

# SHIGA TOXIN CHEK™

An Enzyme Immunoassay for the Detection of Shiga Toxins 1 and 2  
in Fecal Specimens and Cultures Derived from Fecal Specimens

Catalog No. T30696 (96 Tests)

**IVD** *In Vitro* Diagnostic Medical Device

ESPAÑOL p. 12

Inmunoensayo enzimático para la detección de las toxinas Shiga 1 y 2  
en muestras fecales y cultivos derivados de muestras fecales

N.º de catálogo. T30696 (96 pruebas)

**IVD** Dispositivo médico diagnóstico *in vitro*

DEUTSCH p. 21

Ein Enzymimmunoassay für den Nachweis von Shiga-Toxin 1 und 2  
in Stuhlproben und Kulturen aus Stuhlproben

Katalognr. T30696 (96 Tests)

**IVD** *In-Vitro-Diagnostikum*

FRANÇAISE p. 30

Test immunoenzymatique pour la détection des toxines Shiga 1 et 2  
dans des échantillons de selles et des cultures issues d'échantillons de selles

Catalogue n° T30696 (96 tests)

**IVD** Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

U. S. Patent #5,747,272

U. S. Patent #14/039,439 and 14/274,485

---

**Developed and Manufactured by:**



**TECHLAB®**

**2001 Kraft Drive**

**Blacksburg, VA 24060-6358 USA**

**[www.techlab.com](http://www.techlab.com)**

**TEL 1-800-832-4522 USA**

**TEL 1-540-953-1664 Outside USA**



**EC REP** Emergo Europe  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands

## SHIGA TOXIN CHEK™

### INTENDED USE

The *SHIGA TOXIN CHEK*™ test is an enzyme immunoassay for the simultaneous qualitative detection of Shiga toxin 1 (Stx1) and Shiga toxin 2 (Stx2) in a single test. It is intended for use with human fecal samples from patients with gastrointestinal symptoms to aid in the diagnosis of disease caused by Shiga Toxin producing *Escherichia coli* (STEC). It may be used directly with human fecal specimens, or broth or plate cultures derived from fecal specimens. The test results should be considered in conjunction with the patient history. **Caution: U.S. Federal Law restricts this device to sale by or on the order of a physician.**

### EXPLANATION

Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) were first described by O' Brien, *et al.* after discovering that *E.coli* culture supernatant, which was cytotoxic to HeLa and Vero cells, could be neutralized by rabbit anti-Shiga toxin antibodies (1). STEC cause foodborne and waterborne diarrheal disease worldwide which, if left undiagnosed, can progress to hemorrhagic colitis and/or hemolytic uremic syndrome (HUS) (2, 3). Since certain treatments and medications can increase the risk of HUS (4), prompt detection is necessary to prevent outbreaks and secondary transmission (5-9). STEC strain O157:H7 has historically been the focus of attention in the United States since first isolated from undercooked hamburgers (3, 10), causing an estimated 73,000 illnesses annually (11). However, STEC infections caused by non-O157 strains have become more prevalent in recent years, both in the United States as well as abroad (12-16, 29). O157:H7 infections are routinely diagnosed by culture of fecal samples on selective media (17, 18), but this methodology allows non-O157 STEC strains to go undetected. STEC produce either one or both Shiga toxins (Stx1 and/or Stx2), both potent cytotoxins (19, 20). Isolates producing only Stx2 have been attributed to higher incidence rates of HUS (18, 21-23). Shiga toxins can be detected by tissue culture assay (24), but this method is both time consuming and labor intensive. By detecting the toxins, the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test can detect STEC present in fecal samples or culture, regardless of the serotype or other virulence factors (25).

### PRINCIPLE OF THE TEST

The *SHIGA TOXIN CHEK*™ test uses antibodies to Stx1 and Stx2. The microassay wells supplied with the kit contain immobilized monoclonal antibodies against Stx1 and Stx2. The detecting antibody consists of a mixture of anti-Stx1 and anti-Stx2 polyclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase. In the assay, an aliquot of a fecal specimen or culture is emulsified in the *Diluent* and the diluted specimen is then transferred to the microassay well containing the detecting antibody. If Stx1 and/or Stx2 are present in the specimen, they will bind to the detecting antibody and to the immobilized monoclonal antibodies during the incubation phase. Any unbound material is removed during the washing steps. Following the addition of substrate, a color is detected due to the enzyme-antibody-antigen complexes that form in the presence of toxin.

### MATERIALS PROVIDED

|    |     |
|----|-----|
| MA | PLT |
|----|-----|

**Microassay Plate** –12 strips, each strip consisting of 8 wells, coated with monoclonal antibodies specific for Stx1 and Stx2 (stored with desiccant)

|     |     |
|-----|-----|
| DIL | SPE |
|-----|-----|

**Diluent (40 mL)** – buffered protein solution containing 0.02% thimerosal\*

|      |      |
|------|------|
| SUBS | REAG |
|------|------|

**Substrate (14 mL)** – solution containing tetramethylbenzidine and peroxide

|         |     |
|---------|-----|
| WASHBUF | 20X |
|---------|-----|

**Wash Buffer Concentrate (50 mL)** – 20X concentrate containing phosphate buffered saline, detergent, and 0.2% thimerosal\*

Signal Word: Warning

H373: May cause damage to organs through prolonged or repeated exposure



H411: Toxic to aquatic life with long lasting effects

P260, P273, P314, P391, P501

$H_2SO_4$  0.6N

**Stop Solution (7 mL)** – 0.6N sulfuric acid. CAUTION: Avoid contact with skin; flush with water immediately if contact occurs

Signal Word: Danger

H314: Causes severe skin burns and eye damage

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353,

P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501

CONTROL +

**Positive Control (3.5 mL)** – inactivated antigen in a buffered protein solution containing amphotericin B

contains 0.05% ProClin® 300

Signal Word: Warning

H317: May cause an allergic skin reaction

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

CONJ ENZ

**Conjugate (7 mL)** – polyclonal antibodies specific for Stx1 and Stx2 coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution containing 0.02% thimerosal\*

contains 0.05% ProClin® 300

Signal Word: Warning

H317: May cause an allergic skin reaction

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501

\*contains mercury



## ACCESSORIES

Disposable plastic transfer pipettes (100)

Plastic adhesive sheets, (2) sheets

Wash Solution Label, (1)

## MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Wash bottle

Timer

Vortex

Mixer

Discard container

Distilled water

Tubes for dilution of specimen

Paper towels or absorbent sheets

Applicator sticks

Refrigerator set between 2°C and 8°C

Incubator set at 37°C ± 2°C

Pipetter and tips

Disposable gloves for handling fecal samples

Swabs or inoculating loops

Spectrophotometer capable of reading dual wavelength at 450/620 nm or single

wavelength at 450 nm (a dual wavelength plate reader is recommended; absorbance

should be measured at 450 nm and referenced at 620 nm)

## SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the label. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit should be stored between 2°C and 8°C. The kit containing the reagents with designated shelf life should be stored between 2°C and 8°C and should be returned to the refrigerator as soon as possible after use.

## PRECAUTIONS

1. Rx - Prescription Only
2. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
3. Each component in the kit should be inspected for any signs of leakage. Upon arrival, inspect the kit to ensure that components are not frozen or warm to the touch due to improper shipping conditions.
4. Reagents from different kits should not be mixed or interchanged. Do not use a kit past the expiration date.
5. Caps and tips are color-coded; do NOT mix or interchange!
6. Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!

7. Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2°C and 8°C.
8. When handling assay wells, avoid scratching the bottom of the wells because this may result in elevated absorbance readings.
9. Unused microwells must be placed back inside of the resealable pouch with the desiccant to protect them from moisture. Check the desiccant pack before using the microwells. The color indicator on the desiccant pack should be blue. If the color turns pink, the quality of the microwells may be compromised. Please do not use microwells stored with pink desiccant.
10. Hold reagent bottles vertically to dispense reagents to ensure consistent drop size and correct volume.
11. Use fecal specimens within 24 hours of collection to obtain optimal results.
12. Microbial contamination of reagents may decrease the accuracy of the assay. Avoid microbial contamination of reagents by using sterile disposable pipettes if removing aliquots from reagent bottles.
13. Perform the washing procedure as directed to avoid high background reactions.
14. The *Substrate* is light sensitive and should be protected from direct sunlight or UV sources.
15. The test has been optimized for sensitivity and specificity. Alterations of the specified procedure and/or test conditions may affect the sensitivity and specificity of the test. Do not deviate from the specified procedure.
16. Fecal specimens may contain potentially infectious agents and should be handled at "Biosafety Level 2" as recommended in the CDC/NIH Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories."
17. Handle specimens and used microassay wells as if capable of transmitting infectious agents. Wear disposable gloves when doing the test.
18. The *Conjugate* and *Positive Control* reagents contain 0.05% ProClin® 300 as a preservative. Although the concentration is low, ProClin® 300 is known to be harmful (skin sensitization may occur). If skin sensitization/irritation or rash occurs, get medical advice/attention. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support
19. The *20X Wash Buffer Concentrate* contains 0.2% Thimerosal as a preservative. Once diluted to normal use concentration this solution is classified as non-hazardous. The *Stop Solution* contains 0.6N sulfuric acid. Flush with water immediately if contact occurs. Take off contaminated clothing and wash it before reuse. Handle reagents according to existing regulations for laboratory safety and good laboratory practice. Safety Data Sheets for this product are available upon request, contact technical support.
20. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations. Do not place in trash, dispose of as hazardous waste.

#### COLLECTION, HANDLING, AND STORAGE OF FECAL SPECIMENS

CDC guidelines for collection and handling of specimens for optimal STEC diagnostic testing recommend testing as soon as received by the laboratory.

| Acceptable Sample Types                             |
|-----------------------------------------------------|
| Fresh Fecal Specimen                                |
| Frozen Fecal Specimen (frozen undiluted samples)    |
| Specimens in Transport Media (e.g. Cary Blair, C&S) |

| Do Not Use                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Fecal specimens in Formalin-based fixative (e.g. sodium acetate formalin, 10% formalin) |
| Fecal specimens in alcohol-based fixative (e.g. polyvinyl alcohol)                      |

|                                            |
|--------------------------------------------|
| Broth cultured from acceptable sample type |
|--------------------------------------------|

|                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bacterial cultures from a SMAC, CT-SMAC, or CHROMagar® O157 plate, grown from any acceptable sample type |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## COLLECTION AND HANDLING OF FECAL SPECIMENS

### 1. Specimen Handling for Direct Fecal Testing –

- Fresh specimens should be tested as soon as possible after receipt. If testing cannot be performed upon receipt, samples may be stored between 2°C and 8°C or frozen ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) for up to 14 days from sample receipt.
- Specimens in transport media (C&S or Cary Blair) can be stored between 2°C and 8°C or frozen ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) for up to 14 days from sample receipt.

### 2. Specimen Handling for Broth or Plate Method –

- Specimens should be stored between 2°C and 8°C and cultured as soon as possible after receipt. If cultures cannot be started within 2 hours of sample receipt, samples may be frozen ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) for up to 14 days from sample receipt.
  - Specimens in transport media (C&S or Cary Blair) can be stored between 2°C and 8°C for up to 5 days.
- Make sure that specimens are thoroughly mixed before performing the assay.
  - Repeated freeze/thaw cycles should be avoided. If using frozen specimens, thaw at room temperature.
  - If using semi-automated or automated washing equipment, once diluted specimens should be centrifuged (5000 x g for 10 minutes) to remove any particulate matter. If samples cannot be centrifuged, wells must be pre-washed once manually as instructed in the **TEST PROCEDURE step 11**.

## SPECIMEN PREPARATION

### A. Direct Fecal Specimen Testing (for fresh specimens and samples in transport media)

- Mix all specimens thoroughly regardless of consistency - it is essential that the specimens be evenly suspended before sampling.
- Continue to **TEST PROCEDURE**.

### B. Broth Method (for fresh specimens and samples in transport media)

- Mix all specimens thoroughly regardless of consistency - it is essential that the specimens be evenly suspended before inoculating the broth.
  - Liquid/Semi-solid specimens** - transfer 25  $\mu\text{L}$  of specimen into a culture tube containing 5 mL of MacConkey or 8 mL of Gram-Negative (GN) broth. Vortex for 10 seconds.
  - Formed/Solid specimens** - transfer a small portion (approximately 2 mm diameter, the equivalent of 25  $\mu\text{L}$ ) of the specimen into a culture tube containing 5 mL of MacConkey or 8 mL of GN broth.
  - Fecal specimens in Cary Blair or C&S transport media** - transfer 100  $\mu\text{L}$  of the preserved specimen to a culture tube containing 5 mL of MacConkey or 8 mL of GN broth.
- Loosely cap the inoculated broth tubes and incubate for 16-24 hours between 35°C and 39°C.
- Examine the tube for growth. If there is no growth, do not proceed with testing. Instead, inoculate another tube of broth with either the same fecal specimen or a fresh specimen from the same patient. Alternatively, the selective plate method (see “C” below) or direct fecal specimen testing method (see “A” above) may be used.
- Continue to **TEST PROCEDURE**.

### C. Plate Method (for fresh specimens and samples in transport media)

- Mix all specimens thoroughly regardless of consistency - it is essential that the specimens be evenly suspended before inoculating the plate. Use a swab to

sample the specimen, and then spread on a SMAC, CT-SMAC, or CHROMagar® O157 plate. *NOTE: CT-SMAC and CHROMagar® O157 are more selective than SMAC plates and may inhibit the growth of non-O157 STEC.*

2. Incubate the plates for 16-24 hours between 35°C and 39°C.
3. Examine the plate for growth. If there is no growth, do not proceed with testing. Instead, inoculate another plate with either the same fecal specimen or a fresh specimen from the same patient. Alternatively, the broth method (see “B” above) or direct fecal specimen testing method (see “A” above) may be used.
4. Continue to **TEST PROCEDURE**.

### PRELIMINARY PREPARATIONS

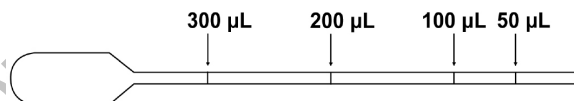
1. **All reagents must be at room temperature prior to use in the assay.**
2. **Prepare 1X Wash Solution.** The *Wash Buffer Concentrate* is supplied as a 20X concentrate (a precipitate may be noticed). It should be diluted to a total volume of 1 liter by adding 50 mL of the concentrate to 950 mL of distilled water. Label the bottle. Store any unused 1X *Wash Solution* between 2°C and 8°C.
3. **Assay Strip Preparation.** Each strip contains 8 wells coated with monoclonal antibodies specific for Stx1 and Stx2. Each specimen or control will use one of these coated wells. Determine the number of wells to be used. Avoid contact with the base of the wells. Assay wells not used must be returned to the plastic bag and carefully resealed with desiccant.

### TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents and the required number of test strips to room temperature before use.
2. **Set up and label one test tube for each sample as necessary.**
3. **Add Diluent to each tube using a transfer pipette.** The pipettes have raised graduations at 50 µL, 100 µL, 200 µL and 300 µL.

| Sample Type                                               | Volume of Diluent                                                |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Direct Fecal Specimen<br>Broth Specimen<br>Plate Specimen | 200 µL (3 <sup>rd</sup> graduation mark on the transfer pipette) |
| Specimen in Transport Media                               | 100 µL (2 <sup>nd</sup> graduation mark on the transfer pipette) |

**Transfer Pipette**



4. Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample.
5. **Mix all specimens and cultures thoroughly regardless of consistency- it is essential that the samples be evenly suspended before sampling. Add the required amount of specimen or culture to the tube.**

Direct fecal testing - Liquid/Semi-solid specimens - sample 50 µL of specimen with a transfer pipette and dispense into the *Diluent* tube. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen. If testing cannot be performed immediately after dilution, samples may be stored between 2°C and 8°C for up to 2 days.

Direct fecal testing - Formed/Solid specimens – care must be taken to add the correct amount of formed feces to the sample mixture. Mix the specimen thoroughly using a wooden applicator stick and transfer a small portion (approximately 3 mm diameter, the equivalent of 50 µL) of the specimen into the *Diluent* tube. Emulsify the specimen

using the applicator stick. If testing cannot be performed immediately after dilution, diluted samples may be stored between 2°C and 8°C for up to 2 days.

**Fecal specimens in transport media (Cary Blair or C&S)** – sample 100 µL of specimen with a transfer pipette and dispense into the *Diluent* tube. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen.

**Broth cultures** – sample 50 µL of specimen with a transfer pipette and dispense into the *Diluent* tube. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen.

**Plate cultures** –sweep through a confluent area on the plate several times or pick individual colonies with an inoculating loop, then mix the loop in the *Diluent* tube. Rotate the loop against the inside of the tube several times to release the sample and remove the loop.

*NOTE: Transferring too little sample, or failure to mix and completely suspend the sample in the Diluent, may result in a false-negative test result.*

6. Close each tube of diluted sample or control and mix thoroughly. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube several times.
7. **Add 1 drop (50 µL) of Conjugate (red cap) to each well.** Be sure to hold each bottle vertically when adding the drops. Use 1 well for each fecal specimen, 1 well for the *Positive Control* and 1 well for the negative control. Identification marks may be written directly on side of well.
8. **Using a new transfer pipette, transfer 100 µL of diluted specimen to the assay well.** Add 1 drop (50 µL) of the *Positive Control* (black cap) to the positive control well and 100 µL of the *Diluent* (negative control) to the negative control well. Tap the sides of the plate to mix.
9. Cut the adhesive plastic sheet to the size necessary to cover the wells. **Cover the wells and incubate them at 37°C ± 2°C for 50 minutes.**
10. Shake out the contents of the assay wells into a discard pan.
11. **Wash each well using the 1X Wash Solution in a squirt bottle with a fine-tipped nozzle,** directing the *Wash Solution* to the bottom of the well with force. Fill the wells, and then shake the *Wash Solution* out of the well into a discard pan. Slap the inverted plate on a dry paper towel.  
*Note: If using semi-automated or automated washing equipment, add 350 µL of 1X Wash Solution to each well. Wash for a total of 5 times (4 times if performing a manual pre-wash for non-centrifuged samples).*
12. Repeat step 11 four additional times using a dry paper towel each time. If any particulate matter is seen in the wells, continue washing until all the particulate matter is removed.
13. After washing, completely remove any residual liquid in the wells by striking the plate once again onto a dry paper towel until no liquid comes out. Dispose of paper towels and specimen containers properly.
14. **Add 2 drops (100 µL) of Substrate (blue cap) to each well.** Gently tap the wells to mix the substrate. Incubate the wells at room temperature for 10 minutes. Gently tap the wells at 5 minutes.
15. **Add 1 drop (50 µL) of Stop Solution (yellow cap) to each well.** Gently tap the wells and wait 2 minutes before reading. The addition of the *Stop Solution* converts the blue color to a yellow color which may be quantitated by measuring the optical density at 450 nm on a microplate ELISA reader. The instrument should be blanked against air. If a dual wavelength reader is used, blank against air at 620 nm and read at 450 nm. Wipe the underside of each well before measuring the optical density. If an ELISA reader is unavailable, the test may be read visually in good light against a white background. Read within ten minutes after adding *Stop Solution*.

#### ALTERNATE TEST PROCEDURE/RAPID FORMAT

Perform the regular test procedure according to the instructions provided above replacing the 50 minute incubation at 37°C ± 2°C with 20 minutes at 37°C using the *Stat*



*Fax 2200 Incubator/Shaker* or equivalent incubator/shaker. If the *Stat Fax 2200 Incubator/Shaker* is used, set the shaker to speed 7 and the temperature to 37°C. If other shakers are used, a speed of 1500 rpm is recommended. Shaking should not cause spillage. If spillage occurs, reduce the speed accordingly (26).

### QUALITY CONTROL

1. A positive and negative control must be run with each series of test specimens.
2. Positive and negative controls must fall within their respective ranges or the test is not valid.
  - a) **Positive Control must be a visible yellow color.** If read on a spectrophotometer, the OD at 450 nm or using dual wavelength at 450/620 nm must be  $\geq 0.500$ .
  - b) **Negative Control must be visually clear.** If read on a spectrophotometer, the OD at 450 nm must be  $< 0.120$ . If read at 450/620 nm the absorbance must be  $< 0.080$ .
3. Wells that are clear visually but give absorbance  $\geq 0.120$  OD at 450 nm should be wiped on the underside and re-measured.
4. Visual readings must be taken in good light against a white background.
5. A sample that yields a weak positive result (i.e.,  $< 0.200$ ) and is adjacent to a strong positive should be repeated to assure carryover did not occur.

### INTERPRETATION OF RESULTS

|                 | Visual Reading   | Spectrophotometric Reading  |                               |
|-----------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|
|                 |                  | Single Wavelength at 450 nm | Dual Wavelength at 450/620 nm |
| <b>Negative</b> | Colorless        | OD $< 0.120$                | OD $< 0.080$                  |
| <b>Positive</b> | Any yellow color | OD $\geq 0.120$             | OD $\geq 0.080$               |

A positive test result indicates that Stx1 and/or Stx2 are present in the specimen. A negative result indicates that Stx1 and/or Stx2 are absent or the level is below the detection limit of the test.

Note: Due to the epidemiological importance of obtaining Shiga toxin positive bacterial isolates, it is recommended that all toxin positive samples undergo bacterial culture to isolate the toxin producing organisms. It is suggested that laboratories perform bacterial culture on all positive samples or coordinate the process with their local & state health laboratories in the United States.

### LIMITATIONS OF THE SHIGA TOXIN CHEK™ TEST

1. The *SHIGA TOXIN CHEK™* test is used to detect Stx1 and Stx2 in fecal specimens and cultures derived from fecal specimens. The test confirms the presence of Stx1 and/or Stx2 in the sample, and this information should be taken under consideration by the physician in light of the clinical history and physical examination of the patient.
2. A negative test result does not preclude the possibility of the presence of Shiga toxins in the specimen which may occur if the level of antigen is below the detection limit of the test.
3. The *SHIGA TOXIN CHEK™* test is qualitative. The intensity of the color should not be interpreted quantitatively.
4. The toxin produced by *Shigella dysenteriae* is nearly identical to Shiga Toxin 1 produced by *E. coli* (27) and if present at detectable levels, will give a positive result in the well.

### EXPECTED VALUES

The *SHIGA TOXIN CHEK™* test detects the presence of Stx1 and Stx2. Expected values for a particular population should be established by each laboratory. The positivity



rate may be dependent upon a number of factors including geography, process of specimen collection, handling and transport, patient age.

Shiga toxin *E. coli* is the source of an estimated 110,000 cases (0.04% of the population) of foodborne illness annually in the United States (11). Reported incidence rates in fecal samples submitted for testing range from 0% - 4.1% (18) and vary depending upon the season, geographical location, and patient population, with higher incidence rates seen in the summer months and in preschool-aged children and the elderly (28). A positive result in the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test confirms the presence of Shiga toxin in the sample; a negative result indicates the absence of toxin or insufficient levels of toxin for detection.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### Direct Fecal Testing

The performance of the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test was compared to the Vero Cell Cytotoxin Assay (with neutralization), considered the clinical reference standard (gold standard), and included 899 fresh and 14 frozen specimens. Age information was available for 902 patients. Of the 902 patients, 8.8% were ≤ 18 years. The following table shows a summary of the clinical performance of the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test. The results show that the test exhibited a sensitivity of 100% a specificity of 99.9% and an overall correlation of 99.9% with the cytotoxin assay.

### Direct Fecal Testing Results

| n = 913                            | Vero Cell Cytotoxin Positive | Vero Cell Cytotoxin Negative |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ Positive | 78                           | 1                            |
| <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ Negative | 0                            | 834                          |

|             |       | 95% Confidence Interval |
|-------------|-------|-------------------------|
| Sensitivity | 100%  | 94.2 - 100%             |
| Specificity | 99.9% | 99.2 - 100%             |
| Correlation | 99.9% | 100 - 100%              |

### Broth Cultures

The performance of the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test using overnight broth cultures (GN or MacConkey broth) from fecal specimens was compared to the Vero Cell Cytotoxin Assay (with neutralization), considered the clinical reference standard (gold standard). The following table shows a summary of the clinical performance of the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test. The results show that the test exhibited a sensitivity of 97.1%, a specificity of 99.7% and an overall correlation of 99.5% with the cytotoxin assay.

### Broth Culture Testing Results

| n = 789                            | Vero Cell Cytotoxin Positive | Vero Cell Cytotoxin Negative |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ Positive | 67                           | 2                            |
| <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ Negative | 2                            | 718                          |

|             |       | 95% Confidence Interval |
|-------------|-------|-------------------------|
| Sensitivity | 97.1% | 89.0 - 99.5%            |
| Specificity | 99.7% | 98.9 - 99.9%            |
| Correlation | 99.5% | 99.5 - 99.5%            |

### REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the *SHIGA TOXIN CHEK*<sup>™</sup> test was determined using 11 fecal specimens that were coded to prevent their identification during testing. Testing was performed at 2 independent laboratories and on-site at TECHLAB<sup>®</sup>, Inc. The samples were tested, twice a day over a 5-day period by multiple technicians at each site using 2 different kit lots. A positive and negative control was run with each panel of the masked samples. The results from each laboratory were submitted to TECHLAB<sup>®</sup>, Inc. and compared with in-house results. The results were consistent among the different locations, and exhibited a correlation of 100%. The samples produced the expected results 100% of the time.

### CENTRIFUGATION

A total of 108 fecal specimens, including 19 positives and 89 negatives, were evaluated to determine the effect of centrifugation on performance. For the analysis, specimens were diluted and vortexed as described in the package insert. The specimens were centrifuged (5,000 x g) to remove insoluble material and the supernatant fluid was assayed in the *SHIGA TOXIN CHEK*<sup>™</sup>. Results were compared to results obtained with the same panel of diluted and vortexed specimens that had not been centrifuged. The results demonstrated a correlation of 100% between centrifuged and non-centrifuged specimens.

### CROSS REACTIVITY

The *SHIGA TOXIN CHEK*<sup>™</sup> test was evaluated for cross-reactivity with the bacterial and viral strains listed below. None of the strains were shown to interfere with the performance of the *SHIGA TOXIN CHEK*<sup>™</sup> test.

|                                                 |                                             |                                                |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                     | <i>Campylobacter coli</i>                   | <i>Campylobacter fetus</i>                     |
| <i>Campylobacter jejuni</i>                     | <i>Candida albicans</i>                     | <i>Citrobacter freundii</i>                    |
| <i>Clostridium difficile</i>                    | <i>Clostridium perfringens</i>              | <i>Enterobacter cloacae</i>                    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                    | <i>Escherichia coli</i>                     |                                                |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (non-toxigenic) |                                             | <i>Escherichia coli</i> EIEC (enteroinvasive)  |
| <i>Escherichia coli</i> EPEC (enteropathogenic) |                                             | <i>Escherichia coli</i> ETEC (enterotoxigenic) |
| <i>Escherichia fergusonii</i>                   | <i>Escherichia hermannii</i>                | <i>Gardnerella vaginalis</i>                   |
| <i>Helicobacter pylori</i>                      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                | <i>Lactobacillus acidophilus</i>               |
| <i>Proteus vulgaris</i>                         | <i>Providencia stuartii</i>                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                  |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                  | <i>Salmonella enteric</i> serovar minnesota |                                                |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                   | <i>Serratia liquefaciens</i>                | <i>Shigella flexneri</i>                       |
| <i>Shigella sonnei</i>                          |                                             | <i>Staphylococcus aureus</i>                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)            |                                             | <i>Staphylococcus epidermidis</i>              |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>                  |                                             |                                                |

|                                         |                              |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| Human Adenovirus, Type 2, 14, 40 and 41 | Human Cocksackievirus A9, B1 |
| Human Enterovirus 69                    | Feline calicivirus           |
|                                         | Human rotavirus              |

### STRAINS/SEROTYPES

Various *E.coli* Shiga toxin-producing strains and serotypes were tested in the *SHIGA TOXIN CHEK*<sup>™</sup> test by both the Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) plate and MacConkey broth cultures. *Escherichia coli* O157 strains were also tested using CT-SMAC and

ChromAgar® O157 plate cultures. Each strain is a clinical isolate and each was tested by a cytotoxin assay and by a polymerase chain reaction (PCR) to confirm the presence of the Shiga toxin gene(s). All organisms generated positive results for the appropriate toxin(s) when tested.

Following is a list of the serotypes tested, the number of strains tested in that group type and the type of toxin produced by each strain.

**Shiga Toxin Type Stx1: Strain Types** - O26:H11 (5 strains), O157:H7, O111:NM (2 strains), O103:H2, O103:H25, O103:H6, O103:N, O111:H11, O111:H8, O145:H16, O145:NM, O45:H2 (4 strains), O45:NM, O125:NM, O146:H21, O156:H21, O26, O5:N, O70:H11, O111a:NM

**Shiga Toxin Type Stx2: Strain Types** - 157:H7 (6 strains), O104:H4 (European 2011 outbreak strain), O177:NM, O6:H10, O121:H19 (3 strains), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21, O6:H10

**Shiga Toxin Type Stx1 and Stx2: Strain Types** - O157:H7 (8 strains), O157:NM (2 strains), O111:H8, O111, O111:NM (2 strains), O113:H21, O15:H27

#### INTERFERING SUBSTANCES (U.S. Formulations)

The following substances had no effect on positive or negative test results analyzed at the concentrations indicated: Hog gastric mucin (3.5% w/v), Human blood (40% v/v), Barium sulfate (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Maalox® Advanced (5% v/v), Steric Acid (40% w/v), Metronidazole (0.25% w/v), Vancomycin (0.25% w/v), Prilosec OTC® (5 µg/mL), TUMS (50 µg/mL), Tagamet® (5 µg/mL), Leukocytes (0.05% v/v), Ciprofloxacin (0.25% w/v).

#### PRECISION – INTRA-ASSAY

For the determination of intra-assay performance, 6 positive fecal specimens and 6 negative fecal specimens were analyzed. Each specimen was assayed in replicates of eight. All positives remained positive and all negatives remained negative.

#### PRECISION – INTER-ASSAY

The inter-assay precision of the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test was determined using 12 fecal specimens (six negative, two positive for Stx1, two positive for Stx2, and two positive for both Stx1 and Stx2). The samples were tested, twice a day over a 5-day period using 2 different kit lots. A positive and negative control was run on each day. All positives remained positive and all negatives remained negative.

#### ANALYTICAL SENSITIVITY

The cutoff for the *SHIGA TOXIN CHEK*™ test for direct fecal specimens was established at concentrations of 0.28 ng/mL Stx1 and 0.23 ng/mL Stx2, and for broth cultures at concentrations of 0.18 ng/mL Stx1 and 0.30 ng/mL Stx2.

## SHIGA TOXIN CHEK™ - ESPAÑOL

### USO PREVISTO

La prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ es un inmunoensayo enzimático para la detección cualitativa simultánea de la toxina Shiga 1 (Stx1) y la toxina Shiga 2 (Stx2) en una única prueba. Está pensada para el uso con muestras fecales humanas de pacientes con síntomas gastrointestinales, para ayudar en el diagnóstico de enfermedades causadas por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). Puede emplearse directamente con muestras fecales humanas o cultivos en caldo o placa obtenidos de muestras fecales. Los resultados de la prueba deben evaluarse junto con la historia clínica del paciente.

**Precaución: La Ley Federal de los Estados Unidos solo autoriza la venta de este dispositivo a través de un facultativo o bajo prescripción médica.**

### FUNDAMENTO

La *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) fue descrita por primera vez por O'Brien, *et al.* después de descubrir que el sobrenadante del cultivo de *E. coli*, que era citotóxico para las células HeLa y Vero, podía ser neutralizado por anticuerpos de conejo anti-toxina Shiga (1). El STEC causa a nivel mundial enfermedades diarreicas transmitidas por la alimentación y por el agua que, si no se diagnostican, pueden conducir a colitis hemorrágica y/o síndrome hemolítico urémico (SHU) (2, 3). Como determinados tratamientos y medicamentos pueden aumentar el riesgo de SHU (4), la detección precoz es necesaria para prevenir los brotes y la transmisión secundaria (5-9). La cepa O157:H7 de STEC ha sido históricamente el foco de atención en Estados Unidos desde que se aisló por primera vez en hamburguesas poco hechas (3, 10), y causa un número estimado de 73.000 enfermedades al año (11). Sin embargo, las infecciones por STEC causadas por cepas distintas de O157 se han hecho más prevalentes en los últimos años, tanto en Estados Unidos como fuera (12-16, 29). Las infecciones por O157:H7 se diagnostican rutinariamente mediante cultivo de muestras fecales en medios selectivos (17,18), pero esta metodología permite que pasen sin detección las cepas de STEC distintas de O157. Los STEC producen una o ambas toxinas Shiga (Stx1 y/o Stx2), ambas potentes citotoxinas (19, 20). A los aislados que producen sólo Stx2 se les han atribuido tasas de incidencia mayores de SHU (18, 21-23). Las toxinas Shiga pueden detectarse mediante ensayos de cultivo tisular (24), pero este método consume mucho tiempo y trabajo. Al detectar las toxinas, la prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ puede detectar STEC presentes en muestras fecales o cultivos, independientemente del serotipo y otros factores de virulencia (25).

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ emplea anticuerpos específicos frente a Stx1 y Stx2. Los pocillos de microanálisis suministrados con este kit contienen anticuerpos monoclonales inmovilizados frente a Stx1 y Stx2. El anticuerpo detector consta de una mezcla de anticuerpos policlonales anti-Stx1 y anti-Stx2 conjugados con peroxidasa de rábano picante. En el análisis, se emulsiona una parte alícuota de una muestra o cultivo fecal en el *Diluyente* y, posteriormente, la muestra diluida se transfiere al pocillo de microanálisis que contiene el anticuerpo detector. Si la muestra contiene Stx1 y/o Stx2, se unirán al anticuerpo detector y a los anticuerpos monoclonales inmovilizados durante la fase de incubación. El material no unido se elimina durante los pasos de lavado. Tras la adición de un sustrato, se detecta un color debido a los complejos enzima-anticuerpo-antígeno que se forman en presencia de la toxina.

### MATERIALES SUMINISTRADOS

|     |     |                                                                                                                                                                |
|-----|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MA  | PLT | <b>Placa de microensayo</b> –12 tiras, cada una con 8 pocillos, revestidas con anticuerpos monoclonales específicos de Stx1 y Stx2 (conservados con desecante) |
| DIL | SPE | <b>Diluyente (40 ml)</b> – solución tamponada proteínica con tiomersal al 0,02%*                                                                               |

|         |      |
|---------|------|
| SUBS    | REAG |
| WASHBUF | 20X  |

**Sustrato (14 ml)** – solución con tetrametilbenzidina y peróxido

**Tampón de lavado concentrado (50 ml)** – concentrado 20X con solución salina tamponada con fosfato, detergente y tiomersal al 0,2%\*

Palabra de advertencia: Advertencia

H373: Puede provocar daños en los órganos tras exposiciones prolongadas o repetidas

H411: Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

P260, P273, P314, P391, P501



|                                |      |
|--------------------------------|------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 0.6N |
|--------------------------------|------|

**Solución de parada (7 ml)** – ácido sulfúrico al 0,6N. ATENCIÓN: Evitar el contacto con la piel; aclarar inmediatamente con agua en caso de contacto.

Palabra de advertencia: Peligro

H314: Provoca quemaduras graves en la piel y

lesiones oculares graves

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



|         |   |
|---------|---|
| CONTROL | + |
|---------|---|

**Control positivo (3,5 ml)** – antígeno inactivado en una solución tamponada de proteínas que contiene anfotericina B

contiene ProClin® 300 al 0,05%

Palabra de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501



|      |     |
|------|-----|
| CONJ | ENZ |
|------|-----|

**Conjugado (7 ml)** – anticuerpos policlonales específicos frente a Stx1 y Stx2 acoplados a peroxidasa de rábano picante en una solución de proteína tamponada con tiomersal al 0,02%\*

contiene ProClin® 300 al 0,05%

Palabra de advertencia: Advertencia

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501



\*contiene mercurio



## ACCESORIOS

Pipetas desechables de plástico (100)

Hojas adhesivas de plástico, (2) hojas

Etiqueta de solución de lavado, (1)

## MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Frasco de lavado

Cronómetro

Vórtex

Mezclador

Contenedor desechable

Agua destilada

Tubos para la dilución de las muestras

Compresas de papel o láminas absorbentes

Varillas aplicadoras

Refrigerador a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C

Incubadora - ajustada a 37°C ± 2°C

Pipeteador y puntas de pipeta

Guantes desechables para manipular las muestras fecales

Torundas o asas inoculadoras

Espectrofotómetro capaz de leer una longitud de onda doble a 450/620 nm o una longitud de onda única a 450 nm (se recomienda un lector de placa de longitud de onda doble; las absorbancias se deben leer a 450 nm con referencia a una longitud de onda de 620 nm)

## PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta. Las fechas de caducidad de los componentes se indican en sus correspondientes etiquetas. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2°C y 8°C. El kit con los reactivos con un período de validez designado debe conservarse a una temperatura entre 2°C y 8°C y debe volver a colocarse en el refrigerador lo antes posible después de su uso.

## PRECAUCIONES

1. Rx Only - Solo con receta
2. Para uso diagnóstico *in vitro*. Exclusivamente para uso profesional.
3. Debe inspeccionarse cada componente del kit por si existe algún signo de fuga. A su recepción, se inspeccionará el kit para comprobar que los componentes no están congelados ni calientes al tacto debido a condiciones de envío inadecuadas.
4. No deben mezclarse ni intercambiarse reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de su fecha de caducidad.
5. ¡Los tapones y las puntas están codificados con colores y NO deben mezclarse ni intercambiarse!
6. ¡ANTES DEL USO deje que todos los componentes alcancen la TEMPERATURA AMBIENTE!
7. No congele los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2°C y 8°C.
8. Cuando se manipulen pocillos de ensayo, evite rascar el fondo de los pocillos, ya que esto podría causar lecturas de absorbancia elevadas.
9. Los micropocillos no utilizados se introducirán en la bolsa resellable junto con el desecante para protegerlos de la humedad. Comprobar la bolsa de desecante antes de utilizar los pocillos. El indicador de color de la bolsa de desecante debe estar azul. Si el color pasa a rosa puede estar comprometida la calidad de los pocillos. No utilizar los pocillos almacenados con desecante rosa.
10. Cuando añada los reactivos, sujete los frascos de los reactivos en posición vertical con el fin de asegurar que el tamaño de las gotas sea consistente y el volumen sea correcto.
11. Para obtener unos resultados óptimos deben analizarse las muestras fecales en un plazo no superior a 24 horas a partir de su recogida.
12. La contaminación microbiana de los reactivos puede afectar a la exactitud del análisis. Evite la contaminación microbiana de los reactivos utilizando pipetas estériles desechables para extraer partes alícuotas de los frascos de reactivos.
13. Efectuar el procedimiento de lavado según las indicaciones para evitar reacciones de fondo elevadas.
14. El *Sustrato* es sensible a la luz y debe protegerse de la luz solar directa o de fuentes de UV.
15. La prueba se ha optimizado para mejorar la sensibilidad y la especificidad. Las alteraciones del procedimiento especificado y/o de las condiciones de la prueba pueden afectar a su sensibilidad y especificidad. No se desvíe del procedimiento especificado.
16. Las muestras fecales pueden contener agentes potencialmente infecciosos y deben manejarse en un "Nivel de Bioseguridad 2", tal como se recomienda en el Manual de los CDC/NIH, "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos".
17. Manipular las muestras y los pocillos de microanálisis utilizados como potenciales transmisores de agentes infecciosos. Utilizar guantes para realizar la prueba.
18. Los reactivos *conjugado* y *control positivo* contienen ProClin 300® al 0,05 % como conservante. Aunque la concentración es baja, se sabe que ProClin® 300 es nocivo (puede producirse sensibilización cutánea). En caso de irritación/sensibilización o erupción cutánea, consulte a un médico. Quítese las prendas contaminadas y lávelas antes de volver a usarlas. Manipule los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido; consulte al servicio técnico.
19. El *concentrado de tampón de lavado* 20x contiene tiomerosal al 0,2% como conservante. Una vez diluida hasta la concentración de uso normal, esta solución se clasifica como no peligrosa. La *solución de parada* contiene ácido sulfúrico 0,6 N. Aclarar inmediatamente con agua si se produce el contacto. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Manejar los reactivos de acuerdo con las normas existentes de seguridad de laboratorio y buenas prácticas de laboratorio. Se dispone de fichas de datos de seguridad de este producto bajo pedido, consultar al soporte técnico.

20. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos. No lo tire a la basura, elimínelo como residuo peligroso.

## RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

Las directrices de los CDC para la recogida y manipulación de muestras para pruebas diagnósticas óptimas de STEC recomiendan realizar las pruebas en las muestras en cuanto sean recibidas por el laboratorio.

| Tipos de muestra aceptables                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Muestras fecales recientes                                                                                                                |
| Muestra fecal congelada (muestras congeladas no diluidas)                                                                                 |
| Muestras en medios de transporte (p. ej., Cary Blair, C&S)                                                                                |
| Caldo cultivado a partir de un tipo de muestra aceptable                                                                                  |
| Cultivos bacterianos a partir de una placa de SMAC, CT-SMAC o CHROMagar® O157, cultivados a partir de cualquier tipo de muestra aceptable |

| No utilizar                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Muestras fecales con fijación basada en formol (p. ej., formol acetato sódico, formol al 10%) |
| Muestras fecales en fijación basada en alcohol (p. ej., alcohol polivinílico)                 |

## RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

- Manipulación de muestras para pruebas fecales directas –**
  - Las muestras frescas deben estudiarse lo antes posible después de su recepción. Si no pueden realizarse las pruebas a su recepción, las muestras pueden conservarse entre 2°C y 8°C o congelarse ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) durante hasta 14 días desde el momento de la recepción de la muestra.
  - Las muestras en medios de transporte (C&S o Cary Blair) pueden conservarse entre 2°C y 8°C o congeladas ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) durante hasta 14 días desde el momento de la recepción de la muestra.
- Manipulación de muestras para el método de caldo o placa -**
  - Las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2°C y 8°C y cultivarse cuanto antes después de su recepción. Si no pueden comenzarse los cultivos en el plazo de 2 horas desde la recepción, las muestras pueden congelarse ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) durante hasta 14 días desde el momento de la recepción de la muestra.
  - Las muestras en medios de transporte (C&S o Cary Blair) pueden conservarse entre 2°C y 8°C durante hasta 5 días.
- Debe comprobar que las muestras estén completamente mezcladas antes de realizar el análisis.
- Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación/descongelación. Si se utilizan muestras congeladas, descongele a temperatura ambiente.
- Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, se deben centrifugar las muestras una vez diluidas (5000 x g durante 10 minutos) para eliminar las partículas. Si las muestras no se pueden centrifugar, los pocillos deben prelavarse una vez manualmente como se indica en el **PROCEDIMIENTO DE PRUEBA paso 11**.

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

### A. Pruebas directas en muestras fecales (en muestras frescas y muestras en medios de transporte)

- Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de tomar las muestras.
- Continúe con el **PROCEDIMIENTO DE PRUEBA**.



**B. Método de caldo (en muestras frescas y muestras en medios de transporte)**

1. Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de inocular el caldo.
  - a. **Muestras líquidas/semisólidas** - transferir 25 µl de muestra a un tubo de cultivo con 5 ml de caldo MacConkey u 8 ml de caldo para gramnegativos (GN). Agitar con vórtex durante 10 segundos.
  - b. **Muestras formadas/sólidas** - transferir una pequeña porción (aproximadamente 2 mm de diámetro, el equivalente a 25 µl) de la muestra en un tubo de cultivo con 5 ml de caldo MacConkey u 8 ml de caldo para GN.
  - c. **Muestras fecales en medios de transporte Cary Blair o C&S** - transferir 100 µl de la muestra conservada a un tubo de cultivo con 5 ml de MacConkey u 8 ml de caldo GN.
2. Ponga el tapón sin apretar en los tubos de caldo inoculados e incube durante 16-24 horas entre 35°C y 39°C.
3. Examine el tubo para ver si hay crecimiento. Si no hay crecimiento, no continúe con la prueba. En lugar de ello, inocule otro tubo de caldo con la misma muestra fecal o una muestra fresca del mismo paciente. De forma alternativa, puede emplearse el método de placa selectivo (véase "C" a continuación) o el método de prueba de muestra fecal directa (véase "A" más arriba).
4. Continúe con el **PROCEDIMIENTO DE PRUEBA**.

**C. Método de placa (en muestras frescas y muestras en medios de transporte)**

1. Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de inocular la placa. Utilice una torunda para tomar muestras del material y extiéndalo en una placa SMAC, CT-SMAC o CHROMagar® O157. *NOTA: las placas CT-SMAC y CHROMagar® O157 son más selectivas que las placas SMAC y pueden inhibir el crecimiento de STEC no O157.*
2. Incube las placas durante 16-24 horas entre 35°C y 39°C.
3. Examine la placa para ver si hay crecimiento. Si no hay crecimiento, no continúe con la prueba. En lugar de ello, inocule otra placa con la misma muestra fecal o una muestra reciente del mismo paciente. De forma alternativa, pueden usarse el método de caldo (véase "B" más arriba) o el método de prueba de muestras fecales directas (véase "A" más arriba).
4. Continúe con el **PROCEDIMIENTO DE PRUEBA**.

**PREPARACIONES PRELIMINARES**

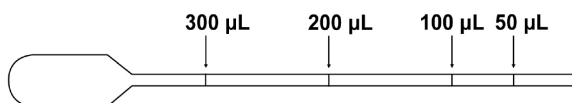
1. **Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso en el análisis.**
2. **Preparar Solución de lavado 1X.** El *Tampón de lavado concentrado* se suministra como concentrado 20x (*se puede apreciar un precipitado*). Se debe diluir hasta un volumen total de 1 litro añadiendo 50 ml del concentrado y 950 ml de agua destilada. Etiquetar el frasco. Conservar la *Solución de lavado 1X* no utilizada a una temperatura comprendida entre 2°C y 8°C.
3. **Preparación de la tira a analizar.** Cada tira contiene 8 pocillos recubiertos de anticuerpos monoclonales específicos frente a Stx1 y Stx2. Se empleará uno de estos pocillos recubiertos para cada muestra o control. Determinar el número de pocillos que se van a utilizar. Evitar el contacto con la base de los pocillos. Los pocillos de análisis no utilizados deben volver a colocarse en la bolsa de plástico y resellarse con cuidado con desecante.

**PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA**

1. Espere hasta que todos los reactivos y el número de tiras de análisis necesarios estén a temperatura ambiente antes de su uso.
2. **Asigne e identifique un tubo de ensayo para cada muestra según sea necesario.**
3. **Añada Diluyente a cada tubo usando una pipeta.** Las pipetas tienen graduaciones elevadas a 50 µl, 100 µl, 200 µl y 300 µl.

| Tipo de muestra                                               | Volumen de <i>Diluyente</i>                  |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Muestra fecal directa<br>Muestra de caldo<br>Muestra de placa | 200 µl (3ª marca de graduación en la pipeta) |
| Muestra en medios de transporte                               | 100 µl (2ª marca de graduación en la pipeta) |

**Pipeta:**



- Obtenga una pipeta de plástico desechable (suministrada con el kit) para cada muestra.
- Mezcle bien todas las muestras y cultivos independientemente de su consistencia ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea antes de tomar las muestras. Añada la cantidad necesaria de muestra o cultivo al tubo.**

Pruebas fecales directas - Muestras líquidas/semisólidas - tome una muestra de 50 µl del material con una pipeta y dispénsela en el tubo de *Diluyente*. Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida. Si no pueden realizarse pruebas inmediatamente después de la dilución, las muestras pueden conservarse a una temperatura entre 2°C y 8°C durante hasta 2 días.

Pruebas fecales directas - muestras formadas/sólidas – es preciso tener cuidado para añadir el volumen correcto de heces formadas a la mezcla de muestra. Mezcle bien la muestra con una varilla aplicadora de madera y transfiera una parte pequeña (aproximadamente de 3 mm de diámetro, el equivalente de 50 µl) de la muestra al tubo de *Diluyente*. Emulsione la muestra con la varilla aplicadora. Si no pueden realizarse pruebas inmediatamente después de la dilución, las muestras diluidas pueden conservarse a una temperatura entre 2°C y 8°C durante hasta 2 días.

Muestras fecales en medios de transporte (Cary Blair o C&S) – tome 100 µl de muestra con una pipeta y dispénselos al tubo de *Diluyente*. Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida.

Cultivos de caldo – tome 50 µl de la muestra con una pipeta y dispénselos en el tubo de *Diluyente*. Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida.

Cultivos de placa – barra a través de un área confluyente de la placa varias veces o tome colonias individuales con un asa inoculadora y luego mezcle el asa en el tubo de *Diluyente*. Haga girar el asa contra la parte interior del tubo de ensayo varias veces para liberar la muestra y retire el asa.

**NOTA:** Si se transfiere una cantidad muy reducida de muestra o si no se mezcla y se suspende completamente la muestra en el diluyente puede obtenerse un resultado falso negativo en la prueba.

- Cierre cada tubo de muestra diluida o control y mezcle bien. Mezcle adecuadamente con vórtex o invirtiendo el tubo varias veces.
- Añadir 1 gota (50 µl) de *Conjugado* (tapa roja) a cada pocillo.** Asegurarse de sostener el frasco en posición vertical al añadir las gotas. Utilice 1 pocillo para cada muestra fecal, 1 pocillo para el *Control positivo* y 1 pocillo para el control negativo. Se pueden escribir marcas de identificación directamente en el lateral del pocillo.
- Utilizando una nueva pipeta, transfiera 100 µl de muestra diluida al pocillo de ensayo.** Añada 1 gota (50 µl) del *Control positivo* (tapa negra) al pocillo de control positivo y 100 µl del *Diluyente* (control negativo) al pocillo de control negativo. Golpee suavemente los laterales de la placa para mezclar.

9. Recortar la hoja adhesiva de plástico al tamaño necesario para cubrir los pocillos.  
**Cubrir los pocillos e incubarlos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 50 minutos.**
10. Vaciar el contenido de los pocillos de análisis a un contenedor de desechos.
11. **Lavar cada pocillo con la *Solución de lavado 1X* en un frasco con rociador con boquilla de punta fina**, dirigiendo con fuerza la *solución de lavado* hacia el fondo del pocillo. Llenar los pocillos y a continuación transferir la *Solución de lavado* de los pocillos a un contenedor de desechos. Golpear la placa invertida sobre una compresa de papel seca.  
*Nota: Si se utiliza un equipo de lavado semiautomático o automático, añadir 350  $\mu\text{L}$  de Solución de lavado 1X a cada pocillo. Lavar un total de 5 veces (4 veces si se realiza un prelavado manual para muestras no centrifugadas).*
12. Repetir la etapa 11 cuatro veces más utilizando cada vez una compresa de papel seca. Si se observan partículas en los pocillos, seguir lavando hasta que se elimine toda esta materia.
13. Después del lavado, retirar completamente cualquier líquido residual de los pocillos golpeando de nuevo la placa sobre una compresa de papel seca hasta que no salga más líquido. Eliminar adecuadamente las compresas de papel y los contenedores de muestras.
14. **Añadir 2 gotas (100  $\mu\text{L}$ ) de *Sustrato* (tapa azul) a cada pocillo.** Golpear suavemente los pocillos para mezclar el sustrato. Incubar los pocillos durante 10 minutos a temperatura ambiente. Golpear suavemente los pocillos a los 5 minutos.
15. **Añadir 1 gota (50  $\mu\text{L}$ ) de *Solución de parada* (tapa amarilla) a cada pocillo.** Golpear suavemente los pocillos y esperar 2 minutos antes de la lectura. La adición de la *Solución de parada* convierte el color azul en amarillo, lo que puede cuantificarse determinando la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. El instrumento debe calibrarse con aire. Si se utiliza un lector de longitud de onda doble, calibrar con aire a 620 nm y leer a 450 nm. Pasar un paño por la parte inferior de cada pocillo antes de medir la densidad óptica. Si no se dispone de un lector de placas de ELISA, la prueba se puede leer visualmente en condiciones de iluminación adecuadas frente a un fondo blanco. Leer a los 10 minutos de añadir la *Solución de parada*.

## PROCEDIMIENTO ALTERNATIVO DE LA PRUEBA / FORMATO RÁPIDO

Realizar el procedimiento habitual de la prueba siguiendo las instrucciones antes proporcionadas sustituyendo la incubación de 50 minutos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  utilizando el *Incubador/Agitador Stat Fax 2200* o un aparato equivalente. Si se utiliza el *Incubador/Agitador Stat Fax 2200*, seleccionar la velocidad 7 del agitador y fijar la temperatura en  $37^{\circ}\text{C}$ . Se recomienda una velocidad de 1500 rpm si se utilizan otros agitadores. La agitación no debe producir derramamiento. Si se produce algún derramamiento, debe reducirse la velocidad (26).

## CONTROL DE CALIDAD

1. Se efectuarán un control positivo y un control negativo con cada serie de muestras problema.
2. Los controles positivo y negativo deben estar dentro de sus rangos respectivos o la prueba no será válida.
  - a) **El control positivo debe tener un color amarillo visible.** Si se lee en un espectrofotómetro, la OD a 450 nm o a 450/620 nm (cuando se utiliza longitud de onda doble) debe ser  $\geq 0,500$ .
  - b) **El control negativo debe ser transparente.** Si se lee en un espectrofotómetro, la OD a 450 nm debe ser  $<0,120$ . Si se lee a 450/620 nm, la absorbancia debe ser  $<0,080$ .
3. Si los pocillos parecen transparentes pero tienen una absorbancia  $\geq 0,120$  OD a 450 nm, se debe limpiar la parte inferior de los mismos y después repetir su lectura.
4. Las lecturas visuales se deben realizar en condiciones adecuadas de iluminación frente a un fondo blanco.

- Para garantizar que no se ha producido ningún efecto de arrastre, debe repetirse el análisis de las muestras que den resultados débilmente positivos (p. ej.,  $<0,200$ ) y que estén adyacentes a otra con resultado fuertemente positivo.

## INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

|                 | Lectura visual           | Lectura espectrofotométrica     |                                     |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|                 |                          | Longitud de onda única a 450 nm | Longitud de onda doble a 450/620 nm |
| <b>Negativo</b> | Incoloro                 | OD $< 0,120$                    | OD $< 0,080$                        |
| <b>Positivo</b> | Cualquier color amarillo | OD $\geq 0,120$                 | OD $\geq 0,080$                     |

Un resultado de prueba positivo indica que están presentes Stx1 y/o Stx2 en la muestra. Un resultado negativo indica que Stx1 y/o Stx2 están ausentes o el nivel está por debajo del límite de detección de la prueba.

Nota: Debido a la importancia epidemiológica de obtener aislados bacterianos positivos para toxina Shiga, se recomienda que todas las muestras positivas para toxina se sometan a cultivo bacteriano para aislar el organismo productor de toxina. Se sugiere que los laboratorios realicen cultivos bacterianos en todas las muestras positivas o coordinen el proceso con sus laboratorios sanitarios locales y estatales en Estados Unidos.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA SHIGA TOXIN CHEK™

- La prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ se utiliza para detectar Stx1 y Stx2 en muestras fecales y cultivos derivados de muestras fecales. La prueba confirma la presencia de Stx1 y Stx2 en la muestra y esta información deberá analizarla el médico junto con la anamnesis y la exploración física del paciente.
- Un resultado negativo de la prueba no descarta la posibilidad de la presencia de toxinas Shiga en la muestra, lo que puede producirse si el nivel de antígeno está por debajo del límite de detección de la prueba.
- La prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ es cualitativa. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
- La toxina producida por *Shigella dysenteriae* es casi idéntica a la Toxina 1 Shiga producida por *E. coli* (27), y si está presente a niveles detectables, dará un resultado positivo en el pocillo.

## VALORES ESPERADOS

La prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ detecta la presencia de Stx1 y Stx2. Cada laboratorio debe establecer los valores esperados para una población concreta. La tasa de positividad podría depender de diversos factores como la geografía, el proceso de recogida, manipulación y transporte de las muestras y la edad del paciente.

Se estima que *E. coli* con toxina Shiga causa unos 110.000 casos (0,04% de la población) de enfermedades causadas por alimentos anualmente en Estados Unidos (11). Las tasas de incidencia comunicadas en muestras fecales remitidas para pruebas van del 0% al 4,1% (18) y varían dependiendo de la estación del año, la localización geográfica y la población de pacientes, observándose mayores tasas de incidencia en los meses de verano y en los niños preescolares y los ancianos (28). Un resultado positivo en la prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ test confirma la presencia de toxina Shiga en la muestra; un resultado negativo indica la ausencia de toxina o niveles insuficientes de toxina para su detección.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Pruebas fecales directas

Se comparó el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK*™ con el Ensayo de Citotoxina de Célula Vero (con neutralización), considerado la referencia clínica (patrón

oro) y se incluyeron 889 muestras frescas y 14 congeladas. Se dispuso de información sobre edad de 902 pacientes. De los 902 pacientes, el 8,8% eran  $\leq 18$  años. La tabla siguiente muestra un resumen del rendimiento clínico de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™*. Los resultados demuestran que la prueba mostró una sensibilidad del 100%, una especificidad del 99,9% y una correlación global del 99,9% con el ensayo de citotoxina.

Resultados en pruebas fecales directas

| n = 913                               | Positivo con citotoxina de célula Vero | Negativo con citotoxina de célula Vero |
|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Positivo con <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> | 78                                     | 1                                      |
| Negativo con <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> | 0                                      | 834                                    |

|               |       | Intervalo de Confianza del 95% |
|---------------|-------|--------------------------------|
| Sensibilidad  | 100%  | 94,2 - 100%                    |
| Especificidad | 99,9% | 99,2 - 100%                    |
| Correlación   | 99,9% | 100 - 100%                     |

Cultivos de caldo

Se comparó el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™* usando cultivos de una noche en caldo (GN o MacConkey) de muestras fecales con el ensayo de citotoxina de células Vero (con neutralización), considerado el patrón clínico de referencia (patrón oro). La tabla siguiente muestra un resumen del rendimiento clínico de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™*. Los resultados demuestran que la prueba mostró una sensibilidad del 97,1%, una especificidad del 99,7% y una correlación global del 99,5% con el ensayo de citotoxina.

Resultados de pruebas en cultivos de caldo

| n = 789                               | Positivo con citotoxina de célula Vero | Negativo con citotoxina de célula Vero |
|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Positivo con <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> | 67                                     | 2                                      |
| Negativo con <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> | 2                                      | 718                                    |

|               |       | Intervalo de Confianza del 95% |
|---------------|-------|--------------------------------|
| Sensibilidad  | 97,1% | 89,0 - 99,5%                   |
| Especificidad | 99,7% | 98,9 - 99,9%                   |
| Correlación   | 99,5% | 99,5 - 99,5%                   |

REPRODUCIBILIDAD

Se determinó la reproducibilidad la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™* usando 11 muestras fecales que se codificaron para impedir su identificación durante las pruebas. Las pruebas se realizaron en 2 laboratorios independientes e in situ en TECHLAB®, Inc. Las muestras se estudiaron dos veces al día a lo largo de un periodo de 5 días por parte de múltiples clínicos en cada centro, usando 2 lotes diferentes del kit. Se estudió un control positivo y negativo con cada panel de las muestras enmascaradas. Los resultados de cada laboratorio se remitieron posteriormente a TECHLAB®, Inc. y se compararon con

resultados internos. Los resultados fueron coherentes entre las diferentes localizaciones y mostraron una correlación del 100%. Las muestras produjeron los resultados esperados en todos los casos.

## CENTRIFUGACIÓN

Se evaluó un total de 108 muestras fecales, con 19 positivas y 89 negativas, para determinar el efecto de la centrifugación sobre el rendimiento. Para el análisis, las muestras se diluyeron y mezclaron con vórtex tal y como se describe en el prospecto. Se centrifugaron las muestras (5000 x g) para eliminar el material insoluble y se estudió el líquido sobrenadante en el *SHIGA TOXIN CHEK™*. Los resultados se compararon con los obtenidos en el mismo grupo de muestras diluidas y mezcladas (con vórtex) que no habían sido centrifugadas. Los resultados demostraron una correlación del 100% entre las muestras centrifugadas y no centrifugadas.

## REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™* con las cepas bacterianas y víricas enumeradas a continuación. Ninguna de las cepas mostró interferencia con el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™*.

|                                                 |                                             |                                                |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                     | <i>Campylobacter coli</i>                   | <i>Campylobacter fetus</i>                     |
| <i>Campylobacter jejuni</i>                     | <i>Candida albicans</i>                     | <i>Citrobacter freundii</i>                    |
| <i>Clostridium difficile</i>                    | <i>Clostridium perfringens</i>              | <i>Enterobacter cloacae</i>                    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                    | <i>Escherichia coli</i>                     |                                                |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (non-toxigenic) |                                             | <i>Escherichia coli</i> EIEC (enteroinvasive)  |
| <i>Escherichia coli</i> EPEC (enteropathogenic) |                                             | <i>Escherichia coli</i> ETEC (enterotoxigenic) |
| <i>Escherichia fergusonii</i>                   | <i>Escherichia hermannii</i>                | <i>Gardnerella vaginalis</i>                   |
| <i>Helicobacter pylori</i>                      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                | <i>Lactobacillus acidophilus</i>               |
| <i>Proteus vulgaris</i>                         | <i>Providencia stuartii</i>                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                  |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                  | <i>Salmonella enteric</i> serovar minnesota |                                                |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                   | <i>Serratia liquefaciens</i>                | <i>Shigella flexneri</i>                       |
| <i>Shigella sonnei</i>                          |                                             | <i>Staphylococcus aureus</i>                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)            |                                             | <i>Staphylococcus epidermidis</i>              |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>                  |                                             |                                                |

|                                         |                             |
|-----------------------------------------|-----------------------------|
| Human Adenovirus, Type 2, 14, 40 and 41 | Human Coxsackievirus A9, B1 |
| Human Enterovirus 69                    | Feline calicivirus          |
|                                         | Human rotavirus             |

## CEPAS/SEROTIPOS

Se estudiaron diversas cepas y serotipos de *E. coli* productores de toxina Shiga en la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™* mediante los métodos de cultivo en placa de Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) y caldo MacConkey. Se estudiaron también cepas de *Escherichia coli* O157 usando cultivos en placas de CT-SMAC y ChromAgar® O157. Cada cepa es un aislado clínico y cada una de ellas se estudió mediante un ensayo de citotoxinas y una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para confirmar la presencia del(de los) gen(es) de la toxina Shiga. Todos los organismos generaron resultados positivos para la(s) toxina(s) adecuada(s) cuando se estudiaron.

A continuación se muestra una lista de los serotipos estudiados, el número de cepas estudiadas en ese tipo de grupo y el tipo de toxina producida por cada cepa.

**Toxina Shiga de tipo Stx1: Tipos de cepa** - O26:H11 (5 cepas), O157:H7, O111:NM (2 cepas), O103:H2, O103:H25, O103:H6, O103:N, O111:H11, O111:H8, O145:H16, O145:NM, O45:H2 (4 cepas), O45:NM, O125:NM, O146:H21, O156:H21, O26, O5:N, O70:H11, O111a:NM

**Toxina Shiga de tipo Stx2: Tipos de cepas** - 157:H7 (6 cepas), O104:H4 (cepa del brote europeo de 2011), O177:NM, O6:H10, O121:H19 (3 cepas), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21, O6:H10

**Toxina Shiga de tipos Stx1 y Stx2: Tipos de cepa** - O157:H7 (8 cepas), O157:NM (2 cepas), O111:H8, O111, O111:NM (2 cepas), O113:H21, O15:H27

#### **SUSTANCIAS INTERFERENTES (formulaciones de EE.UU.)**

Las siguientes sustancias no tuvieron ningún efecto en los resultados positivos o negativos de la prueba analizados a las concentraciones indicadas: Mucina gástrica de cerdo (3,5% p/v), sangre humana (40% v/v), sulfato de bario (5% w/v), Imodium® (5% v/v), Kaopectate® (5% v/v), Pepto-Bismol® (5% v/v), Maalox® Advanced (5% v/v) ácido estérico (40% p/v), metronidazol (0,25% p/v), vancomicina (0,25% p/v), Prilosec OTC® (5 µg/ml), TUMS (50 µg/ml), Tagamet® (5 µg/ml), leucocitos (0,05% v/v), ciprofloxacino (0,25% p/v).

#### **PRECISIÓN – INTRAANALÍTICA**

Para la determinación del rendimiento intraanalítico, se analizaron 6 muestras fecales positivas y 6 muestras fecales negativas. Se estudió cada muestra en ocho replicaciones. Todos los resultados positivos siguieron siendo positivos y todos los resultados negativos, negativos.

#### **PRECISIÓN – INTERANALÍTICA**

Se determinó la precisión interanalítica de la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™* usando 12 muestras fecales (seis negativas, dos positivas para Stx1, dos positivas para Stx2 y dos positivas tanto para Stx1 como para Stx2). Las muestras se estudiaron dos veces al día a lo largo de un período de 5 días usando 2 lotes de kits diferentes. Se estudió un control positivo y negativo cada día. Todos los resultados positivos siguieron siendo positivos y todos los resultados negativos, negativos.

#### **SENSIBILIDAD ANALÍTICA**

El valor de corte para la prueba *SHIGA TOXIN CHEK™* para muestras fecales directas se estableció a concentraciones de 0,28 ng/ml de Stx1 y 0,23 ng/ml de Stx2 y para los cultivos de caldo a concentraciones de 0,18 ng/ml de Stx1 y 0,30 ng/ml de Stx2.



## SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ - DEUTSCH

### VERWENDUNGSZWECK

Der **SHIGA TOXIN CHEK™** ist ein Enzymimmunoassay für den gleichzeitigen qualitativen Nachweis von Shiga-Toxin 1 (Stx1) und Shiga-Toxin 2 (Stx2) in einem einzigen Test. Er dient als Hilfsmittel zur Diagnose von Erkrankungen durch Shiga-Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) in menschlichen Stuhlproben von Patienten mit Symptomen einer Magen-Darm-Erkrankung. Er kann entweder direkt mit Stuhlproben oder Nährlösungs- bzw. Plattenkulturen aus Stuhlproben verwendet werden. Die Testergebnisse sind gemeinsam mit der Patientenanamnese zu betrachten.

**Achtung: Gemäß US-Bundesgesetz ist der Verkauf dieses Produkts an Ärzte bzw. auf Anordnung eines Arztes beschränkt**

### ERKLÄRUNG

Shiga-Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) wurden erstmals von O'Brien *et al.* beschrieben, nachdem sie entdeckt hatten, dass für HeLa- und Vero-Zellen zytotoxischer *E. coli*-Kulturüberstand durch Antikörper gegen Shiga-Toxin aus Kaninchen neutralisiert werden konnte (1). STEC verursacht weltweit nahrungsmittel- und wasserbedingte Durchfallerkrankungen, die, wenn sie undiagnostiziert bleiben, zu hämorrhagischer Colitis und/oder einem hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) fortschreiten können (2, 3). Da bestimmte Behandlungen und Medikamente das Risiko von HUS erhöhen können (4), ist ein rascher Nachweis notwendig, um Epidemien und sekundäre Übertragungen zu verhindern (5-9). Der STEC-Stamm O157:H7 ist seit jeher im Zentrum der Aufmerksamkeit in den USA, seit er zum ersten Mal aus unzureichend gegarten Frikadellen (3, 10) isoliert wurde. Er verursacht schätzungsweise jährlich etwa 73.000 Krankheitsfälle (11). In den letzten Jahren weisen jedoch sowohl in den USA als auch in anderen Ländern STEC-Infektionen, die durch andere Stämme als O157 verursacht werden, eine zunehmend höhere Prävalenz auf (12-16, 29). O157:H7-Infektionen werden routinemäßig durch Kulturen aus Stuhlproben auf selektiven Medien diagnostiziert (17, 18); bei dieser Methode werden jedoch andere STEC-Stämme als O157 nicht nachgewiesen. STEC produziert entweder ein oder beide Shiga-Toxine (Stx1 und/oder Stx2), die beide starke Zytotoxine sind (19, 20). Isolate, die nur Stx2 produzieren, wurden höhere Inzidenzraten von HUS zugeschrieben (18, 21-23). Shiga-Toxine lassen sich mit Gewebekulturtests nachweisen (24), dieses Verfahren ist jedoch äußerst zeit- und arbeitsaufwändig. Durch den Nachweis der Toxine kann der **SHIGA TOXIN CHEK™** STEC in Stuhlproben oder Kulturen, unabhängig vom Serotyp oder anderen Virulenzfaktoren, nachweisen (25).

### TESTPRINZIP

Der **SHIGA TOXIN CHEK™** basiert auf Antikörpern gegen Stx1 und Stx2. Die mit dem Kit mitgelieferten Mikrotiterkavitäten enthalten immobilisierte monoklonale Antikörper gegen Stx1 und Stx2. Der Nachweisantikörper besteht aus einer Mischung aus an Meerrettich-Peroxidase konjugierten polyklonalen Anti-Stx1- und Anti-Stx2-Antikörpern. Bei dem Test wird ein Aliquot einer Stuhlprobe oder Kultur im *Verdünnungspuffer* emulgiert und die verdünnte Probe in die Mikrotiterkavität mit dem Nachweisantikörper übertragen. Sind Stx1 und/oder Stx2 in der Probe vorhanden, so binden sie während der Inkubationsphase an den Nachweisantikörper und die immobilisierten monoklonalen Antikörper. Nicht gebundenes Material wird während der Waschschriffe entfernt. Nach der Zugabe von *Substrat* wird aufgrund der Enzym-Antikörper-Antigen-Komplexe, die sich in Gegenwart von Toxin bilden, eine Färbung nachgewiesen.

### PACKUNGSGEHALT

|     |     |                                                                                                                                                                       |
|-----|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MA  | PLT | <b>Mikrotiterplatte</b> – 12 Streifen, 8 Kavitäten pro Streifen, beschichtet mit für Stx1 und Stx2 spezifischen monoklonalen Antikörpern (mit Trockenmittel gelagert) |
| DIL | SPE | <b>Verdünnungspuffer (14 ml)</b> – Gepufferte Proteinlösung mit 0,02 % Thimerosal*                                                                                    |

SUBS REAG

**Substrat (14 ml)** – Lösung aus Tetramethylbenzidin und Peroxid

WASCHBUF 20X

**Waschpuffer-Konzentrat (50 ml)** – 20x-Konzentrat mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung, Detergens und 0,2 % Thimerosal\*

Signalwort: Warnung

H373: Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition

H411: Giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

P260, P273, P314, P391, P501

 $H_2SO_4$ 

0.6N

**Stopplösung (7 ml)** – 0,6 N Schwefelsäure. VORSICHT: Kontakt mit der Haut vermeiden; im Falle eines Hautkontakts sofort mit Wasser abspülen

Signalwort: Gefahr

H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353,

P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



CONTROL +

**Positive Kontrolle (3,5 mL)** – inaktiviertes Antigen in gepufferter

Proteinlösung mit Amphotericin B

Signalwort: Warnung – 0,05 % ProClin® 300

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501



CONJ ENZ

**Konjugat (7 ml)** – für Stx1 und Stx2 spezifische polyklonale Antikörper, gebunden an Meerrettich-Peroxidase in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,02 % Thimerosal

Signalwort: Warnung – 0,05 % ProClin® 300

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501



\*Enthält Quecksilber



## ZUBEHÖR

Einweg-Transferpipetten aus Kunststoff (100)

Kunststoffklebefolien, (2) Bögen

Waschlösungsetikett, (1)

## ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT ENHALTEN)

Waschflasche

Zeitmesser

Vortex-Schüttler

Mischer

Abfallbehälter

Destilliertes Wasser

Reagenzgläser zur Probenverdünnung

Papiertücher bzw. Saugpapier

Applikatorstäbchen

Kühlschrank, zwischen 2° C und 8° C eingestellt

Inkubator auf 37° C ± 2° C eingestellt

Pipettierer und Pipettenspitzen

Einweghandschuhe zur Handhabung der Stuhlproben

Tupfer oder Impfösen

Spektrophotometer für zwei Wellenlängen bei 450/620 nm oder eine Wellenlänge bei 450 nm (Plattenlesegerät für zwei Wellenlängen wird empfohlen; Absorptionen sollten bei 450 nm gemessen und bei 620 nm referenziert werden)

## HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Testkits ist auf dem Packungsetikett angegeben. Das Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit muss bei Temperaturen zwischen 2° C und 8° C gelagert werden. Das Kit mit den Reagenzien mit angegebener Haltbarkeit muss bei Temperaturen zwischen 2° C und 8° C gelagert und so rasch wie möglich nach Gebrauch in den Kühlschrank zurückgegeben werden.

## VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Verschreibungspflichtig
2. *In-vitro*-Diagnostikum. Nur für den professionellen Gebrauch.
3. Alle Bestandteile des Kits müssen auf Anzeichen von Undichtigkeit untersucht werden. Bei Erhalt des Kits muss sichergestellt werden, dass die Komponenten nicht wegen unsachgemäßer Transportbedingungen gefroren oder zu warm sind.
4. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen oder miteinander vertauschen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem Verfallsdatum.
5. Verschlüsse und Spitzen sind farbkodiert; NICHT vertauschen!
6. Lassen Sie alle Bestandteile VOR DER VERWENDUNG RAUMTEMPERATUR annehmen!
7. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss bei einer Temperatur zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.
8. Vermeiden Sie beim Umgang mit den Mikrokavitäten, diese zu verkratzen, da dies zu erhöhten Absorptionsmesswerten führen kann.
9. Nicht verwendete Kavitäten der Mikrotiterplatte müssen mit Trockenmittel zurück in den wiederverschließbaren Beutel gegeben werden, damit sie vor Feuchtigkeit geschützt sind. Überprüfen Sie die Trockenmittelpackung vor dem Gebrauch der Mikrokavitäten. Der Farbindikator auf der Trockenmittelpackung muss blau sein. Ein rosafarbener Indikator bedeutet, dass die Qualität der Mikrokavitäten nicht gewährleistet ist. Verwenden Sie bitte keine Mikrokavitäten bei rosafarbenem Trockenmittel.
10. Halten Sie die Reagenzflaschen bei der Reagenzienabgabe senkrecht, um eine einheitliche Tropfengröße und korrekte Menge sicherzustellen.
11. Verwenden Sie Stuhlproben nach der Entnahme innerhalb von 24 Stunden, um optimale Ergebnisse zu erzielen.
12. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen. Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien, indem Sie sterile Einweg-Pipetten für die Reagenzienentnahme aus den Flaschen verwenden.
13. Führen Sie das Waschverfahren nach Anweisung durch, um starke Hintergrundreaktionen zu vermeiden.
14. Das *Substrat* ist lichtempfindlich und muss vor direktem Sonnenlicht und UV-Quellen geschützt werden.
15. Der Test wurde in Bezug auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Abweichungen vom angegebenen Verfahren und/oder Änderungen der Testbedingungen können die Sensitivität und Spezifität des Tests beeinflussen. Halten Sie sich genau an die Anweisungen.
16. Stuhlproben können potenzielle Infektionserreger enthalten und sind wie im CDC/NIH-Handbuch „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories“ (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors) empfohlen nach „Biosicherheitsstufe 2“ zu handhaben.
17. Behandeln Sie die Proben und gebrauchten Mikrokavitäten als infektiöses Material. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Schutzhandschuhe.
18. Das *Konjugat* und die *Positive Kontrolle* enthalten 0.05% ProClin® 300 als Konservierungsstoff. Auch wenn die Konzentration gering ist, ist ProClin® 300 als schädlich bekannt (Hautsensibilisierung kann auftreten). Bei Hautsensibilisierung/-reizung ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den Kundendienst.
19. Das 20-fache *Waschpufferkonzentrat* enthält 0,2 % Thimerosal als Konservierungsmittel. Sobald sie auf normale Gebrauchskonzentration verdünnt ist, wird diese Lösung als ungefährlich eingestuft. Die *Stopplösung* enthält 0,6N Schwefelsäure. Bei Kontakt sofort mit Wasser abspülen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Reagenzien gemäß

vorhandenen Vorschriften für die Laborsicherheit und gute Laborpraxis behandeln. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Nachfrage erhältlich. Wenden Sie sich an den technischen Support.

20. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung. Nicht zum Hausmüll geben, als gefährlichen Abfall entsorgen.

### ENTNAHME, HANDHABUNG UND LAGERUNG VON STUHLPROBEN

Nach den CDC-Richtlinien zur Entnahme und Handhabung von Proben für optimale STEC-Diagnostik sollten die Proben unmittelbar nach Eingang im Labor getestet werden.

| Akzeptable Probentypen                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Frische Stuhlproben                                                                                 |
| Gefrorene Stuhlproben<br>(gefrorene unverdünnte Proben)                                             |
| Proben in Transportmedien<br>(z.B. Cary Blair, C&S)                                                 |
| Nährlösungen aus akzeptablem Probentyp                                                              |
| Bakterienkulturen einer SMAC-, CT-SMAC- oder CHROMagar® O157-Platte von einem akzeptablem Probentyp |

| Nicht verwenden                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Stuhlproben in Fixiermittel auf Formalinbasis (z.B. Natriumacetat-Formalin, Formalin 10 %) |
| Stuhlproben in Fixiermittel auf Alkohobasis (z.B. Polyvinylalkohol)                        |

### ENTNAHME UND HANDHABUNG DER STUHLPROBEN

- Handhabung von Proben für direkte Stuhltests –**
  - Frische Proben so rasch wie möglich nach Erhalt testen. Wenn bei Erhalt keine Tests durchgeführt werden können, so können die Proben ab Erhalt für 14 Tage zwischen 2° C und 8° C gelagert bzw. eingefroren ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) werden.
  - Proben in Transportmedien (C&S oder Cary Blair) können ab Erhalt 14 Tage lang bei Temperaturen zwischen 2° C und 8° C oder tiefgefroren ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) gelagert werden.
- Handhabung von Proben bei Nährlösungs- bzw. Plattenmethode –**
  - Die Proben bei Temperaturen zwischen 2° C und 8° C lagern und so bald wie möglich nach Erhalt Kulturen anlegen. Wenn nicht innerhalb von 2 Stunden nach dem Erhalt der Proben Kulturen angelegt werden können, so können die Proben ab Erhalt bis zu 14 Tage lang eingefroren ( $\leq -10^{\circ}\text{C}$ ) werden.
  - Proben in Transportmedien (C&S oder Cary Blair) können bis zu 5 Tage bei Temperaturen zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.
- Stellen Sie sicher, dass die Proben vor dem Test gründlich gemischt wurden.
- Wiederholtes Einfrieren/Auftauen ist zu vermeiden. Gefrorene Proben bei Raumtemperatur auftauen.
- Bei Verwendung automatischer oder halbautomatischer Waschgeräte müssen die verdünnten Proben zur Entfernung von Partikeln zentrifugiert werden (5000 x g – 10 Minuten). Ist ein Zentrifugieren der Proben nicht möglich, müssen die Kavitäten einmal manuell vorgewaschen werden. Siehe hierzu **TESTVERFAHREN Schritt 11**.

### VORBEREITUNG DER PROBEN

#### A. Direkte Stuhlprobentestmethode (bei frischen Proben und Proben in Transportmedien)

- Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Übertragen ist unbedingt erforderlich.
- Weiter zu **TESTVERFAHREN**.

#### B. Nährlösungsmethode (bei frischen Proben und Proben in Transportmedien)

1. Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Beimpfen der Nährlösung ist unbedingt erforderlich.
  - a. **Flüssige/Halb feste Proben** - 25 µl Probe in ein Kultur-Reagenzglas mit 5 ml MacConkey- oder 8 ml gramnegativer (GN) Nährlösung übertragen. 10 Sekunden vortexen.
  - b. **Feste Stuhlproben** - Eine kleine Menge (ca. 2 mm Durchmesser, entspricht 25 µL) der Probe in ein Kultur- Reagenzglas mit 5 ml MacConkey- bzw. 8 ml GN-Nährlösung übertragen.
  - c. **Stuhlproben in Cary Blair- oder C&S-Transportmedien** - 100 µl der konservierten Probe in ein Kultur-Reagenzglas mit 5 ml MacConkey- oder 8 ml GN-Nährlösung übertragen.
2. Die beimpften Reagenzgläser mit Nährlösung lose verschließen und 16-24 Stunden zwischen 35° C und 39° C inkubieren.
3. Das Reagenzglas auf Wachstum untersuchen. Wenn kein Wachstum erfolgt ist, keine Tests durchführen. Ein neues Nährlösungs-Reagenzglas entweder mit derselben Stuhlprobe oder einer frischen Stuhlprobe des betreffenden Patienten beimpfen. Als Alternative kann die selektive Plattenmethode (siehe „C“ unten) oder die direkte Stuhlproben testmethode (siehe „A“ oben) angewandt werden.
4. Weiter zu **TESTVERFAHREN**.

#### C. Plattenmethode (bei frischen Proben und Proben in Transportmedien)

1. Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Beimpfen der Platte ist unbedingt erforderlich. Benutzen Sie einen Tupfer für die Probenentnahme und verteilen Sie die Probenmenge auf einer SMAC-, CT-SMAC-, oder CHROMagar® O157-Platte. *BITTE BEACHTEN: CT-SMAC- und CHROMagar® O157-Platten sind selektiver als SMAC-Platten und können das Wachstum von anderen als O157-STEC hemmen.*
2. Die Platten 16-24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 35° C und 39° C inkubieren.
3. Die Platte auf Wachstum untersuchen. Wenn kein Wachstum erfolgt ist, keine Tests durchführen. Stattdessen eine weitere Platte entweder mit derselben Stuhlprobe oder einer frischen Stuhlprobe des betreffenden Patienten beimpfen. Als Alternative kann die Nährlösungsmethode (siehe „B“ unten) oder die direkte Stuhlproben testmethode (siehe „A“ oben) angewandt werden.
4. Weiter zu **TESTVERFAHREN**.

#### VORBEREITUNGEN

1. **Vor der Verwendung müssen alle Reagenzien Raumtemperatur angenommen haben.**
2. **Bereiten Sie 1xWaschlösung zu.** Das Waschpuffer-Konzentrat wird als 20x-Konzentrat geliefert (*möglicherweise ist ein Präzipitat sichtbar*). Verdünnen Sie es auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, indem Sie 50 ml Konzentrat 950 ml destilliertem Wasser hinzufügen. Beschriften Sie die Flasche. Lagern Sie nicht gebrauchte 1xWaschlösung zwischen 2° C und 8° C.
3. **Vorbereitung der Teststreifen.** Jeder Streifen enthält 8 Kavitäten, die mit für Stx1 und Stx2 spezifischen monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Für jede Probe bzw. Kontrolle ist eine dieser beschichteten Kavitäten erforderlich. Legen Sie die Anzahl der zu verwendenden Kavitäten fest. Vermeiden Sie eine Berührung des Bodens der Kavitäten. Nicht verwendete Mikrotiterplattenkavitäten müssen zurück in den Kunststoffbeutel gegeben und mit Trockenmittel gut verschlossen werden.

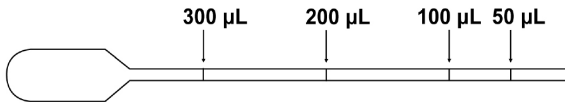
#### TESTVERFAHREN

1. Lassen Sie alle Reagenzien und die erforderliche Anzahl an Teststreifen vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen.
2. **Verwenden Sie für jede Stuhlprobe ein eigenes Reagenzglas und kennzeichnen Sie es.**

3. **Fügen Sie jedem Reagenzglas mithilfe einer Transferpipette Verdünnungspuffer hinzu.** Die Pipetten sind mit einer Messskala von 50 µl, 100 µl, 200 µl und 300 µl versehen.

| Probentyp                                                 | Menge Verdünnungspuffer                        |
|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Direkte Stuhlproben<br>Nährlösungsproben<br>Plattenproben | 200 µL (3. Markierung auf der Transferpipette) |
| Proben in Transportmedien                                 | 100 µL (2. Markierung auf der Transferpipette) |

Transferpipette



4. Sie benötigen 1 Einweg-Kunststofftransferpipette (im Lieferumfang enthalten) für jede Probe.
5. **Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Übertragen ist unbedingt erforderlich. Geben Sie die erforderliche Menge Probe oder Kultur in das Reagenzglas.**

Direkter Stuhlprobentest - Flüssige/halbfeste Proben – Übertragen Sie 50 µl Probe mit einer Transferpipette und pipettieren Sie sie in das Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer*. Benutzen Sie dieselbe Transferpipette zum Mischen der verdünnten Probe. Wenn nicht sofort nach der Verdünnung getestet werden kann, so können die Proben für max. 2 Tage zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.

Direkter Stuhlprobentest - Feste Proben – Achten Sie genau darauf, dass Sie der Probenmischung die korrekte Stuhlmenge beifügen. Mischen Sie die Probe gründlich mithilfe eines Applikatorstäbchens durch, und übertragen Sie eine kleine Probenmenge (ca. 3 mm Durchmesser, entspricht der Menge von 50 µl) in das Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer*. Emulgieren Sie die Probe mit dem Applikatorstäbchen. Wenn nicht sofort nach der Verdünnung getestet werden kann, so können die verdünnten Proben für max. 2 Tage zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.

Stuhlproben in Transportmedien (Cary Blair oder C&S) – 100 µL Probe mit einer Transferpipette entnehmen und in das Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer* dispensieren. Verwenden Sie dieselbe Transferpipette zum Mischen der verdünnten Probe.

Nährlösungskulturen – 50 µL Probe mit einer Transferpipette entnehmen und in das Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer* dispensieren. Verwenden Sie dieselbe Transferpipette zum Mischen der verdünnten Probe.

Plattenkulturen – Mehrmals mit einer Impföse über einen konfluierenden Bereich der Platte streichen oder einzelne Kolonien damit aufnehmen und dann die Öse im Reagenzglas mit dem *Verdünnungspuffer* mischen. Die Impföse mehrmals an der Innenseite des Reagenzglases drehen, um die Probe abzulösen und die Öse entfernen.

**BITTE BEACHTEN:** Ist die übertragene Probenmenge zu gering oder wird die Probe im Verdünnungspuffer nicht ausreichend gemischt und vollständig suspendiert, so kann dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen.

6. Verschließen Sie alle Reagenzgläser mit den verdünnten Proben, und mischen Sie gründlich. Gründliches Mischen erzielen Sie durch Vortexen oder mehrmaliges Umdrehen des Reagenzglases.

7. **Geben Sie einen Tropfen (50 µl) Konjugat (roter Verschluss) in jede Kavität.** Achten Sie darauf, dabei jede Flasche senkrecht zu halten. Verwenden Sie 1 Kavität pro Stuhlprobe, 1 Kavität für die *positive Kontrolle* und 1 Kavität für die negative Kontrolle. Die Kavitäten können zur Identifizierung direkt auf der Seite beschriftet werden.
8. **Übertragen Sie 100 µL verdünnte Probe mit einer neuen Transferpipette in die Testkavität.** Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) *positive Kontrolle* (schwarze Verschlusskappe) in die Kavität für die positive Kontrolle sowie 100 µL *Verdünnungspuffer* (negative Kontrolle) in die Kavität für die negative Kontrolle. Klopfen Sie zum Mischen gegen die Plattenseiten.
9. Schneiden Sie den Kunststoffklebebogen so zurecht, dass er die Kavitäten abdeckt. **Decken Sie die Kavitäten ab und inkubieren Sie sie bei 37 °C ± 2° C für 50 Minuten.**
10. Schütteln Sie den Inhalt der Kavitäten in eine Abfallschale aus.
11. **Waschen Sie jede Kavität mit der 1xWaschlösung aus einer Spritzflasche mit feiner Düse,** indem Sie die *Waschlösung* jeweils kraftvoll auf den Boden der Kavität richten. Füllen Sie die Kavitäten und schütteln Sie die *Waschlösung* aus der Kavität in eine Abfallschale aus. Schlagen Sie die umgedrehte Platte gegen ein trockenes Papiertuch.  
Hinweis: Bei Verwendung eines halbautomatischen bzw. automatischen Waschgeräts geben Sie 350 µl 1xWaschlösung in jede Kavität. Insgesamt 5x waschen (4x bei manuellem Vorwaschen bei unzentrifugierten Proben).
12. Wiederholen Sie Schritt 11 viermal und verwenden Sie dabei jedesmal ein trockenes Papiertuch. Wenn in den Kavitäten Partikel sichtbar sind, fahren Sie mit dem Waschen fort, bis alle Partikel entfernt sind.
13. Entfernen Sie nach dem Waschen sämtliche Flüssigkeitsreste aus den Kavitäten, indem Sie die Platte nochmals gegen ein trockenes Papiertuch ausschlagen, bis keine Flüssigkeit mehr austritt. Entsorgen Sie die Papiertücher und Probenbehältnisse ordnungsgemäß.
14. **Geben Sie 2 Tropfen (100 µl) Substrat (blauer Verschluss) in jede Kavität.** Klopfen Sie zum Mischen des Substrats sanft gegen die Kavitäten. Inkubieren Sie die Kavitäten 10 Minuten lang bei Raumtemperatur. Klopfen Sie nach 5 Minuten sanft gegen die Kavitäten.
15. **Geben Sie 1 Tropfen (50 µl) Stopplösung (roter Verschluss) in jede Kavität.** Klopfen Sie sanft gegen die Kavitäten und warten Sie 2 Minuten bis zum Ablesen. Durch die Zugabe der *Stopplösung* wandelt sich die blaue Färbung in eine gelbe Färbung um. Dieser Effekt kann quantifiziert werden, indem die optische Dichte bei 450 nm mit einem ELISA-Lesegerät gemessen wird. Für das Instrument muss der Leerwert gegen Luft ermittelt werden. Wenn Sie ein Lesegerät für zwei Wellenlängen benutzen, messen Sie den Leerwert bei 620 nm und lesen bei 450 nm ab. Wischen Sie vor der Messung der optischen Dichte die Unterseite jeder Kavität ab. Sollte kein ELISA-Lesegerät verfügbar sein, so kann das Testergebnis bei guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund visuell abgelesen werden. Lesen Sie innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe der *Stopplösung* ab.

#### ALTERNATIVES TESTVERFAHREN/SCHNELLTEST

Führen Sie das reguläre Testverfahren gemäß o. g. Anleitung durch und ersetzen Sie dabei die Inkubationszeit von 50 Minuten bei 37° C ± 2° C durch 20 Minuten bei 37° C. Verwenden Sie dabei den *Stat Fax 2200 Inkubator/Schüttler* oder einen gleichwertigen Inkubator/Schüttler. Bei Verwendung des *Stat Fax 2200 Inkubators/Schüttlers* stellen Sie den Schüttler auf die Geschwindigkeitsstufe 7 und die Temperatur auf 37° C. Bei Verwendung eines anderen Schüttlers wird eine Geschwindigkeit von 1500 Umdrehungen pro Minute (UpM) empfohlen. Beim Schüttelvorgang darf nichts verschüttet werden. Andernfalls Geschwindigkeit entsprechend reduzieren (26).



## QUALITÄTSKONTROLLE

1. Bei jeder Testprobenserie müssen eine positive und negative Kontrolle mitgetestet werden.
2. Die positive und negative Kontrolle müssen in ihrem jeweiligen Bereich liegen, andernfalls ist der Test ungültig.
  - a) **Die positive Kontrolle muss eine sichtbare gelbe Färbung aufweisen.** Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei 450 bzw.  $450/620 \geq 0,500$  sein.
  - b) **Die negative Kontrolle muss optisch farblos sein.** Wenn mit einem Spektrophotometer abgelesen wird, muss die optische Dichte bei  $450 < 0,120$  sein. Wenn bei  $450/620$  abgelesen wird, muss die Absorption  $< 0,080$  sein.
3. Kavitäten, die optisch farblos sind, jedoch eine Absorption von  $\geq 0,120$  bei 450 nm ergeben, müssen auf der Unterseite abgewischt und nochmals gemessen werden.
4. Visuelles Ablesen muss bei guten Lichtverhältnissen gegen einen weißen Hintergrund durchgeführt werden.
5. Wenn eine Probe, die neben einer stark positiven liegt, ein schwach positives Ergebnis (d. h.  $< 0,200$ ) liefert, so muss diese erneut getestet werden, um eine mögliche Verschleppung auszuschließen.

## INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

|                | Visueller Messwert | Spektrophotometrische Messwerte  |                                      |
|----------------|--------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
|                |                    | Bei einer Wellenlänge von 450 nm | Bei zwei Wellenlängen von 450/620 nm |
| <b>Negativ</b> | Farblos            | OD $< 0,120$                     | OD $< 0,080$                         |
| <b>Positiv</b> | Gelbe Färbung      | OD $\geq 0,120$                  | OD $\geq 0,080$                      |

Ein positives Testergebnis weist darauf hin, dass Stx1 und/oder Stx2 in der Probe vorhanden ist. Ein negatives Ergebnis weist darauf hin, dass kein Stx1 und/oder Stx2 vorhanden ist bzw. die Konzentration unter der Nachweisgrenze des Tests liegt. Bitte beachten: Aufgrund der epidemiologischen Relevanz der Gewinnung von Shiga-Toxin-positiven Bakterienisolaten empfiehlt es sich, bei allen Toxin-positiven Proben eine Bakterienkultur durchzuführen, um die toxinproduzierenden Organismen zu isolieren. Labors sollten bei allen positiven Proben eine Bakterienkultur durchführen bzw. das Verfahren mit ihren örtlichen und landesweiten medizinischen Labors in den USA koordinieren.

## EINSCHRÄNKUNGEN DES SHIGA TOXIN CHEK™

1. Der **SHIGA TOXIN CHEK™** dient für den Nachweis von Stx1 und Stx2 in Stuhlproben und Kulturen aus Stuhlproben. Der Test bestätigt das Vorhandensein von Stx1 und/oder Stx2 in der Probe. Diese Information muss vom Arzt unter Berücksichtigung der Patientenanamnese und einer körperlichen Untersuchung des Patienten ausgewertet werden.
2. Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit eines Vorhandenseins von Shiga-Toxinen in der Probe nicht aus, sondern kann bedeuten, dass die Antigenkonzentration unter der Nachweisgrenze des Tests liegt.
3. Der **SHIGA TOXIN CHEK™** ist qualitativ. Die Farbintensität darf nicht quantitativ interpretiert werden.
4. Das von *Shigella dysenteriae* produzierte Toxin ist nahezu identisch mit dem von *E. coli* produzierten Shiga-Toxin 1 (27). Wenn es in nachweisbaren Konzentrationen vorhanden ist, liefert es ein positives Ergebnis in der Kavität.

## ERWARTUNGSWERTE

Der **SHIGA TOXIN CHEK™** weist Stx1 und Stx2 nach. Jedes Labor sollte eigene Erwartungswerte für eine bestimmte Population festlegen. Die Positivitätsrate hängt von

einer Reihe von Faktoren ab, u.a. geografische Herkunft, Probenentnahmeverfahren, Handhabung und Transport, Alter der Patienten.

Shiga-Toxin produzierende *E. coli* verursachen in den USA jährlich schätzungsweise 110.000 Fälle (0,04 % der Bevölkerung) an nahrungsmittelbedingten Erkrankungen (11). Die berichtete Inzidenzrate bei für Tests eingesandten Stuhlproben reicht von 0 % - 4,1 % (18) und variiert je nach Jahreszeit, geografischer Herkunft und Patientenpopulation, wobei die Inzidenz in den Sommermonaten sowie bei Kindern im Vorschulalter und bei älteren Personen höher ist (28). Ein positives Ergebnis beim *SHIGA TOXIN CHEK™* bestätigt das Vorhandensein von Shiga-Toxin in der Probe; ein negatives Ergebnis bedeutet, dass kein Toxin vorhanden ist bzw. die Toxinkonzentration unter der Nachweisgrenze liegt.

## LEISTUNGSDATEN

### Direkter Stuhlprobentest

Die Leistung des *SHIGA TOXIN CHEK™* wurde mit dem Vero Cell Zytotoxizitätstest (mit Neutralisierung) als klinischem Referenzstandard (Goldstandard) anhand von 899 frischen und 14 eingefrorenen Proben verglichen. Daten zum Alter waren für 902 Patienten verfügbar. Von den 902 Patienten waren 8,8 % im Alter von  $\leq 18$  Jahren. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die klinische Leistung des *SHIGA TOXIN CHEK™*. Wie aus den Ergebnissen zu sehen ist, wies der Test eine Sensitivität von 100 %, eine Spezifität von 99,9 %, und eine Gesamtkorrelation von 99,9 % mit dem Zytotoxizitätstest auf.

### Ergebnisse direkter Stuhlprobentest

| Az = 913                         | Vero Cell Zytotoxizitätstest positiv | Vero Cell Zytotoxizitätstest negativ |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> positiv | 78                                   | 1                                    |
| <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> negativ | 0                                    | 834                                  |

|              |        | 95%- Konfidenzintervall |
|--------------|--------|-------------------------|
| Sensitivität | 100 %  | 94,2 - 100 %            |
| Spezifität   | 99,9 % | 99,2 - 100 %            |
| Korrelation  | 99,9 % | 100 - 100 %             |

### Nährlösungskulturen

Die Leistung des *SHIGA TOXIN CHEK™* wurde anhand von über Nacht angesetzten Nährlösungskulturen (GN bzw. MacConkey Nährlösung) aus Stuhlproben mit dem Vero Cell Zytotoxizitätstest (mit Neutralisierung) als klinischem Referenzstandard (Goldstandard) verglichen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die klinische Leistung des *SHIGA TOXIN CHEK™*. Wie aus den Ergebnissen zu sehen ist, wies der Test eine Sensitivität von 97,1 %, eine Spezifität von 99,7 %, und eine Gesamtkorrelation von 99,5 % mit dem Zytotoxizitätstest auf.

### Ergebnisse Nährlösungskulturen

| Az = 789                         | Vero Cell Zytotoxizitätstest positiv | Vero Cell Zytotoxizitätstest negativ |
|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> positiv | 67                                   | 2                                    |
| <i>SHIGA TOXIN CHEK™</i> negativ | 2                                    | 718                                  |

|              |        | 95%- Konfidenzintervall |
|--------------|--------|-------------------------|
| Sensitivität | 97,1 % | 89,0 - 99,5 %           |
| Spezifität   | 99,7 % | 98,9 - 99,9 %           |
| Korrelation  | 99,5 % | 99,5 - 99,5 %           |

**REPRODUZIERBARKEIT**

Die Reproduzierbarkeit des *SHIGA TOXIN CHEK™* wurde anhand von 11 Stuhlproben bestimmt, die zur Verhinderung ihrer Identifizierung während des Tests kodiert wurden. Die Tests wurden in 2 unabhängigen Labors und intern bei TECHLAB®, Inc durchgeführt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen zweimal täglich von mehreren Laborkräften an an den einzelnen Standorten getestet. Es wurden jeweils 2 verschiedene Kitchargen verwendet. Mit jeder maskierten Probenreihe wurden eine positive und eine negative Kontrolle mitgetestet. Die Ergebnisse der einzelnen Labors wurden anschließend an TECHLAB®, Inc. eingesandt und mit internen Ergebnissen verglichen. Die Ergebnisse der verschiedenen Standorte waren durchgehend konsistent und ergaben eine Korrelation von 100 %. Die Proben lieferten zu 100 % die erwarteten Ergebnisse.

**ZENTRIFUGATION**

Insgesamt wurden 108 Stuhlproben (19 positive und 89 negative) zur Bestimmung der Zentrifugationswirkung auf die Testergebnisse untersucht. Für die Analyse wurden die Proben laut Packungsbeilage verdünnt und gevortext. Die Proben wurden zentrifugiert (5000 x g), um unlösliches Material zu entfernen, und die Überstandsflüssigkeit wurde mit dem *SHIGA TOXIN CHEK™* getestet. Die Ergebnisse wurden mit jenen verglichen, die mit demselben Panel an verdünnten und gevortexten Proben ohne Zentrifugation erzielt wurden. Die Ergebnisse zeigten eine 100 %ige Korrelation zwischen zentrifugierten und nicht zentrifugierten Proben.

**KREUZREAKTIVITÄT**

Der *SHIGA TOXIN CHEK™* wurde auf Kreuzreaktivität mit den folgenden Bakterien- und Virenstämmen untersucht. Keiner dieser Stämme zeigte eine Kreuzreaktivität mit dem *SHIGA TOXIN CHEK™*.

|                                                 |                                             |                                                |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                     | <i>Campylobacter coli</i>                   | <i>Campylobacter fetus</i>                     |
| <i>Campylobacter jejuni</i>                     | <i>Candida albicans</i>                     | <i>Citrobacter freundii</i>                    |
| <i>Clostridium difficile</i>                    | <i>Clostridium perfringens</i>              | <i>Enterobacter cloacae</i>                    |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                    | <i>Escherichia coli</i>                     |                                                |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (non-toxigenic) |                                             | <i>Escherichia coli</i> EIEC (enteroinvasive)  |
| <i>Escherichia coli</i> EPEC (enteropathogenic) |                                             | <i>Escherichia coli</i> ETEC (enterotoxigenic) |
| <i>Escherichia fergusonii</i>                   | <i>Escherichia hermannii</i>                | <i>Gardnerella vaginalis</i>                   |
| <i>Helicobacter pylori</i>                      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                | <i>Lactobacillus acidophilus</i>               |
| <i>Proteus vulgaris</i>                         | <i>Providencia stuartii</i>                 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                  |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                  | <i>Salmonella enteric</i> serovar minnesota |                                                |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                   | <i>Serratia liquefaciens</i>                | <i>Shigella flexneri</i>                       |
| <i>Shigella sonnei</i>                          |                                             | <i>Staphylococcus aureus</i>                   |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)            |                                             | <i>Staphylococcus epidermidis</i>              |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>                  |                                             |                                                |

|                                         |                              |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| Human Adenovirus, Type 2, 14, 40 and 41 | Human Cocksackievirus A9, B1 |
| Human Enterovirus 69                    | Feline calicivirus           |
|                                         | Human rotavirus              |

**STÄMME/SEROTYPEN**

Verschiedene Shiga-Toxin erzeugende *E. coli*-Stämme und Serotypen wurden mit dem *SHIGA TOXIN CHEK™* unter Verwendung der Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)-Platte

und MacConkey Nährlösungskulturen getestet. *Escherichia coli* O157-Stämme wurden auch unter Verwendung von CT-SMAC- und ChromAgar® O157-Plattenkulturen getestet. Jeder Stamm ist ein klinisches Isolat und wurde mittels Zytotoxizitätstest sowie Polymeraseketten-Reaktion (PCR) getestet, um das Vorhandensein von Shiga-Toxin-Gen(en) zu bestätigen. Alle Organismen lieferten bei den Tests positive Ergebnisse für die entsprechenden Toxine.

Es folgt eine Auflistung der getesteten Serotypen, Anzahl der getesteten Stämme in diesem Gruppentyp, und des von den einzelnen Stämmen produzierten Toxintyps.

Shiga-Toxin Typ Stx1: Stammtypen - O26:H11 (5 Stämme), O157:H7, O111:NM (2 Stämme), O103:H2, O103:H25, O103:H6, O103:N, O111:H11, O111:H8, O145:H16, O145:NM, O45:H2 (4 Stämme), O45:NM, O125:NM, O146:H21, O156:H21, O26, O5:N, O70:H11, O111a:NM

Shiga-Toxin Typ Stx2: Stammtypen - 157:H7 (6 Stämme), O104:H4 (Ausbruchsstamm Europa 2011), O177:NM, O6:H10, O121:H19 (3 Stämme), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21, O6:H10

Shiga-Toxin Typ Stx1 und Stx2: Stammtypen - O157:H7 (8 Stämme), O157:NM (2 Stämme), O111:H8, O111, O111:NM (2 Stämme), O113:H21, O15:H27

### **INTERFERIERENDE STOFFE (US-Formulierungen)**

Die folgenden Stoffe hatten in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die positiven oder negativen Testergebnisse: Mucin aus dem Schweinemagen (3,5 % w/v), menschliches Blut (40 % v/v), Bariumsulfat (5 % w/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), Maalox® Advanced (5 % v/v), Stearinsäure (40 % w/v), Metronidazol (0,25 % w/v), Vancomycin (0,25 % w/v), Prilosec OTC® (5 µg/ml), TUMS (50 µg/ml), Tagamet® (5 µg/ml), Leukozyten (0,05 % v/v), Ciprofloxacin (0,25 % w/v).

### **INTRA-ASSAY-PRÄZISION**

Für die Bestimmung der Intra-Assay-Leistung wurden 6 positive Stuhlproben und 6 negative Stuhlproben untersucht. Getestet wurde mit 8 Replikaten je Probe. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen negativ.

### **INTER-ASSAY-PRÄZISION**

Die Inter-Assay-Präzision des *SHIGA TOXIN CHEK™* wurde anhand von 12 Stuhlproben (6 negativen, 2 positiven für Stx1, 2 positiven für Stx2 und 2 positiven für Stx1 und Stx2) bestimmt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen 2x täglich anhand von 2 verschiedenen Kitchargen getestet. Es wurden täglich eine positive und eine negative Kontrolle mitgetestet. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen negativ.

### **ANALYTISCHE SENSITIVITÄT**

Der Cut-off-Wert des *SHIGA TOXIN CHEK™* wurde für direkte Stuhlproben bei einer Konzentration von 0,28 ng/mL für Stx1 und 0,23 ng/mL für Stx2 und für Nährlösungskulturen bei einer Konzentration von 0,18 ng/mL für Stx1 und 0,30 ng/mL für Stx2 bestimmt.

## SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ - FRANÇAISE

### UTILISATION PRÉVUE

Le test *SHIGA TOXIN CHEK™* est un test immunoenzymatique pour la détection qualitative simultanée de la toxine Shiga 1 (Stx1) et de la toxine Shiga 2 (Stx2) dans un seul test. Il est destiné à être utilisé avec des échantillons de selles de patients humains présentant des symptômes gastro-intestinaux afin de faciliter le diagnostic de pathologies provoquées par les STEC (Shiga toxin producing *Escherichia coli*). Il peut être utilisé directement avec des échantillons de selles humaines ou avec des cultures sur milieu liquide ou sur plaque issues des prélèvements de selles. Les résultats obtenus doivent être évalués en association avec le dossier médical du patient.

**Attention : selon la loi fédérale des États-Unis, ce dispositif ne peut être vendu que par un médecin ou sur ordonnance.**

### EXPLICATION

O'Brien, et al. ont été les premiers à décrire les STEC (Shiga toxin producing *Escherichia coli*), après avoir découvert que le surnageant de culture d'*E. coli*, qui était cytotoxique pour les cellules HeLa et Vero, pouvait être neutralisé par des anticorps de lapin anti-toxine Shiga (1). Dans le monde entier, les STEC provoquent une pathologie diarrhéique hémotogène et hydrique qui, en l'absence de diagnostic, peut évoluer en colite hémorragique et/ou en syndrome urémique et hémolytique (SHU) (2,3). Dans la mesure où certains traitements et médicaments peuvent accroître le risque de SHU (4), une détection rapide est nécessaire pour prévenir toute épidémie et transmission secondaire (5-9). Provoquant 73 000 maladies par an selon les estimations (11), la souche O157:H7 des STEC est au centre des attentions aux États-Unis depuis qu'elle a été isolée pour la première fois à partir de hamburgers pas assez cuits (3, 10). Cependant, les infections à STEC provoquées par des souches non-O157 se sont répandues ces dernières années, tant aux États-Unis qu'ailleurs dans le monde (12-16, 29). Les infections à O157:H7 sont diagnostiquées en routine par mise en culture d'échantillons de selles dans des milieux sélectifs (17, 18), mais cette méthodologie ne permet pas de détecter les souches non-O157 des STEC. Les STEC produisent l'une des toxines Shiga, voire les deux (Stx1 et/ou Stx2), qui sont des cytotoxines puissantes (19, 20). Les isolats qui produisent uniquement Stx2 ont été imputés à des taux supérieurs de SHU (18, 21-23). Les toxines Shiga peuvent être détectées par mise en culture tissulaire (24), mais cette méthode est aussi chronophage que laborieuse. En détectant les toxines, le test *SHIGA TOXIN CHEK™* permet de détecter la présence de STEC dans les échantillons de selles ou les coprocultures, quel que soit le sérotype ou les autres facteurs de virulence (25).

### PRINCIPE DU TEST

Le test *SHIGA TOXIN CHEK™* utilise des anticorps anti-Stx1 et Stx2. Les micropuits fournis dans le kit contiennent des anticorps monoclonaux immobilisés anti-Stx1 et Stx2. L'anticorps de dépistage se compose d'un mélange d'anticorps polyclonaux anti-Stx1 et anti-Stx2 conjugué à de la peroxydase de raifort. Lors de l'essai, une aliquote d'un échantillon de selles ou de culture est émulsifiée dans le *Diluant* et l'échantillon dilué est transféré dans le micropuits contenant l'anticorps de dépistage. Si des toxines Stx1 et/ou Stx2 sont présentes dans l'échantillon, elles seront liées à l'anticorps de dépistage et aux anticorps monoclonaux immobilisés pendant la phase d'incubation. Toute substance non liée est éliminée lors du processus de lavage. L'adjonction du substrat entraîne une modification de la coloration suite à la formation de complexes enzyme-anticorps-antigène en présence de toxines.

### MATÉRIEL FOURNI

|     |     |                                                                                                                                                          |
|-----|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MA  | PLT | <b>Microplaque</b> – 12 bandes, 8 micropuits par bande enduits d'anticorps monoclonaux spécifiques à Stx1 et Stx2 (conservée avec un produit dessiccant) |
| DIL | SPE | <b>Diluant (40 ml)</b> – Solution tamponnée et protéinée contenant 0,02 % de thimérosal                                                                  |

SUBS REAG  
WASHBUF 20X

**Substrat (14 ml)** – Solution contenant du tétraméthylbenzidine et du peroxyde

**Tampon de lavage concentré (50 ml)** – Concentré à 20X contenant un tampon salin phosphaté, un détergent et 0,2 % de thimérol\*

Mot indicateur : Avertissement

H373 : Peut endommager les organes en cas d'exposition prolongée ou répétée

H411: Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

P260, P273, P314, P391, P501



H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.6N

**Solution d'arrêt (7 ml)** – 0,6 N d'acide sulfurique. ATTENTION : Éviter tout contact avec la peau ; en cas de contact, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau.

Mot indicateur : Danger

H314 : Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires

P260, P264, P280, P301, P330, P331, P303, P361, P353, P363, P304, P340, P310, P321, P305, P351, P338, P501



CONTROL +

**Contrôle positif (3,5 mL)** – Antigène désactivé dans une solution tamponnée et protéinée contenant de l'amphotéricine B contient du ProClin® 300 0,05 %

Mot indicateur : Avertissement

H317 : Risque de réactions cutanées allergiques

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501



CONJ ENZ

**Conjugué (7 ml)** – Anticorps polyclonal spécifique à Stx1 et Stx2 conjugué à la peroxydase de raifort dans une solution tamponnée et protéinée contenant 0,02 % de thimérol

contient du ProClin® 300 0,05 %

Mot indicateur : Avertissement

H317 : Risque de réactions cutanées allergiques

P261, P272, P280, P302, P352, P333, P313, P321, P362, P363, P364, P501



\*contient du mercure



## ACCESSOIRES

Pipettes de transfert en plastique jetables (100)

Films adhésifs en plastique, (2) films

Étiquette de la solution de lavage, (1)

## MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Pissette

Minuterie

Agitateur

Mélangeur

Réceptacle à déchets

Eau distillée

Tubes de dilution de l'échantillon

Serviettes en papier ou feuilles absorbantes

Écouvillons

Réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C

Incubateur à 37 °C ± 2 °C

Pipeteur et embouts

Gants jetables pour manipuler les échantillons de selles

Tiges ou boucles d'inoculation

Un spectrophotomètre capable de lire une onde double à 450/620 nm ou une onde simple à 450 nm (un lecteur de plaque à onde double est recommandé ; les absorbances doivent être mesurées à 450 nm et référencées à 620 nm).

## DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration du kit est indiquée sur l'étiquette. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Le kit contenant les réactifs dont la durée de conservation est indiquée doit être conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C et remis au réfrigérateur aussitôt que possible après utilisation.

## PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Rx uniquement - Sur ordonnance uniquement
2. Pour une utilisation diagnostique *in vitro*. Uniquement à usage professionnel.
3. Contrôler tous les éléments du kit afin de vérifier qu'ils ne présentent aucun signe de fuite. Examiner le kit dès réception afin de vérifier que les éléments ne sont ni glacés ni chauds au toucher en raison de conditions de transports inadéquates.
4. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés ou échangés. Ne pas utiliser de kit dont la date d'expiration serait dépassée.
5. Les capsules et les embouts sont classés par couleur. Il convient de NE PAS les mélanger ni les échanger !
6. Placer tous les composants à TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION !
7. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
8. Lors des manipulations, éviter d'effleurer le fond des micropuits, toute dégradation pouvant entraîner un relevé d'absorbance élevée.
9. Les micropuits non utilisés doivent être placés dans l'emballage refermable contenant un agent de dessiccation pour les protéger de l'humidité. Vérifier le paquet de déshydratant avant d'utiliser les micropuits. L'indicateur coloré du paquet de déshydratant doit être bleu. Si la couleur devient rose, la qualité des micropuits peut être compromise. Ne pas utiliser les micropuits conservés avec un déshydratant rose.
10. Verser les réactifs en tenant les flacons verticalement de façon à instiller une goutte de taille adéquate et des volumes corrects.
11. Utiliser les échantillons de selles dans les 24 heures suivant le prélèvement, et ce afin d'obtenir les meilleurs résultats possibles.
12. La contamination microbienne des réactifs peut réduire l'exactitude de l'analyse. Éviter la contamination microbienne des réactifs en utilisant des pipettes stériles jetables pour extraire les aliquots des flacons à réactifs.
13. Le lavage doit être réalisé suivant les consignes indiquées afin d'éviter toute réaction hors essai.
14. Le *Substrat* est photosensible et ne doit pas être directement exposé à la lumière solaire ou à une source de rayons UV.
15. Le test a été optimisé dans le sens de la sensibilité et de la spécificité. Toute modification de la procédure spécifiée et/ou des conditions de test peut altérer la sensibilité et la spécificité du test. Procéder conformément à la procédure spécifiée.
16. Les échantillons de selles peuvent contenir des agents potentiellement infectieux et doivent être manipulés selon le « Niveau de biosécurité 2 », comme le recommande le manuel du CDC/NIH, « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories ».
17. Manipuler les échantillons et micropuits utilisés comme tout facteur potentiel de transmission d'agents infectieux. Utiliser des gants pour effectuer les tests.
18. Les réactifs du *Conjugué* et *Contrôle positif* contiennent 0,05 % de ProClin® 300 comme conservateur. Même si la concentration est faible, le ProClin® 300 est connu pour sa nocivité (risque de sensibilisation de la peau). En cas de sensibilisation/irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.
19. Le *Tampon de lavage concentré 20X* contient du Thimérosal 0,2 % comme conservateur. Une fois diluée à une concentration normale d'utilisation, cette solution est classée comme non dangereuse. La *Solution d'arrêt* contient 0,6N d'acide sulfurique. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin. Les vêtements contaminés doivent être ôtés puis lavés avant d'être réutilisés. Manipuler les réactifs selon les réglementations existantes relatives à la sécurité des laboratoires et les bonnes pratiques de laboratoire. Les fiches de sécurité de ce produit sont disponibles à la demande. Contacter le support technique.



20. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets. Ne pas les jeter avec les déchets ménagers mais avec les matières dangereuses.

## PRÉLÈVEMENT, MANIPULATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

Les consignes du CDC relatives au prélèvement et à la manipulation des échantillons pour des tests diagnostiques optimaux des STEC recommandent d'analyser les échantillons dès que le laboratoire les reçoit.

| Types d'échantillons acceptables                                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Échantillons de selles frais                                                                                                      |
| Échantillon de selles congelé (non dilué)                                                                                         |
| Échantillons dans un milieu de transport (par ex. Cary Blair, C&S)                                                                |
| Milieu liquide mis en culture issu d'un type d'échantillon acceptable                                                             |
| Cultures bactériennes issues d'une plaque SMAC, CT-SMAC ou CHROMagar® O157, réalisées à partir d'un type d'échantillon acceptable |

| Ne pas utiliser                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Échantillons de selles fixés au formol (par ex. formole à base d'acétate de sodium, formol à 10 %) |
| Échantillons de selles fixés à l'alcool (par ex. alcool de polyvinyle)                             |

## PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

- Manipulation des échantillons dans le cadre de l'analyse de selles directe –**
  - Les échantillons frais doivent être analysés dès que possible après leur réception. Si les tests ne peuvent pas être effectués à réception, les échantillons peuvent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C ou congelés ( $\leq -10$  °C) pendant 14 jours à compter de leur réception.
  - Les échantillons en milieu de transport (C&S ou Cary Blair) peuvent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C ou congelés ( $\leq -10$  °C) pendant 14 jours à compter de leur réception.
- Manipulation des échantillons dans le cadre de la méthode sur milieu liquide ou sur plaque –**
  - Les échantillons doivent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C et mis en culture dès que possible après réception. Si les cultures ne peuvent pas débuter dans les 2 heures suivant la réception des échantillons, ceux-ci peuvent être congelés ( $\leq -10$  °C) pendant 14 jours à compter de leur réception.
  - Les échantillons en le milieu de transport (C&S ou Cary Blair) peuvent être conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 5 jours.
- Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés avant de réaliser l'essai.
- Éviter les cycles de congélation/décongélation répétés. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler à température ambiante.
- Avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, les échantillons doivent être centrifugés (5 000 x g pendant 10 minutes) après dilution pour retirer les particules. Si est impossible de centrifuger les échantillons, les puits doivent être pré-lavés manuellement comme expliqué à l'étape 11 de la PROCÉDURE DE TEST.

## PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

### A. Analyse des échantillons de selles par méthode directe (pour les échantillons frais en milieu de transport)

1. Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant échantillonnage.
2. Passer à la **PROCÉDURE DE TEST**.

### B. Méthode d'analyse sur culture liquide (pour les échantillons frais en milieu de transport)

1. Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant inoculation du milieu liquide.
  - a. **Échantillons liquides ou semi-solides** - Transférer 25 µl d'échantillon dans un tube de culture contenant 5 ml de milieu liquide MacConkey ou 8 ml de milieu liquide gram négatif (GN). Agiter pendant 10 secondes.
  - b. **Échantillons moulés ou solides** - Transférer un petit fragment (de 2 mm de diamètre environ, équivalent à 25 µl) de l'échantillon dans un tube de culture contenant 5 ml de milieu liquide MacConkey ou 8 ml de milieu liquide GN.
  - c. **Échantillons de selles provenant d'un milieu de transport tel qu'un Cary Blair ou un C&S** - Transférer 100 µl de l'échantillon conservé dans un tube de culture contenant 5 ml de milieu liquide MacConkey ou 8 ml de milieu liquide GN.
2. Fermer les tubes de milieu liquide inoculé sans serrer et incuber pendant 16 à 24 heures à une température comprise entre 35 °C et 39 °C.
3. Examiner le tube à la recherche de croissance. En l'absence de croissance, ne pas réaliser d'analyse. Inoculer un autre tube de milieu liquide avec le même échantillon de selles ou avec un nouvel échantillon du même patient. Il est également possible de recourir à la méthode sur plaque sélective (voir le point « **C** » ci-dessous) ou à la méthode d'analyse directe des échantillons de selles (voir le point « **A** » ci-dessus).
4. Passer à la **PROCÉDURE DE TEST**.

### C. Méthode d'analyse sur plaque (pour les échantillons frais en milieu de transport)

1. Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant inoculation de la plaque. Utiliser un écouvillon pour l'échantillonnage, puis répartir l'échantillon sur une plaque SMAC, CT-SMAC ou CHROMagar® O157. *REMARQUE : Les plaques CT-SMAC et CHROMagar® O157 sont plus sélectives que les plaques SMAC et risquent d'inhiber la croissance des STEC non-O157.*
2. Incuber les plaques pendant 16 à 24 heures à une température comprise entre 35 °C et 39 °C.
3. Examiner la plaque à la recherche de croissance. En l'absence de croissance, ne pas réaliser d'analyse. Inoculer une autre plaque avec le même échantillon de selles ou avec un autre échantillon frais du même patient. Il est également possible de recourir à la méthode sur milieu liquide (voir le point « **B** ») ou la méthode d'analyse directe des échantillons de selles (voir le point « **A** »).
4. Passer à la **PROCÉDURE DE TEST**.

## PRÉPARATIONS PRÉLIMINAIRES

1. **Tous les réactifs doivent se trouver à température ambiante avant application dans l'essai.**
2. **Préparer la Solution de lavage à 1X.** Le *Tampon de lavage concentré* est fourni sous forme de concentré à 20X (un précipité peut être observé). Verser 50 ml de concentré dans 950 ml d'eau distillée pour obtenir un volume total d'un litre. Étiqueter la bouteille. Conserver toute *Solution de lavage* 1X non utilisée à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
3. **Préparation de la bande d'essai.** Chaque bande contient 8 puits enduits d'anticorps monoclonaux spécifiques à Stx1 et Stx2. Chaque échantillon ou solution de contrôle

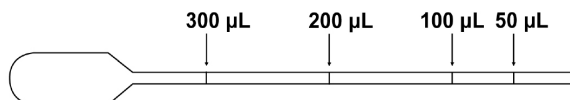
nécessite l'un de ces micropuits enduits. Déterminer le nombre de micropuits à utiliser. Éviter tout contact avec la base des puits. Les puits inutilisés doivent être remis dans le sachet en plastique et ce dernier doit être fermé hermétiquement avec l'agent de dessiccation.

## PROCÉDURE DE TEST

1. Placez tous les réactifs et le nombre de bandelettes réactives requis à température ambiante avant de les utiliser.
2. **Préparer et étiqueter un tube à essai pour chaque échantillon si nécessaire.**
3. **Ajouter du *Diluant* à chaque tube à l'aide d'une pipette de transfert.** Les pipettes ont des graduations à 50 µl, 100 µl, 200 µl et 300 µl.

| Type d'échantillon                                                                       | Volume de <i>Diluant</i>                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Échantillon de selles direct<br>Échantillon sur milieu liquide<br>Échantillon sur plaque | 200 µl (3 <sup>e</sup> marque sur la pipette de transfert) |
| Échantillon dans un milieu de transport                                                  | 100 µl (2 <sup>e</sup> marque sur la pipette de transfert) |

### Pipette de transfert



4. Se munir d'une pipette de transfert en plastique jetable (fournie dans le kit) pour chaque échantillon.
5. **Mélanger complètement tous les échantillons et les cultures indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant échantillonnage. Ajouter la quantité d'échantillon ou de culture nécessaire dans le tube.**

Analyse directe des échantillons de selles - échantillons liquides ou semi-solides – Prélever 50 µl d'échantillon à l'aide d'une pipette de transfert et les transférer dans le tube de *Diluant*. Utiliser la même pipette de transfert pour mélanger l'échantillon dilué. S'il est impossible de réaliser le test immédiatement après la dilution, les échantillons peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 2 jours.

Analyse directe des échantillons - échantillons moulés ou solides – Veiller à ajouter la quantité adéquate d'échantillons de selles au mélange témoin. Mélanger complètement l'échantillon à l'aide d'un écouvillon en bois et transférer un petit fragment (de 3 mm de diamètre environ, équivalent à 50 µl) de l'échantillon dans le tube de *Diluant*. Émulsionner l'échantillon à l'aide de l'écouvillon. S'il est impossible de réaliser le test immédiatement après la dilution, les échantillons dilués peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 2 jours.

Échantillons de selles dans un milieu de transport (Cary Blair ou C&S) – Prélever 100 µl d'échantillon à l'aide d'une pipette de transfert et les transférer dans le tube de *Diluant*. Utiliser la même pipette de transfert pour mélanger l'échantillon dilué.

Cultures sur milieu liquide – Prélever 50 µl d'échantillon à l'aide d'une pipette de transfert et les transférer dans le tube de *Diluant*. Utiliser la même pipette de transfert pour mélanger l'échantillon dilué.

Cultures sur plaque – Balayer une zone confluyente de la plaque plusieurs fois ou sélectionner des colonies individuelles avec une boucle d'inoculation, puis mélanger la boucle dans le tube de *Diluant*. Faire pivoter plusieurs fois la boucle contre l'intérieur du tube pour libérer l'échantillon et retirer la boucle.

**REMARQUE :** si le fragment transféré est trop petit, si le mélange est défectueux ou si l'échantillon n'est pas complètement mis en suspension dans le Diluant, les résultats obtenus peuvent se révéler faussement négatifs.

6. Fermer chaque tube d'échantillon ou de contrôle dilué et mélanger complètement. Pour obtenir un mélange approprié, procéder par mixage ou agitation du tube plusieurs fois.
7. **Ajouter 1 goutte (50 µl) de Conjugué (bouchon rouge) dans chaque micropuits.** Veiller à maintenir chaque flacon à la verticale lors de l'ajout des gouttes. Utiliser 1 puits pour chaque échantillon de selles, 1 puits pour le *Contrôle positif* et 1 puits pour le contrôle négatif. Les marques d'identification peuvent être écrites directement sur le côté du micropuits.
8. **À l'aide d'une pipette de transfert neuve, transférer 100 µl d'échantillon dilué dans le tube à essai.** Ajouter 1 goutte (50 µl) du *Contrôle positif* (bouchon noir) dans le micropuits positif et 100 µl de *Diluant* (contrôle négatif) dans le micropuits de contrôle négatif. Tapoter les côtés de la plaque pour mélanger.
9. Couper le film adhésif plastique à la taille nécessaire pour couvrir les puits. **Couvrir les puits et les laisser incuber à 37°C ± 2°C pendant 50 minutes.**
10. Agiter le contenu hors des micropuits dans un réceptacle à déchets.
11. **Nettoyer les micropuits en projetant énergiquement la Solution de lavage 1X à l'aide d'un pulvérisateur** à jet continu vers le fond de chaque micropuits. Remplir les puits puis agiter la *Solution de lavage* hors du puits dans un réceptacle à déchets. Rabattre la plaque à l'envers sur une serviette en papier sèche.  
Remarque : Avec un équipement de lavage semi-automatique ou automatique, ajouter 350 µl de Solution de lavage 1X dans chaque micropuits. Au total, laver 5 fois (4 fois si vous réalisez un prélavage manuel des échantillons non centrifugés).
12. Répéter l'étape 11 quatre fois supplémentaires avec une serviette en papier sèche à chaque fois. Si des particules sont visibles dans les micropuits, continuer le lavage jusqu'à disparition complète de ces dernières.
13. Après lavage, éliminer complètement tout liquide résiduel des micropuits en rabattant à nouveau énergiquement la plaque sur une serviette en papier sèche de façon à expulser toute trace de liquide. Éliminer les serviettes en papier et les récipients ayant contenu des échantillons de façon appropriée.
14. **Ajouter 2 gouttes (100 µl) de Substrat (bouchon bleu) dans chaque micropuits.** Tapoter légèrement les micropuits pour mélanger le *substrat*. Laisser incuber les micropuits à température ambiante pendant 10 minutes. Tapoter doucement les puits au bout de 5 minutes.
15. **Ajouter 1 goutte (50 µL) de Solution d'arrêt (bouchon jaune) dans chaque micropuits.** Tapoter légèrement les micropuits et attendre 2 minutes avant de procéder au relevé. Lors de l'ajout de la *Solution d'arrêt*, la couleur bleue vire au jaune. Cette modification peut être quantifiée en mesurant la densité optique à 450 nm sur un lecteur de microplaques ELISA. Le zéro d'absorbance de l'instrument doit être ajusté à l'air. Pour les lecteurs à double longueur d'onde, ajuster le zéro à l'air à 620 nm et effectuer le relevé à 450 nm. Essuyer le dessous de chaque micropuits avant de mesurer la densité optique. Si aucun lecteur ELISA n'est disponible, le test peut être lu à l'œil nu avec un bon éclairage sur fond blanc. Effectuer la lecture dans les dix minutes qui suivent l'adjonction de *Solution d'arrêt*.

#### PROCÉDURE DE TEST ALTERNATIVE/FORMAT RAPIDE

Lancer la procédure de test normale en suivant les instructions fournies ci-dessus, en remplaçant l'incubation de 50 minutes à 37° C ± 2° C par une incubation de 20 minutes à 37° C avec l'*Incubateur/Agitateur Stat Fax 2200* ou tout autre appareil équivalent. Si l'*Incubateur/Agitateur Stat Fax 2200* est utilisé, régler l'agitateur sur la vitesse 7 et la température sur 37° C. Si d'autres agitateurs sont utilisés, une vitesse de 1 500 t/min est recommandée. Toute agitation peut provoquer des renversements. En cas de renversement, réduire la vitesse en conséquence (26).

## CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

- Des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués sur chaque série d'analyses d'échantillons.
- Les contrôles positifs et négatifs doivent figurer dans les plages respectives ou le test est invalide.
  - Le contrôle positif doit être de couleur jaune.** Lue sur un spectrophotomètre, la DO à 450 nm ou avec une onde double à 450/620 nm doit être  $\geq 0,500$ .
  - Le contrôle négatif doit être visuellement clair.** Lue sur un spectrophotomètre, la DO à 450 nm doit être  $< 0,120$ . Lue à 450/620 nm, l'absorbance doit être  $< 0,080$ .
- Les micropuits visuellement clairs mais indiquant une DO  $> 0,120$  à 450 nm doivent être essuyés dessous et remesurés.
- Les relevés visuels doivent être effectués dans de bonnes conditions d'éclairage sur fond blanc.
- Un échantillon donnant un résultat positif faible ( $< 0,200$ ) et adjacent à un puits positif net doit être renouvelé pour garantir l'absence de contamination.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

|                | Relevé visuel       | Mesure spectrophotométrique     |                                     |
|----------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|                |                     | Longueur d'onde simple à 450 nm | Longueur d'onde double à 450/620 nm |
| <b>Négatif</b> | Incolore            | DO $< 0,120$                    | DO $< 0,080$                        |
| <b>Positif</b> | Toute couleur jaune | DO $\geq 0,120$                 | DO $\geq 0,080$                     |

Un résultat de test positif indique que Stx1 et/ou Stx2 sont présents dans l'échantillon. Un résultat négatif indique que Stx1 et/ou Stx2 sont absents ou que le niveau est inférieur à la limite de détection du test.

Remarque : en raison de l'importance épidémiologique d'obtenir des isolats de bactéries positifs pour la Shiga-toxine, il est recommandé de soumettre tous les échantillons positifs pour la toxine à une culture bactérienne afin d'isoler les organismes qui produisent la toxine. Chaque laboratoire devrait pratiquer une culture bactérienne sur tous les échantillons positifs ou coordonner la procédure avec d'autres laboratoires d'analyses médicales au niveau national ou régional des États-Unis.

## LIMITES DU TEST SHIGA TOXIN CHEK™

- Le test *SHIGA TOXIN CHEK™* sert à détecter les toxines Stx1 et Stx2 dans des échantillons de selles et des cultures issues des prélèvements de selles. Il confirme la présence de Stx1 et/ou Stx2 dans l'échantillon et ces informations doivent être examinées par le médecin avec le dossier médical du patient et l'examen physique de ce dernier.
- Un résultat de test négatif n'exclue pas la possibilité que des toxines Shiga soient présentes dans les échantillons ; le taux d'antigène peut être inférieur à la limite de détection du test.
- SHIGA TOXIN CHEK™* est un test qualitatif. L'intensité de la couleur ne doit pas être interprétée en termes quantitatifs.
- La toxine produite par *Shigella dysenteriae* est quasi-identique à la toxine Shiga 1 produite par l'*E. coli* (27) et, si elle est présente à des taux détectables, elle produit un résultat positif dans les puits.

## VALEURS ATTENDUES

Le test *SHIGA TOXIN CHEK™* détecte la présence de Stx1 et de Stx2. Chaque laboratoire est tenu d'établir ses propres valeurs attendues pour une population donnée. Le taux de positivité peut dépendre d'un certain nombre de facteurs : zones géographiques, méthode de prélèvement des échantillons, manipulation, transport, âge du patient, etc.

On estime que l'*E. coli* producteur de toxine Shiga est à l'origine de 110 000 cas (0,04 % de la population) de pathologies hémato-gènes diagnostiqués chaque année aux États-Unis (11). Les taux d'incidence communiqués pour les échantillons de selles soumis à la plage de test se situent entre 0 % et 4,1 % (18) et varient en fonction de la saison, de la zone géographique et de la population de patients, des taux supérieurs étant observés durant les mois d'été, ainsi que chez les enfants en âge préscolaire et les personnes âgées (28). Un résultat positif au test *SHIGA TOXIN CHEK*™ confirme la présence de la toxine Shiga dans l'échantillon, alors qu'un résultat négatif indique l'absence de toxine ou des taux de toxine insuffisants pour être détectés.

#### EFFICACITÉ DU TEST

##### Analyse de selles directe

La performance du test *SHIGA TOXIN CHEK*™ a été comparée à celle du test de la cytotoxine anti-cellules Vero (avec neutralisation), qui est considéré comme la norme de référence clinique (étalon d'or), qui comportait 899 échantillons frais et 14 échantillons congelés. Les données relatives à l'âge étaient disponibles pour 902 patients. Parmi eux, 8,8 % avaient 18 ans ou moins. Le tableau suivant présente un résumé de la performance clinique du test *SHIGA TOXIN CHEK*™. Les résultats indiquent que le test a affiché une sensibilité de 100 %, une spécificité de 99,9 %, avec une corrélation totale de 99,9 % avec le test de la cytotoxine.

##### Résultats de l'analyse de selles directe

| n = 913                             | Positif à la cytotoxine anti-cellules Vero | Négatif à la cytotoxine anti-cellules Vero |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Positif à <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ | 78                                         | 1                                          |
| Négatif à <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ | 0                                          | 834                                        |

| Intervalle de Confiance A 95% |       |             |
|-------------------------------|-------|-------------|
| Sensibilité                   | 100%  | 94,2 - 100% |
| Spécificité                   | 99,9% | 99,2 - 100% |
| Corrélation                   | 99,9% | 100 - 100%  |

##### Cultures sur milieu liquide

La performance du test *SHIGA TOXIN CHEK*™ utilisant des cultures sur milieu liquide durant la nuit (milieu liquide GN ou MacConkey) issues des prélèvements de selles a été comparée à celle du test de la cytotoxine anti-cellules Vero (considéré comme l'étalon d'or). Le tableau suivant présente un résumé de la performance clinique du test *SHIGA TOXIN CHEK*™. Les résultats indiquent que le test a affiché une sensibilité de 97,1 %, une spécificité de 99,7 %, avec une corrélation totale de 99,5 % avec le test de la cytotoxine.

##### Résultats d'analyse avec les cultures sur milieu liquide

| n = 789                             | Positif à la cytotoxine anti-cellules Vero | Négatif à la cytotoxine anti-cellules Vero |
|-------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Positif à <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ | 67                                         | 2                                          |
| Négatif à <i>SHIGA TOXIN CHEK</i> ™ | 2                                          | 718                                        |

|             |       | Intervalle de Confiance A 95% |
|-------------|-------|-------------------------------|
| Sensibilité | 97,1% | 89,0 - 99,5%                  |
| Spécificité | 99,7% | 98,9 - 99,9%                  |
| Corrélation | 99,5% | 99,5 - 99,5%                  |

## REPRODUCTIBILITÉ

La reproductibilité du test *SHIGA TOXIN CHEK™* a été déterminée à partir de 11 échantillons de selles codés pour éviter leur identification pendant le test. Le test a été réalisé dans 2 laboratoires indépendants et sur site chez TECHLAB®, Inc. Les échantillons ont été testés deux fois par jour pendant 5 jours par plusieurs techniciens travaillant sur chaque site avec 2 lots de kits différents. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été effectués avec chaque panel d'échantillons masqués. Les résultats de chaque laboratoire ont été transmis à TECHLAB®, Inc. et comparés aux résultats internes. Ils étaient cohérents entre les différents sites et ont affiché une corrélation de 100 %. Les échantillons ont donné les résultats prévus sur toute la durée des essais.

## CENTRIFUGATION

Un total de 108 échantillons de selles, dont 19 positifs et 89 négatifs, ont été évalués pour déterminer l'effet de la centrifugation sur la performance. Pour l'analyse, les échantillons ont été dilués et mixés tel que décrit dans la notice jointe. Les échantillons ont été centrifugés (5 000 x g) pour retirer les matières insolubles et le liquide surnageant a été testé avec le test *SHIGA TOXIN CHEK™*. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le même panel d'échantillons dilués et mixés qui n'avaient pas été centrifugés. Les résultats ont montré une corrélation de 100 % entre les échantillons centrifugés et les échantillons non centrifugés.

## RÉACTIVITÉ CROISÉE

La réactivité croisée du test *SHIGA TOXIN CHEK™* a été évaluée avec les souches bactériennes et virales énumérées ci-après. Aucune de ces souches n'a provoqué d'interférence avec le test *SHIGA TOXIN CHEK™*.

|                                                 |                                                |                                   |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>                     | <i>Campylobacter coli</i>                      | <i>Campylobacter fetus</i>        |
| <i>Campylobacter jejuni</i>                     | <i>Candida albicans</i>                        | <i>Citrobacter freundii</i>       |
| <i>Clostridium difficile</i>                    | <i>Clostridium perfringens</i>                 | <i>Enterobacter cloacae</i>       |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                    | <i>Escherichia coli</i> (non-toxigenic)        |                                   |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (non-toxigenic) | <i>Escherichia coli</i> EIEC (enteroinvasive)  |                                   |
| <i>Escherichia coli</i> EPEC (enteropathogenic) | <i>Escherichia coli</i> ETEC (enterotoxigenic) |                                   |
| <i>Escherichia fergusonii</i>                   | <i>Escherichia hermannii</i>                   | <i>Gardnerella vaginalis</i>      |
| <i>Helicobacter pylori</i>                      | <i>Klebsiella pneumoniae</i>                   | <i>Lactobacillus acidophilus</i>  |
| <i>Proteus vulgaris</i>                         | <i>Providencia stuartii</i>                    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>     |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                  | <i>Salmonella enteric</i> serovar minnesota    |                                   |
| <i>Salmonella typhimurium</i>                   | <i>Serratia liquefaciens</i>                   | <i>Shigella flexneri</i>          |
| <i>Shigella sonnei</i>                          |                                                | <i>Staphylococcus aureus</i>      |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Cowan)            |                                                | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>                  |                                                |                                   |

|                                         |                             |
|-----------------------------------------|-----------------------------|
| Human Adenovirus, Type 2, 14, 40 and 41 | Human Coxsackievirus A9, B1 |
| Human Enterovirus 69                    | Feline calicivirus          |
|                                         | Human rotavirus             |

## SOUCHES/SÉROTYPES

Diverses souches et sérotypes d'*E. coli* producteur de toxine Shiga ont été analysés avec le test *SHIGA TOXIN CHEK™* selon les méthodes de culture sur plaque Sorbitol



MacConkey Agar (SMAC) et sur milieu liquide MacConkey. Les souches O157 de l'*Escherichia coli* ont également été testées à l'aide de cultures sur plaque CT-SMAC et ChromAgar® O157.

Chaque souche est un isolat clinique qui a été analysé par un test de la cytotoxine et par une réaction en chaîne par polymérase (PCR) afin de confirmer le gène de la toxine Shiga. Tous les organismes ont produit des résultats positifs pour la ou les toxines appropriées lorsqu'ils ont été testés.

Voici une liste des sérotypes testés, accompagnée du nombre de souches testées dans ce type de groupe et du type de toxine produite par chaque souche.

**Toxine Shiga de type Stx1 : Types de souches** - O26:H11 (5 souches), O157:H7, O111:NM (2 souches), O103:H2, O103:H25, O103:H6, O103:N, O111:H11, O111:H8, O145:H16, O145:NM, O45:H2 (4 souches), O45:NM, O125:NM, O146:H21, O156:H21, O26, O5:N, O70:H11, O111a:NM

**Toxine Shiga de type Stx2 : Types de souches** - 157:H7 (6 souches), O104:H4 (souche de l'épidémie 2011 en Europe), O177:NM, O6:H10, O121:H19 (3 souches), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21, O6:H10

**Toxine Shiga de types Stx1 et Stx2 : Types de souches** - O157:H7 (8 souches), O157:NM (2 souches), O111:H8, O111, O111:NM (2 souches), O113:H21, O15:H27

### SUBSTANCES INTERFÉRENTES (formules américaines)

Les substances suivantes n'ont pas modifié le résultat positif ou négatif des tests aux concentrations indiquées ci-après : Mucine gastrique de porc (3,5 % p/v), sang humain (40 % v/v), sulfate de baryum (5 % p/v), Imodium® (5 % v/v), Kaopectate® (5 % v/v), Pepto-Bismol® (5 % v/v), Maalox® Advanced (5 % v/v), acide stérique (40 % p/v), métronidazole (0,25 % p/v), vancomycine (0,25 % p/v), Prilosec OTC® (5 µg/ml), TUMS (50 µg/ml), Tagamet® (5 µg/ml), leucocytes (0,05 % v/v), ciprofloxacine (0,25 % p/v).

### PRÉCISION – INTRA-ANALYSE

Pour la détermination de l'efficacité intra-analyse, 6 échantillons de selles positifs et 6 échantillons de selles négatifs ont été analysés. Chaque échantillon a été analysé en 8 répétitions. Tous les échantillons positifs le sont restés, de même que tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

### PRÉCISION – INTER-ANALYSE

La précision inter-analyse du test *SHIGA TOXIN CHEK™* a été déterminée à l'aide de 12 échantillons de selles (six négatifs, deux positifs pour Stx1, deux positifs pour Stx2 et deux positifs pour Stx1 et Stx2). Les échantillons ont été testés deux fois par jour pendant 5 jours à l'aide de 2 lots de kit différents. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été testés chaque jour. Tous les échantillons positifs le sont restés, de même que tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

### SENSIBILITÉ ANALYTIQUE

Le seuil du test *SHIGA TOXIN CHEK™* a été établi à 0,28 ng/ml pour Stx1 et 0,23 ng/ml pour Stx2 dans le cadre de l'analyse directe des échantillons de selles et à 0,18 ng/ml pour Stx1 et 0,30 ng/ml pour Stx2 dans le cadre des cultures en milieu liquide.

## REFERENCES

- O'Brien, A. D. and G. D. LaVeck. 1983. Purification and Characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-Like toxin Produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 40:675-683.
- Boyce, T.G., D. L. Swerdlow, and P. M. Griffin. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic-Uremic Syndrome. N. Engl. J. Med. 333:364-368.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M.L. Cohen. 1983. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. N. Engl. J. Med. 308:681-685.
- Wong, C. S., S. Jelacic, R. L. Habeeb, S.L. Watkins, and P.I. Tarr. 2000. The Risk of the Hemolytic-Uremic Syndrome After Antibiotic Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 Infections. N. Engl. J. Med. 342:1930-1936.
- Boudailliez, B., P. Berquin, P. Mariani-Kurkdjian, D. Ille, B. Cuvelier, I. Capek, B. Tribout, E. Bingen, and C. Piussan. 1997. Possible Person-to-Person Transmission of *Escherichia coli* O111 – Associated Hemolytic Uremic Syndrome. Pediatr. Nephrol. 11:36-39
- Dundas, S., W. T. Todd, A. I. Stewart, P. S. Murdoch, A. K. Chaudhuri, and S. J. Hutchinson. 2001. The Central Scotland *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak: Risk Factors for the Hemolytic Uremic Syndrome and Death Among Hospitalized Patients. Clin. Infect. Dis. 33:923-931.
- Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J.G. Wells, and P.M. Griffin. 1993. An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. J. Amer. Med. Assoc. 269:2217-2220.
- Hilborn, E. D., J. H. Mermin, P. A. Mshar, J. L. Hadler, A. Voetsch, C. Wojtkunski, M. Swartz, R. Mshar, M. Lambert-Fair, J. A. Farrar, M. K. Glynn, and L. Slutsker. 1999. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated With Consumption of Mesclun Lettuce. Arch. Intern. Med. 159:1758-64.
- Keene, W. E., J. M. MacAnulty, F. C. Hoesly, L. P. Williams Jr., K. Hedberg, G. L. Oxman, T. J. Barrett, M. A. Pfaller, and D. W. Fleming. 1994. A Swimming-Associated Outbreak of Hemorrhagic Colitis Caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N. Engl. J. Med. 331:579-584.
- O'Brien, A. D., A. R. Melton, C. K. Schmitt, M.L. McKee, M. L. Batts, and D. E. Griffin. 1993. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 Pathogen Responsible for Hamburger-Borne Outbreak of Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in Washington. J. Clin. Microbiol. 31:2799-801.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607-625.
- Bopp, C., and N. Strockbine. 2009. Laboratory Diagnosis of STEC Infections. ASM Teleconference.
- Johnson, K. E., C. M. Thorp, and C. L. Sears. 2006. The Emerging Clinical Importance of Non-O157 Shiga toxin-Producing *Escherichia coli*. Clin. Infect. Dis. 43:1587-95.
- Beutin, L., G. Krause, S. Zimmermann, S. Kaulfuss, and K. Gleier. 2004. Characterization of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany Over a 3-year Period. J. Clin. Microbiol. 42:1099-108.
- Couturier, M. R., B. Lee, N. Zelyas, and L. Chui. 2011. Shiga Toxigenic *Escherichia coli* (STEC) Detection in Stool Samples Screened for Viral Gastroenteritis in Alberta, Canada. J. Clin. Microbiol. 49:574-578.
- Ethelberg, S., B. Smith, M. Torpdahl, M. Lisby, J. Boel, T. Jensen, E. M. Nielsen, and K. Mølbaek. 2009. Outbreak of Non-O157 Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* Infection from Consumption of Beef Sausage. Clin. Infect. Dis. 48:78-81.
- March, S. B., and S. Ratnam. 1986. Sorbitol-MacConkey Medium for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with Hemorrhagic Colitis. J. Clin. Microbiol. 23:869-872.
- Gould, L. H., C. Bopp, N. Strockbine, R. Atkinson, V. Baselski, B. Body, R. Carey, C. Crandall, S. Hurd, R. Kaplan, M. Neill, S. Shea, P. Somsel, M. Tobin-D'Angelo, P. M. Hriffin, and P. Gerner-Smidt. 2009. Recommendations for Diagnosis of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. MMWR 58:1-14.
- Strockbine, N.A., L. R. Marques, J. W. Newland, H. W. Smith, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1986. Two toxin-Converting Phages from *Escherichia coli* O157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct toxins with Similar Biologic Activities. Infect. Immun. 53:135-40.

20. O'Loughlin, E. V., and R. M. Robins-Browne. 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-Like toxins on Eukaryotic Cells. *Microbes Infect.* 3:493-507.
21. Siegler, R.L., T. G. Obrig, T. J. Pysher, V. L. Tesh, N. D. Denkers, and F. B. Taylor. 2003. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a Baboon Model of Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 18:92-96.
22. Kleanthous H., H. R. Smith, S.M. Scotland, R. J. Gross, B. Rowe, C. M. Taylor, and D. V. Milford. 1990. Haemolytic Uraemic Syndromes in the British Isles, 1985-8: Association with Verocytotoxin Producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological Aspects. *Arch. Dis. Child.* 65:722-727.
23. Louise, C. B., and T. G. Obrig. 1995. Specific Interaction of *Escherichia coli* O157:H7-Derived Shiga-Like toxin II with Human Renal Endothelial Cells. *J. Infect. Dis.* 172:1397-401.
24. Karmali, M. A. 1987. Laboratory Diagnosis of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin. Microbiol. News.* 65-69.
25. Law, D. 2000. Virulence Factors of *Escherichia coli* O157 and Other Shiga toxin-Producing *E. coli*. *J. Appl. Microbiol.* 88:729-745.
26. Data on File
27. Strockbine, N.A., M. P. Jackson, L. M. Sung, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1988. Cloning and Sequencing of the Genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* Type 1. *J. Bacteriol.* 170:1116-22.
28. Slutsker, L., A. A. Ries, K. D. Greene, J. G. Wells, L. Hutwagner, and P. M. Griffin. 1997. *Escherichia coli* O157:H7 Diarrhea in the United States: Clinical and Epidemiologic Features. *Ann. Intern. Med.* 126:505-13.
29. Bielaszewska, M., A. Mellmann, W. Zhang, R. Köck, A. Fruth, A. Bauwens, G. Peters, H. Karch. 2011. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *Lancet Infect. Dis.* 11:671-676.

For Informational Use Only

**Technical Support**

Further information can be obtained by contacting TECHLAB® Technical Support:

|       |                |
|-------|----------------|
| US    | +1 800 TECHLAB |
| Phone | (540) 953-1664 |
| Fax   | (540) 953-1665 |
| Email | ts@techlab.com |

© 2021 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

SHIGA TOXIN CHEK, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc. Proclin is a trademark of Rohm and Haas Company.

All other trademarks referenced are trademarks of their respective owners.