sup>5</sup> KBE/mL bzw. 7,67 x 10<sup>5</sup> KBE/mL.
- Ein negatives Testergebnis zeigt an, dass keine Antigene von Shiga-Toxin bildenden E. coli O157 vorliegen oder dass die Antigen-Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegen. Bei negativen Proben sollten weitere Tests zur Bestimmung der Ursache der Diarrhoe durchgeführt werden. Eine optimale Sensitivität wird mit Methoden der Bestätigungskultur erzielt.
- Viele Länder verlangen einen negativen Test auf STEC oder E. coli O157, bevor ein Kind, das eine STEC E. coli-Infektion durchgemacht hat wieder zur Schule oder Tageseinrichtung zurückkehren darf. Um das Risiko, infektiöse Kinder in diese Umgebungen zurückzuschicken, zu vermeiden, sollte eine Methode für eine Bestätigungskultur verwendet werden.
- Bei der Berichterstattung von Erkrankungen an STEC oder E. coli O157 sollten alle Vorschriften regionaler, Länder- und Bundesbehörden eingehalten werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Der ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test wurde in sechs Zentren bewertet.<sup>9, 10, 13-16</sup> Dazu gehörten vier Kinderkliniken und zwei allgemeine Krankenhäuser. Der Immuno Card STAT! E. coli O157 Plus Test wurde mit direkten Stuhlproben (n=299 frische, 483 gefrorene Proben), mit 24Stunden bouillon-Kulturen (n=277) und mit Sorbitol-negativen Kolonien aus SMAC-Platten (n=52) überprüft.

In der Tabelle unten werden die Ergebnisse des ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Tests mit einem Latextest auf Sorbitol-negativen Kolonien aus einer SMAC-Platte verglichen.

Ergebnisse der O157:H7 Kultur	Ergebnisse des ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Tests					
	Direkte Stuhlproben		MacConkey Bouillon		SMAC-Platte	
Pos.	341	77	17	0	20	0
Neg.	5	359	0	261	0	32
Sensitivität	82%	78%-85%	100%	81%-100%	100%	83%-100%
Spezifität	99%	97%-100%	100%	99%-100%	100%	89%-100%

Der ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test zeigte eine 82%ige Sensitivität und 99%ige Spezifität bei der Analyse von direkten Stuhlproben. Die Sensitivität des Tests war größer, wenn bestätigte Kulturmethoden eingesetzt wurden. Die Sensitivität und Spezifität des ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Tests war bei MacConkey-Bouillon-Proben und bei Kolonien aus SMAC-Platten jeweils 100%.

UNTERSUCHUNG VON PROBEN IM MODIFIZIERTEN CARY-BLAIR-MEDIUM

Proben in modifizierten Cary- Blair-Medium wurden mit dem ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test untersucht. Die Proben sollten bei 4 C aufbewahrt werden, bis sie untersucht werden. Die Proben sollten wenn möglich innerhalb von 24 Stunden und unbedingt innerhalb von 72 Stunden untersucht werden.

ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus	KULTUR		
	Positiv	Negativ	Insgesamt
Positiv	33	3	36
Negativ	6	400	406
Insgesamt	39	403	442

REPRODUZIERBARKEIT

In den Labors von drei Arztpraxen wurden sechs Proben und die zwei Kontrollen in je drei Aliquots an jeweils drei verschiedenen Tagen analysiert. Die Testreihe des ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Tests zeigte bei zwei negativen, zwei schwach positiven und zwei mittel positiven Proben eine 100%ige Reproduzierbarkeit. In der Kontrollreihe war die Reproduzierbarkeit mit allen Proben 100%.

TESTSPEZIFITÄT

Die Spezifität des ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Tests wurde mit folgenden Bakterien- und Virus-Stämmen überprüft. Positive und negative Stuhlproben wurden mit  $\geq 1 \times 10^8$  Organismen/mL angeimpft und mit dem Immuno Card STAT! E. coli O157 Plus Test analysiert. E. coli O157:H7 ergaben im Test positive Ergebnisse. Alle anderen Organismen zeigten negative Ergebnisse, wenn sie in negativen Stuhl angeimpft wurden. Darüber hinaus verfälschten sie nicht die Ergebnisse positiver Proben.<sup>17</sup>

Mikroorganismen oder Viren (Anzahl der getesteten Stämme)

Adenovirus 40 & 41 (2)	Pseudomonas aeruginosa (1)
Campylobacter coli (1)	Pseudomonas fluorescens (2)
Campylobacter fetus (1)	Rotavirus (1)
Campylobacter jejuni (1)	Salmonella dublin (1)
Candida albicans (1)	Salmonella typhimurium (1)
Citrobacter freundii (1)	Salmonella urbana (1)
Clostridium difficile (2)	Serratia liquefaciens (3)
Clostridium perfringens (1)	Shigella dysenteriae (1)
Enterobacter cloacae (1)	Shigella flexneri (1)
Enterobacter agglomerans (1)	Shigella sonnei (1)
Escherichia coli non-O157:H7 (13)	Staphylococcus aureus (1)
Escherichia fergusonii (1)	Staphylococcus aureus (Cowan I) (1)
Escherichia hermannii (1)	Staphylococcus epidermidis (1)
Hafnia alvei (1)	Streptococcus faecalis (1)
Helicobacter pylori (1)	Xanthomonas maltophilia (1)
Klebsiella pneumoniae (1)	Yersinia enterocolitica (1)
Providencia stuartii (1)	
Proteus vulgaris (1)	

Drei kreuzreagierende Bakterien wurden identifiziert: Salmonella hilversum, ein E. coli O157:H38- und ein E. coli O157:H1-Stamm. Salmonella hilversum kommt nicht beim Menschen vor. E. coli O157:H38 und H1 sind seltene menschlichen Isolate.

Es konnte nachgewiesen werden, dass einundzwanzig bekannte Labor-Isolate von E. coli O157:H7 im ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test korrekt positive Ergebnisse zeigten. Bei keinem E. coli O157:H7-Isolat wurden negative Ergebnisse beobachtet.

In klinischen Tests mit Stuhlproben zeigte der ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test keine Kreuzreaktionen mit einer Vielzahl anderer pathogener Stuhlkeime. Eine Liste von pathogenen Keimen, die in den Stuhlproben vorhanden waren und die im ImmunoCard-Test keine Kreuzreaktionen zeigten, wird unten angegeben:

Nicht kreuzreagierende pathogene Stuhlkeime (Anzahl von Stuhlproben)

Aeromonas (1)	E. coli O157:H19 (Toxin-negativ) (1)
Campylobacter (34)	E. coli O18:H7 (1)
E. coli O103:H2 (1)	E. coli O26:H11 (4)
E. coli O103:NM (1)	E. coli O69:H47 (1)
E. coli O111:NM (1)	Plesiomonas shigelloides (1)
E. coli O113:H21 (1)	Salmonella spp. (18)
E. coli O121:NM (1)	Shigella (7)
E. coli O145:NM (1)	Yersinia (1)

Die folgenden Stämme der Nicht-Shigatoxin-produzierenden Stämme E. coli O157 und E. coli nicht -O157 wurden in positive und negative Stuhlproben überimpft und mit dem ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus Test mit  $\geq 6 \times 10^5$  Zellen/mL analysiert. Keiner der Stämme zeigte eine Kreuzreaktion oder eine Verfälschung positiver Ergebnisse.

E. coli O157:H44	E. coli O26:H11
E. coli O157:H3	E. coli O111:NM
E. coli O157:H12	E. coli O125:NM
E. coli O126:H27	E. coli O55:B5:H-
E. coli O45:H2	E. coli #8739
E. coli ETEC LT	E. coli #9637
E. coli O121:H19	

REFERENCES

- Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, 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.
- Karmali MB. Laboratory diagnosis of verotoxin-producing Escherichia coli infection. Clin Micro Newsletter. 1987; 9:65-70.
- O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and shiga-like toxins. Micro Reviews. 1987; 51:206-219.
- Tarr P. Escherichia coli O157:H7: Clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. Clin Inf Dis. 1995; 20:1-10.
- Alison O'Brien and James Kaper, eds., O'Brien AD, Kaper J. Shiga toxin-producing Escherichia coli. Yesterday, today and tomorrow. ASM, Washington, DC. 1998.
- Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Micro Rev. 1998; 11:142-201.
- Itoh Y. et. al. Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 present in radish sprouts. Applied and Env. Microbiol. 1998; 64:1532-1535.
- Chers ML, et al. An outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection associated with leaf lettuce consumption. J Inf Dis. 1998; 177:1588-1593.
- Manley WA, Walford JR, Harrison JF, McKee GL. ImmunoCard STAT! (ICS) E. coli O157:H7 test in a suspect waterborne outbreak in Wyoming. ASM, Abstract submitted for 1999 General Meeting. 1998.
- Lembcke AR, Willis DH. Prospective evaluation of a 10 minute ImmunoCard STAT! (ICS) E. coli O157:H7 test at a children's hospital. AMS, Abstract submitted for 1999 General Meeting. 1998.
- Kay BA, Griffin PM, Stockbine VA, Wells JG. Too fast food: Bloody diarrhea and death from Escherichia coli O157:H7. Clin Micro Newsletter. 1994; 16:17-19.
- Neill MA. Escherichia coli O157:H7. A pathogen of no small renown. Infec Dis Newsletter. 1991; 10:19-24.
- Barrett B, Laurie KL, Priocou NJ. Evaluation of ImmunoCard STAT! STEC O157 for detection of E. coli O157:H7 in human stool specimens, enrichment broth and non-sorbitol fermenting E. coli from SMAC agar. ASM, Abstract submitted for 1999 General Meeting. 1998.
- Stapp JR, Jelacic S, Fischer M, Yea YL, Clausen CR, Tarr PI. Sensitivity assessment of the Meridian ImmunoCard STAT! for the detection of Escherichia coli O157:H7 in children's stools. ASM, Abstract submitted for 1999 General Meeting. 1998.
- Park CH, Alverson J. Evaluation of the Meridian ImmunoCard STAT! STEC O157 for the rapid detection of antigen directly from human stools and enhanced broth. ASM, Abstract submitted for 1999 General Meeting. 1998.
- Mackenzie A, Chan F, Orrbine E, Hoban D, Kennedy W, Willis D, et al. and the CPKDRC- co-investigators. Sensitivity and specificity of ImmunoCard STAT test for the detection of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in stools. ASM, Abstract submitted for 1999 General Meeting. 1998.
- Data on file, Meridian Bioscience, Inc.



SN11206

REV. 02/15



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

Manufactured By

EC REP

Authorized Representative

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

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


















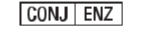









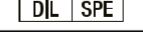




Meridian Bioscience Europe France  
34 rue de Ponthieu - 75008 Paris  
FRANCE  
Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40  
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10  
Email: info.fr@meridianbioscience.eu

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

TABELA UŻYWANYCH SYMBOLI MIĘDZYNARODOWYCH

Na etykiecie/opakowaniu tego produktu może znajdować się jeden lub więcej z poniższych symboli:

Wykaz symboli (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de símbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use by / Utilizzare entro / Utiliser jusqu' / hasta a la caducidad / Verwendbar bis		Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung		Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico diagnóstico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico médico para diagnóstico in vitro / In-vitro-Diagnostikum		Authorized Representative in the European Community / Représentant autorisé dans la Communauté Européenne / Mandatário dans la Comunidade Europeia / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79 CE sul dispositivo medico-dispositivo 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 Diagnostika von 98/79/EG		Sample Preparation Apparatus containing Enzyme Dispersant / Dispositif pour la préparation de l'échantillon contenant des diluants de sample / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para la preparación de muestras con diluyente de muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenwiderstandsmittel befindet
	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult instructions for Use / Consulter le mode d'emploi par l'uso / Consultar las instrucciones d'uso / Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten		Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction / Tampone / Lösung de Reaktion / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricador / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Reactivity IVD reserved for evaluation des performances / Sólo para evaluación de los fundamentos / Nur zur IVD Leistungsbeurteilung
	Control sufficient for <= 10 tests / Conteneur suffisant pour <= 10 tests / Conteneur suffisant pour <= 10 tests / Contenedor suficiente para <= 10 ensayos / Inhalt ausreichend für <= 10 Prüfungen		Stoppage Solution / Solution d'arrêt / Solution d'arrêt / Solution de parada / Stopplösung
	Temperature / Température / Unité de température / Unidad de temperatura / Maße de temperatura Temperaturangabe		Enzyme Conjugate / Conjugato enzimatico / Conjugate enzymatique / Conjugado enzimático / -enzymkonjugat
	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer		Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
	Test Device / Dispositivo de / Dispositif de test Dispositivo de Prueba / Testgerät		Reagent / Réactif / Réactif / Reagents / Reagenzien
	Date of manufacture / Date di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum		Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampon de lavado / Waschpuffer
	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / tampon / Puffer		Warning / Avvertenza / Miso En Gando / Advertencia / Warnhinweise
	Conjugate / Conjugato / Conjugé / Conjugado / Konjugat		Specimen Diluent / Sample Diluent / Diluente del Campione / Diluent échantillon / Diluyente de muestras / Probenwiderstandsmittel
	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat		Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
			Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

Aby uzyskać pomoc techniczną, zadzwoń do Działu Pomocy Technicznej pod numer 800-343-3858 w godzinach od 8:00 do 18:00 czasu wschodniego USA. Aby złożyć zamówienie, zadzwoń do Działu Obsługi Klienta pod numer 800-543-1980.