Key Code TSMX7834A

www.oxoid.com/ifu

Europe +800 135 79 135 US 1 855 2360 190

CA 1 855 805 8539 ROW +31 20 794 7071

ProSpecT Shiga Toxin E.coli (STEC) Microplate Assay

REF R2474048 ..... Σ 48 **EN**

REF R2474096 ..... Σ 96

1. INDIKATIONEN

Der ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay ist für den qualitativen Nachweis von Shigatoxinen (Stx 1 und 2) in wässrigen Extrakten von Stuhlproben und bouillon-angereicherten Stuhlkulturen vorgesehen. Der Assay soll die Diagnose von enterohämorrhagischen E.-coli-Infektionen unterstützen.

2. ZUSAMMENFASSENDE ERKLÄRUNG

Shigatoxin-bildende E. coli (STEC) sind sowohl als Krankheitserreger von Diarrhö bekannt geworden als auch als Verursacher ernsthafter Ausbrüche und sporadischer Fälle von lebensbedrohender hämorrhagischer Kolitis und hämolytisch-urämischen Syndromen [HUS; 2, 3, 13, 14]. Die E.-coli-Stämme, die diese Krankheitsbilder verursachen, sind von Konowalchuk et al. beschrieben worden. Sie isolierten ein Zytotoxin, das einen zytopathischen Effekt auf Verozellen hatte und deshalb Verotoxin (VT) genannt wurde [6, 7, 8]. Es konnte gezeigt werden, dass das Zytotoxin nah verwandt ist mit dem Shigatoxin, das von O'Brien et al. [9] als shiga-ähnliches Toxin (SLT, Shiga-like Toxin) bezeichnet wurde. Zwei Formen des Toxins sind identifiziert worden: Stx 1 und Stx 2 [9]. Wie sich zeigte, produzieren shigatoxin-bildende E.-coli-Isolate entweder eines oder beide der Zytotoxine [15, 16]. E. coli O157:H7 ist der am häufigsten identifizierte EHEC-Serotyp und kann in den meisten klinischen Laboren isoliert und identifiziert werden [1, 10, 12, 14]. Insgesamt wurden mindestens 50 Serotypen von E. coli gefunden, die mit der Produktion von Zytotoxinen und der Entwicklung von HUS und/oder hämorrhagischer Kolitis in Zusammenhang stehen [5, 11]. Karmali [4] beschreibt einen Zytotoxintest zum Nachweis des Toxins, der nicht nur viel Zeit in Anspruch nimmt, sondern auch eine gewisse Erfahrung erfordert, um die Gegenwart des Zytotoxins eindeutig zu bestätigen. Beim ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay handelt es sich um einen Enzym-Immunassay, der den direkten Nachweis der Shigatoxine Stx 1 und 2 in Stuhlproben und angereicherten Stuhlkulturen ermöglicht.

3. VERFAHRENSPRINZIPIEN

Der ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay ist ein Festphasen-Enzym-Immunassay zum Nachweis von Shigatoxinen. Verdünnte Proben werden in abbrechbare Mikrotitervertiefungen gegeben, die mit polyklonalen Anti-Shigatoxinen 1 und 2 von Kaninchen beschichtet sind. Wenn Toxine vorliegen, werden sie vom gebundenen Antikörper erfasst.

Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Das Enzymkonjugat (monoklonale, mit Meerrettichperoxidase markierte Anti-Shigatoxine 1 und 2 von Mäusen) wird zugefügt. Die Vertiefungen werden inkubiert und anschließend gewaschen, um das ungebundene Enzymkonjugat zu entfernen. Bei einer positiven Reaktion wird das Enzymkonjugat durch das Toxin an die Vertiefung gebunden. Das Substrat für das Enzym, TMB, wird hinzugefügt. Bei einer positiven Reaktion konvertiert das durch das Toxin an die Vertiefung gebundene Enzym das Substrat in ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Farbentwicklung kann visuell oder mit einem Spektrophotometer ausgewertet werden. Bei einer negativen Reaktion ist kein oder nicht genügend Toxin vorhanden, um das Enzymkonjugat an die Vertiefung zu binden, und es wird kein farbiges Reaktionsprodukt gebildet.

4. SYMBOLDEFINITIONEN

REF	Katalognummer
IVD	In-vitro-Diagnostikum
i	In der Packungsbeilage (IFU) nachlesen
	Temperatureinschränkungen (Lagertemperatur)
Σ N	Ausreichend für "n" Ansätze
LOT	Chargencode (Lotnummer)
	Verwendbar bis" (Verfallsdatum)
	Hergestellt von

5. REAGENZIEN

Der ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay enthält genügend Reagenzien für die Durchführung von 48 oder 96 Bestimmungen.

Reagenzien	48 / 96 TESTS
Mikrotiterplatte* Beschichtet mit polyklonalen Anti-Shigatoxinen 1 und 2 von Kaninchen	**8 Vertiefungen / Streifen** 6 / 12 Streifen
Enzymkonjugat* Mit Meerrettichperoxidase markierte monoklonale Anti-Shigatoxine 1 und 2 von Mäusen mit 0,01 % Thimerosal	**1 Flasche** 12 / 25 ml
Positivkontrolle E.-coli-Kulturen mit den Shigatoxinen 1 und 2 und Serum von Kälberföten, Kaninchenserum sowie 0,02 % Thimerosal	**1 Flasche** 4 ml
Negativkontrolle Gepufferte Lösung mit Kaninchenserum und 0,02 % Thimerosal	**1 Flasche** 4 ml
Probenverdünnung Gepufferte Lösung mit Kaninchenserum und 0,02 % Thimerosal	**1 Flasche** 110 ml
Waschpuffer 10-fach konzentrierte, gepufferte Lösung mit 0,1 % Thimerosal	**1 Flasche** 110 ml
Farbsubstrat TMB in Puffer	**1 Flasche** 25 ml
Stopplösung 1,0 N Schwefelsäure	**1 Flasche** 6 ml

*Hinweis: Die Reagenzien von Kits verschiedener IVD Chargennummern dürfen nicht gegeneinander vertauscht werden.

6. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

IVD Nur zur In-vitro-Diagnostik

6.1. Mit Ausnahme des konzentrierten Waschpuffers liegen die Reagenzienin der erforderlichen Konzentration vor. Die Reagenzien nur verdünnen, wenn ausdrücklich angewiesen.

6.2. Die Reagenzien nicht nach dem Verfallsdatum verwenden. Die Verfallsdaten sind auf jedem Reagenzetikett aufgedruckt. Die Verwendung von Reagenzien nach dem Verfallsdatum kann die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigen.

6.3. Eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien kann die Testgenauigkeit vermindern. Beim Entfernen aliquoter Teile aus den Reagenzflaschen sterile Einwegpipetten verwenden, um eine mikrobielle Kontaminierung der Reagenzien zu vermeiden.

6.4. Die Reagenzien werden aus Biomaterial hergestellt und müssen als potenziell infektiöses Material behandelt werden. Unter Einhaltung entsprechender Verfahren für infektiöses Material („Biohazard") entsorgen.

6.5. Nicht mit dem Mund pipettieren. Bei der Handhabung von Proben und der Durchführung des Tests Einweghandschuhe und Schutzbrille tragen. Danach die Hände gründlich waschen.

6.6. Die Mikrotiterstreifen im wiederverschließbaren Kunststoffbeutel lagern, um die Mikrotitervertiefungen vor Feuchtigkeit zu schützen.

6.7. Die Proben können potenziell infektiöse Mittel enthalten und müssen unter Einhaltung der Sicherheitsstufe 2 („Biosafety Level 2") entsprechend des CDC/NIH-Handbuchs „Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4th Edition, gehandhabt werden.

6.8. Die Stuhlproben vor der Verarbeitung der Probe gründlich mischen, um die Repräsentativität der Probe sicherzustellen. **DIE PROBEN VOR DEM TEST NICHT KONZENTRIEREN**.

6.9. Das Farbsubstrat ist lichtempfindlich. Wenn das Reagens Licht ausgesetzt wird und Farbe entwickelt, muss es entsorgt werden.

6.10. Bediener, die an Farbenblindheit oder anderen Sehschwächen leiden, können das Testergebnis nicht visuell ablesen und sollten die Messergebnisse mithilfe des Spektrophotometers auswerten.

6.11. Den benutzten Waschpuffer in entsprechenden Behältern für infektiöses Material („Biohazard") entsorgen.

6.12. Der Waschpuffer (0,1 %), die Probenverdünnung (0,02 %), das Enzymkonjugat (0,01 %) sowie die Positiv- und Negativkontrollen (0,02 %) enthalten Thimerosal.

ACHTUNG

H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition
P305+P351 +P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P260	Dampf nicht einatmen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

6.13. Shiga Toxin 1 und das von Shigella dysenteriae Typ I-Stämmen (Shiga-Toxin) produzierte Toxin sind nahezu identisch. Daher kann der ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Mikroplatten-Assay positiv sein, wenn eine feststellbare Menge Shiga-Toxin in der Probe vorhanden ist.

7. VORBEREITUNG VON REAGENZIEN, LAGERUNG UND HANDHABUNG

Vor der Verwendung alle Reagenzien auf Zimmertemperatur (20 -25 °C) bringen und vorsichtig mischen. Die Reagenzien nach der Verwendung wieder kühl stellen.

Mit Ausnahme des Waschpuffers werden die Reagenzien gebrauchsfertig in Tropfflaschen geliefert. Die Reagenzien können direkt von den Flaschen getropft oder zum Pipettieren mit einer Mehrkanal-Pipette in ein Gefäß gegossen werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz muss entsorgt werden. Zuviel ausgeschüttetes Reagenz nicht wieder in die Flasche füllen.

10-fach konzentrierten Waschpuffer auf eine einfache Konzentration verdünnen; hierzu ein Teil Konzentrat zu 9 Teilen destilliertes oder deionisiertes Wasser hinzufügen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Lagerung bei 2 bis 8 ºC einen Monat stabil.

Das Verfallsdatum jedes Kits befindet sich auf dem Verpackungsetikett. Alle Komponenten bei 2 bis 8 °C lagern. Die unbenutzten Mikrotiterstreifen müssen im Kunststoffbeutel, der Trockenmittel enthält, gelagert werden, um sie vor Feuchtigkeit zu schützen. Das Farbsubstrat in der lichtgeschützten Flasche, in der es geliefert wird, aufbewahren und daraus entnehmen. Wenn aus einem beliebigen Grund ein aliquoter Teil aus der Flasche entnommen wird, das unbenutzte Farbsubstrat nicht wieder in die Flasche füllen.

8. ENTNEHMEN DER STUHLPROBEN

Frische Proben (oder Proben in Cary-Blair-Transportmedium) sollten sofort nach der Entnahme bei 2 - 8 °C gelagert oder bei höchstens -20°C eingefroren werden. Proben, die für Kulturen verwendet werden sollen, ein bis zwei Stunden nach dem Eintreffen im Labor in Bouillon geben. Wenn die Proben nicht innerhalb von ein bis zwei Stunden kultiviert werden können, die frischen bzw. in Cary-Blair-Transportmedium konservierten Proben bei höchstens -20 °C einfrieren. Bei der direkten Bestimmung von Stuhlproben werden optimale Ergebnisse erzielt, wenn die Proben unmittelbar nach dem Eintreffen im Labor analysiert werden. Wenn die frischen Proben innerhalb von 48 Stunden bzw. in Cary-Blair-Transportmedium konservierte Proben innerhalb von 7 Tagen nach der Entnahme getestet werden können, ist deren Lagerung bei 2 bis 8 °C möglich. Ansonsten müssen sie bei höchstens -20 °C eingefroren werden. Ein wiederholtes Auftauen kann zur Zersetzung des Toxins führen. Mit Probenverdünnung verdünnte Proben können bei 2 - 8 °C für bis zu 48 Stunden bis zur Bestimmung aufbewahrt werdeng.

9. HINWEISE ZUM VERFAHREN

- Alle beiliegenden Anleitungen sorgfältig durchlesen und befolgen.
- Alle Reagenzien und verdünnten Proben vor der Verwendung auf Zimmertemperatur (20 bis 25 °C) bringen.
- Reagenzien während des gesamten Verfahrens in der gleichen Reihenfolge in die Testvertiefungen pipettieren. Die Flüssigkeit in den Vertiefungen nicht mit dem Flaschenhals berühren, um eine Kontaminierung zu vermeiden.
- Die Warezeiten genau beachten. Nach dem Hinzufügen des Reagens in die letzte Vertiefung auf jeder zu testenden Mikrotiterplatte die Zeitmessung starten. Nie mehr als drei Platten mit 96 Vertiefungen gleichzeitig bearbeiten, um eine genaue Zeitmessung zu gewährleisten. Abweichungen von diesem Testverfahren können die Testergebnisse beeinträchtigen.

10. TESTVERFAHREN

Benötigte, mitgelieferte Materialien:
Reagenzien
Pipetten
Halterung und Abdeckung für
Farbreaktion-Kurzanleitung Mikrotiterstreifen
Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien:
Behälter für Stuhlproben
Stoppuhr mit Minutenmessung
Waschflasche für Waschpuffer
Destilliertes oder deionisiertes Wasser
Optionale, nicht mitgelieferte Materialien:
Mikrotiterplatten-Reader für 450 nm oder 450/630 nm
Abstrichtupfer mit Baumwoll- oder Viskosespitze
Mikropipette für Volumen bis zu 200 µl
Einwegröhrchen (Kunststoff oder Glas)
Vortex-Mixer mit Plattenaufsatz oder Schüttler
zusätzlich 110mL Waschpuffer REF R2450002
zusätzlich 1L Waschpuffer REF R24500011

11. SPEPROBENVORBEREITUNG FÜR DEN ASSAY

A DIREKTE STUHLBESTIMMUNG

11.A.1. 0,6 ml Probenverdünnung in ein sauberes Röhrchen (12 x 75 mm) geben.

11.A.2. Stuhlprobe so gründlich wie möglich vermischen und wie folgt verdünnen:

11.A.2. A. Flüssiger oder halbflüssiger Stuhl: Mit einer Pipette 0,3 ml (dritte Markierung von der Spitze der bereitgestellten Pipette) hinzugeben. Stuhl gründlich mit dem Probenverdünnung vermischen und Pipette im Röhrchen belassen.

11.A.2.B. Fester Stuhl: Mit einem Abstrichtupfer 0,3 g (ein ungefähr 6 mm dickes Stück) hinzugeben. Den Stuhl in der Probenverdünnung zu einer Emulsion verrühren und eine Pipette in das Röhrchen geben.

11.A.2.C. Stuhl in Cary-Blair-Transportmedium ohne weitere Verdünnung direkt in die Mikrotitervertiefung geben.

11.A.2.D.Stuhlsuspension mit einem Vortex-Mixer mischen.

B BOUILLONVERFAHREN

11.B.1 Fünf (5) ml TSB (Tryptic Soy Broth), mTSB (modified Tryptic Soy Broth) oder MacConkey-Bouillon mit 50 µl oder 50 µg (ein erbsengroßes Stück) des frischen oder in Cary-Blair-Transportmedium vorliegenden Stuhls beimpfen.

11.B.2 Bei 37 °C für 18 bis 24 Stunden bebrüten.

11.B.3 0,6 ml Probenverdünnung in ein sauberes Röhrchen (12 x 75 mm) geben.

11.B.4 Mit einer Pipette 0,3 ml Bouillonkultur in 0,6 ml Probenverdünnung geben. Pipette im Röhrchen belassen.

12. TESTVERFAHREN

12.1. Kunststoffbeutel öffnen, die erforderliche Anzahl Mikrotiterstreifen herausnehmen und in eine Halterung für Mikrotiterstreifen geben. Eine Vertiefung für die Negativkontrolle und eine Vertiefung für die Positivkontrolle verwenden. Wenn weniger als 8 Vertiefungen verwendet werden, die erforderliche Anzahl Vertiefungen von den Streifen abbrechen. **DIE NICHT VERWENDETEN MIKROTITERVERTIEFUNGEN WIEDER IN DEN BEUTEL LEGEN UND DIESEN FEST VERSCHLIESSEN, DAMIT KEINE FEUCHTIGKEIT EINDRINGEN KANN.**

12.2. **4 Tropfen** (200 µl) der Negativkontrolle in die erste Vertiefung geben. **4 Tropfen** (200 µl) der Positivkontrolle in eine zweite Vertiefung geben.

12.3. Mit einer Pipette pro Vertiefung **4 Tropfen** (200 µl) der verdünnten oder unverdünnten Probe in Cary-Blair-Transportmedium hinzugeben.

Hinweis: Die Öffnung der Pipette etwas in die Vertiefungen halten, um Spritzer in die angrenzenden Vertiefungen zu vermeiden.

12.4. Die Mikrotiterplatte abdecken und bei Zimmertemperatur für **60 Minuten** bebrüten. Die Zeitmessung nach der Zugabe der letzten Probe starten.

12.5. Den Inhalt der Vertiefungen ausschütten oder absaugen. Waschen, indem jede Vertiefung vollständig mit verdünntem Waschpuffer (350 bis 400 µl/Vertiefung) gefüllt wird. Nach jedem Waschen die gesamte Flüssigkeit aus den Vertiefungen ausschütten oder absaugen. Insgesamt 3- mal waschen. Nach dem letzten Waschen den Inhalt ausschütten und Platte auf sauberen Papiertüchern ausklopfen oder absaugen. Soviel Waschpuffer wie möglich entfernen; die Vertiefungen dürfen jedoch niemals vollkommen trocken sein.

12.6. **4 Tropfen** (200 µl) Enzymkonjugat in jede Vertiefung geben.

12.7. Die Mikrotiterplatte abdecken und bei Zimmertemperatur für **30 Minuten** bebrüten.

12.8. Jede Vertiefung wie in Schritt 5 **5-mal** ausschütten bzw. absaugen und waschen.

12.9. **4 Tropfen** (200 µl) Farbsubstrat in jede Vertiefung geben.

12.10. Die Mikrotiterplatte abdecken und bei Zimmertemperatur für 10 Minuten bebrüten.

12.11. **1 Tropfen** (50 µl) Stopplösung in jede Vertiefung geben. Die Vertiefungen vorsichtig schütteln oder darauf klopfen, bis sich die gelbe Farbe gleichmäßig verteilt hat. Die Reaktionen innerhalb von **10 Minuten** nach dem Hinzufügen der Stopplösung ablesen.

12.12. Reaktionen visuell oder bei 450 nm, 450/630-650 nm am Spektrophotometer ablesen.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Die Positiv- und Negativkontrollen bei jedem Testdurchlauf durchführen. Sie dienen sowohl für die Reagenzien als auch das Verfahren als Kontrolle. Die Kontrollen sollen die Reagenzien auf eindeutige Fehler hin überwachen. Die Positivkontrolle ist nicht in der Lage, ausreichende Präzision am Cut-Off-Wert des Assays zu gewährleisten.

Die optische Dichte (OD) der Negativkontrolle sollte bei der Messung an einer Wellenlänge <0,100 bzw. an zwei Wellenlängen < 0,070 betragen; beim visuellen Ablesen sollte die Negativkontrolle farblos sein.Wenn in der Negativkontrolle eine gelbe Farbe vorhanden ist, die 1+ oder höher auf der Kurzanleitung entspricht, den Test unter genauer Einhaltung des Waschverfahrens wiederholen.

Die optische Dichte der Positivkontrolle sollte sowohl an einer als auch an zwei Wellenlängen >0,500 sein; beim visuellen Ablesen sollte die Intensität größer oder gleich der 2+-Reaktion sein. Wenn die gelbe Farbe in der Positivkontrolle geringer als 2+ der Kurzanleitung ist, technische Unterstützung hinzuziehen.

14. ERGEBNISSE

Für die Farbauswertung siehe beigefügte Kurzanleitung

Visuell:

14.1. Die Testergebnisse durch Vergleichen mit den Reaktionsfarben der Kurzanleitung ablesen.

Positiv: gelbe Farbe mit einer Intensität von mindestens 1+

Negativ: farblos

Unbestimmt: schwach gelb, weniger als 1+

14.2. Auswertung der visuellen Ergebnisse:

Positiv: Wenn sich eine gelbe Färbung mit einer Intensität von mindestens 1+ in der Testvertiefung bildet, enthält die Probe entweder Stx 1, Stx 2 oder beide Toxine, und der Test ist positiv.

Negativ: Eine farblose Reaktion ist ein negatives Ergebnis und bedeutet, dass kein bzw. eine nicht nachweisbare Menge an Stx 1 oder Stx 2 in der getesteten Probe vorhanden ist.

Unbestimmt: Bildet sich eine schwache gelbe Färbung aus, die unterhalbder 1+-Reaktion liegt, liegt ein unbestimmter Testausgang vor. Unbestimmte Tests sollten wiederholt werden. Führt die Wiederholung des Tests zu einem positiven Ergebnis, wird die Probe als positiv gewertet. Ist die Wiederholung des Tests jedoch negativ, wird die Probe als negativ gewertet. Ist ein wiederholter Test weiterhin unbestimmt, sollte eine andere Probe genommen und der Test wiederholt werden.

Spektrophotometer:

14.3. Das Ergebnis an einer (450 nm) oder zwei (450/630-650 nm Wellenlängen ablesen.

14.4. Die Testergebnisse ablesen:

14.4.A. Eine Wellenlänge

Positiv: O.D. > 0.150
Negativ: O.D. <0.100
Unbestimmt: O.D. 0.100-0.150.

14.4.B. Zwei Wellenlängen

Positiv: O.D. >0.100
Negativ: O.D. <0.070
Unbestimmt: O.D. 0.070-0.100

14.5. Auswertung der spektrophotometrischen Ergebnisse:

Positiv: Eine optische Dichte über 0,150 (eine Wellenlänge) bzw. 0,100 (zwei Wellenlängen) stellt ein positives Testergebnis dar und bedeutet, dass Stx 1 und/oder Stx 2 in der Probe vorliegt.

Negativ: Eine optische Dichte unter 0,100 (eine Wellenlänge) oder 0,070 (zwei Wellenlängen) stellt ein negatives Ergebnis dar und bedeutet, dass kein bzw. eine nicht nachweisbare Menge an Stx 1, Stx 2 oder beiden Toxinen in der getesteten Probe vorliegt.

Unbestimmt: Optische Dichten von 0,100-0,150 (eine Wellenlänge) bzw. 0,070- 0,100 (zwei Wellenlängen) stellen ein unbestimmtes Ergebnis dar. Unbestimmte Tests sollten wiederholt werden. Führt die Wiederholung des Tests zu einem positiven Ergebnis, wird die Probe als positiv gewertet. Ist die Wiederholung des Tests jedoch negativ, wird die Probe als negativ gewertet. Ist ein wiederholter Test weiterhin unbestimmt, sollte eine andere Probe genommen und der Test wiederholt werden.

Hinweis: Alle Vertiefungen, die transparent erscheinen, aber eine optische Dichte haben, die mit der visuellen Auswertung nicht übereinstimmt, sollten auf Blasen oder kleine Partikel untersucht werden. Um diese zu entfernen, den Boden der Vertiefungen abwischen und die optische Dichte erneut ablesen. Wenn die Diskrepanz zwischen der visuellen Auswertung und der spektrophotometrischen Bestimmung der optischen Dichte fortbesteht, den Test wiederholen.

15. EINSCHRÄNKUNGEN:

15.1. Die Zuverlässigkeit der Testergebnisse des ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay hängt davon ab, ob die Kontrollreaktionen erwartungsgemäß ablaufen. Siehe Abschnitt „Qualitätskontrolle".

15.2. Ein negatives Testergebnis schließt nicht gänzlich aus, dass Shigatoxine vorhanden sind. Dieser Fall kann eintreten, wenn die Antigenkonzentration in der Probe unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt. Eine Korrelation zwischen der Antigenmenge in einer Probe und der klinischen Form konnte nicht nachgewiesen werden.

15.3. Die korrekte Durchführung der Entnahme und Verarbeitung der Stuhlprobe ist für die optimale Leistungsfähigkeit des Tests von größter Bedeutung. Optimale Testergebnisse werden mit Stuhlproben erzielt, die möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Siehe „Entnehmen der Stuhlproben"..

15.4. Die korrekte Durchführung der Entnahme und Verarbeitung der Stuhlprobe ist für die optimale Leistungsfähigkeit des Tests von größter Bedeutung. Optimale Testergebnisse werden mit Stuhlproben erzielt, die möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Siehe „Entnehmen der Stuhlproben".

Der ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay wurde alssehr komplex klassifiziert.

16. ZU ERWARTENDE WERTE

Mindestens 50 verschiedene Serotypen von shigatoxin-bildendem E. coli (STEC) sind mit der Produktion von Zytotoxinen und als Verursacher von lebensbedrohender hämorrhagischer Kolitis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) — einer schweren Komplikation, die zu Nierenversagen, Thrombozytopenie und Anämie führen kann — in Verbindung gebracht worden. Kleinkinder unterliegen zwar einem besonders hohen Risiko, infolge einer shigatoxin-bildenden E.-coli-Infektion an HUS zu erkranken, aber bestimmte andere Gruppen wie z. B. ältere Menschen und Personen mit Immunschwäche, sind ebenfalls nicht gegen STEC-Infektionen gefeit.

Wie die Ergebnisse der klinischen Studien verdeutlichen, die mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay durchgeführt wurden, lag in den untersuchten Personengruppen eine Reihe unterschiedlicher Serotypen vor. Die Untersuchungen auf STECInfektionen sollten nicht auf Tests beschränkt werden, die ausschließlich für O157:H7 spezifisch sind. Es sollte berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse von direkten und bouillon-

angereicherten Tests nicht immer miteinander korrelieren. Als mögliche Gründe hierfür kommt Folgendes in Betracht:

16.4.A. Das Toxin liegt zwar in einer nachweisbaren Konzentration im Stuhl vor, aber die STEC-Zellen verfügen nicht über eine ausreichende Lebensfähigkeit zum Züchten von Kulturen;

16.4.B. Die isolierten E.-coli-O157-Stämme von Stuhlkulturen sind umgekehrt proportional zum Zeitraum zwischen dem Einsetzen der Diarrhö und der Erstellung der mikrobiologischen Kultur [17];

16.4.C. Das Toxin liegt im Stuhl in einer Konzentration vor, die mit dem Assay nicht nachweisbar ist, aber die STEC Zellen sind dennoch lebensfähig genug, um Kulturen zu züchten;

16.4.D. Eine antimikrobielle Therapie hat einen Einfluss darauf, inwieweit die STEC Zellen zum Züchten von Kulturen geeignet sind.

17. LEISTUNGSMERKMALE

Sensitivität und Spezifität:

Der ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay wurde an drei klinischen Instituten in den USA, in Kanada und Deutschland untersucht. Zu den beteiligten Zentren gehörten ein städtisches Krankenhaus in Virginia, USA, ein Kinderkrankenhaus in Toronto, Kanada, und ein großes mikrobiologisches Institut in Deutschland. Die Proben wurden von symptomatischen Patienten normaler adulter und pädiatrischer Prävalenzgruppen genommen.

Die Proben lagen im nicht konservierten Zustand vor und wurden als frische Proben und übernacht angereicherte Kulturen mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay getestet. Darüber hinaus wurden alle Proben mit einem Zytotoxintest (CTA) auf Shigatoxine untersucht. Positiv auf Shigatoxin getestete Proben wurden isoliert und gemäß Serotyp klassifiziert (siehe Tabelle 3). An allen positiven und unbestimmten Proben wurde ein auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhender Test, der ausschließlich für Forschungszwecke geeignet ist, zum Nachweis von Shigatoxin-Genen durchgeführt.

Die Ergebnisse sind für die verschiedenen Zentren in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst. Das direkte Testverfahren umfasste 20 positive Proben (EIA-positiv, CTA-positiv, PCR-positiv). Darüber hinaus gab es 3 Proben, die EIA-negativ, CTA-positiv und PCR-positiv waren. Fünf Proben waren EIA-positiv, CTA-negativ und PCR-negativ. Alle unbestimmten Ergebnisse wurden schließlich als richtig negative Proben bereinigt. 354 Proben fielen mit beiden Verfahren negativ aus (EIA-negativ und CTA-negativ). Die Gesamtleistungsdaten der anfänglichen und der bereinigten Ergebnisse mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay sind unten in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Direkte Bestimmung von Stuhlproben mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay und einem Zytotoxintest

Direkte Bestimmung der Proben

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Zentrum 1	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	12	2	0	+	12	2	0
-	1	156	4	-	1	161	0
Unbest.	0	0	1	Unbest.	0	0	0
Proben insgesamt:	176				176		
Sensitivität:	92.3%				92.3%		
Spezifität:	98.7%				98.7%		

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Zentrum 2	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	8	3	0	+	8	3	0
-	2	186	6	-	2	193	0
Unbest.	0	0	1	Unbest.	0	0	0
Proben insgesamt:	206				206		
Sensitivität:	80.0%				80.30%		
Spezifität:	98.4%				98.5%		

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Gesamt	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	20	5	0	+	20	5	0
-	3	342	10	-	3	354	0
Unbest.	0	1	1	Unbest	0	0	0
Proben insgesamt:	382				382		
Sensitivität:	87.0% (66.4-97.2)				87.0% (66.4-97.2)		
Spezifität:	98.6% (96.7-99.5)				98.6% (96.6-99.5)		
Korrelation:	95.0% (92.3-97.0)				97.9% (95.9-99.1)		

Die in Klammen angegebenen Zahlen tellen die Ergebnisse für ein Konfidenzintervall von 95 % dar.

*In den bereinigten Tabellen sind die Ergebnisse der wiederholten EIATests von denjenigen Proben aufgeführt, die anfangs unbestimmt waren.

Wie die Daten in Tabelle 1 verdeutlichen, gibt es bei der direkten Bestimmung der Proben zwischen dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay und dem Zytotoxintest der bereinigten Daten eine Korrelation von 97,9 %, wenn die Ergebnisse beider Zentren zusammengeführt werden (insgesamt).

Beim Verfahren der angereicherten Kulturen gab es 63 positive Proben (EIA-positiv, CTA-positiv und PCR-positiv). Darüber hinaus gab es 3 Proben, die EIA-negativ, CTA-positiv und PCR-negativ waren. Bei der Wiederholung der CTA-Tests konnten 2 der 3 Proben als richtig negative Ergebnisse bereinigt werden. Zehn Proben waren EIA-positiv, CTA-negativ und PCRnegativ. Alle unbestimmten Ergebnisse wurden nach der Wiederholung der Tests schließlich als richtig negative Proben bereinigt. 771 Proben fielen mit beiden Verfahren negativ aus (EIA-negativ und CTA-negativ). Die Gesamtleistungsdaten der anfänglichen und der bereinigten Ergebnisse mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay sind unten in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Bestimmung von Proben nach Anreicherung mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay und einem Zytotoxintest.

In Bouillon angereicherte Kulturen

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Zentrum 1	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	12	1	0	+	12	1	0
-	0	160	3	-	0	163	0
Unbest.	0	0	0	Unbest	0	0	0
Proben insgesamt:	176				176		
Sensitivität:	100%				100%		
Spezifität:	99.4%				99.4%		

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Zentrum 2	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	9	0	0	+	9	0	0
-	1	192	4	-	1	196	0
Unbest	0	0	0	Unbest	0	0	0
Proben insgesamt:	206				206		
Sensitivität:	90.0%				90.0%		
Spezifität:	100%				100%		

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Zentrum 3	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	42	9	0	+	42	9	0
-	2**	410	0	-	0	412	0
Unbest.	0	0	0	Unbest	0	0	0
Proben insgesamt:	463				463		
Sensitivität:	100%				100%		
Spezifität:	97.9%				97.9%		

	Anfangsergebnisse				Bereinigte Ergebnisse*		
ProSpecT	Zytotoxintest			ProSpecT	Zytotoxintest		
Gesamt	+	-	Unbest.		+	-	Unbest.
+	63	10	0	+	63	10	0
-	3	762	7	-	1	771	0
Unbest.	0	0	0	Unbest.	0	0	0
Proben insgesamt:	845				845		
Sensitivität:	95.5% (87.3-99.1)				98.4% (91.6-100)		
Spezifität:	98.7% (97.6-99.4)				98.7% (97.7-99.4)		
Korrelation:	97.6% (96.4-98.5)				98.7% (97.7-99.3)		

Die in Klammern angegebenen Zahlen stellen die Ergebnisse für ein Konfidenzintervall von 95 % dar.

*In den bereinigten Tabellen sind die Ergebnisse der wiederholten EIA Tests von denjenigen Proben aufgeführt, die anfangs unbestimmt waren.

** In Zentrum 3 waren anfangs 2 falsch positive CTA-Ergebnisse, die bei der Wiederholung des CTA-Tests negativ ausfielen.

Wie die Daten in Tabelle 2 verdeutlichen, gibt es beim Verfahren der angereicherten Kulturen zwischen dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay und dem Zytotoxintest der bereinigten Daten eine Korrelation von 98,7 %, wenn die Ergebnisse aller Zentren zusammengeführt werden (Insgesamt).

Verschiedene Serotypen von shigatoxin-bildenden E.-coli-Stämmen wurden mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay gestestet und entweder bei der direkten Bestimmung der Proben oder beim Verfahren der angereicherten Kulturen als reaktiv befunden. Die getesteten Serotypen, die Anzahl der serotyp-spezifischen Proben und der Typ des produzierten Toxins sind, soweit bekannt, in der folgenden Tabelle nach Stamm aufgeführt.

Tabelle 3. Anzahl der verschiedenen Serotypen shigatoxin-bildender E.-coli-Stämme, die von positiven Proben isoliert wurden.

Serotyp	Anzahl der isolierten Stämme					
Serotypen	Stx1	Stx2	Stx1&2	Stx2c	Unbekannt	Gesamt
O8:H9		1				1
O26:H11	7	2	1		3	13
O30		1				1
O88:H5		1				1
O91	2	1				3
O103:H2	1					1
O111:NM	2	1				3
O118	2					2
O128	2					2
O145	1	1				2
O153:H2	1	1				2
O157:H7		7	9	2		18
O166	1					1
Toxintypen gesamt	19	16	10	2	3	50

Tabelle 4. Positive Tests auf Shigatoxin nach Beschaffenheit der Stuhlprobe

Beschaffenheit des Stuhls

	Wässrig	Weich	Schleimig	Wässrig/ Schleimig	Weich/ Schleimig	Blutig
Anzahl Stuhl	119	134	41	17	50	30
Shigatoxin +	8	5	5	0	2	7
zytotoxin +	10	5	5	1	3	7

Analytische Sensitivität: Mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay können ungefähr 52 pg/ml von Stx 1 und 126 pg/ml von Stx 2 nachgewiesen werden.

Reproduzierbarkeit: Der Inter-Assay-Variationskoeffizient (VK) des ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay wurde ermittelt, indem eine negative und drei positive Proben mit unterschiedlichen optischen Dichten ausgewählt wurden. Jede Probe wurde in drei aufeinanderfolgenden Durchläufen in 24 Vertiefungen pro Durchlauf getestet. Der durchschnittliche Inter-Assay-Variationskoeffizient betrug 8,69 %.

Probe	Durchschnittliche OD	Standardabweichung	VK%
1	0.065	0.0101	15.61
2	0.264	0.0176	6.67
3	0.675	0.0270	4.00
4	0.830	0.0703	8.48

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient wurde bestimmt, indem 4 Proben inje 24 Vertiefungen getestet wurden. Der durchschnittliche Intra-Assay-Variationskoeffizient betrug 4,59 %.

Probe	Durchschnittliche OD	Standardabweichung	VK%
1	0.069	0.0055	8.01
2	0.274	0.0134	4.90
3	0.563	0.1490	2.65
4	1.226	0.0340	2.78

Kreuzreaktivität: Beim Testen von einer Reihe von Organismen der humanen Darmmikroflora mit dem ProSpecT Shiga Toxin E. coli (STEC) Microplate Assay trat keine Kreuzreaktivität auf. Bei diesen Tests wurden negative und positive Shigatoxin-Stuhlproben mit den unten aufgeführten Organismen beimpft. Die Impfung der Stuhlproben mit den Bakterien wurde bei Konzentrationen >1 x 107 CFU/ml Stuhl durchgeführt.

Pathogene E.-coli-Stämme, die kein Shigatoxin bilden, wurden ebenfalls mit dem ProSpecT Assay getestet und als negativ befunden.

Campylobacter jejuni ATCC 29428
Klebsielia pneumoniae ATCC 27736
Citrobacter braaki ATCC 43162
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Enterobacter cloacae ATCC 13047
Proteus vulgarus ATCC 33420
Enterococcus faecalis ATCC 49149
Salmonella typhimurium SA972229
Escherichia coli, VT negative, ATCC 25922
Serratia liquefacians ATCC 27592
Escherichia coli, EPEC, ATCC 12014 (O55:NM)
Shigella dysenteriae ATCC 49347
Escherichia coli, EPEC, ATCC 33780 (O111:NM)
Shigella flexneri ATCC 25929
Escherichia coli, ETEC/ EPEC, ATCC 43887 (O111:NM)
Shigella sonnei ATCC 25931
Escherichia coli, EIEC, ATCC 43893 (O124:NM)
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Escherichia coli ATCC 33660
Yersinia enterocolitica ATCC 2371516

18. LITERATURVERWEISE

18.1. Johnson, W.M., H. Lior, and G.S. Bezanson, 1983. “Cytotoxic Escherichia coli O157:H7 Associated with Haemorrhagic Colitis in Canada.“ Lancet pp. 76.

18.2. Karmali, M.A., B.T. Steele, M. Petric, and C. Lim, 1983. “Sporadic Cases of Haemolytic Uremic Syndrome Associated with Faecal Cytotoxin and Cytotoxin-Producing Escherichia coli.” Lancet pp.619-620.

18.3. Karmali, M.A., M. Petric, C. Lim, P.C. Fleming, G.S. Arbus, and H. Lior, 1985. “The Association Between Haemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin-Producing Escherichia coli.” J. Infect. Dis. 151(5): 775-782.

18.4. Karmali, M.B., 1987. “Laboratory Diagnosis of Verotoxin-Producing Escherichia coli Infections.” Clin. Microbiol. Newsletter. 9(9): 65-70.

18.5. Kleanthous, H., H.R. Smith, S. M. Scotland, R.J. Gross, B. Rowe, C. M. Taylor, and D.V. Milford. 1990. “Haemolytic uraemic syndrome in the British Isles, 1985-8: association with Verocytotoxin producing Escherichia coli. Part 2. Micriobiological aspects.” Am. J. Dis. Child. 65:722-727.

18.6. Konowalchuk, J., I. Speirs, and S. Stavric. 1977. “Vero Response to a Cytotoxin of Escherichia coli.” Infect. Immun. 18(3): 775-779.

18.7. Konowalchuk, J., N. Dickie, S. Stavric, and J.I. Speirs. 1978, “Properties of an Escherichia coli Cytotoxin.” Infect. Immun. 20: 575-577.

18.8. Konowalchuk, J., N. Dickie, S. Stavric, and J.I. Speirs, 1978. “Comparative Studies of Five Heat-labile Toxic Products of Escherichia coli.” Infect. Immun. 22:644-648.

18.9. O’Brien, A.D., G.D. LaVeck, M.R. Thompson, and S.B. Formal, 1982. “Production of Shigella dysenteriae type 1-like Cytotoxin by Escherichia coli.” J. Infect. Dis. 144(6):763-769.

18.10. O’Brien, A.D., T.A. Lively, M.E. Chen, S.W. Rothman, and S.B. Formal, 1983. “Escherichia coli O157:H7 Strains Associated with Haemorrhagic Colitis in the United States Produce a Shigella dysenteriae I (Shiga)-like Cytotoxin.” Lancet pp.702.

18.11. O’Brien, A.D. and R.K. Holmes. 1987. “Shiga and Shiga-like Toxins.” Microbiol. Rev. 51(2): 206-220.

18.12. Pai, C.H., R. Gordon, H.Y. Sims, and L.E. Bryan, 1984. “Sporadic Cases of Haemorrhagic Colitis Associated with Escherichia coli O157:H7.” Ann. Intern. Med. 101: 738;-742.

18.13. Pai, C. H., N. Ahmed, H. Lior, W.M, Johnson, H.V. Sims, and D.E. Woods, 1988. “Epidemiology of Sporadic Diarrhoea Due to Verocytotoxin-Producing Escherichia coli; A Two-year Prospective Study.” J. Infect. Dis. 157(5):1054-1057.

18.14. Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, B.R. Davis, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, P.A. Blake, and M.L. Cohen, 1983. “Haemorrhagic Colitis Associated with a Rare Escherichia coli Serotype.” N. Engl. J. Med. 308(12): 681-685.

18.15. Scotland, S.M., H.R. Smith, and B. Rowe, 1985. “Two Distinct Toxins Active on Vero Cells from Escherichia coli O157.” Lancet. pp.885-886.

18.16. Strockbine, N., L. Marques, J. Newland, H. Williams Smith, R.K. Holmes, and A.D. O’Brien, 1986. “Two Toxin-Producing Phages from Escherichia coli O157:H7 Strain 933 Encode Antigenically Distinct Toxins with Similar Biologic Activities.” Infect. Immun. 53(1):135-140.

18.17. Karch, H., et al., 1996. “Isolation of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157 Strains from Patients with Hemolytic-Uremic Syndrome by Using Immunomagnetic Separation, DNA-Based Methods, and Direct Culture.“ JCM, March 1996, 34(3):516-519.

CE

IFU X7834A, überarbeitet Dezember 2015

Remel Europe Ltd
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an Ihren Händler