

SHIGA TOXIN QUIK CHEK™

A Rapid Membrane Enzyme Immunoassay for the Simultaneous
Qualitative Detection and Differentiation of Shiga toxin 1 and
Shiga toxin 2 in Human Fecal Specimens and
Cultures Derived from Fecal Specimens

Catalog No. T30625 (25 Tests)

IVD *In Vitro* Diagnostic Medical Device

For Laboratory Use Only. Not intended for near patient or self-testing.

ESPAÑOL p. 12

Inmunoensayo enzimático rápido de membrana para la detección
cualitativa simultánea y la diferenciación de toxina Shiga 1 y Shiga 2 en
muestras fecales humanas y cultivos derivados de muestras fecales

N.º de catálogo. T30625 (25 pruebas)

IVD Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*

Uso exclusivo en laboratorios. No apto para pruebas de cabecera o
autodiagnóstico.

DEUTSCH p. 23

Ein rascher Membranenzym-Immunistest für die gleichzeitige qualitative
Entdeckung und Differenzierung von Shiga-Toxin 1 und Shiga-Toxin 2
in menschlichen Stuhlproben und aus Stuhlproben gewonnenen Kulturen

Katalognr. T30625 (25 Tests)

IVD *In-Vitro*-Diagnostikum

Nur für den Laborgebrauch. Nicht für patientennahe oder Selbsttests bestimmt.

FRANCAISE p. 34

Test immunoenzymatique sur membrane rapide pour la détection et la
différenciation qualitatives simultanées de la toxine Shiga 1 et
de la toxine Shiga 2 dans des échantillons de selles de patients

humains et des cultures issues des prélèvements de selles

Catalogue n° T30625 (25 tests)

IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

Réservé à un usage en laboratoire. Non destiné aux autotests ou tests à
proximité des patients.

Made in the USA

Developed and Manufactured by:



TECHLAB®

2001 Kraft Drive

Blacksburg, VA 24060-6358 USA

www.techlab.com

TEL 1-800-832-4522 USA

TEL 1-540-953-1664 Outside USA



EU REP Emergo Europe
Westervoorstdijk 60
6827 AT Arnhem
The Netherlands

CH REP MedEnvoy Switzerland
Gotthardstrasse 28
6302 Zug
Switzerland

SHIGA TOXIN QUIK CHEK™

INTENDED USE

The *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test is a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous qualitative detection and differentiation of Shiga toxin 1 (Stx1) and Shiga toxin 2 (Stx2) in a single test device. 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 with 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, 28). 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 QUIK 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 QUIK CHEK™* test utilizes specific antibodies against Stx1 and Stx2. The *Membrane Device* contains a *Reaction Window* with three vertical lines of immobilized antibodies. The "1" test line contains monoclonal antibodies against Stx1. The control line ("C") is a dotted line that contains anti-horseradish peroxidase (HRP) antibodies. The "2" test line contains monoclonal antibodies against Stx2. The *Conjugate* consists of antibodies to Stx1 and Stx2 coupled to horseradish peroxidase. To perform the test, the sample is added to a tube containing a mixture of *Diluent* and *Conjugate*. The diluted sample-conjugate mixture is added to the *Sample Well* and the device is allowed to incubate at room temperature for 15 minutes. During the incubation, any Stx1 and/or Stx2 present in the sample binds to the antibody-peroxidase conjugates. The toxin-antibody-peroxidase complexes migrate through a filter pad to a membrane where they are captured by the immobilized Stx1 and Stx2 specific monoclonal antibodies in the test lines. The *Reaction Window* is subsequently washed with *Wash Buffer*, followed by the addition of *Substrate*. After a 10 minute incubation period, the *Reaction Window* is examined visually for the appearance of vertical blue lines on the "1" and "2" sides of the *Reaction Window*. A blue line on the "1" side of the *Reaction Window* is a positive result indicating the presence of Stx1. A blue line on the "2" side of the *Reaction Window* is a positive result indicating the presence of Stx2. A positive "C" reaction, indicated by a vertical dotted blue line under the "C" portion of the *Reaction Window*, confirms that the test is working properly, the procedure was followed, and the results are valid.

MATERIALS PROVIDED

MEM	DEV	Membrane Devices – each pouch contains 1 device
DIL	SPE	Diluent (22 mL) – Buffered protein solution with graduated dropper assembly* H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
WASH	REAG	Wash Buffer (12 mL) – Buffered solution with graduated dropper assembly* H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
SUBS	REAG	Substrate (3.5 mL) – Solution containing tetramethylbenzidine
CONJ	ENZ	Conjugate (2.5 mL) – Antibodies specific for Stx1 and Stx2 coupled to horseradish peroxidase in a buffered protein solution*
CONTROL	+	Positive Control (1 mL) – Antigen in a buffered protein solution*
Disposable plastic transfer pipettes – graduated at 25 µL, 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL and 500 µL		
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device	

*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



MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Small test tubes (e.g., plastic Eppendorf tubes or glass tubes)

Applicator sticks or swabs

Timer

Vortex mixer

Disposable gloves for handling fecal samples

Pipettor and tips

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the kit is given on the label and is assigned 24 months from the date of manufacture. Expiration dates for each component are listed on the individual labels. The kit should be stored between 2°C and 8°C. The kit and all components remain stable for listed expiration dates after first opening when stored between 2°C and 8°C. Bring all components to room temperature before use. The kit will remain stable at room temperature for subsequent 8 hour work shifts if returned to refrigerated storage between shifts.

PRECAUTIONS

1. Rx Only - Prescription Only
2. For *in vitro* diagnostic use. For professional use only.
3. This is a manual assay.
4. 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.
5. The *Substrate* reagent should be colorless. If the *Substrate* reagent changes to a dark blue/violet color, discard and call Technical Services for a replacement.
6. Reagents from different kits should not be mixed or interchanged. Do not use a kit past the expiration date.
7. Caps, tips and dropper assemblies are color-coded; do NOT mix or interchange!
8. Bring all components to ROOM TEMPERATURE BEFORE USE!
9. Do not freeze the reagents. The kit should be stored between 2°C and 8°C.
10. The pouch containing the *Membrane Device* should be at room temperature before opening. Keep the membrane devices dry before use.
11. Hold reagent bottles vertically to dispense reagents to ensure consistent drop size and correct volume.
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. Membrane devices cannot be reused.
14. 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.
15. The validity of the test results using the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test is dependent upon the proper reaction of the internal and external controls. See the Quality Control section.

16. Specimens and used membrane devices should be handled and disposed of as potential biohazards after use. Wear disposable gloves when doing the test.
17. 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."
18. The *Conjugate*, *Diluent*, *Positive Control*, and *Wash Buffer* 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. Follow your national, regional, and local ordinances accordingly for waste disposal regulations.
20. Report any serious incident to TECHLAB and the competent authority of the Member State or other in which the user and/or patient is established.

COLLECTION, HANDLING, AND STORAGE OF FECAL SPECIMENS

CDC guidelines for STEC diagnostic testing recommend testing specimens as soon as received by the laboratory.

Acceptable Sample Types
Fresh Fecal Specimens
Specimens in transport media (e.g. Cary Blair, C&S)
Frozen Fecal Specimens (frozen undiluted or frozen in transport media)
Gram Negative or MacConkey broth cultures grown from an acceptable sample type
Bacterial cultures from a SMAC, CT-SMAC, or CHROMagar® O157 plate, grown from any acceptable sample type

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)

1. **Specimen Handling for Direct Fecal Testing –**
 - a. Fresh specimens should be tested as soon as possible after receipt. If testing cannot be performed upon receipt, samples may be stored between 2° and 8°C or frozen ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) for up to 14 days from sample receipt.
 - b. Specimens in transport media (C&S or Cary Blair) can be stored between 2° 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 –**
 - a. Specimens should be stored between 2° 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 stored frozen ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) for up to 14 days from sample receipt.
 - b. Specimens in transport media (C&S or Cary Blair) can be stored between 2° and 8°C for up to 5 days.
3. Make sure that specimens are thoroughly mixed before performing the assay.
4. Repeated freeze/thaw cycles should be avoided. If using frozen specimens, thaw at room temperature.
5. Storing fecal specimens in the *Diluent* is NOT recommended.
6. Do not allow the samples to remain in the *Diluent/Conjugate* mixture for more than two hours.

SPECIMEN PREPARATION

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

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

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

1. Mix all specimens thoroughly regardless of consistency - it is essential that the specimens be evenly suspended before inoculating the broth.
 - a. **Liquid/Semi-solid specimens** - transfer 25 μ L of specimen into a culture tube containing 5 mL of MacConkey or 8 mL of Gram-Negative (GN) broth.
 - b. **Formed/Solid specimens** - transfer a small portion (approximately 2 mm diameter, the equivalent of 25 μ L) of the specimen into a culture tube containing 5 mL of MacConkey or 8 mL of GN broth.
 - c. **Fecal specimens in Cary Blair or C&S transport media** - transfer 100 μ L of the preserved specimen to a culture tube containing 5 mL of MacConkey or 8 mL of GN broth.
2. Loosely cap the inoculated broth tubes and incubate for 16-24 hours between 35° and 39°C.
3. 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.
4. Continue to **TEST PROCEDURE**.

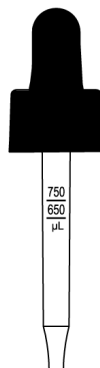
C. Plate Method (for fresh specimens and samples in transport media)

1. 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**.

TEST PROCEDURE

1. Bring all reagents and the required number of devices to room temperature before use.
2. **Set up and label one small test tube for each sample, and optional external controls as necessary.**
3. **Add Diluent to each tube using the black graduated dropper assembly.**

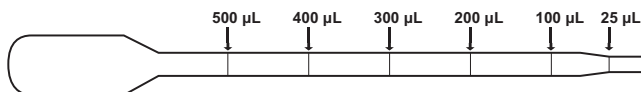
Sample Type	Volume of Diluent
Fecal Specimen (unpreserved) Plate Culture External Controls	750 μ L (2nd graduation from tip)
Broth Culture Transport Media Specimen	650 μ L (1st graduation from tip)



6

4. **Add one drop of *Conjugate* (red capped bottle) to each tube.**
Be attentive to the total assay time when testing more than one fecal specimen. The *Diluent* and *Conjugate* should be added to all tubes prior to adding the specimens.
5. Obtain one disposable plastic transfer pipette (supplied with the kit) for each sample – the pipettes have raised graduations at 25 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L and 500 μ L.

Graduated Transfer Pipette:



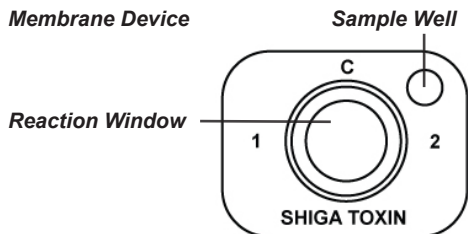
6. **Mix all specimens and cultures thoroughly regardless of consistency- it is essential that the samples be evenly suspended before sampling. Add the required amount of specimen or culture to the tube.**
Direct fecal testing - Liquid/Semi-solid specimens - Using a transfer pipette, transfer 25 μ L of specimen into the *Diluent/Conjugate* mixture. Use the same transfer pipette to mix the diluted specimen.
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 2 mm diameter, the equivalent of 25 μ L) of the specimen into the *Diluent/Conjugate* mixture. Emulsify the specimen using the applicator stick.

Broth cultures and Fecal specimens in transport media (Cary Blair or C&S) - Using a transfer pipette, transfer 100 μ L of specimen into the *Diluent/Conjugate* mixture.

Plate cultures - Sweep through a confluent area of the plate several times with a swab, then mix the swab in the *Diluent/Conjugate* mixture. Rotate the swab against the inside of the test tube several times to release the sample from the swab. **Remove the swab, mix well and allow to incubate for 30 minutes at room temperature before proceeding with Step 8 of the TEST PROCEDURE.**

NOTE: Transferring too little sample, or failure to mix and completely suspend the sample in the Diluent mixture, may result in a false-negative test result. The addition of too much sample may cause invalid results due to restricted flow.

7. **Optional External Controls:**
External Positive Control - add one drop of *Positive Control* (gray-capped bottle) to the appropriate test tube.
External Negative Control - add 25 μ L *Diluent* to the appropriate test tube.
8. Close each tube of diluted sample or control and mix thoroughly. Proper mixing can be achieved by vortexing or inverting the tube several times. Once a sample or control has been diluted in the *Diluent/Conjugate* mixture, it may be incubated at room temperature for any period of time up to 2 hours prior to addition to the *Membrane Device*.
9. Obtain one *Membrane Device* for each sample and optional external positive or negative control as necessary. The foil bags containing the devices should be brought to room temperature before opening. Label each device appropriately and orient it on a flat surface so the "SHIGA TOXIN" print is at the bottom of the device, and the small *Sample Well* is located in the top right corner of the device.



10. Make sure that each sample is thoroughly mixed before addition to the *Membrane Device*. **Using a new transfer pipette, transfer 500 μ L from each tube into the Sample Well (smaller hole in the top right corner of the device) of a *Membrane Device*, making certain to expel the liquid sample onto the wicking pad inside of the *Membrane Device*.** When loading the sample into the sample well, make sure that the tip of the transfer pipette is angled towards the *Reaction Window* (larger hole in the middle of the device).
11. **Incubate the device at room temperature for 15 minutes** – the sample will wick through the device and a wet area will spread across the *Reaction Window*. The 15-minute incubation step begins after the last diluted sample-conjugate mixture has been transferred to the final *Membrane Device*.

NOTE FOR SAMPLES THAT FAIL TO MIGRATE:

Occasionally, a diluted sample fails to migrate properly and the Reaction Window does not fully wet. If the Reaction Window does not appear to be completely wet within 5 minutes of adding the sample to the Sample Well, then add 100 μ L (4 drops) of Diluent to the Sample Well and wait an additional 5 minutes (for a total of 20 minutes).

12. **After the incubation, add 300 μ L of Wash Buffer to the Reaction Window using the graduated white dropper assembly (or equivalent).** Allow the Wash Buffer to flow through the *Reaction Window* membrane and be absorbed completely.
13. **Add 2 drops of Substrate (white-capped bottle) to the Reaction Window.** Read visually and record results after 10 minutes.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Interpretation of the test is most reliable when the device is read immediately at the end of the 10 minute reaction period. A test cannot be interpreted before that time. Read the device at a normal working distance in a well-lit area. View with a line of vision directly over the device.
2. Observe device for the appearance of a dotted blue line in the middle of the *Reaction Window* representing the internal positive control. The appearance of any control dot(s) represents a valid internal control.
3. Observe device for the appearance of blue lines on the “1” and “2” sides of the *Reaction Window* representing the test lines. The lines may appear faint to dark in intensity. An obvious partial line is interpreted as a valid line. Do not interpret membrane discoloration as a positive result.

Positive Stx1 (“1”) Result: The blue “1” line and the dotted blue control line below “C” are visible (Figure 1a). A positive result indicates the presence of Stx1.

Positive Stx2 (“2”) Result: The blue “2” line and the dotted blue control line below “C” are visible (Figure 1b). A positive result indicates the presence of Stx2.

Positive Stx1 and Stx2 (“1” and “2”) Result: Both the blue “1” and blue “2” lines are visible as well as the dotted blue control line below “C” (Figure 1c). A positive result indicates the presence of both Stx1 and Stx2.

4. **Negative Result:** A single blue dotted line is visible in the middle of the *Reaction Window*, below the “C” and no test lines are visible on the “1” side or the “2” side of the *Reaction Window* (Figure 1d). A negative result on “1” side indicates that Stx1 is either absent in the sample or is below the detection limit of the test. A negative result on “2” side indicates that Stx2 is either absent in the sample or is below the detection limit of the test.

5. **Invalid Result:** No lines are visible in the *Reaction Window* (Figure 1e) or a blue dotted line is not present below the “C” at the completion of the reaction period (Figures 1f, 1g, 1h).
6. A positive result in the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* confirms the presence of Stx1 and/or Stx2 in the sample; a negative result indicates the absence of toxin or insufficient levels of toxin for detection.

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.

FIGURE 1: SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ INTERPRETATION OF RESULTS



Figure 1a
Positive Stx1 Result



Figure 1b
Positive Stx2 Result



Figure 1c
Positive Stx1 and
Stx2 Result



Figure 1d
Negative Result



Figure 1e
Invalid Result



Figure 1f
Invalid Result



Figure 1g
Invalid Result



Figure 1h
Invalid Result

QUALITY CONTROL

Internal: A dotted blue line must be visible in the middle of the *Reaction Window*, below the “C” on every *Membrane Device* that is tested. The appearance of the blue control dotted line confirms that the sample and reagents were added correctly, that the reagents were active at the time of performing the assay, and that the sample migrated properly through the *Membrane Device*. A clear background in the result area is considered an internal negative control. If the test has been performed correctly and reagents are working properly, the background will be white to light blue to give a discernible result.

External: The reactivity of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* kit should be verified upon receipt using the *Positive Control* and negative control (*Diluent*). The *Positive Control* is supplied with the kit (gray-capped bottle). The *Positive Control* confirms the reactivity of the other reagents associated with the assay, and is not intended to ensure precision at the analytical assay cut-off. *Diluent* is used for the negative control. Additional tests can be performed with the controls to meet the requirements of local, state and/or federal regulations and/or accrediting organizations.

LIMITATIONS

1. The *SHIGA TOXIN QUIK 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 QUIK 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 Stx1 produced by *E. coli* (26), and if present at detectable levels, will give a positive result on the "1" side of the *Reaction Window*.

EXPECTED VALUES

The *SHIGA TOXIN QUIK 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, and 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 (27). A positive result in the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* confirms the presence of Stx1 and/or Stx2 in the sample; a negative result indicates the absence of toxin or insufficient levels of toxin for detection.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test was evaluated at 3 independent sites. A summary of overall performance at the 3 sites follows.

Direct Fecal Testing

The performance of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* (STQC) test was compared to the Vero Cell Cytotoxin Assay (with neutralization), considered the clinical reference standard (gold standard) and included 873 fresh and 14 frozen samples. Age and sex information was available for 878 patients. Of the 878 patients, 8% were ≤ 18 years and 59.8% were females and 40.2% were males. The following tables show a summary of the clinical performance of the Stx1 portion and the Stx2 portion of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test at all 3 sites. The results show that the Stx1 portion exhibited a sensitivity of 98.0%, a specificity of 99.8%, and an overall correlation of 99.7% with cytotoxin assay. The Stx2 portion exhibited a sensitivity of 98.0%, a specificity of 100%, and an overall correlation of 99.9% with cytotoxin assay.

Direct Fecal Testing Results

	Vero Cell Cytotoxin Assay	
n = 887	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	48	2
STQC Stx1 -	1	836

		95% Confidence Interval
Sensitivity	98.0%	87.8 - 99.9%
Specificity	99.8%	99.0 - 99.9%
Correlation	99.7%	99.7 - 99.7%

	Vero Cell Cytotoxin Assay	
n = 887	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	48	0
STQC Stx2 -	1	838

		95% Confidence Interval
Sensitivity	98.0%	87.8 - 99.9%
Specificity	100%	99.4 - 99.9%
Correlation	99.9%	100 - 100%

Broth Cultures

The performance of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test using overnight broth cultures (GN or MacConkey broth) from fecal specimens was compared to the Vero Cell Cytotoxin Assay (with neutralization). The following tables show a summary of the clinical performance of the Stx1 portion and the Stx2 portion of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test. The results show that the Stx1 portion exhibited a sensitivity of 100%, a specificity of 99.5%, and an overall correlation of 99.5% with cytotoxin assay. The Stx2 portion exhibited a sensitivity of 95.7%, a specificity of 99.9%, and an overall correlation of 99.6% with cytotoxin assay.

Broth Culture Testing Results

	Vero Cell Cytotoxin Assay	
n = 770	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	42	4
STQC Stx1 -	0	724

	Vero Cell Cytotoxin Assay	
n = 770	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	45	1
STQC Stx2 -	2	722

		95% Confidence Interval
Sensitivity	100%	89.6 - 100%
Specificity	99.5%	98.5 - 99.8%
Correlation	99.5%	99.5 - 99.5%

		95% Confidence Interval
Sensitivity	95.7%	84.3 - 99.3%
Specificity	99.9%	99.1 - 100%
Correlation	99.6%	99.6 - 99.6%

REPRODUCIBILITY

The reproducibility of the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test was determined using 12 fecal specimens that were coded to prevent their identification during testing. Testing was performed at 2 independent laboratories and on-site at TECHLAB, 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, 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.

CROSS REACTIVITY

The *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* 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 *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* 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> (non-toxicogenic)	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (non-toxicogenic)		<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

STRAINS/SEROTYPES

Various *E. coli* Shiga toxin-producing strains and serotypes were tested in the *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* test by both the Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) plate and MacConkey broth culture methods. *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), O111a:NM, 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

Shiga Toxin Type Stx2: Strain Types - O26:H11, O157:H7 (4 strains), O157:NM, O8:H19 (2 strains), O8:H10, ORU:H29, O177:NM, O6:H10, O104:H4 (European 2011 outbreak strain), O121:H19 (3 strains), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21

Shiga Toxin Type Stx1 and Stx2: Strain Types - O157:H7 (7 strains), O157:NM (2 strains), O111:H8, O111, O111:NM, O113:H21

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/Palmitic 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 (two positive for Stx1, two positive for Stx2, two positive for both Stx1 and Stx2) and six negative fecal specimens were analyzed. Each specimen was assayed on 5 cassettes. All positives remained positive and all negatives remained negative.

PRECISION – INTER-ASSAY

The inter-assay precision of the *SHIGA TOXIN QUIK 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 QUIK CHEK™* test was established at concentrations of 0.04 ng/mL Stx1 and 0.04 ng/mL Stx2.

SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ - ESPAÑOL

USO PREVISTO

La prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* es un inmunoensayo enzimático rápido de membrana para la detección cualitativa simultánea y la diferenciación de la toxina Shiga 1 (Stx1) y la toxina Shiga 2 (Stx2) en un único dispositivo de prueba. Está pensada para 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 con muestras fecales o cultivos en caldo o placa obtenidos de muestras fecales. Los resultados de las pruebas 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

El *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) fue descrito 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 neutralizarse con anticuerpos de conejo frente a la 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, 28). Las infecciones por O157:H7 se diagnostican rutinariamente mediante cultivo de muestras fecales en medios selectivos (17, 18), pero esta metodología permite que las cepas de STEC distintas de O157 no se detecten. 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 QUIK 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 QUIK CHEK™* emplea anticuerpos específicos frente a Stx1 y Stx2. El *Dispositivo de membrana* contiene una *Ventana de reacción* con tres líneas verticales de anticuerpos inmovilizados. La línea de prueba "1" contiene anticuerpos monoclonales frente a Stx1. La línea de control ("C") es una línea de puntos que contiene anticuerpos anti-peroxidasa de rábano picante (HRP). La línea de prueba "2" contiene anticuerpos monoclonales frente a Stx2. El *Conjugado* contiene anticuerpos frente a Stx1 y Stx2 unidos a peroxidasa de rábano picante. Para realizar el test, la muestra se añade a un tubo que contiene una mezcla de *Diluyente* y *Conjugado*. La mezcla muestra-conjugado diluida se añade al *Pocillo de muestra* y el dispositivo se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante la incubación, cualquier Stx1 y/o Stx2 presente en la muestra se une a los conjugados anticuerpo-peroxidasa. Los complejos toxina-anticuerpo-peroxidasa migran a través de un filtro almohadillado a una membrana y los captan los anticuerpos monoclonales específicos de Stx1 y Stx2 en las líneas de la prueba. A continuación, se lava la *Ventana de reacción* con *Tampón de lavado*, seguido por la adición de *Sustrato*. Después de un período de incubación de 10 minutos, se examina visualmente la *Ventana de reacción* en busca de la aparición de líneas azules verticales en

los lados “1” y “2” de la *Ventana de reacción*. Una línea azul en el lado “1” de la *Ventana de reacción* es un resultado positivo que indica la presencia de Stx1. Una línea azul en el lado “2” de la *Ventana de Reacción* es un resultado positivo que indica la presencia de Stx2. Una reacción positiva “C”, indicada por una línea azul de puntos vertical bajo la parte “C” de la *Ventana de reacción*, confirma que el test funciona adecuadamente, que se siguió el procedimiento y que los resultados son válidos.

MATERIALES SUMINISTRADOS

MEM	DEV	Dispositivos de membrana – cada bolsa contiene 1 dispositivo
DIL	SPE	Diluyente (22 ml) – Solución tamponada proteínica con cuentagotas graduado*
		H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
WASH	REAG	Tampón de lavado (12 ml) – Solución tamponada con cuentagotas graduado*
		H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
SUBS	REAG	Sustrato (3,5 ml) – Solución con tetrametilbenzidina
CONJ	ENZ	Conjugado (2,5 ml) – Anticuerpos específicos de Stx1 y Stx2 unidos a peroxidasa de rábano picante, en una solución tamponada proteínica*
CONTROL	+	Control positivo (1 ml) – Antígeno en una solución tamponada de proteínas*
Pipetas de plástico desechables – graduadas a 25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl y 500 µl		
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	

*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



MATERIALES Y EQUIPAMIENTO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Tubos de ensayo pequeños (p. ej., tubos de plástico Eppendorf o tubos de vidrio)

Palillos o torundas aplicadores

Cronómetro

Mezclador de tipo vortex

Guantes desechables para manipular las muestras fecales

Pipeta y puntas de pipeta

PERÍODO DE VALIDEZ Y CONSERVACIÓN

La fecha de caducidad del kit se indica en la etiqueta y corresponde a 24 meses a partir de la fecha de fabricación. 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 y todos los componentes son estables una vez abiertos hasta las fechas de caducidad indicadas si se conservan entre 2 °C y 8 °C. Deje que todos los componentes alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. El kit es estable a temperatura ambiente durante turnos seguidos de 8 horas si se vuelve a conservar refrigerado entre los turnos.

PRECAUCIONES

1. Rx Only - Solo con receta
2. Para uso diagnóstico *in vitro*. Exclusivamente para uso profesional.
3. Se trata de un ensayo manual.
4. Cada componente del kit debe inspeccionarse por si existe algún signo de fugas. 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.
5. El reactivo *Sustrato* debe ser incoloro. Si el reactivo *Sustrato* adquiere un color azul oscuro/violeta, deseche y avise al Servicio técnico para su sustitución.
6. No deben mezclarse ni intercambiarse reactivos de kits diferentes. No utilizar los kits después de su fecha de caducidad.
7. ¡Los tapones, las puntas y los cuentagotas están codificados con colores y NO deben mezclarse!
8. ¡ANTES DEL USO deje que todos los componentes alcancen la TEMPERATURA AMBIENTE!
9. No congele los reactivos. El kit debe conservarse a una temperatura entre 2 y 8 °C.
10. La bolsa que contiene el *Dispositivo de Membrana* debe estar a temperatura ambiente antes de abrirse. Mantenga secos los dispositivos de membrana antes de su uso.
11. 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.

12. La contaminación microbiana de los reactivos puede afectar a la precisión del análisis. Evite la contaminación microbiológica de los reactivos utilizando pipetas estériles desechables para extraer partes alícuotas de los frascos de reactivos.
13. Los dispositivos de membrana no pueden volver a utilizarse.
14. 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.
15. La validez de los resultados al usar el test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* depende de la reacción adecuada de los controles internos y externos. Véase la sección de Control de Calidad.
16. Las muestras y los dispositivos de membrana deben manipularse y eliminarse después del uso como materiales biológicos potencialmente peligrosos. Utilice guantes desechables para realizar la prueba.
17. 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".
18. Los reactivos *conjugado*, *diluyente*, *control positivo* y *tampón de lavado* 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. Siga las normas nacionales, regionales y locales para consultar los reglamentos de eliminación de residuos.
20. Comunique cualquier incidente grave a TECHLAB y a la autoridad competente del estado miembro del o del país en el que el usuario y/o el paciente esté establecido.

RECOGIDA, MANIPULACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS FECALES

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

Tipos de muestra aceptables
Muestras fecales recientes
Muestras en medios de transporte (p. ej., Cary Blair, C&S)
Muestras fecales congeladas (congeladas sin diluir o congeladas en medios para transporte)
Cultivos para gramnegativos o en caldo de MacConkey 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)

1. Manipulación de muestras para pruebas fecales directas –

- a. Las muestras frescas deben estudiarse lo antes posible después de su recepción. Si no pueden realizarse las pruebas al recibirlas, las muestras pueden conservarse entre 2° y 8°C o congeladas ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) durante hasta 14 días desde el momento de la recepción de la muestra.
- b. Las muestras en medios de transporte (C&S o Cary Blair) pueden conservarse entre 2° y 8°C o congeladas ($\leq -10^{\circ}\text{C}$) durante hasta 14 días desde el momento de la recepción de la muestra.

2. Manipulación de muestras para el método de caldo o placa -

- Las muestras deben conservarse a una temperatura entre 2° 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° 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.
 - NO se recomienda conservar las muestras fecales en el *Diluyente*.
 - No permita que las muestras permanezcan en la mezcla *Diluyente/Conjugado* durante más de dos horas.

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.

2. Continúe con el PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.

B. Método de caldo (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 inocular el caldo.
 - Muestras líquidas/semisólidas** - transferir 25 μl de muestra a un tubo de cultivo con 5 ml de caldo MacConkey o 8 ml de caldo para gramnegativos (GN).
 - Muestras formadas/sólidas** - transfiera una pequeña porción (aproximadamente 2 mm de diámetro, el equivalente de 25 μl) de la muestra a un tubo de cultivo con 5 ml de caldo MacConkey u 8 ml de caldo GN.
 - Muestras fecales en medios de transporte Cary Blair o C&S** - transfiera 100 μl de la muestra conservada a un tubo de cultivo con 5 ml de caldo MacConkey u 8 ml de caldo GN.
- Ponga el tapón sin apretar en los tubos de caldo inoculados e incube durante 16-24 horas entre 35° y 39°C.
- 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 reciente del mismo paciente. De forma alternativa, pueden usarse el método de placa selectivo (véase "C" a continuación) o el método de prueba de muestras fecales directas (véase "A" más arriba).

4. Continúe con el PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.

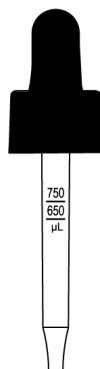
C. Método de placa (en muestras frescas y muestras en medios de transporte)

- Mezcle bien todas las muestras independientemente de su consistencia ya que es muy importante obtener una suspensión homogénea de las muestras antes de 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.*
- Incube las placas durante 16-24 horas entre 35°C y 39°C.
- 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).
- Continúe con el **PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.**

PROCEDIMIENTO DEL TEST

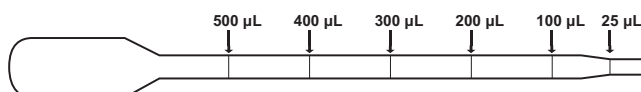
1. Espere hasta que todos los reactivos y el número de dispositivos necesarios estén a temperatura ambiente antes de su uso.
2. **Asigne e identifique un tubo de ensayo pequeño para cada muestra así como controles externos opcionales según sea necesario.**
3. **Añada *Diluyente* a cada tubo usando el cuentagotas graduado negro.**

Tipo de muestra	Volumen de <i>Diluyente</i>
Muestra fecal (no conservada) Cultivo de placa Controles externos	750 µl (2ª graduación desde la punta)
Cultivo de caldo Muestra en medio de transporte	650 µl (1ª graduación desde la punta)



4. **Añada una gota de *Conjugado* (frasco con tapón rojo) a cada tubo.** Preste atención al tiempo total del análisis cuando realice la prueba con más de una muestra fecal. El *Diluyente* y el *Conjugado* deben añadirse a los tubos antes de añadir las muestras.
5. Utilice una pipeta de plástico desechable (suministrada con el kit) para cada muestra – las pipetas tienen graduaciones a 25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl y 500 µl.

Pipeta graduada:



6. **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 - Utilizando una pipeta, transfiera 25 µl de muestra a la mezcla *Diluyente/Conjugado*. Utilice la misma pipeta para mezclar la muestra diluida.

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 un palito aplicador de madera y transfiera una parte pequeña (aproximadamente de 2 mm de diámetro, el equivalente de 25 µl) de la muestra a la mezcla de *Diluyente/Conjugado*. Emulsione la muestra con el palito aplicador.

Cultivos de caldo y muestras fecales en medios de transporte (Cary Blair o C&S) - Utilizando una pipeta, transfiera 100 µl de muestra a la mezcla *Diluyente/Conjugado*.

Cultivos de placa - Pase a través de un área confluyente de la placa varias veces con una torunda, luego mezcle lo obtenido en la torunda en la mezcla de *Diluyente/Conjugado*. Rote la torunda contra la parte interior del tubo de ensayo varias veces para liberar la muestra de la torunda. **Retire la torunda, mezcle bien y deje incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 8 del PROCEDIMIENTO DE PRUEBA.**

NOTA: Si se transfiere una cantidad muy reducida de muestra o si no se mezcla y se suspende completamente la muestra en la mezcla de *Diluyente* puede obtenerse un resultado falso negativo en la prueba. Si se añade una cantidad excesiva de muestra, pueden obtenerse resultados no válidos debido al reducido flujo.

7. Controles externos opcionales:

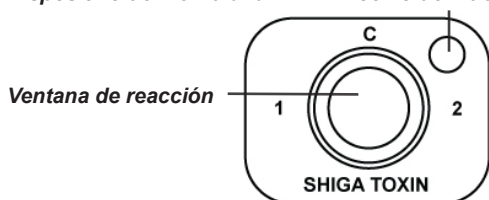
Control positivo externo - añada una gota de *Control positivo* (frasco con tapón gris) al tubo de ensayo adecuado.

Control negativo externo - añada 25 µl de *Diluyente* al tubo de ensayo adecuado.

8. Cierre cada tubo de muestra diluida o control y mezcle bien. Mezcle adecuadamente con vórtex o invirtiendo el tubo varias veces. Una vez diluida la muestra de paciente o el control en la mezcla *Diluyente/Conjugado*, esta puede incubarse a temperatura ambiente durante cualquier período de tiempo hasta 2 horas antes de la adición al *Dispositivo de Membrana*.
9. Utilice un *Dispositivo de membrana* para cada muestra y control externo opcional positivo o negativo según sea adecuado. Las bolsas de papel de aluminio que contienen los dispositivos deben estar a temperatura ambiente antes de proceder a su apertura. Identifique los dispositivos de forma apropiada y oriéntelos en una superficie plana de forma que la inscripción "SHIGA TOXIN" del dispositivo se encuentre en el fondo del mismo y el *Pocillo de muestra* pequeño se encuentre en la esquina superior derecha del dispositivo.

Dispositivo de membrana

Pocillo de muestra



10. Compruebe que cada muestra se mezcla bien antes de la adición al *Dispositivo de membrana*. Utilizando una nueva pipeta, transfiera 500 µl de cada tubo al **Pocillo de muestra** (orificio más pequeño en la esquina superior derecha del dispositivo) de un *Dispositivo de membrana*, asegurándose de expeler la muestra líquida en la almohadilla de absorción dentro del *Dispositivo de membrana*. Cuando cargue la muestra en el pocillo, compruebe que la punta de la pipeta está angulada hacia la *Ventana de reacción* (orificio mayor en el centro del dispositivo).
11. **Incube el dispositivo a temperatura ambiente durante 15 minutos** – la muestra se absorberá a través del dispositivo y el área húmeda se extenderá en la *Ventana de reacción*. El paso de incubación de 15 minutos comienza después de que se haya transferido la última mezcla de muestra-conjugado diluida al *Dispositivo de membrana* final.

NOTA PARA LAS MUESTRAS QUE NO MIGRAN:

Ocasionalmente, una muestra diluida no migra adecuadamente y la *Ventana de reacción* no se humedece completamente. Si la *Ventana de reacción* no aparece completamente húmeda en el plazo de 5 minutos después de añadir la muestra al pocillo, añada 100 µl (4 gotas) de *Diluyente* al **Pocillo de muestra** y espere otros 5 minutos (para un total de 20 minutos).

12. Después de la incubación, añada 300 µl de **Tampón de lavado** a la **Ventana de reacción** usando el cuentagotas graduado blanco (o equivalente). Deje que la *Solución de lavado* penetre en la membrana de la *Ventana de reacción* y se absorba completamente.
13. **Añada 2 gotas de Sustrato (frasco con tapón blanco) a la Ventana de reacción.** Lea y anote los resultados observados después de 10 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

1. La interpretación del test es más fiable cuando se lee el dispositivo inmediatamente después del período de reacción de 10 minutos. No puede interpretarse un test antes de ese momento. Lea el dispositivo a una distancia normal en una zona bien iluminada. Dirija la mirada a la línea de visión situada directamente sobre el dispositivo.

2. Observe en el dispositivo la aparición de una línea de puntos azules en el centro de la *Ventana de reacción* que representa el control positivo interno. La presencia de cualquier punto de control representa un control interno válido.
3. Observe la aparición en el dispositivo de líneas azules en los lados "1" y "2" de la *Ventana de reacción* que representan las líneas de test. El color de las líneas puede ser débil o intenso. Una línea parcialmente visible se interpreta como una línea válida. No interprete la decoloración de la membrana como un resultado positivo.
Resultado positivo Stx1 ("1"): Se ven la línea azul "1" y la línea control de puntos azules debajo de "C" (Figura 1a). Un resultado positivo indica la presencia de Stx1.
Resultado positivo Stx2 ("2"): Se ven la línea azul "2" y la línea control de puntos azules debajo de "C" (Figura 1b). Un resultado positivo indica la presencia de Stx2.
Resultado positivo Stx1 y Stx2 ("1" y "2"): Se ven tanto la línea azul "1" y la línea azul "2" y también la línea de control de puntos azul debajo de "C" (Figura 1c). Un resultado positivo indica la presencia de Stx1 y Stx2.
4. **Resultado negativo:** Se observa una única línea azul de puntos en el centro de la *Ventana de reacción*, debajo de "C" y no hay líneas de test visibles en el lado "1" o en el lado "2" de la *Ventana de reacción* (Figura 1d). Un resultado negativo en el lado "1" indica que Stx1 está ausente en la muestra o está por debajo del límite de detección del test. Un resultado negativo en el lado "2" indica que Stx2 está ausente en la muestra o está por debajo del límite de detección del test.
5. **Resultado no válido:** No se ven líneas en la *Ventana de reacción* (Figura 1e) o no hay una línea de puntos azules debajo de "C" a la terminación del período de reacción (Figuras 1f, 1g, 1h).
6. Un resultado positivo en *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* confirma la presencia de Stx1 y/o Stx2 en la muestra; un resultado negativo indica la ausencia de toxina o niveles insuficientes de toxina para su detección.

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.

FIGURA 1: *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*, INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS



Figura 1a
Resultado positivo
de Stx1



Figura 1b
Resultado positivo
de Stx2



Figura 1c
Resultado Positivo
de Stx1 y de Stx2



Figura 1d
Resultado negativo



Figura 1e
Resultado no válido



Figura 1f
Resultado no válido



Figura 1g
Resultado no válido



Figura 1h
Resultado no válido

CONTROL DE CALIDAD

Interno: Debe observarse una línea azul de puntos en el centro de la *Ventana de reacción*, debajo de "C" en cada *Dispositivo de membrana* que se estudie. La aparición de la línea azul de control confirma que se han añadido correctamente la muestra y los reactivos, que

los reactivos estaban activos durante la realización del análisis y que la mezcla ha migrado adecuadamente a través del *Dispositivo de membrana*. Un fondo transparente en el área de resultados se considera como un control negativo interno. Si el test se ha realizado adecuadamente y los reactivos funcionan correctamente, el fondo será de blanco a azul claro para dar un resultado apreciable.

Externo: La reactividad del kit *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* debe comprobarse al recibir el kit usando el *Control positivo* y el control negativo (*Diluyente*). El *Control positivo* se suministra con el kit (frasco con tapón gris). El *Control positivo* se utiliza para verificar la reactividad de los demás reactivos del ensayo y su objetivo no es asegurar la precisión del punto de corte del ensayo. El *Diluyente* se utiliza para el control negativo. Pueden realizarse tests adicionales con los controles para cumplir los requisitos administrativos locales, regionales o federales y los de los organismos de acreditación.

LIMITACIONES

1. El test *SHIGA TOXIN QUIK 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.
2. Un resultado negativo del test 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.
3. El test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* es cualitativo. La intensidad del color no debe interpretarse cuantitativamente.
4. La toxina producida por *Shigella dysenteriae* es casi idéntica a la Stx1 producida por *E. coli* (26), y si está presente a niveles detectables, dará un resultado positivo en el lado "1" de la *Ventana de reacción*.

VALORES ESPERADOS

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

Se estima que *E. coli* con toxina Shiga causa de 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 (27). Un resultado positivo en *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* confirma la presencia de Stx1 y/o Stx2 en la muestra; un resultado negativo indica la ausencia de toxina o niveles insuficientes de toxina para su detección.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se evaluó el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* en 3 centros independientes. A continuación se muestra un resumen del rendimiento global en los 3 centros.

Pruebas fecales directas

Se comparó el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* (STQC) con el del Ensayo de Citotoxina de Célula Vero (con neutralización), considerado el patrón de referencia clínica (patrón oro) y se incluyeron 873 muestras frescas y 14 congeladas. Se dispuso de información sobre edad y sexo de 878 pacientes. De los 878 pacientes, el 8% eran ≤ 18 años y el 59,8% eran mujeres y el 40,2% eran varones. Las tablas siguientes muestran un resumen del rendimiento clínico de la porción Stx1 y la porción Stx2 de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* en los 3 centros. Los resultados demuestran que la porción Stx1 mostró una sensibilidad del 98,0%, una especificidad del 99,8% y una

correlación global del 99,7% con el ensayo de citotoxina. La porción Stx2 mostró una sensibilidad del 98,0%, una especificidad del 100% y una correlación global del 99,9% con el ensayo de citotoxina.

Resultados en pruebas fecales directas

	Ensayo con citotoxina de célula Vero	
n = 887	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	48	2
STQC Stx1 -	1	836

	Intervalo de Confianza del 95%	
Sensibilidad	98,0%	87,8 - 99,9%
Especificidad	99,8%	99,0 - 99,9%
Correlación	99,7%	99,7 - 99,7%

	Ensayo con citotoxina de célula Vero	
n = 887	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	48	0
STQC Stx2 -	1	838

	Intervalo de Confianza del 95%	
Sensibilidad	98,0%	87,8 - 99,9%
Especificidad	100%	99,4 - 99,9%
Correlación	99,9%	100 - 100%

Cultivos de caldo

Se comparó el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* usando cultivos de caldo por la noche (caldo GN o MacConkey) de muestras fecales con el del Ensayo de Citotoxina de Célula Vero (con neutralización). Las tablas siguientes muestran un resumen del rendimiento clínico de la porción Stx1 y de la porción Stx2 de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*. Los resultados demuestran que la porción Stx1 mostró una sensibilidad del 100%, una especificidad del 99,5% y una correlación global del 99,5% con el ensayo de citotoxina. La porción Stx2 demostró una sensibilidad del 95,7%, una especificidad del 99,9% y una correlación global del 99,6% con el ensayo de citotoxina.

Resultados de pruebas en cultivos de caldo

	Ensayo con citotoxina de célula Vero	
n = 770	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	42	4
STQC Stx1 -	0	724

	Intervalo de Confianza del 95%	
Sensibilidad	100%	89,6 - 100%
Especificidad	99,5%	98,5 - 99,8%
Correlación	99,5%	99,5 - 99,5%

	Ensayo con citotoxina de célula Vero	
n = 770	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	45	1
STQC Stx2 -	2	722

	Intervalo de Confianza del 95%	
Sensibilidad	95,7%	84,3 - 99,3%
Especificidad	99,9%	99,1 - 100%
Correlación	99,6%	99,6 - 99,6%

REPRODUCIBILIDAD

Se determinó la reproducibilidad del test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* usando 12 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 período 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.

REACTIVIDAD CRUZADA

Se evaluó la reactividad cruzada de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* con las cepas bacterianas y víricas enumeradas a continuación. Ninguna de las cepas mostró interferencia con el rendimiento de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK 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 (enterotoxic)	
<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 QUIK 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 cepas - O26:H11 (5 cepas), O157:H7, O111:NM (2 cepas), O111a:NM, 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

Toxina Shiga de tipo Stx2: Tipos de cepas - O26:H11, O157:H7 (4 cepas), O157:NM, O8:H19 (2 cepas), O8:H10, ORU:H29, O177:NM, O6:H10, O104:H4 (cepa del brote europeo de 2011), O121:H19 (3 cepas), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21

Toxina Shiga de tipos Stx1 y Stx2: Tipos de cepas - O157:H7 (7 cepas), O157:NM (2 cepas), O111:H8, O111, O111:NM, O113:H21

SUSTANCIAS INTERFERENTES (formulaciones de EE.UU.)

Las siguientes sustancias no tuvieron ningún efecto en los resultados positivos o negativos de la prueba analizadas 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/palmitico (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 (dos positivas para Stx1, dos positivas para Stx2, dos positivas tanto para Stx1 como para Stx2) y seis muestras fecales negativas. Se ensayó cada muestra en 5 cassettes. Todos los resultados positivos siguieron siendo positivos y todos los resultados negativos, negativos.

PRECISIÓN – INTERANALÍTICA

La precisión interanalítica del test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* se determinó 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 de la prueba *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* se estableció en concentraciones de 0,04 ng/ml de Stx1 y 0,04 ng/ml de Stx2.

SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ - DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* Test ist ein rascher Membranenzym-Immuntest für die gleichzeitige qualitative Entdeckung und Differenzierung von Shiga-Toxin 1 (Stx1) und Shiga-Toxin 2 (Stx2) mit einer einzigen Testvorrichtung. Er ist zur Verwendung an menschlichen Stuhlproben von Patienten mit gastrointestinalen Symptomen gedacht, um bei der Diagnose von Erkrankungen zu helfen, die durch Shiga-Toxin produzierende *Escherichia coli* (STEC) verursacht sind. Er kann an Stuhlproben, oder an aus Stuhlproben gewonnenen Nährmedium- bzw. Plattenkulturen 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 erzeugende *Escherichia coli* (STEC) wurden erstmals von O'Brien *et.al.* beschrieben, nachdem sie entdeckt hatten, dass Überstand einer *E. coli*-Kultur, der für HeLa- und Vero-Zellen zytotoxisch war, durch Antigene von Kaninchen gegen Shiga-Toxin neutralisiert werden konnte (1). STEC verursacht weltweit nahrungsmittel- und wasserbedingte Durchfallerkrankungen, die, wenn sie undiagnostiziert bleiben, zu hämorrhagischer Colitis und/oder einem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) fortschreiten können (2, 3). Da bestimmte Behandlungen und Medikamente das Risiko von HUS erhöhen können (4), ist eine rasche Entdeckung notwendig, um Epidemien und sekundäre Übertragungen zu verhindern (5-9). Der STEC-Strang O157:H7 war historisch im Zentrum der Aufmerksamkeit in den USA, seit er zum ersten Mal aus zu wenig gegarten Hamburgern (3, 10) isoliert wurde und verursacht schätzungsweise jährlich etwa 73.000 Erkrankungen (11). In den letzten Jahren wurden sowohl in den USA als auch im Ausland jedoch STEC-Infektionen, die nicht durch O157-Stämme verursacht sind, eine zunehmend höhere Prävalenz auf (12-16, 28). O157:H7-Infektionen werden routinemäßig durch Kulturen aus Stuhlproben auf ausgewählten Medien diagnostiziert (17, 18), aber mit dieser Methode bleiben andere Stämme als O157 STEC unentdeckt. STEC erzeugt entweder ein oder beide Shiga-Toxine (Stx1 und/oder Stx2), die beide starke Zytotoxine sind (19, 20). Isolate, die nur Stx2 erzeugen, wurden höhere Inzidenzraten von HUS zugeschrieben (18, 21-23). Shiga-Toxine können durch Test an Gewebekulturen entdeckt werden (24), aber diese Methode ist zeitraubend und auch laborintensiv. Indem er die Toxine entdeckt, kann der *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Test STEC in Stuhlproben oder Kulturen ungeachtet des Serotyps oder anderer Virulenzfaktoren entdecken (25).

TESTPRINZIP

Der *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Test verwendet spezifische Antikörper gegen Stx1 und Stx2. Die *Testkarte* verfügt über ein *Reaktionsfenster* mit drei vertikalen Linien immobilisierter Antikörper. Die Testlinie "1" enthält monoklonale Antikörper gegen Stx1. Die Kontrolllinie („C“) ist eine gepunktete Linie, die Anti-Meerrettich-Peroxidase (MRP)-Antikörper enthält. Die Testlinie "2" enthält monoklonale Antikörper gegen Stx2. Das *Konjugat* besteht aus an Meerrettich-Peroxidase gebundenen Antikörpern gegen Stx1 und Stx2. Zur Durchführung des Tests wird die Probe einem Reagenzglas mit einer Mischung aus *Verdünnungspuffer* und *Konjugat* hinzugefügt. Die verdünnte Proben-Konjugat-Mischung wird in die *Probenvertiefung* gegeben und die *Testkarte* bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation binden sich die in der Probe vorhandenen Stx1 und/oder Stx2 an die Antikörper-Peroxidase-Konjugate. Die Toxin-Antikörper-Komplexe migrieren durch ein Filterpad zu einer Membran, wo sie von den immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen Stx1 und Stx2 auf den Testlinien eingefangen werden. Anschließend wird das *Reaktionsfenster* mit *Waschpuffer* gewaschen und *Substrat* zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wird das *Reaktionsfenster* einer Sichtprüfung auf das Erscheinen von vertikalen blauen Linien auf Site "1" und "2" des *Reaktionsfensters* unterzogen.

Eine blaue Linie auf Seite "1" des *Reaktionsfensters* ist ein positives Ergebnis, das das Vorhandensein von Stx1 anzeigt. Eine blaue Linie auf Seite "2" des *Reaktionsfensters* ist ein positives Ergebnis, das das Vorhandensein von Stx2 anzeigt. Eine positive „Kontroll“-Reaktion, angezeigt durch eine vertikale gepunktete blaue Linie unter dem „C“-Bereich des *Reaktionsfensters*, bestätigt, dass der Test ordnungsgemäß funktioniert und die Ergebnisse gültig sind.

PACKUNGSIHALT

MEM	DEV	Testkarten – jeder Beutel enthält 1 Testkarte
DIL	SPE	Verdünnungspuffer (22 ml) – Gepufferte Proteinlösung mit geeichetem Tropfer*
WASH	REAG	H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung Waschpuffer (12 ml) – Gepufferte Lösung mit geeichetem Tropfer*
SUBS	REAG	H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung Substrat (3,5 ml) – Lösung mit Tetramethylbenzidin
CONJ	ENZ	Konjugat (2,5 ml) – spezifische Antikörper für Stx1 und Stx2, gebunden an Meerrettich-Peroxidase in einer gepufferten Proteinlösung*
CONTROL	+	Positivkontrolle (1 ml) – Antigen in gepufferten Proteinlösung*
Einweg-Kunststoffpipetten - auf 25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl und 500 µl geeicht		
IVD	In-Vitro-Diagnostikum	

*enthält 0,05 % ProClin® 300

Signalwort: Warnung

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen

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



BENÖTIGTES, NICHT ENTHALTENES MATERIAL

Kleine Reagenzgläser (z. B. Eppendorf-Reagenzgläser aus Kunststoff oder Glas)

Applikatorstäbchen oder Tupfer

Zeitmesser

Vortex-Schüttler

Einweghandschuhe zur Handhabung der Stuhlproben

Pipettierer und Pipettenspitzen

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Verfallsdatum des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben und beträgt 24 Monate ab dem Herstellungsdatum. Das Verfallsdatum für die einzelnen Bestandteile ist auf den jeweiligen Etiketten angegeben. Das Kit muss zwischen 2 °C und 8 °C gelagert werden. Nach Anbruch sind das Testkit und alle Bestandteile bis zum jeweils angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Alle Bestandteile vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen lassen. Das Testkit ist für die nachfolgenden 8-Stunden-Arbeitsschichten bei Raumtemperatur stabil, wenn es zwischen den Schichten wieder kühl gelagert wird.

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Rx Only - Verschreibungspflichtig
2. *In-vitro*-Diagnostikum. Nur für den professionellen Gebrauch.
3. Hierbei handelt es sich um einen manuellen Assay.
4. 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.
5. Das *Substratreagens* muss farblos sein. Sollte das *Substratreagens* eine dunkelblaue/ violette Färbung annehmen, so wenden Sie sich bitte an den Kundendienst für einen Ersatz.
6. Reagenzien aus verschiedenen Kits nicht mischen oder miteinander vertauschen. Verwenden Sie das Testkit nicht nach dem Verfallsdatum.
7. Verschlüsse, Spitzen und Tropfer sind farbkodiert; NICHT vertauschen!
8. Lassen Sie alle Bestandteile VOR DER VERWENDUNG RAUMTEMPERATUR annehmen!
9. Reagenzien nicht einfrieren. Das Kit muss bei einer Temperatur zwischen 2° C und 8° C gelagert werden.
10. Der Beutel mit der *Testkarte* muss vor dem Öffnen Raumtemperatur angenommen haben. Testkarten vor Gebrauch trocken lagern.

11. Halten Sie die Reagenzflaschen bei der Reagenzienabgabe senkrecht, um eine einheitliche Tropfengröße und korrekte Menge sicherzustellen.
12. Eine mikrobielle Kontamination der Reagenzien kann die Genauigkeit des Tests beeinträchtigen. Vermeiden Sie mikrobielle Kontaminationen der Reagenzien durch Verwendung steriler Einweg-Pipetten für die Reagenzienentnahme aus den Flaschen.
13. Die Testkarten dürfen nicht wiederverwendet werden.
14. 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.
15. Die Gültigkeit der Testergebnisse bei Verwendung des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Tests hängt von der ordnungsgemäßen Reaktion der internen und externen Kontrollen ab. Siehe Abschnitt Qualitätskontrolle.
16. Proben und Testkarten nach dem Gebrauch als potenzielle biologische Gefahrstoffe behandeln und entsorgen. Tragen Sie während der Durchführung des Tests Einweghandschuhe.
17. 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.
18. Das *Konjugat*, der *Verdünnungspuffer*, die *Positive Kontrolle* und der *Waschpuffer* 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. Befolgen Sie Ihre nationalen, regionalen und lokalen Verordnungen in Bezug auf die Abfallentsorgung.
20. Schwerwiegende Vorkommnisse sind TECHLAB und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates bzw. Landes zu melden, in dem der Benutzer und/oder Patienten ansässig sind.

SAMMELN, HANDHABUNG UND LAGERUNG VON STUHLPROBEN

Die CDC-Richtlinien für STEC-Diagnostiktests empfehlen, die Proben zu testen, sobald sie im Labor eingegangen sind.

Akzeptierbare Probenotypen
Frische Stuhlproben
Proben in Transportmedien (z.B. Cary Blair, C&S)
Tiefgefrorene Stuhlproben (unverdünnt oder in Transportmedien eingefroren)
Gram-negative oder MacConkey-Nährmediumkulturen, die von einer akzeptierbaren Probe gewonnen wurden
Bakterienkulturen von einer SMAC, CT-SMAC, oder CHROMagar® O157-Platte, die von einer akzeptierbaren Probe gewonnen wurden

Nicht verwenden
Stuhlproben in Fixativ auf Formalinbasis (z.B. Natriumazetat-Formalin, 10 %-iges Formalin)
Stuhlproben in Fixativ auf Alkoholbasis (z.B. Polyvinylalkohol)

1. Handhabung von Proben für direkte Stuhltests –

- a. Frische Proben sollten so rasch wie möglich nach Erhalt getestet werden. Wenn bei Erhalt keine Tests durchgeführt werden können, können die Proben ab ihrem Erhalt 14 Tage lang bei Temperaturen zwischen 2° und 8° C oder tiefgefroren ($\leq -10^\circ \text{C}$) gelagert werden.
- b. Proben in Transportmedien (C&S oder Cary Blair) können ab ihrem Erhalt 14 Tage lang bei Temperaturen zwischen 2° und 8° C oder tiefgefroren ($\leq -10^\circ \text{C}$) gelagert werden.

2. Handhabung von Proben bei Methode mit Nährmedium oder Platte –

- a. Proben sollten bei Temperaturen zwischen 2° und 8° C gelagert werden und es sollten so bald wie möglich nach Erhalt Kulturen angelegt werden. 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 tiefgefroren ($\leq -10^\circ \text{C}$) gelagert werden.
- b. Proben in Transportmedien (C&S oder Cary Blair) können bis zu 5 Tage bei Temperaturen zwischen 2° und 8° C gelagert werden.
3. Stellen Sie sicher, dass die Proben vor dem Test gründlich gemischt werden.
4. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen sollte vermieden werden. Gefrorene Proben bei Raumtemperatur auftauen.
5. Stuhlproben sollten NICHT im *Verdünnungspuffer* gelagert werden.
6. Lassen Sie die Proben nicht länger als zwei Stunden in der Mischung von *Verdünnungspuffer/Konjugat* liegen.

VORBEREITUNG DER PROBEN

A. Direkte Tests an Stuhlproben (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 Übertragen ist unbedingt erforderlich.
2. Weiter zur **TESTVERFAHREN**.

B. Methode mit Nährmedium (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 Einimpfen in das Nährmedium ist unbedingt erforderlich.
 - a. **Flüssige/Halb feste Proben** - 25 µl Probe in ein Kultur-Reagenzglas übertragen, das 5 ml MacConkey- oder 8 ml gramnegatives (GN) Nährmedium enthält.
 - b. **Geförnte/feste Proben** - eine kleine Menge (etwa 2 mm Durchmesser entsprechend 25 µl) der Probe in ein Kultur-Reagenzglas übertragen, das 5 ml MacConkey- oder 8 ml gramnegatives (GN) Nährmedium enthält.
 - c. **Stuhlproben in Cary Blair- oder C&S-Transportmedien** - 100 µl der konservierten Probe in ein Kultur-Reagenzglas übertragen, das 5 ml MacConkey- oder 8 ml gramnegatives (GN) Nährmedium enthält.
2. Die geimpften Reagenzgläser mit Nährmedium lose verschließen und 16-24 Stunden zwischen 35° und 39° C inkubieren.
3. Das Reagenzglas auf Wachstum untersuchen. Wenn kein Wachstum erfolgt ist, keine Tests durchführen. Stattdessen ein weiteres Reagenzglas Nährmedium entweder mit der gleichen oder einer frischen Stuhlprobe vom selben Patienten impfen. Alternativ dazu kann die selektive Plattenmethode (siehe "C" unten), oder ein direkter Stuhlprobestest (siehe "A" oben) angewandt werden.
4. Weiter zur **TESTVERFAHREN**.

C. Platten-Methode (bei frischen Proben und Proben in Transportmedien)

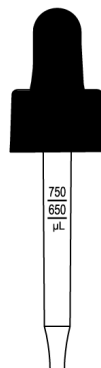
1. Mischen Sie alle Proben unabhängig von ihrer Konsistenz gründlich durch – eine gleichmäßige Suspension der Proben vor dem Impfen der Platte ist unbedingt erforderlich. Benutzen Sie einen Tupfer für die Probenentnahme und verteilen Sie die Probenmenge auf einer SMAC, CT-SMAC, oder CHROMagar® O157-Platte.
BITTE BEACHTEN: CT-SMAC und CHROMagar® O157 sind selektiver als SMAC-Platten und können das Wachstum von anderen als O157-STEC hemmen.

- Die Platten 16-24 Stunden bei Temperaturen zwischen 35° und 39° inkubieren.
- Die Platte auf Wachstum untersuchen. Wenn kein Wachstum erfolgt ist, keine Tests durchführen. Stattdessen eine weitere Platte entweder mit der gleichen oder einer frischen Stuhlprobe vom selben Patienten impfen. Alternativ dazu kann die Nährmedium-Methode (siehe "B" oben), oder ein direkter Stuhlproben test (siehe "A" oben) angewandt werden.
- Weiter zur **TESTVERFAHREN**.

TESTVERFAHREN

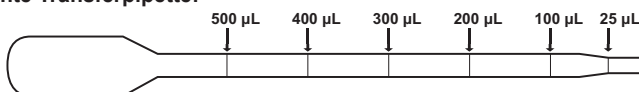
- Lassen Sie alle Reagenzien und die erforderliche Anzahl von Testkarten vor der Verwendung Raumtemperatur annehmen.
- Verwenden Sie für jede Stuhlprobe und jede zusätzliche externe Kontrolle ein eigenes kleines Reagenzglas und kennzeichnen Sie es.**
- Geben Sie mit dem geeichten Tropfer Verdünnungspuffer in jedes Reagenzglas hinzu.**

Probentyp	Volumen an Verdünnungspuffer
Stuhlprobe (nicht konserviert) Plattenkultur Externe Kontrollen	750 µl (2. Gradeinteilung von der Spitze an)
Nährmediumkultur Probe in Transportmedium	650 µl (1. Gradeinteilung von der Spitze an)



- Fügen Sie jedem Reagenzglas einen Tropfen Konjugat (Flasche mit rotem Verschluss) bei.** Achten Sie beim Testen mehrerer Stuhlproben auf die Gesamttestzeit. Der *Verdünnungspuffer* und das *Konjugat* sollten vor den Proben in alle Reagenzgläser hinzugefügt werden.
- Nehmen Sie eine Einweg-Kunststoffpipette (im Lieferumfang enthalten) für jede Probe – die Pipetten sind auf 25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl und 500 µl geeicht.

Geeichte Transferpipette:



- 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 hinzu.**

Direkter Test von Stuhlproben - Flüssige/halb feste Proben - Übertragen Sie 25 µl Probenmenge mithilfe einer Transferpipette in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung. Verwenden Sie dieselbe Transferpipette zum Mischen der verdünnten Probe.

Direkter Test von Stuhlproben - Geformte/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. 2 mm Durchmesser, entspricht der Menge von 25 µl) in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung. Emulgieren Sie die Probe mit dem Applikatorstäbchen.

Nährmediumkulturen und Stuhlproben in Transportmedien (Cary Blair oder C&S) - Übertragen Sie 100 µl Probenmenge mithilfe einer Transferpipette in die *Verdünnungspuffer/Konjugat*-Mischung.

Plattenkulturen - Mehrmals mit einem Tupfer über einen Zusammenflussbereich der Platte streichen, dann den Tupfer in der Mischung von *Verdünnungspuffer/Konjugat*

mischen. Den Tupfer mehrmals an der Innenseite des Test-Reagenzglas drehen, um die Probe vom Tupfer freizusetzen. **Den Tupfer herausnehmen, gut mischen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren lassen, bevor Sie mit Schritt 8 des TESTVERFAHRENS fortfahren.**

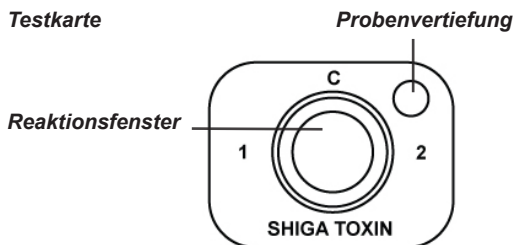
***BITTE BEACHTEN:** Ist die übertragene Probenmenge zu gering oder wird die Probe in der Verdünnungspuffer-Mischung nicht ausreichend gemischt und vollständig suspendiert, so kann dies zu einem falsch-negativen Testergebnis führen. Eine zu große Probenmenge kann aufgrund des beeinträchtigten Probenflusses zu ungültigen Ergebnissen führen.*

7. Optionale Externe Kontrollproben:

Externe positive Kontrolle – geben Sie einen Tropfen *Positive Kontrolle* (Flasche mit grauem Verschluss) in das entsprechende Reagenzglas.

Externe Negativkontrolle – geben Sie 25 µl *Verdünnungspuffer* in das entsprechende Reagenzglas.

8. Verschließen Sie alle Reagenzgläser mit den verdünnten Proben, und mischen Sie gründlich. Gründliches Mischen erzielen Sie mittels Vortexen oder mehrmaliges Umdrehen des Reagenzglas. Nach der Verdünnung einer Probe oder Kontrolle in der Mischung *Verdünnungspuffer/Konjugat* kann diese bei Raumtemperatur für eine beliebig lange Zeitdauer bis max. 2 Stunden vor dem Übertragen auf die *Testkarte* inkubiert werden.
9. Nehmen Sie für jede Probe oder optionale externe positive oder negative Kontrolle nach Bedarf je eine *Testkarte*. Bringen Sie die Folienbeutel mit den Testkarten vor dem Öffnen auf Raumtemperatur. Beschriften Sie jede Karte ordnungsgemäß, und legen Sie sie so auf eine flache Oberfläche, dass sich der Aufdruck „SHIGA TOXIN“ unten auf der Karte und die kleine *Probenvertiefung* in der rechten oberen Ecke der Karte befinden.



10. Vergewissern Sie sich, dass jede Probe gründlich gemischt ist, bevor Sie sie auf die *Testkarte* geben. **Mithilfe einer neuen Transferpipette übertragen Sie 500 µl von jedem Reagenzglas in die Probenvertiefung (kleineres Loch in der oberen rechten Ecke der Karte) einer *Testkarte*. Stellen Sie dabei sicher, dass die flüssige Probe auf das Wicking-Pad im Inneren der *Testkarte* gelangt.** Stellen Sie bei der Ausgabe der Probe in die Probenvertiefung sicher, dass die Spitze der Transferpipette auf das *Reaktionsfenster* zeigt (größeres Loch in der Mitte der *Testkarte*).
11. **Inkubieren Sie die *Testkarte* 15 Minuten bei Raumtemperatur** – die Probe sickert durch die Karte, und eine Feuchtstelle breitet sich im *Reaktionsfenster* aus. Der 15-minütige Inkubationsschritt beginnt nach Übertragung der letzten verdünnten Proben-Konjugat-Mischung auf die letzte *Testkarte*.

HINWEIS FÜR PROBEN, DIE NICHT MIGRIEREN:

Gelegentlich migriert eine verdünnte Probe nicht richtig und das Reaktionsfenster wird nicht voll befeuchtet. Wenn das Reaktionsfenster nicht innerhalb von 5 Minuten nach dem Hinzufügen der Probe in die Probenvertiefung vollkommen feucht erscheint, geben Sie 100 µl (4 Tropfen) Verdünnungspuffer in die Probenvertiefung und warten weitere 5 Minuten (insgesamt 20 Minuten lang).

12. Nach der Inkubation geben Sie 300 µl **Waschpuffer** in das **Reaktionsfenster**. Verwenden Sie dazu den geeichten weißen Tropfer (oder Ähnliches). Warten Sie, bis der **Waschpuffer** durch die Membran des **Reaktionsfensters** geflossen und vollständig absorbiert ist.
13. Geben Sie 2 Tropfen **Substrat** (Flasche mit weißem Verschluss) auf das **Reaktionsfenster**. Lesen Sie die Ergebnisse nach 10 Minuten visuell ab, und protokollieren Sie sie.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

1. Die Interpretation des Tests ist am verlässlichsten, wenn die Ergebnisse sofort nach Ende der 10-minütigen Reaktionszeit abgelesen werden. Vor Ablauf dieser Zeit kann ein Test nicht interpretiert werden. Lesen Sie die Testkarte bei normalem Arbeitsabstand und in einer gut beleuchteten Umgebung ab. Folgen Sie einer Sichtlinie direkt über der Testkarte.
2. Prüfen Sie, ob in der Mitte des **Reaktionsfensters** eine blau gepunktete Linie, die sogenannte interne positive Kontrolle, sichtbar ist. Das Auftreten einer gepunkteten Kontrolllinie gilt als gültige interne Kontrolle.
3. Prüfen Sie, ob blaue Linien auf den Seiten „1“- und „2“ des **Reaktionsfensters**, die sogenannten Testlinien, sichtbar sind. Die Farbintensität der Linien kann schwach bis stark sein. Eine deutliche Teillinie gilt als positives Ergebnis. Interpretieren Sie eine Membranverfärbung nicht als positives Ergebnis.
Positives Stx1 („1“) Ergebnis: Die blaue Linie „1“ und die gepunktete blaue Kontrolllinie unter dem „C“ sind sichtbar (Abbildung 1a). Ein positives Ergebnis weist auf Vorhandensein von Stx1 hin.
Positives Stx2 („2“) Ergebnis: Die blaue Linie „2“ und die gepunktete blaue Kontrolllinie unter dem „C“ sind sichtbar (Abbildung 1b). Ein positives Ergebnis weist auf Vorhandensein von Stx2 hin.
Positives Stx1 und Stx2 („1“ und „2“) Ergebnis: Die blaue Linie „1“ und die blaue Linie „2“ sind beide sichtbar ebenso wie die gepunktete blaue Kontrolllinie unter dem „C“ (Abbildung 1c). Ein positives Ergebnis weist auf Vorhandensein von Stx1 und Stx2 hin.
4. **Negatives Ergebnis:** Eine einzelne blaue gepunktete Linie ist in der Mitte des **Reaktionsfensters** unter dem „C“ sichtbar und es sind keine Testlinien auf der Seite „1“- bzw. „2“ des **Reaktionsfensters** sichtbar (Abbildung 1d). Ein negatives Ergebnis auf Seite „1“ zeigt an, dass Stx1 entweder in der Probe nicht vorhanden ist, oder unter der Erkennungsschwelle des Tests liegt. Ein negatives Ergebnis auf Seite „2“ zeigt an, dass Stx2 entweder in der Probe nicht vorhanden ist, oder unter der Erkennungsschwelle des Tests liegt.
5. **Ungültiges Ergebnis:** Im **Reaktionsfenster** sind nach Ablauf der Reaktionszeit keine Linien sichtbar (Abbildung 1e) oder die blau gepunktete Linie unter dem „C“ ist nicht vorhanden (Abbildungen 1f, 1g, 1h).
6. Ein positives Ergebnis beim **SHIGA TOXIN QUIK CHEK™** bestätigt das Vorhandensein von Stx1 und/oder Stx2 in der Probe; ein negatives Ergebnis bedeutet, dass kein Toxin vorhanden ist bzw. die Toxinkonzentration unter der Nachweisgrenze 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.

ABBILDUNG 1: SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ INTERPRETATION VON ERGEBNISSEN



Abbildung 1a
Positives Stx1-ErgebnisAbbildung 1b
Positives Stx2-ErgebnisAbbildung 1c
Positives Stx1-
und Stx2-ErgebnisAbbildung 1d
Negatives ErgebnisAbbildung 1e
Ungültiges ErgebnisAbbildung 1f
Ungültiges ErgebnisAbbildung 1g
Ungültiges ErgebnisAbbildung 1h
Ungültiges Ergebnis

QUALITÄTSKONTROLLE

Intern: Auf jeder *Testkarte* muss nach dem Test eine gepunktete blaue Linie in der Mitte des *Reaktionsfensters* unter dem „C“ sichtbar sein. Die blaue gepunktete Kontrolllinie bestätigt, dass Probe und Reagenzien korrekt zugegeben wurden, die Reagenzien während des Testverlaufs aktiv waren und eine korrekte Probenmigration durch die *Testkarte* stattgefunden hat. Ein farbloser Hintergrund im Ergebnisbereich gilt als interne negative Kontrolle. Bei korrekt durchgeführtem Test und ordnungsgemäßer Funktion der Reagenzien ist der Hintergrund weiß bis hellblau um ein erkennbares Ergebnis zu liefern.

Extern: Die Reaktivität des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Kits muss bei Erhalt anhand der *positiven Kontrolle* und der negativen Kontrolle (*Verdünnungspuffer*) überprüft werden. Die *positive Kontrolle* ist im Kit enthalten (Flasche mit grauem Verschluss). Die *positive Kontrolle* dient zur Überprüfung der Reaktivität der anderen Testreagenzien und ist nicht zur Bestätigung der Verlässlichkeit beim analytischen Test-Cut-off bestimmt. Als negative Kontrolle wird der *Verdünnungspuffer* verwendet. Es können auch weitere Tests mit den Kontrollen durchgeführt werden, um die Anforderungen lokaler, landes- und/oder bundesweiter Vorschriften und/oder von Zertifizierungsbehörden zu erfüllen.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Test wird zum Entdecken von Stx1 und Stx2 in Stuhlproben und in aus Stuhlproben gewonnenen Kulturen benutzt. 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 interpretiert werden.
2. Ein negatives Testergebnis schließt die Möglichkeit eines Vorhandenseins von Shiga-Toxinen in der Probe nicht aus, vielmehr kann es auch sein, dass der Antigenpegel einfach nur unter der Erfassungsschwelle des Tests liegt.
3. Der *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Test ist qualitativ. Die Farbintensität darf nicht quantitativ interpretiert werden.
4. Das von *Shigella dysenteriae* erzeugte Toxin ist nahezu identisch mit dem von *E. coli* erzeugten Stx1 (26). Wenn es in erfassbaren Mengen vorhanden ist, ergibt es auf der Seite „1“ des *Reaktionsfensters* ein positives Ergebnis.

ERWARTUNGSWERTE

Der *SHIGA TOXIN QUIK 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 *E. coli* ist in den USA jährlich die Quelle von schätzungsweise 110.000 Fällen (0,04 % der Bevölkerung) von nahrungsmittelbedingten Erkrankungen (11). Die berichteten Inzidenzraten in zum Test eingesandten Stuhlproben reichen von 0 % - 4,1 % (18) und variieren je nach Jahreszeit, geographischer Herkunft und Patientenpopulation, wobei die Inzidenzraten in den Sommermonaten sowie bei Kindern im Vorschulalter und

bei älteren Personen höher sind (27). Ein positives Ergebnis beim *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* bestätigt das Vorhandensein von Stx1 und/oder Stx2 in der Probe, ein negatives Ergebnis zeigt ein Fehlen des Toxins oder unzureichende Toxinpegel für die Erfassung an.

LEISTUNGSDATEN

Die Leistung des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* wurde an drei unabhängigen Standorten beurteilt. Nachstehend folgt eine Zusammenfassung der Gesamtleistung an den drei Standorten.

Direkter Test von Stuhlproben

Die Leistung des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* (STQC) wurde mit dem Vero Cell Zytotoxizitätstest (mit Neutralisierung) als klinischem Referenzstandard (Goldstandard) anhand von 873 frischen und 14 eingefrorenen Proben verglichen. Daten zu Alter und Geschlecht waren für 878 Patienten verfügbar. Von den 878 Patienten waren 8% im Alter von ≤ 18 Jahren. 59,8% waren weiblich und 40,2% männlich. Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die klinische Leistung des Stx1-Teils und Stx2-Teils des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* an allen 3 Standorten. Nach den Ergebnissen wies der Stx1-Teil eine Sensitivität von 98,0%, eine Spezifität von 99,8%, und eine Gesamtkorrelation von 99,7% mit dem Zytotoxizitätstest auf. Der Stx2-Teil wies eine Sensitivität von 98,0%, eine Spezifität von 100% sowie eine Gesamtkorrelation von 99,9% mit dem Zytotoxizitätstest auf.

Ergebnisse von direktem Test von Stuhlproben

	Vero Cell Zytotoxizitätstest	
n = 887	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	48	2
STQC Stx1 -	1	836

	Vero Cell Zytotoxizitätstest	
n = 887	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	48	0
STQC Stx2 -	1	838

		95%- Konfiden- zintervall
Sensitivität	98,0%	87,8 - 99,9%
Spezifität	99,8%	99,0 - 99,9%
Korrelation	99,7%	99,7 - 99,7%

		95%- Konfiden- zintervall
Sensitivität	98,0%	87,8 - 99,9%
Spezifität	100%	99,4 - 99,9%
Korrelation	99,9%	100 - 100%

Nährmediumkulturen

Die Leistung des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* wurde anhand von über Nacht angesetzten Nährlösungskulturen (GN bzw. MacConkey Nährlösung) aus Stuhlproben mit dem Vero Cell Zytotoxizitätstest (mit Neutralisierung) verglichen. Die folgenden Tabellen geben eine Übersicht über die klinische Leistung des Stx1-Teils und Stx2-Teils des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*. Nach den Ergebnissen wies der Stx1-Teil eine Sensitivität von 100%, eine Spezifität von 99,5%, und eine Gesamtkorrelation von 99,5% mit dem Zytotoxizitätstest auf. Der Stx2-Teil wies eine Sensitivität von 95,7%, eine Spezifität von 99,9% sowie eine Gesamtkorrelation von 99,6% mit dem Zytotoxizitätstest auf.

Ergebnisse von Tests an Nährmedienkulturen

n = 770	Vero Cell Zytotoxizitätstest	
	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	42	4
STQC Stx1 -	0	724

n = 770	Vero Cell Zytotoxizitätstest	
	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	45	1
STQC Stx2 -	2	722

95%- Konfiden- zintervall		
Sensitivität	100%	89,6 - 100%
Spezifität	99,5%	98,5 - 99,8%
Korrelation	99,5%	99,5 - 99,5%

95%- Konfiden- zintervall		
Sensitivität	95,7%	84,3 - 99,3%
Spezifität	99,9%	99,1 - 100%
Korrelation	99,6%	99,6 - 99,6%

REPRODUZIERBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* - Tests wurde anhand von 12 Stuhlproben bestimmt, die zur Verhinderung einer Identifikation während des Tests kodiert wurden. Die Tests wurden in 2 unabhängigen Laboren und im Haus bei TECHLAB, Inc. durchgeführt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen zweimal täglich von mehreren Technikern an jedem Standort unter Verwendung von zwei verschiedenen Kit-Chargen getestet. Mit jeder maskierten Probenreihe wurden eine positive und eine negative Kontrolle mitgetestet. Die Ergebnisse der einzelnen Labore 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.

KREUZREAKTIVITÄT

Der *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Test wurde auf Kreuzreaktivität mit den folgenden Bakterien- und Virenstämmen geprüft. Keiner dieser Stämme zeigte eine Kreuzreaktivität mit dem *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-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> (non-toxicogenic)	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (non-toxicogenic)	<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

STÄMME/SEROTYPEN

Verschiedene Shiga-Toxin erzeugende *E. coli*-Stämme und Serotypen wurden mit dem *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*-Test unter Verwendung der Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)-Platte und dem MacConkey-Nährmedium getestet. Stämme von *Escherichia coli* O157 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. Nachstehend finden Sie eine Liste der getesteten Serotypen, die Anzahl der getesteten Stämme in dieser Gruppe, und den Typ des Toxins, das von jedem Stamm erzeugt wird.

Shiga-Toxin Typ Stx1: Stammtypen - O26:H11 (5 Stämme), O157:H7, O111:NM (2 Stämme), O111a:NM, 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

Shiga-Toxin Typ Stx2: Stammtypen - O26:H11, O157:H7 (4 Stämme), O157:NM, O8:H19 (2 Stämme), O8:H10, ORU:H29, O177:NM, O6:H10, O104:H4 (Europäischer Ausbruchstamm 2011), O121:H19 (3 Stämme), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21

Shiga-Toxin Typ Stx1 und Stx2: Stammtypen - O157:H7 (7 Stämme), O157:NM (2 Stämme), O111:H8, O111, O111:NM, O113:H21

INTERFERIERENDE STOFFE (US-Formulierungen)

Die folgenden Substanzen 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®/Weiterentwicklung (5 % v/v), Stearinsäure/Palmitinsäure (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).

INTRATEST-PRÄZISION

Zum Bestimmen der Intratest-Leistung wurden 6 positive Stuhlproben (zwei auf Stx1 positive, zwei auf Stx2 positive, zwei auf Stx1 und Stx2 positive) und sechs negative Stuhlproben analysiert. Jede Probe wurde auf 5 Testkarten getestet. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen negativ.

INTERTEST-PRÄZISION

Die Intertest-Präzision des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* -Tests wurde anhand von 12 Stuhlproben (sechs negativen, zwei positiven auf Stx1, zwei positiven auf Stx2 und zwei positiven auf Stx1 und Stx2) festgestellt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen zweimal täglich unter Verwendung von 2 verschiedenen Kit-Chargen getestet. Täglich wurden eine positive und eine negative Kontrolle getestet. Alle positiven Proben blieben positiv und alle negativen negativ.

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

Der Cut-off des *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* -Tests wurde bei Konzentrationen von 0,04 ng/ml Stx1 und 0,04 ng/ml Stx2 festgestellt.

SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ - FRANÇAISE

UTILISATION PRÉVUE

SHIGA TOXIN QUIK CHEK™ est un test immunoenzymatique sur membrane rapide pour la détection et la différenciation qualitatives simultanées de la toxine Shiga 1 (Stx1) et de la toxine Shiga 2 (Stx2) dans un seul dispositif de 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 avec des échantillons de selles 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: la loi fédérale américaine limite la vente de ce dispositif aux médecins ou sur prescription médicale.

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, 28). 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 QUIK 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 QUIK CHEK™** a recours à des anticorps spécifiques contre Stx1 et Stx2. Le *Dispositif à membrane* comporte une *Fenêtre de réaction* avec trois bandes verticales d'anticorps immobilisés. La bande de test « 1 » contient des anticorps monoclonaux contre Stx1. La bande de contrôle (« C ») est une bande en pointillés qui contient des anticorps anti-peroxydase de raifort (HRP). La bande de test « 2 » contient des anticorps monoclonaux contre Stx2. Le *Conjugué* est composé d'anticorps contre Stx1 et Stx2 conjugués à la peroxydase de raifort. Pour réaliser le test, l'échantillon est ajouté à un tube contenant un mélange de *Diluant* et de *Conjugué*. Le mélange conjugué-échantillon dilué est placé dans le *Micropuits d'échantillon* et le dispositif est soumis à une période d'incubation de 15 minutes à température ambiante. Pendant l'incubation, les toxines Stx1 et/ou Stx2 présentes dans l'échantillon se lient aux conjugués anticorps-peroxydase. Les complexes toxine-anticorps-peroxydase migrent à travers un filtre vers une membrane où ils sont capturés par les anticorps monoclonaux spécifiques à Stx1 et Stx2 sur les bandes de test. La *Fenêtre de réaction* est ensuite lavée avec un *Tampon de lavage* puis remplie de *Substrat*. Après une période d'incubation de 10 minutes, la *Fenêtre de réaction* est examinée visuellement afin de repérer les éventuelles bandes bleues verticales situées sur les côtés « 1 » et « 2 ». Une bande bleue du côté « 1 » de la *Fenêtre de réaction* correspond à un résultat positif indiquant la présence de Stx1. Une bande

bleue du côté « 2 » de la *Fenêtre de réaction* correspond à un résultat positif indiquant la présence de Stx2. Une réaction positive « C », indiquée par une bande bleue verticale en pointillés, dans la zone de contrôle « C » de la *Fenêtre de réaction*, confirme que le test fonctionne correctement, que la procédure a été respectée et que les résultats sont valides.

MATÉRIEL FOURNI

MEM	DEV	Dispositifs à membranes – un sachet contenant 1 dispositif
DIL	SPE	Diluant (22 ml) – Solution tamponnée et protéinée avec compte-gouttes gradué* H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme
WASH	REAG	Tampon de lavage (12 ml) – Solution tamponnée avec compte-gouttes gradué* H412 : Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme
SUBS	REAG	Substrat (3,5 ml) – Solution contenant du tétraméthylbenzidine
CONJ	ENZ	Conjugué (2,5 ml) – Anticorps spécifiques à Stx1 et Stx2 conjugués à la peroxydase de raifort dans une solution tamponnée et protéinée*
CONTROL	+	Contrôle positif (1 ml) – Antigène dans une solution tamponnée et protéinée*
Pipettes de transfert jetables en plastique – Graduées à 25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl et 500 µl		
IVD	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	

*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



MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Petits tubes à essai (par exemple des tubes en plastique ou en verre Eppendorf)

Écouvillons

Minuterie

Agitateur vortex

Gants jetables pour manipuler les échantillons de selles

Pipeteur et embouts

DURÉE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption du kit est indiquée sur l'étiquette, la validité du kit étant de 24 mois à partir de la date de fabrication. La date d'expiration de chaque composant est indiquée sur chaque étiquette. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2 et 8 °C. Après la première ouverture, le kit et tous ses composants restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée à condition d'être stockés à une température comprise entre 2 et 8 °C. Amener tous les composants à température ambiante avant utilisation. Le kit reste stable à température ambiante pendant 8 heures de service consécutives à condition d'être stocké au réfrigérateur entre les vacations.

PRÉCAUTIONS À PRENDRE

1. Rx Only - Sur ordonnance uniquement
2. Pour une utilisation diagnostique *in vitro*. Uniquement à usage professionnel.
3. Il s'agit d'un test manuel.
4. Contrôler tous les éléments du kit afin de vérifier qu'ils ne présentent aucune 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.
5. Le *Substrat* doit être incolore. S'il prend une couleur bleu foncé / violet, le jeter et appeler les services techniques pour procéder à un remplacement.
6. Les réactifs des différents kits ne doivent pas être mélangés ou échangés. Ne pas utiliser de kit dont la date d'expiration est dépassée.
7. Les capsules, les embouts et les compte-gouttes sont classés par couleur. Ne PAS les mélanger !
8. Placer tous les composants à TEMPÉRATURE AMBIANTE AVANT UTILISATION !
9. Ne pas congeler les réactifs. Le kit doit être conservé à une température comprise entre 2° et 8 °C.
10. Le sachet contenant le *Dispositif à membrane* doit être à température ambiante avant ouverture. Maintenir les dispositifs à membranes au sec avant de les utiliser.
11. Verser les réactifs en tenant les flacons verticalement de façon à instiller une goutte de taille adéquate et des volumes corrects.

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 aliquotes des flacons à réactifs.
13. Les dispositifs à membranes ne peuvent pas être réutilisés.
143. 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.
15. La validité des résultats d'analyse obtenus avec le test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* dépend de la réaction des contrôles interne et externe. Voir la section Contrôle de la qualité.
16. Les échantillons et les dispositifs à membranes usagés doivent être manipulés et jetés de la même façon que des matières présentant un danger biologique. S'équiper de gants jetables pendant le test.
17. 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 ».
18. Les réactifs du *Conjugué*, *Diluant*, *Contrôle positif* et *Tampon de lavage* 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. Respecter les arrêtés locaux, régionaux et nationaux relatifs aux réglementations sur l'élimination des déchets.
20. Signaler tout incident grave à TECHLAB et à l'autorité compétente de l'état membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

PRÉLÈVEMENT, MANIPULATION ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS DE SELLES

Les consignes du CDC relatives aux tests diagnostiques des STEC recommandent d'analyser les échantillons dès que le laboratoire les reçoit.

Types d'échantillons acceptables
Échantillons de selles frais
Échantillons dans un milieu de transport (par ex. Cary Blair, C&S)
Échantillons de selles congelés (congelés non dilués ou dans un milieu de transport)
Cultures sur milieu liquide gram négatif ou MacConkey réalisées à partir 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)

1. **Manipulation des échantillons dans le cadre de l'analyse de selles directe –**
 - a. 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° et 8 °C ou congelés (≤ -10 °C) pendant 14 jours à compter de leur réception.
 - b. Les échantillons en milieu de transport (C&S ou Cary Blair) peuvent être conservés à une température comprise entre 2° et 8 °C ou congelés (≤ -10 °C) pendant 14 jours à compter de leur réception.

2. Manipulation des échantillons dans le cadre de la méthode sur milieu liquide ou sur plaque –

- a. Les échantillons doivent être conservés à une température comprise entre 2° 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 conservés congelés (≤ -10 °C) pendant 14 jours à compter de leur réception.
- b. Les échantillons en le milieu de transport (C&S ou Cary Blair) peuvent être conservés à une température comprise entre 2° et 8 °C pendant 5 jours.
3. Veiller à ce que les échantillons soient bien mélangés avant de réaliser l'essai.
4. Éviter les cycles de congélation/décongélation répétés. En cas d'utilisation d'échantillons congelés, les décongeler à température ambiante.
5. Le stockage des échantillons de selles dans le *Diluant* est déconseillé.
6. Ne pas laisser les échantillons dans le *Diluant/Conjugué* pendant une période supérieure à deux heures.

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).
 - 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 en milieu de transport Cary Blair ou 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° 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 autre échantillon frais 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)

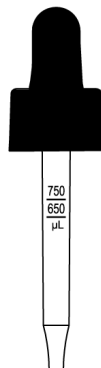
1. Mélanger complètement tous les échantillons indépendamment de leur consistance. Les échantillons doivent tous être parfaitement mis en suspension avant inoculation de la plaque. Utiliser un écouvillon pour l'échantillonnage, puis répartir l'échantillon sur une plaque SMAC, CT-SMAC ou CHROMagar® O157. **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.

- 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** »).
- Passer à la **PROCÉDURE DE TEST**.

PROCÉDURE DE TEST

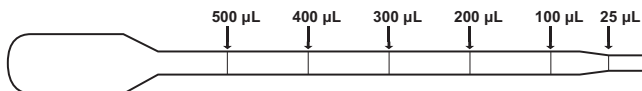
- Placer tous les réactifs et le nombre de dispositifs nécessaires à température ambiante avant de les utiliser.
- Préparer et étiqueter un petit tube à essai pour chaque échantillon et pour chaque contrôle externe facultatif.**
- Ajouter le *Diluant* dans chaque tube à l'aide du compte-gouttes gradué noir.**

Type d'échantillon	Volume de <i>Diluant</i>
Échantillon de selles (sans conservateur) Culture sur plaque Contrôles externes	750 µl (2ème graduation depuis l'extrémité)
Culture sur milieu liquide Échantillon en milieu de transport	650 µl (1ère graduation depuis l'extrémité)



- Ajouter une goutte de *Conjugué* (bouteille à capsule rouge) dans chaque tube.** Vérifier la durée totale de l'analyse si plusieurs échantillons de selles sont testés. Le *Diluant* et le *Conjugué* doivent être ajoutés dans tous les tubes avant les échantillons.
- Prendre une pipette de transfert jetable en plastique (fournie avec le kit) pour chaque échantillon – les pipettes présentent des graduations en relief à 25 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl et 500 µl.

Pipette de transfert graduée :



- 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 - Au moyen d'une pipette de transfert, transférer 25 µl d'échantillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*. Utiliser la même pipette de transfert pour mélanger l'échantillon dilué.

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 2 mm de diamètre environ, équivalent à 25 µl) de l'échantillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*. Émulsionner l'échantillon à l'aide de l'écouvillon.

Cultures sur milieu liquide et échantillons de selles en milieu de transport (Cary Blair ou C&S) – Au moyen d'une pipette de transfert, transférer 100 µl d'échantillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*.

Cultures sur plaque – Balayer une zone de confluence de la plaque plusieurs fois à l'aide d'un écouvillon, puis mélanger cet écouvillon dans le mélange de *Diluant/Conjugué*. Faire pivoter plusieurs fois l'écouvillon contre l'intérieur du tube de test pour libérer l'échantillon de l'écouvillon. **Retirer l'écouvillon, bien mélanger et laisser**

incuber pendant 30 minutes à température ambiante avant de passer à l'étape 8 de la PROCÉDURE DE TEST.

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 mélange dilué, les résultats obtenus peuvent se révéler faussement négatifs. Une trop grande quantité d'échantillon peut donner des résultats nuls à cause du débit limité.

7. **Contrôles externes facultatifs :**

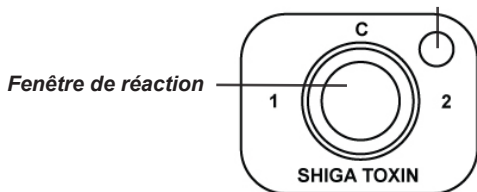
Contrôle positif externe – Ajouter une goutte de *Contrôle positif* (bouteille à capsule grise) dans le tube à essai approprié.

Contrôle négatif externe – Ajouter 25 µl de *Diluant* dans le tube à essai approprié.

8. 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. Dès qu'un échantillon ou un contrôle a été dilué dans le mélange de *Diluant/Conjugué*, il peut être incubé à température ambiante pendant n'importe quelle durée jusqu'à 2 heures avant d'être ajouté au *Dispositif à membrane*.
9. Prendre un *Dispositif à membrane* par échantillon et un contrôle externe positif ou négatif facultatif. Les sachets en aluminium contenant les dispositifs doivent être mis à température ambiante avant ouverture. Étiqueter chaque dispositif correctement et l'orienter sur une surface plane de sorte que la mention « SHIGA TOXIN » se trouve en bas et que le *Micropuits d'échantillon* se trouve dans l'angle supérieur droit du dispositif.

Dispositif à membrane

Micropuits d'échantillon



10. Vérifier que chaque échantillon est complètement mélangé avant de l'ajouter au *Dispositif à membrane*. **À l'aide d'une pipette de transfert neuve, transférer 500 µl de chaque tube dans le Micropuits d'échantillon (petite cavité située dans le coin supérieur droit du dispositif) d'un *Dispositif à membrane*, en veillant à bien expulser l'échantillon liquide sur la garniture perméable située à l'intérieur du *Dispositif à membrane*.** Lors de l'introduction de l'échantillon dans le micropuits, veiller à ce que l'extrémité de la pipette de transfert soit inclinée en direction de la Fenêtre de réaction (grande cavité au centre du dispositif).
11. **Laisser incuber le dispositif à température ambiante pendant 15 minutes** – L'échantillon sera absorbé par le dispositif et une zone humide apparaîtra dans la *Fenêtre de réaction*. L'étape d'incubation de 15 minutes commence dès que le dernier mélange conjugué-échantillon dilué est transféré sur le dernier *Dispositif à membrane*.

NOTE CONCERNANT LES ÉCHANTILLONS NE MIGRANT PAS :

L'échantillon dilué ne parvient pas toujours à migrer correctement ; la Fenêtre de réaction n'est alors que partiellement humidifiée. Si la Fenêtre de réaction ne semble pas complètement humidifiée dans les 5 minutes suivant l'ajout de l'échantillon dans le Micropuits d'échantillon, ajouter 100 µl (4 gouttes) de Diluant dans le Micropuits d'échantillon, puis attendre 5 minutes supplémentaires (soit 20 minutes au total).

12. **Après incubation, ajouter 300 µl de Tampon de lavage à l'aide du compte-gouttes blanc gradué (ou équivalent) dans la Fenêtre de réaction.** Laisser le *Tampon de lavage* pénétrer la *Fenêtre de réaction* et veiller à ce qu'il soit complètement absorbé.
13. **Verser 2 gouttes de Substrat (bouteille à capsule blanche) dans la Fenêtre de réaction.** Lire les résultats observés et les consigner au bout de 10 minutes.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

1. L'interprétation du test est plus fiable lorsque le dispositif est lu immédiatement à la fin de la période de réaction de 10 minutes. Il n'est pas possible d'interpréter un test avant ce délai. Lire le dispositif à une distance normale dans une pièce bien éclairée en regardant directement le dessus du dispositif à la verticale.
2. Observer si une bande bleue en pointillés apparaît au centre de la *Fenêtre de réaction* : il s'agit du contrôle positif interne. L'aspect des bandes de contrôle représente un contrôle interne valide.
3. Observer si des bandes bleues apparaissent des côtés « 1 » et « 2 » de la *Fenêtre de réaction* : ce sont les bandes de test. Les bandes peuvent présenter une couleur claire à foncée. Une bande partielle évidente est interprétée comme une bande valide. La décoloration de la membrane ne peut pas être interprétée comme un résultat positif.
Résultat Stx1 positif (« 1 ») : La bande bleue « 1 » et la bande de contrôle bleue en pointillés sous le « C » doivent être visibles (Figure 1a). Un résultat positif indique la présence de Stx1.
Résultat Stx2 positif (« 2 ») : La bande bleue « 2 » et la bande de contrôle bleue en pointillés sous le « C » doivent être visibles (Figure 1b). Un résultat positif indique la présence de Stx2.
Résultat Stx1 et Stx2 positif (« 1 » et « 2 ») : Les deux bandes bleues « 1 » et « 2 » sont visibles, de même que la bande de contrôle bleue en pointillés sous le « C » (Figure 1c). Un résultat positif indique la présence de Stx1 et de Stx2.
4. **Résultat négatif** : Une seule bande bleue en pointillés est visible au centre de la *Fenêtre de réaction*, sous le « C » et aucune bande de test n'est visible du côté « 1 » ou « 2 » de la *Fenêtre de réaction* (Figure 1d). Un résultat négatif sur « 1 » indique soit l'absence de toxine Stx1 dans l'échantillon, soit que le taux de toxine est inférieur à la limite de détection du test. Un résultat négatif sur « 2 » indique soit l'absence de toxine Stx2 dans l'échantillon, soit que le taux de toxine est inférieur à la limite de détection du test.
5. **Résultat nul** : Aucune bande n'est visible dans la *Fenêtre de réaction* (Figure 1e) ou aucune bande bleue en pointillés n'apparaît sous le « C » à la fin de la période de réaction (Figures 1f, 1g, 1h).
6. Un résultat positif au test **SHIGA TOXIN QUIK CHEK™** confirme la présence de Stx1 et/ou de Stx2 dans l'échantillon, alors qu'un résultat négatif indique l'absence de toxine ou des taux de toxine insuffisants pour être détectés.

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.

FIGURE 1 : INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DU TEST SHIGA TOXIN QUIK CHEK™

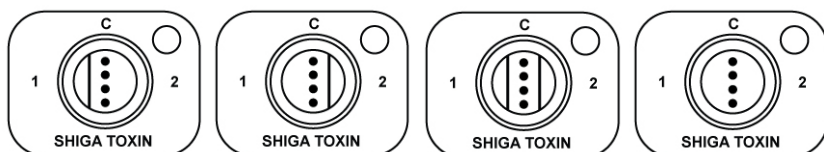


Figure 1a
Résultat Stx1 positif

Figure 1b
Résultat Stx2 positif

Figure 1c
Résultat Stx1 et Stx2
positif

Figure 1d
Résultat négatif



Figure 1e
Résultat nul



Figure 1f
Résultat nul



Figure 1g
Résultat nul



Figure 1h
Résultat nul

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Interne : une bande bleue en pointillés doit être visible au centre de la *Fenêtre de réaction*, sous le « C », pour chaque *Dispositif à membrane* utilisé. L'apparition de la bande bleue en pointillés confirme que l'échantillon et les réactifs ont été correctement ajoutés, que les réactifs étaient actifs au moment de la réalisation de l'essai et que l'échantillon a bien migré via le *Dispositif à membrane*. Un fond clair dans la zone résultat est considéré comme un contrôle interne négatif. Si le test a été réalisé correctement et que les réactifs fonctionnent, le fond est blanc à bleu clair afin de fournir un résultat discernable.

Externe : la réactivité du kit *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* doit être vérifiée dès réception à l'aide du *Contrôle positif* et du contrôle négatif (*Diluant*). Le *Contrôle positif* est fourni avec le kit (bouteille à capsule grise). Le Contrôle positif permet de confirmer la réactivité des autres réactifs associés à l'essai mais il ne permet pas de garantir la précision à la limite de détection de l'essai analytique. Le *Diluant* est utilisé pour le contrôle négatif. Des tests supplémentaires peuvent être réalisés à l'aide des contrôles pour répondre aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales et/ou des organismes d'accréditation.

LIMITES

1. Le test *SHIGA TOXIN QUIK 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.
2. 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.
3. *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* est un test qualitatif. L'intensité de la couleur ne doit pas être interprétée en termes quantitatifs.
4. La toxine produite par *Shigella dysenteriae* est quasiment identique à la toxine Stx1 produite par *E. coli* (26) ; si elle est présente à des taux détectables, elle produit un résultat positif du côté « 1 » de la *Fenêtre de réaction*.

VALEURS ATTENDUES

Le test *SHIGA TOXIN QUIK 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 hématogènes 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'étés, ainsi que chez les enfants en âge préscolaire et les personnes âgées (27). Un résultat positif au test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* confirme la présence de Stx1 et/ou de Stx2 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

Les performances du test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* ont été évaluées sur 3 sites indépendants. Un résumé des performances globales sur les 3 sites est proposé ci-après.

Analyse de selles directe

Les performances du test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* (STQC) ont été comparées au test de la cytotoxine anti-cellules Vero (avec neutralisation), considéré comme la norme de référence clinique (étalon d'or), qui comportait 873 échantillons frais et 14 échantillons congelés. Les données d'âge et de sexe étaient disponibles pour 878 patients. Parmi eux, 8 % avaient 18 ans ou moins, 59,8 % étaient des femmes et 40,2 % étaient des hommes. Les tableaux suivants présentent un résumé des performances cliniques de la partie Stx1 et de la partie Stx2 du test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* sur les 3 sites. Les résultats indiquent que la partie Stx1 a affiché une sensibilité de 98,0 %, une spécificité de 99,8 % et une corrélation totale de 99,7 % avec le test de la cytotoxine. La partie Stx2 a affiché une sensibilité de 98,0 %, une spécificité de 100 % et une corrélation totale de 99,9 % avec le test de la cytotoxine.

Résultats de l'analyse de selles directe

	Test de la cytotoxine anti-cellules Vero	
n = 887	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	48	2
STQC Stx1 -	1	836

	Test de la cytotoxine anti-cellules Vero	
n = 887	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	48	0
STQC Stx2 -	1	838

	Intervalle de Confiance A 95%	
Sensibilité	98,0%	87,8 - 99,9%
Spécificité	99,8%	99,0 - 99,9%
Corrélation	99,7%	99,7 - 99,7%

	Intervalle de Confiance A 95%	
Sensibilité	98,0%	87,8 - 99,9%
Spécificité	100%	99,4 - 99,9%
Corrélation	99,9%	100 - 100%

Cultures sur milieu liquide

La performance du test *SHIGA TOXIN QUIK 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). Les tableaux suivants présentent un résumé de la performance clinique de la partie Stx1 et de la partie Stx2 du test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™*. Les résultats indiquent que la partie Stx1 a affiché une sensibilité de 100 %, une spécificité de 99,5 % et une corrélation totale de 99,5 % avec le test de la cytotoxine. La partie Stx2 a affiché une sensibilité de 95,7 %, une spécificité de 99,9 % et une corrélation totale de 99,6 % avec le test de la cytotoxine.

Résultats d'analyse avec les cultures sur milieu liquide

	Test de la cytotoxine anti-cellules Vero	
n = 770	Stx1 +	Stx1 -
STQC Stx1 +	42	4
STQC Stx1 -	0	724

	Test de la cytotoxine anti-cellules Vero	
n = 770	Stx2 +	Stx2 -
STQC Stx2 +	45	1
STQC Stx2 -	2	722

	Intervalle de Confiance A 95%	
Sensibilité	100%	89,6 - 100%
Spécificité	99,5%	98,5 - 99,8%
Corrélation	99,5%	99,5 - 99,5%

	Intervalle de Confiance A 95%	
Sensibilité	95,7%	84,3 - 99,3%
Spécificité	99,9%	99,1 - 100%
Corrélation	99,6%	99,6 - 99,6%

REPRODUCTIBILITÉ

La reproductibilité du test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* a été déterminée à partir de 12 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.

RÉACTIVITÉ CROISÉE

La réactivité croisée du test *SHIGA TOXIN QUIK 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 QUIK 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 Enterovirus 69 *Feline calicivirus*

Human Coxsackievirus A9, B1
Human rotavirus

SOUCHES/SÉROTYPES

Diverses souches et sérotypes d'*E. coli* producteur de toxine Shiga ont été analysés avec le test *SHIGA TOXIN QUIK CHEK™* selon les méthodes de culture sur plaque Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) et sur milieu liquide MacConkey. Les souches O157 de *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 la présence du gène de la ou des toxines Shiga. Tous les organismes ont généré 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), O111a:NM, 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

Toxine Shiga de type Stx2 : Types de souches - O26:H11, O157:H7 (4 souches), O157:NM, O8:H19 (2 souches), O8:H10, ORU:H29, O177:NM, O6:H10, O104:H4 (Souche à l'origine de l'épidémie qu'a connu l'Europe en 2011), O121:H19 (3 souches), O121, O145:H28, O145, O113:H21, O104:H21, O55:H7, O91:H21

Toxine Shiga de types Stx1 et Stx2 : Types de souches - O157:H7 (7 souches), O157:NM (2 souches), O111:H8, O111, O111:NM, O113:H21

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/palmitique (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 (deux positifs pour Stx1, deux positifs pour Stx2, deux positifs pour Stx1 et Stx2) et six échantillons de selles négatifs ont été analysés. Chaque échantillon a été testé sur 5 cassettes. Tous les échantillons positifs le sont restés, de même que tous les échantillons négatifs sont restés négatifs.

PRÉCISION – INTER-ANALYSE

La précision inter-test du test *SHIGA TOXIN QUIK 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 QUIK CHEK™* a été établi aux concentrations de 0,04 ng/ml pour Stx1 et 0,04 ng/ml pour Stx2.

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. Helgeson, 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. Hrifin, 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.
- 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.
- 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. 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.
27. 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.
28. 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.

	
EN	Device not for self-testing
ES	No destinado para el autodiagnóstico
DE	Produkt nicht zur Eigenanwendung
FR	Dispositif non destiné à l'autodiagnostic

	
EN	Device not for near-patient testing
ES	No destinada para diagnóstico en el lugar de asistencia al paciente
DE	Produkt nicht für patientennahe Tests
FR	Dispositif non destiné au diagnostic près du patient

Technical Support

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

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

© 2026 TECHLAB, Inc. All rights reserved.

SHIGA TOXIN QUIK CHEK, the TECHLAB Logo, and TECHLAB are trademarks of TECHLAB, Inc.

All other trademarks referenced are trademarks of their respective owners.

