CONTROL DE CALIDAD

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

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

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

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

Controles positivos y negativos externos deben ser corridos cada vez que se abre un kit. Pero el número de pruebas adicionales realizadas con los controles externos se establecerán según los requisitos de las reglamentaciones locales, estatales o federales, o de agencias acreditadoras. Los controles externos se utilizan para monitorear la reactividad de los reactivos y el funcionamiento de la prueba. Si no se obtienen los resultados esperados con los controles, esto puede deberse a que uno de los reactivos o componentes ya no es reactivo en el momento de su uso, a que la prueba no se realizó correctamente o a que no se añadieron los reactivos o las muestras. **Si los resultados esperados para el control no son observados, repita las prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-4858 (USA) o su distribuidor local.** El kit no debe usarse si las pruebas de control no producen los resultados correctos.

VALORES ESPERADOS

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO
MÉTODO EN PLACA SM

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

METODO COMPARATIVO (Premier EHEC)			
Método SMAC Agar	Positivo	Negativo	Total
Positivo	46	1*	47
Negativo	0	243	243
Total	46	244	290
			CI
Concordancia Positivo	46/46	100%	92,3% - 100%
Concordancia Negativo	243/244	99,6%	97,7% - 100%
Concordancia General	289/290	99,7%	98,7% - 100%

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

MÉTODO EN CALDO

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

METODO COMPARATIVO (Premier EHEC)			
Método Caldo MacConkey			
ICS EHEC			
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	60	1	61
Negativo	4*	384	388
Total	64	385	449
			CI
Concordancia Positivo	60/64	93,8%	84,8% - 98,3%
Concordancia Negativo	384/385	99,7%	98,6% - 100%
Concordancia General	444/449	98,9%	97,4% - 99,6%

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

METODO COMPARATIVO (Premier EHEC)			
Método Caldo GN			
ICS EHEC			
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	57	1	58
Negativo	7*	380	387
Total	64	381	445
			CI
Concordancia Positivo	57/64	89,1%	78,8% - 95,5%
Concordancia Negativo	380/381	99,7%	98,5% - 100%
Concordancia General	437/445	98,2%	96,5% - 99,2%

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

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

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

SENSIBILIDAD ANALÍTICA
PRUEBA EN AGAR SMAC

El método en agar SMAC detecta toxinas en una unidad formadora de colonias ó 25 ng/mL y 62,5 ng/mL para Shiga Toxinas 1 y 2 no purificadas, respectivamente.

PRUEBA EN CALDO GN o MAC

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

REPRODUCIBILIDAD
PRUEBA EN AGAR SM

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

PRUEBA EN CALDO GN o MAC

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

REACTIVIDAD DE ENSAYO

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

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

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

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

REACTIVIDAD CRUZADA

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

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

PRUEBAS PARA SUSTANCIAS INTERFERENTES (PRUEBAS EN CALDO ÚNICAMENTE)

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

DEUTSCH

ImmunoCard STAT! EHEC

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

REF **751630**

IVD **In-vitro-Diagnostikum**

VERWENDUNGSZWECK

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

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

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

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

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

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

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

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN
Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.
1. Immuno*Card* STAT! EHEC Testvorrichtungen enthalten immobilisierte monoklonale Anti-ST1- und Anti-ST2-Antikörper. Die Vorrichtungen sind einzeln in Folie verpackt, die Trockenmittel enthalten. Bei 2-8 C lagern wenn nicht benutzt.
2. Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle, ein gepuffertes Verdünnungsmittel, das 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Das Reagenz wird in einem Tropferfläschchen aus Kunststoff geliefert. Das Reagenz ist gebrauchsfertig. Bei 2-8 C lagern wenn nicht benutz.
3. Positive Kontrolle, eine Lösung aus formalinbehandelten ST1- und ST2-Toxinen in einem gepufferten Verdünnungsmittel, das 0,094% Natriumazid als Konservierungsmittel enthält. Das Reagenz wird in einem Tropferfläschchen aus Kunststoff geliefert. Das Reagenz ist gebrauchsfertig. Bei 2-8 C lagern wenn nicht benutz.
4. Transferpipetten aus Kunststoff für den Einmalgebrauch mit Messungsabschnitten von 50 µL und 175 µL. .

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN
Alle Methoden:
1. Brutschränke, 35-39 C
2. Vortex-Mixer
3. Zeitgeber
4. Autoklav
5. Einweg-Gummihandschuhe

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

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

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

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

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

HINWEISE ZUR DURCHFÜHRUNG
Nachstehend folgen Abbildungen der Immuno*Card* STAT! EHEC Testvorrichtung und der im Lieferumfang enthaltenen Transferpipette.

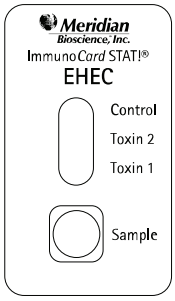
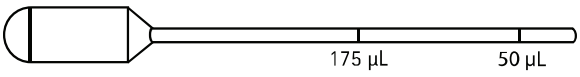


Abbildung der erforderlichen Pipette.



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

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

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

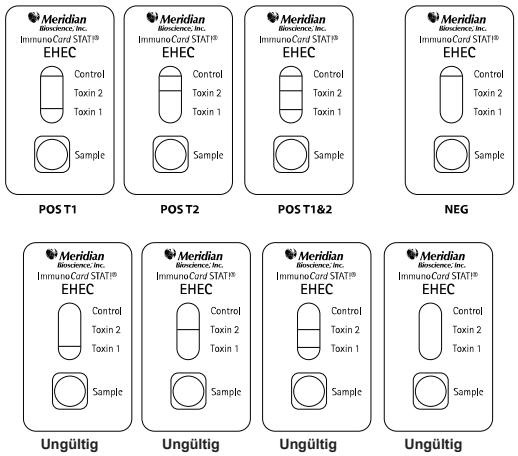
VERFAHREN – SMAC – AGARPLATTENMETHODE
PROBENNAHME – SMAC PLATTENMETHODE
Stuhlproben ohne Konservierungsmittel entnehmen. Proben können bei kontrollierter Raumtemperatur bis zu 4 Stunden vor der Kulturvorbereitung aufbewahrt werden. Stuhlproben, die nicht innerhalb von 4 Stunden kultiviert werden können,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

PROBENVORBEREITUNG / ANREICHERUNG – SMAC PLATTENMETHODE
1. Stuhl ungeachtet der Konsistenz mit einem Applikatorstäbchen gründlich mischen.
2. Mit einem Dacron-Tupfer die Stuhlproben auf die SMAC Agarplatten **ohne** Tellurit oder Cefixim geben. (Hinweis: Tellurit und Cefixim verhindern das Wachstum von nicht O157:H7 *E. Coli* Stämmen).
3. Die beimpfte Platte 18-24 Stunden lang bei 35-39 C inkubieren.
4. Bitte den Test nicht durchführen, wenn die Agarplatte kein Wachstum nach der Inkubationszeit zeigt. Es kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Die Agar-Beimpfung mit der gleichen Probe oder einer neuen Probe des Patienten wiederholen. Alternativ kann die Probe mit Anreicherungsbouillon getestet werden. Bitte benutzen Sie in den folgenden Testschritten die Agar oder Bouillonkulturen die Wachstum aufzeigen.
5. Eine Lösung mit 50 µg/mL Polymyxin B in destilliertem Wasser vorbereiten.
6. 0,5 mL von der 50 µg/mL Polymyxin B Lösung in ein Teströhrchen geben.
7. Mit einem Dacron-Tupfer mehrmals über den konfluenten Wachstumsbereich der Platte streichen, um mukoide Kolonien zu vermeiden. Mukoide Kolonien können die Migration der Probe verhindern.
8. Den Tupfer mit den Kolonien in die Lösung aus destilliertem Wasser/Polymyxin tauchen und mindestens 3 Mal drehen, damit die Organismen freigesetzt werden.
9. Das Gemisch 30 Minuten lang bei 35 C inkubieren.

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

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

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE



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

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

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

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

Ungültige Testergebnisse:

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

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

QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

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

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

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

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

Externe positive und negative Kontrollen sollten bei Öffnung des Kits getestet werden. Allerdings, ist die Anzahl der zusätzlich durchzuführenden Tests mit externen Kontrollen abhängig von den örtlichen, staatlichen oder bundesstaatlichen Bestimmungen sowie zulassungsbehördlichen Auflagen. Die externen Kontrollen werden zur Überwachung der Reagenzreaktivität und der Testleistung eingesetzt. Werden die erwarteten Ergebnisse nicht erzielt, bedeutet dies entweder, dass eines der Reagenzien oder eine der Komponenten zum Zeitpunkt der Verwendung nicht mehr reaktiv war, der Test nicht korrekt durchgeführt wurde oder dass keine Reagenzien oder Proben hinzugefügt wurden. **Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.** Zum Ermitteln der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen.

ERWARTETE WERTE

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

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Es handelt sich um einen qualitativen Test, und es darf bei der Ergebnisfeststellung keine quantitative Auswertung anhand der Intensität der positiven Linie vorgenommen werden.
2. Die Testergebnisse sind in Verbindung mit den verfügbaren Informationen aus der klinischen Untersuchung des Patienten und anderen Diagnostikverfahren heranzuziehen.
3. Wenn beim Hinzufügen von 150 µL Kulturbouillon zu den 5 Tropfen des Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle Fehler begangen wurden (Schritt 7 von Part Probenvorbereitung/ANREICHERUNG Bouillon Methode) kann dies zu falsch negativen Ergebnissen führen. Als eine visuelle Hilfe wäre es hilfreich zu kontrollieren, ob die Bouillonkultur hinzugefügt wurde. Die Seite des Teströhrchens mit einem Strich markieren, um die Volumenoberfläche des Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle zu kennzeichnen. Wenn die Bouillonkultur in das Probenverdünnungspuffer gegeben wird, soll sich der Strich in der Mitte der verdünnten Probe befinden. Die Zugabe von mehr als 5 Tropfen Probenverdünnungspuffer/negative Kontrolle kann auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Eine übermäßige Inkubation kann zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Die Inkubation des Tests bei niedrigeren Temperaturen oder für eine kürzere Zeit kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
5. Die Leistungsmerkmale des Immuno*Card* STAT! EHEC Tests wurden nicht direkt auf Stuhlproben evaluiert. Sie wurden nur auf SMAC Kultur-Platten oder GN und MacConkey Flüssigkulturen bewertet.
6. **HINWEIS: Die Shiga Toxin 1 von *E. coli* und die Toxin von *Shigella dysenteriae* typ 1 Stämmen sind sehr ähnlich. Deshalb kann der Immuno*Card* STAT! EHEC Test ein positives Ergebniss mit *Shigella dysenteriae* typ 1 Toxinen geben. Die zwei Organismen können durch Plattenkultur auf Selektiv-Anreicherungsmedium und mit einer biochemischen Analyse unterschieden werden.**

LEISTUNGSMERKMALE

SMAC PLATTENMETHODE

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

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

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

BOUILLONMETHODE

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

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

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

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

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

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

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

ANALYTISCHE SENSITIVITÄT

SMAC AGARTEST

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

GN oder MAC BOUILLONTEST

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

REPRODUZIERBARKEIT

SMAC AGARTEST

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

GN oder MAC BOUILLONTEST

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

ASSAY-REAKTIVITÄT

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

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

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

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

KREUZREAKTIVITÄT

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

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

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

REFERENCES

1. Karmali MB. Laboratory diagnosis of verotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Newsletter. 1987; 9:65-70.
2. Maniar AC, Williams T, Anand CM, Hammond, GW. Detection of verotoxin in stool specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28:134-135.
3. O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and shiga-like toxins. Microbiol Reviews. 1987; 51:206-219.
4. Griffin PM, Ostroff S, Tauxe R, Green KD, Wells JG, Lewis JH, et al. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. Ann Intern Med. 1988; 109:705-712.
5. Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two year prospective study. J Infec Dis. 1988; 157:1054-1057.
6. Maniar AC, Williams T, Anand CM, Hammond GW. Detection of verotoxin in stool specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28:134-135.
7. Neill MA. *Escherichia coli* O157:H7. A pathogen of no small renown. Infec Dis Newsletter. 1991; 10:19-24.
8. Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Hessesmann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H. J Clin Microbiol. 1993; 31:1200-1205.
9. Mariani-Kurkdijan P, Deamur E, Milan A, Picard B, et. al. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. J Clin Microbiol. 1993; 31:296-301.
10. Kay BA, Griffin PM, Stockbine VA, Wells JG. Too fast food: Bloody diarrhea and death from *Escherichia coli* O157:H7. Clin Microbiol Newsletter. 1994; 16:17-19.
11. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases, *E. coli* O157:H7, What the clinical microbiologist should know. 1994.

SN11169 **REV. 04/15**

Manufactured By

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

EC REP
Authorized Representative

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

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

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

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

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE
You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:
Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL −	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
CE	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünngspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer	1 hour	Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD reservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
Σ	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

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