CERTEST *E. coli* O157+VT1+VT2

ONE STEP
E. coli O157+VT1+VT2 COMBO CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.

CERTEST *E. coli* O157+VT1+VT2

One Step test to detect Escherichia coli O157, VT1 and VT2 of EHEC in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Escherichia coli O157, VT1 y VT2 de EHEC en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Escherichia coli* O157:H7 and Verotoxins 1 and 2 (VT1 and VT2) produced by *E. coli* in stool samples and *E. coli* suspected colonies in stool culture.

CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infection.

INTRODUCTION

Infection with *Escherichia coli* O157:H7 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) presents with a wide spectrum of clinical manifestations, including asymptomatic carriage, nonbloody diarrhoea, haemorrhagic colitis, the haemolytic-uremic syndrome (HUS), and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Not only *is Escherichia coli* O157:H7 an important agent for haemorrhagic colitis, it is also one of the leading causes of bacterial diarrhoea.

Transmission of *Escherichia coli* (EHEC) is primarily food-borne. Undercooked meat is the most common culprit, dairy products and secondary person-to-person spread is also important. The organism produces at least two Verotoxins (Shiga-like toxins). Verotoxins can be classified into two main categories: Verotoxin 1 (VT1) and Verotoxin 2 (VT2). EHEC strains may produce VT1 or VT2 only or both VT1 and VT2 simultaneously. These toxins are thought to have direct pathogenic significance in *Escherichia coli* O157:H7 infection. This infection is usually diagnosed from a positive stool culture, from the presence of Shiga-like toxins, or both. Timely collection (within 7 days of illness onset) of a stool sample for culture is imperative for a high recovery rate.

EHEC are also known as Shiga toxin–producing *E. coli* (STEC) or Verotoxin-producing *E. coli*. Many different STEC serotypes have been isolated from human cases of HC and HUS. O157:H7 is epidemiologically the most frequent serotype; however the improvement of microbiological detection methods has reported an increasing frequency of other serotypes such as O145:H2, O111:H2, O26:H11, O103:H2, and O121:H19. Regardless of serotype, VT1 and VT2 are uniformly expressed by virtually all human STEC. This universal expression of these toxins, in addition to their important role in the life-threatening complications of STEC infections, makes these antigens attractive immunoprophylactic targets.

TEST PRINCIPLE

CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Escherichia coli* O157:H7, VT1 and VT2 produced by *E. coli* in stool samples and *E. coli* suspected colonies in stool culture.

Strip A consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against *Escherichia coli* O157:H7 and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-*Escherichia coli* O157:H7) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip B consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against VT1 and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-VT1) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

Strip C consists of a nitrocellulose membrane pre-coated with mouse monoclonal antibodies on the test line (T), in the results window, against VT2 and with rabbit polyclonal antibodies, on the control line (C), against a specific protein. The label/sample absorbent pad is sprayed with test label solution (mouse monoclonal antibodies anti-VT2) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming two coloured conjugate complexes.

If the sample is *Escherichia coli* O157:H7 positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Escherichia coli* O157:H7 monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, if the sample is VT1 positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-VT1 monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip B and if the sample is VT2 positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-VT2 monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip C, which were previously pre-dried on the absorbent pad. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the binding conjugate complexes migrate. The anti-*Escherichia coli* O157:H7 antibodies present on the membrane of strip A (test line), the anti-VT1 antibodies present on the membrane of strip B (test line) and the anti-VT2 antibodies present on the membrane of strip C (test line) capture the coloured conjugate and the red lines will be visible in the strips. These bands are used to interpret the result.

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

If the sample is negative, there is no *Escherichia coli* O157:H7, VT1 and VT2 presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit value, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*Escherichia coli* O157:H7, anti-VT1 and anti-VT2 antibodies present on the membranes (test lines) will not capture the antigen-red-coloured conjugate complex (not formed), for which the red lines will not appear.

Whether the sample is positive or not, in the three strips, the mixture continues to move across the membranes to the immobilized specific antibodies placed in the control lines. The anti-specific protein antibodies present on three membranes will capture control green-conjugate complex and three control lines will always appear. The presence of these green lines serve as: 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30ºC. The test is stable until the expiration date marked on its sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

- For professional *in vitro* diagnostic use.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent. A new test must be used for each sample to avoid contamination errors.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.
- Reagents contain preservatives. Avoid any contact with skin or mucous membrane. Consult safety data sheet, available on request.
- Components provide in the kit are approved for use in the CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card test. Do not use any other commercial kit component.
- Follow Good Laboratory Practices, wear protective clothing, use disposal gloves, goggles and mask. Do not eat, drink or smoke in the working area.

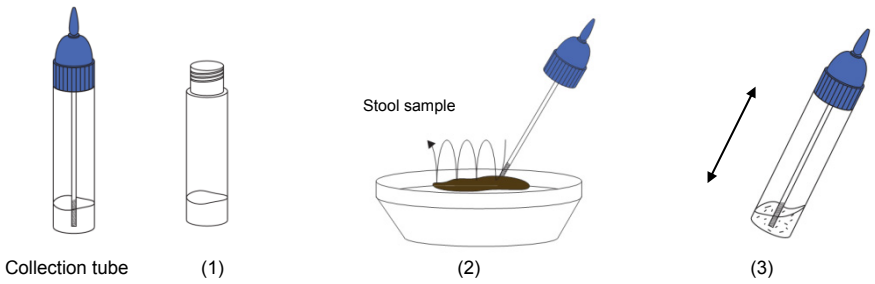
SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples

Stool samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8ºC) for 24 hours prior to testing. For longer storage, maximum 2 weeks, the specimen must be kept frozen at -20ºC. In this case, the sample will be totally thawed and brought to room temperature before testing. Ensure only the amount needed is thawed because of freezing and defrosting cycles are not recommended. Homogenise stool samples as thoroughly as possible prior to preparation.

Specimen preparation (see illustration):

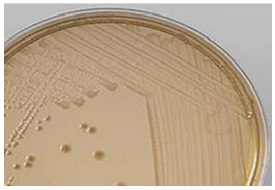
1. Take out the cap of the collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2), to collect faecal sample (approx. 125mg) and add it to the collection tube. For liquid samples, add approx. 125µL in the collection tube using a micropipette.
2. Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

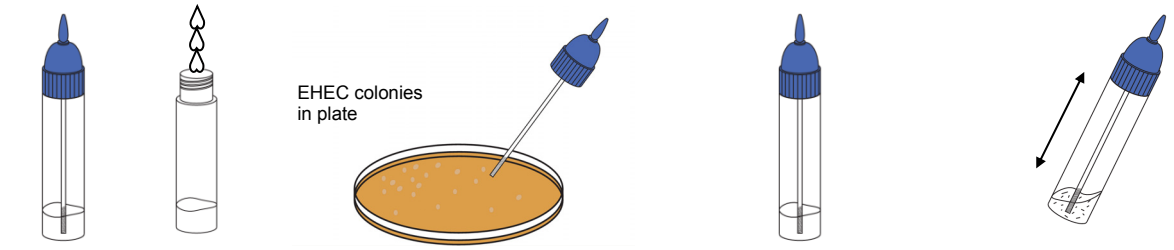
Suspected EHEC colonies in stool culture

The Sorbitol MacConkey Agar (SMACA) without tellurite or cefixime is the method of choice for the isolation of EHEC (aerobic atmosphere, 24 hours/37ºC). After 24 hours of incubation in Sorbitol MacConkey the EHEC colonies will be appear.



E. coli O157:H7 *colonies in SMACA*

1. Take out the cap of the collection tube and add 50µg of Polymixin B (1).
2. Examine Sorbitol MacConkey plates after 1 day incubation. Select EHEC typical colonies. Use the stick or an inoculating needle to pick up 3 or 4 suspected EHEC colonies (2) and add them to the collection tube. Incubate for 30min/35ºC (3).
3. Close the tube with the diluent and suspected colonies. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (4).



Collection tube (1) (2) (3) 30min/35ºC (4)

MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card tests
- Instructions for use
- Collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

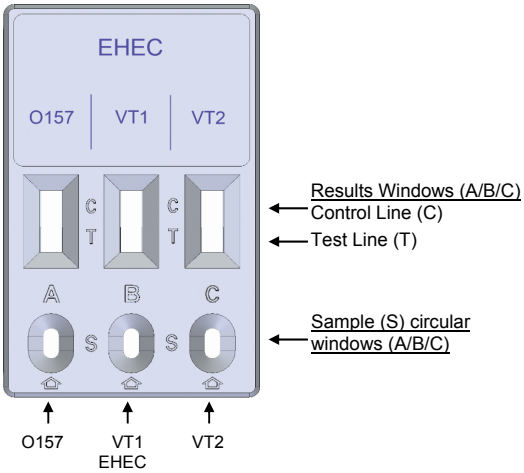
- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer
- SMAC agar
- Polymixin B

TEST PROCEDURE

Allow tests, samples and controls to reach room temperature (15-30ºC) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card test from its sealed bag just before using it.
3. Take the stool collection tube, cut the end of the cap (4) and dispense 4 drops in the circular window marked with the letter A (5), 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6), and 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter C (7). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes**. Do not read the test result later than 10 minutes.

If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn´t work, dispense a drop of extraction diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.



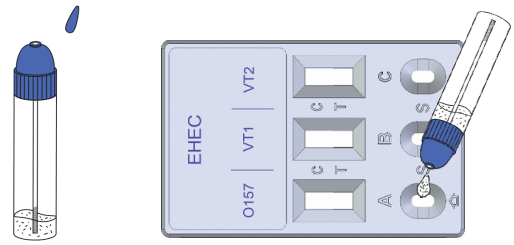
CerTest BIOTEC S.L. Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1, 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN) www.certest.es

CERTEST *E. coli* O157+VT1+VT2

One Step test to detect Escherichia coli O157, VT1 and VT2 of EHEC in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Escherichia coli O157, VT1 y VT2 de EHEC en formato cassette

O157 Strip A-procedure

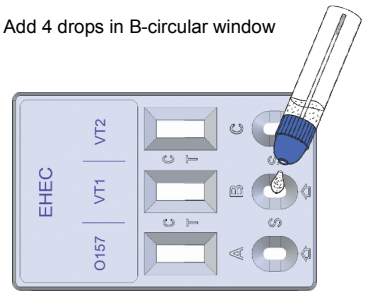
Add 4 drops in A-circular window



(4) (5)

VT1 Strip B-procedure

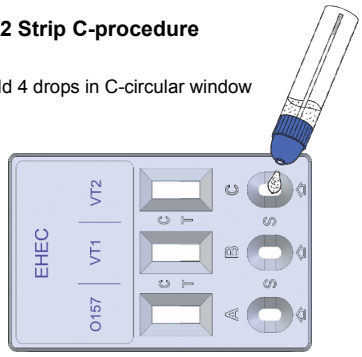
Add 4 drops in B-circular window



(6)

VT2 Strip C-procedure

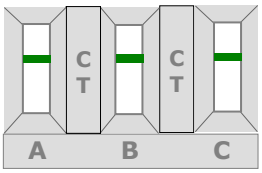
Add 4 drops in C-circular window



(7)

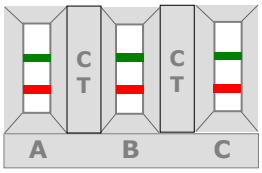
INTERPRETATION OF THE RESULTS (please refer to the illustration below)

1.



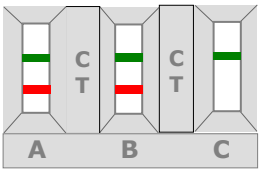
A: Green→Negative *E. coli* O157:H7
B: Green→Negative VT1
C: Green→Negative VT2

2.



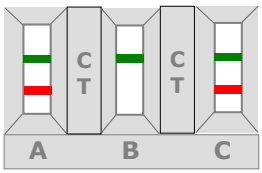
A: Green/Red→Positive *E. coli* O157:H7
B: Green/Red→Positive VT1
C: Green/Red→Positive VT2

3.



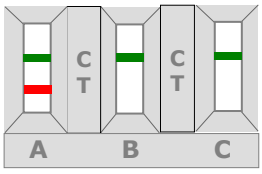
A: Green/Red→Positive *E. coli* O157:H7
B: Green/Red→Positive VT1
C: Green→Negative VT2

4.



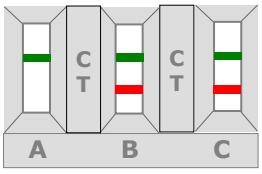
A: Green/Red→ Positive *E. coli* O157:H7
B: Green→Negative VT1
C: Green/Red → Positive VT2

5.



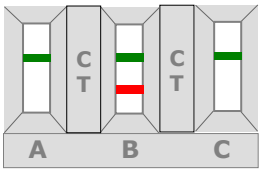
A: Green/Red→ Positive *E. coli* O157:H7
B: Green→Negative VT1
C: Green→Negative VT2

6.



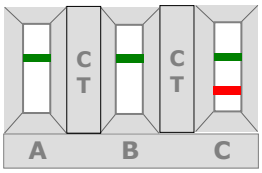
A: Green→Negative *E. coli* O157:H7
B: Green/Red→Positive VT1
C: Green/Red→Positive VT2

7.



A: Green→ Negative *E. coli* O157:H7
B: Green/Red→ Positive VT1
C: Green→Negative VT2

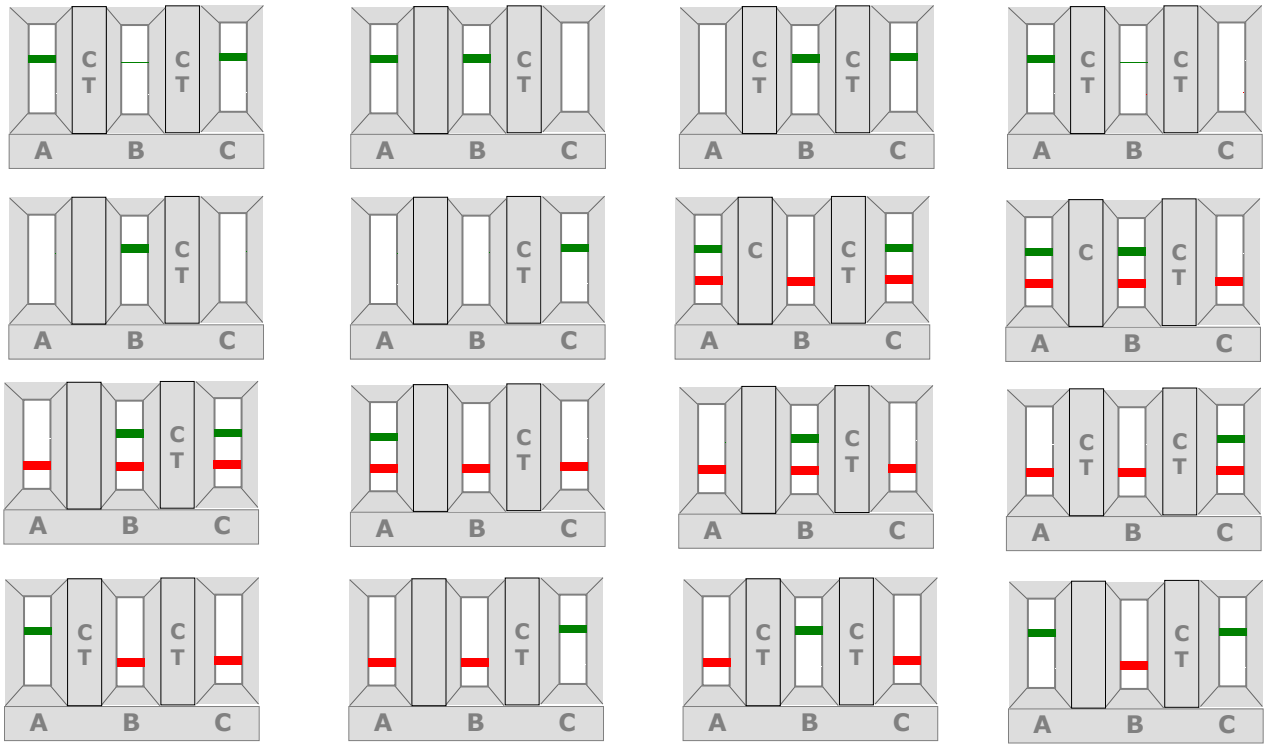
8.



A: Green→ Negative *E. coli* O157:H7
B: Green→ Negative VT1
C: Green/Red→ Positive VT2

INVALID RESULTS

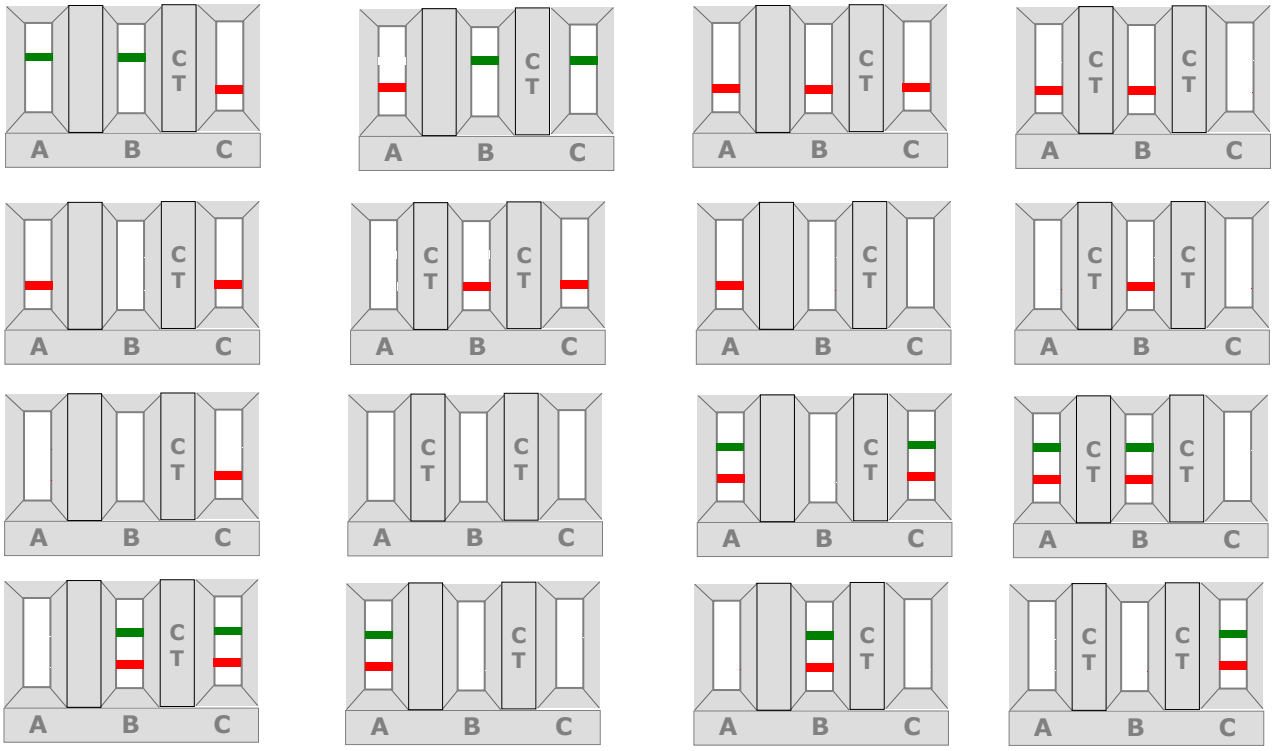
9.



CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

CERTEST *E. coli* O157+VT1+VT2

One Step test to detect Escherichia coli O157, VT1 and VT2 of EHEC in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Escherichia coli O157, VT1 y VT2 de EHEC en formato cassette



	A (*E. coli* O157)	B (VT1)	C (VT2)	Interpretation of the results
1.	-	-	-	There are no *Escherichia coli* O157:H7, VT1 or VT2 presence. No infection caused by EHEC.
	GREEN	GREEN	GREEN	
2.	+	+	+	There are *Escherichia coli* O157:H7, VT1 and VT2 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN-RED	
3.	+	+	-	There is *Escherichia coli* O157:H7 and VT1 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN-RED	GREEN-RED	GREEN	
4.	+	-	+	There is *Escherichia coli* O157:H7 and VT2 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN-RED	GREEN	GREEN-RED	
5.	+	-	-	There is *Escherichia coli* O157:H7 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN-RED	GREEN	GREEN	
6.	-	+	+	There is VT1 and VT2 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN	GREEN-RED	GREEN-RED	
7.	-	+	-	There is VT1 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN	GREEN-RED	GREEN	
8.	-	-	+	There is VT2 presence. Infection caused by EHEC.
	GREEN	GREEN	GREEN-RED	
9.	Any other result			Invalid result either A, B or C, we recommend repeating the assay using the same sample with another test.

INVALID: Total absence of any control coloured line (GREEN) regardless the appearance or not of the test lines (RED). Insufficient specimen volume, incorrect procedural techniques or deterioration of the reagents are mostly the main reasons for control lines failure. Review the procedure and repeat the assay with a new test. If the symptoms or situation still persist, discontinue using the test kit and contact your local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured bands in the test lines (T) in the results windows will vary depending on the concentration of antigens present in the specimen. However, neither the quantitative value nor the rate of increase in antigens can be determined by this qualitative test.

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

QUALITY CONTROL

Internal procedural controls are included in the test. The green lines appearing in the control lines (C) in the results windows are internal controls, which confirm sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours after opening the sealed bag.
2. Only fresh or fresh-frozen unpreserved and unfixed stool samples can be tested.
3. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
4. The intensity of test line may vary from very strong at high antigens concentration to faint when the antigens concentration is close to the detection limit value of the test.
5. After one week of infection, the number of bacteria in faeces is decreasing, making the sample less reactive. Stool samples should be collected within one week of the onset of symptoms
6. CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 should be used only with samples from human faeces. The use of other samples has not been established. The quality of the test depends on the quality of the sample; proper faecal specimens must be obtained.
7. Positive results determine the presence of *Escherichia coli* O157:H7, VT1 and VT2 of EHEC (including non-O157 STEC) in faecal samples, nevertheless, a positive result should be followed up with additional laboratory techniques (biochemical methods or by PCR) to confirm the results and the strain. A confirmed infection should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated and must be based in the correlation of the results with further clinical observations.
8. A negative result is not meaningful because of it is possible the antigens concentration in the stool samples is lower than the detection limit value. If the symptoms or situation still persist, EHEC determination should be carried out on a sample from an enrichment culture.
9. Verotoxin 1 (Shiga-like toxin 1) produced by EHEC is very similar to one produced by *Shigella dysenteriae* type 1 (Shiga toxin). Verotoxin 1 differs from true Shiga toxin by one to seven aminoacids differences. CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 may give a positive result with Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. EHEC and *Shigella dysenteriae* type 1 determination should be carried out on selective culture and with biochemical analysis.

EXPECTED VALUES

Escherichia coli O157:H7 causes 73,000 illnesses in the United States annually. That means 8,598 cases, 17% require hospitalizations, 4% hemolytic uremic syndrome cases and 0.5% deaths. The main transmissions routes are: 52% foodborne, 21% unknown, 14% person to person, 31% waterborne, 3% animal contact and 0.3% laboratory related.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with faecal samples, was performed using an immunochromatographic test (CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2, CerTest) and these results were confirmed using culture (positive results). The results were as follows:

		Culture		
		+	-	Total
IC test: CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 (*E. coli* O157:H7)	+	5	0	5
	-	0	60	60
	Total	5	60	65

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 (*E. coli* O157:H7) vs culture	**>99%**	**>99%**	**>99%**	**>99%**

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

An evaluation, with faecal samples, was performed using an immunochromatographic test (CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2, CerTest) and these results were compared with a commercial available test (Shiga Toxin Quik Chek, TechLab®) for Verotoxins 1 and 2. The results were as follows:

		Shiga Toxin Quik Chek, TechLab®		
		+	-	Total
CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 (VT1 and VT2)	+	4	0	4
	-	0	30	30
	Total	4	30	34

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 vs Shiga Toxin Quik Chek	**>99%**	**>99%**	**>99%**	**>99%**

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Escherichia coli* O157:H7 and Verotoxins 1 and 2 of *Escherichia coli* using CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens occasionally present in faeces:

Campylobacter coli	*Listeria monocytogenes*	*Shigella flexneri*
Campylobacter jejuni	*Salmonella enteritidis*	*Shigella sonnei*
Clostridium difficile	*Salmonella paratyphi*	*Staphylococcus aureus*
E. coli O157:H7 (Strip B and C)	*Salmonella typhi*	Verotoxin 1 EHEC *(Strip A and C)*
E. coli O26	*Salmonella typhimurium*	Verotoxin 2 EHEC *(Strip A and B)*
E. coli O111	*Shigella boydii*	*Yersinia enterocolitica*
Helicobacter pylori	*Shigella dysenteriae*	

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

ESPAÑOL

USO PREVISTO

CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Escherichia coli* O157:H7 y Verotoxinas 1 y 2 (VT1 y VT2*)* producidas por *E. coli* en muestras de heces y de colonias sospechosas de *E. coli* en coprocultivo.

CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección causada por *E: coli* entorohemorrágica (EHEC).

INTRODUCCIÓN

La infección por *Escherichia coli* O157:H7 (*Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)) se presenta mediante diferentes manifestaciones clínicas, incluyendo una forma asintomática, diarrea no sangrienta, colitis enterohemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopenica trombótica (PTT). *Escherichia coli* O157:H7 es también una de las causas más frecuente de diarreas de origen bacteriano.

Escherichia coli (EHEC) principalmente se transmite a través de los alimentos. La carne poco cocinada y los productos lácteos son la forma de transmisión más común y aunque también se transmite por el contacto entre personas. Esta bacteria produce al menos dos toxinas llamadas Verotoxinas (Shiga-like toxins). Estas Verotoxinas pueden clasificarse en dos categorías principales: Verotoxina 1 (VT1) y Verotoxina 2 (VT2). Cepas de EHEC pueden producir únicamente VT1 o VT2 o ambas simultáneamente VT1 y VT2. Estas toxinas están directamente relacionadas con la patogenia en la infección por *Escherichia coli* O157:H7. Esta infección se diagnostica a partir de un cultivo positivo de heces o por detección de la presencia de toxinas, o por ambas técnicas. A partir de los primeros síntomas y durante los 7 días siguientes se encuentra la mayor tasa de este agente en las heces, utilizándose entonces para realizar el cultivo de las mismas.

EHEC también es conocida como *E. coli* productoras de Shiga-toxinas (STEC) o *E. coli* productoras de Verotoxinas. Se han aislado diferentes serotipos STEC en humanos asociados a cuadros de HC y HUS. O157:H7 es epidemiológicamente hablando el serotipo más frecuente, sin embargo, tras la mejora en los métodos de detección microbiológica se ha registrado un aumento de detección de otros serotipos como por ejemplo, O145:H2, O111:H2, O26:H11, O103:H2, and O121:H19. Independientemente del serotipo, VT1 y VT2 se expresan en todos los STEC humanos. Esta expresión universal de las toxinas, además de su importante papel en las complicaciones con riesgo para la vida de las infecciones de STEC, hace de éstos antígenos un objetivo inmunoprofiláctico.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección cualitativa de *Escherichia coli* O157:H7, VT1 y VT2 en muestras de heces y de colonias sospechosas de *E. coli* en coprocultivo.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Escherichia coli* O157:H7 en la línea de test (T), en la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Escherichia coli* O157:H7) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira B consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a VT1 en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente *a VT1)* conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Tira C consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a VT2 en la línea de test (T), de la ventana de resultados, y en la línea de control (C), con anticuerpos policlonales de conejo frente a una proteína específica. En el material absorbente para la muestra se ha dispensado una preparación de reactivos de la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a VT2) conjugada con látex de poliestireno rojo y otra preparación para la línea de control (proteína específica de unión) conjugada con látex de poliestireno verde, formando dos complejos coloreados conjugados.

Si la muestra es *Escherichia coli* O157:H7 positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Escherichia coli* O157:H7-microesferas rojas de látex) en la tira A, si la muestra es VT1 positiva, los antígenos de la muestra diluida de heces reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-VT1-microesferas rojas de látex) en la tira B, y si la muestra es VT2 positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-VT2 -microesferas rojas de látex) en la tira C, los cuales fueron secados previamente en el material absorbente. Esta mezcla avanza por capilaridad a través de la membrana. Conforme la muestra va migrando también lo hacen los complejos conjugados.

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

Los anticuerpos anti-*Escherichia coli* O157:H7 presentes en la membrana de la tira A (línea de test), los anticuerpos anti-VT1 presentes en la membrana de la tira B (línea de test) y los anticuerpos anti-VT2 presentes en la membrana de la tira C (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en las tres tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7, ni de VT1 ni de VT2 o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se produce reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*Escherichia coli* O157:H7, anti-VT1 y anti-VT2 presentes en las membranas (líneas de test) no capturarán el antígeno-complejo coloreado rojo (no formado) y no aparecerán las líneas rojas.

Independientemente de que la muestra sea positiva o no, en las tres tiras, la mezcla continuará moviéndose a través de las membranas hacia los anticuerpos inmovilizados frente a la proteína específica localizados en las líneas de control. Estos anticuerpos anti-proteína específica presentes en las tres membranas capturarán el complejo conjugado de control y las líneas de control verdes siempre aparecerán. La aparición de estas líneas se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente, 2) que el flujo ha sido apropiado y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30ºC en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en el envase. No debe abrirse hasta el momento de su uso. No congelar.

PRECAUCIONES

- Sólo para uso profesional *in vitro*.
- No utilizar después de la fecha de caducidad.
- Las muestras se deben considerar potencialmente peligrosas y deben ser manipuladas de la misma forma que a un agente infeccioso. Un nuevo test deberá utilizarse para cada muestra para evitar errores de contaminación.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).
- Los reactivos contienen conservantes. Debe evitarse cualquier contacto con la piel o las mucosas. Consultar fichas de seguridad, disponibles bajo petición.
- Los componentes proporcionados con el kit son aprobados para su uso con CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card test. No se deben usar con componentes de otros kits comercializados.
- Seguir las Buenas Prácticas de Laboratorio, llevar ropa de protección adecuada, usar guantes desechables, gafas de protección y mascarilla. No comer, ni beber o fumar en la zona de trabajo.

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Muestras de heces

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se deben conservar en frío (2-8ºC) máximo durante 24 horas, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 2 semanas, deben mantenerse congeladas a -20ºC. En este caso, la muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba. Ciclos de congelación y descongelación no son recomendables, por lo que, se debe descongelar únicamente la cantidad necesaria de muestra para hacer la prueba. Homogeneizar la muestra vigorosamente antes de su preparación.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

1. Abrir el tubo para dilución (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), tomando una cantidad de heces (aprox. 125mg) y posteriormente se introducirá la muestra en el tubo para dilución. Para muestras líquidas, añada aprox. 125µL en el tubo para dilución utilizando una micropipeta.
2. Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).

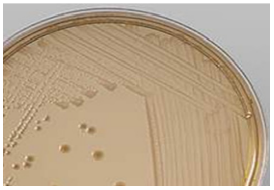


CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

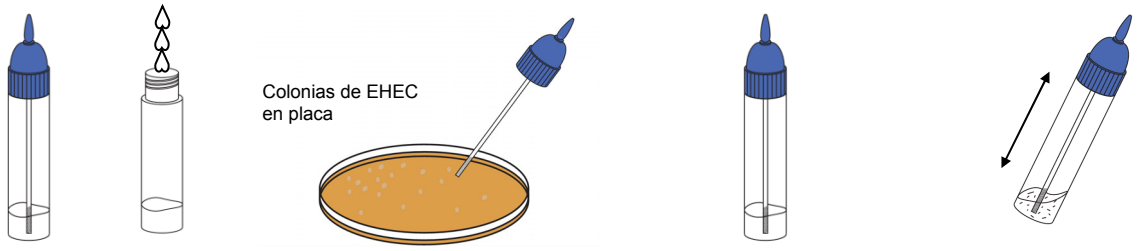
Colonias sospechosas de EHEC en coprocultivo

El Agar MacConkey-sorbitol (SMACA) sin telurito o cefixima es el método de elección para el aislamiento de EHEC (atmósfera aerobia, 24 horas/37ºC). Tras 24 horas de incubación en MacConkey-sorbitol aparecerán las colonias de EHEC.

1. Abrir el tubo para dilución de muestra y añadir 50µg de Polimixina B (1).
2. Examinar las placas MacConkey-sorbitol tras un día de incubación. Seleccionar colonias de EHEC. Usar el palito o una aguja de siembra para "picar" en 3 ó 4 colonias sospechosas de EHEC (2) y añadirlas al tubo para dilución. Incubar durante 30min/35ºC.
3. Cerrar el tubo con el diluyente y con las colonias sospechosas. Agitarlo para facilitar la dispersión de la muestra (3).



Colonias de E. coli O157:H7 en SMACA



Tubo para dilución (1) (2) (3) 30min/35ºC (4)

MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

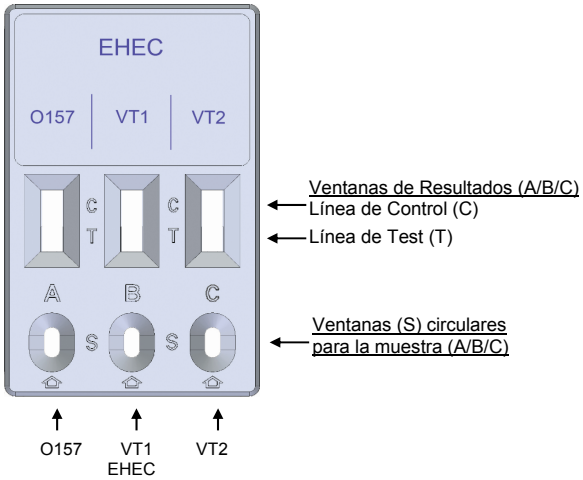
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro
- Agar SMAC
- Polimixina B

PROCEDIMIENTO

Previamente los tests, las muestras y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30ºC). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 de su envase antes de utilizarlo.
3. Tomar el tubo para dilución de muestra, cortar la punta del tapón (4) y añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra A (5), con el mismo tubo, añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra B (6) y con el mismo tubo, añadir 4 gotas del líquido en la ventana circular marcada con la letra C (7), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos**. No leer el resultado superados los 10 minutos.

Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



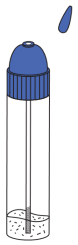
CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

CERTEST *E. coli* O157+VT1+VT2

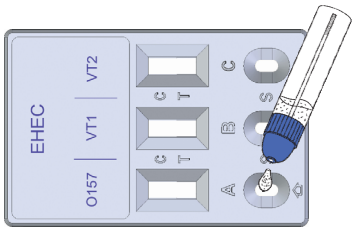
One Step test to detect Escherichia coli O157, VT1 and VT2 of EHEC in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Escherichia coli O157, VT1 y VT2 de EHEC en formato cassette

Procedimiento para la tira A de O157

Añadir 4 gotas en la ventana circular (A)



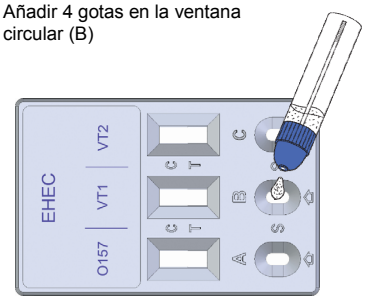
(4)



(5)

Procedimiento para la tira B de VT1

Añadir 4 gotas en la ventana circular (B)



(6)

Procedimiento para la tira C de VT2

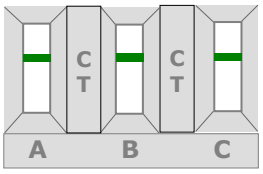
Añadir 4 gotas en la ventana circular (C)



(7)

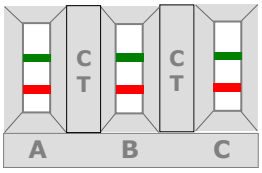
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

1.



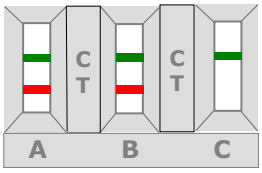
A: Verde→Negativo *E. coli* O157:H7
B: Verde→Negativo VT1
C: Verde→Negativo *VT2*

2.



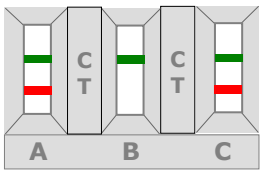
A: Verde/Rojo→Positivo *E. col i* O157:H7
B: Verde/Rojo→Positivo VT1
C: Verde/Rojo→Positivo VT2

3.



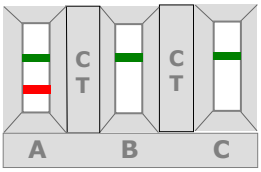
A: Verde/Rojo→Positivo *E. coli* O157:H7
B: Verde/Rojo→Positivo VT1
C: Verde→Negativo VT2

4.



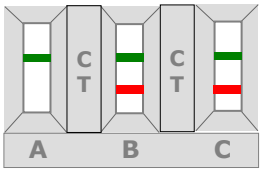
A: Verde/Rojo→Positivo *E. coli* O157:H7
B: Verde→ Negativo VT1
C: Verde/Rojo→ Positivo VT2

5.



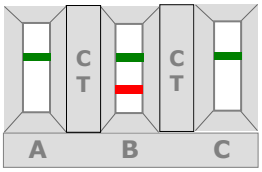
A: Verde/Rojo→ Positivo *E. coli* O157:H7
B: Verde→Negativo VT1
C: Verde→Negativo VT2

6.



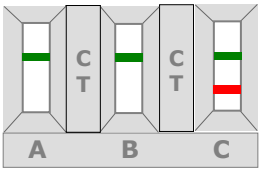
A: Verde→Negativo *E. coli* O157:H7
B: Verde/Rojo→Positivo VT1
C: Verde/Rojo →Positivo VT2

7.



A: Verde→ Negativo *E. coli* O157:H7
B: Verde/Rojo→Positivo VT1
C: Verde→ Negativo VT2

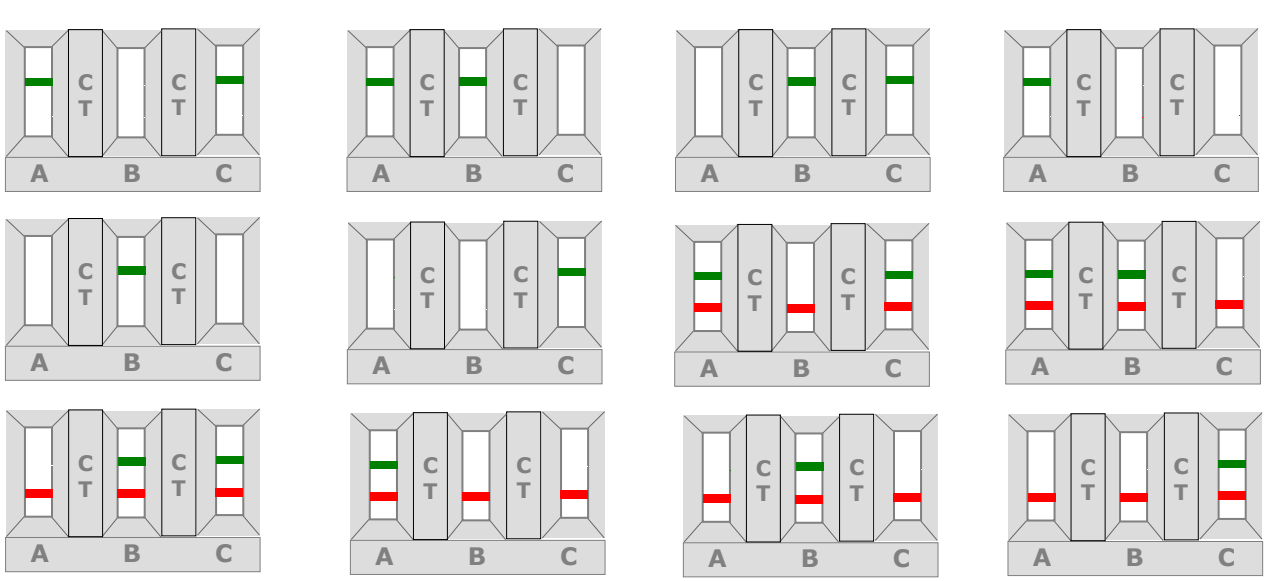
8.



A: Verde→ Negativo *E. coli* O157:H7
B: Verde→Negativo VT1
C: Verde/Rojo→ Positivo VT2

RESULTADOS INVÁLIDOS

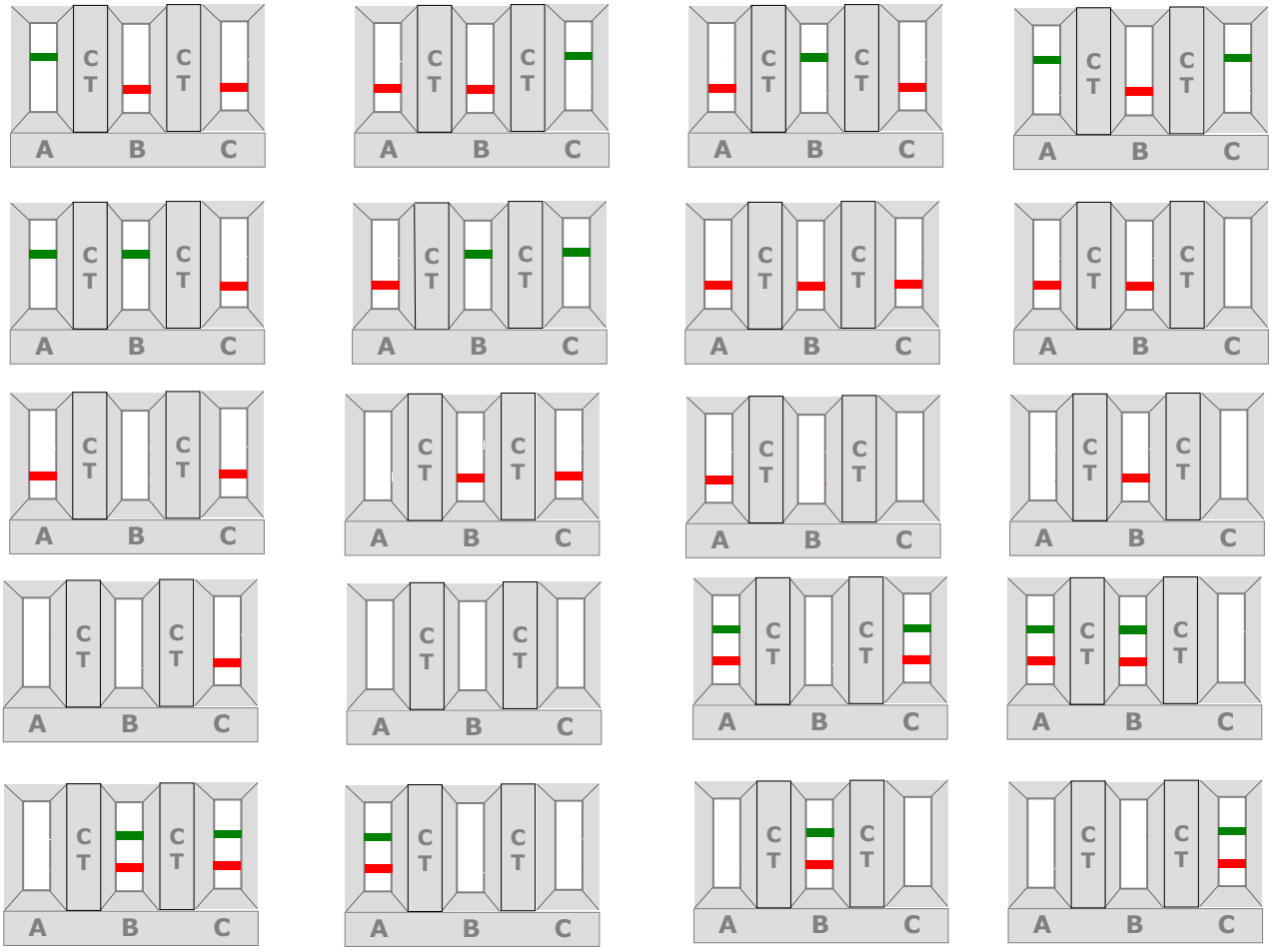
9.



CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

CERTEST *E. coli* O157+VT1+VT2

One Step test to detect Escherichia coli O157, VT1 and VT2 of EHEC in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de Escherichia coli O157, VT1 y VT2 de EHEC en formato cassette



	A (*E. coli* O157)	B (VT1)	C (VT2)	Interpretación de los resultados
1.	**-**	**-**	**-**	No hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7, VT1 o VT2. No hay infección causada por EHEC.
	VERDE	VERDE	VERDE	
2.	**+**	**+**	**+**	Hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7, VT1 y VT2. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
3.	**+**	**+**	**-**	Hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7 y de VT1. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	VERDE	
4.	**+**	**-**	**+**	Hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7 y de VT2. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE-ROJO	
5.	**+**	**-**	**-**	Hay presencia de *Escherichia coli* O157:H7. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE-ROJO	VERDE	VERDE	
6.	**-**	**+**	**+**	Hay presencia de VT1 y VT2. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE-ROJO	
7.	**-**	**+**	**-**	Hay presencia de VT1. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE	VERDE-ROJO	VERDE	
8.	**-**	**-**	**+**	Hay presencia de VT2. Hay infección causada por EHEC.
	VERDE	VERDE	VERDE-ROJO	
9.	Cualquier otro resultado			Cualquier resultado inválido en A, en B o en C: se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

INVÁLIDO: Cuando alguna línea de control (VERDE) no aparece, independientemente de que aparezcan o no las líneas de test (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: un volumen insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisar el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo test. Si los síntomas o la situación persisten, debe dejar de utilizar la prueba y contactar con su distribuidor.

OBSERVACIONES

La intensidad de las líneas de color rojo en las líneas de test (T) en las ventanas de resultados variará dependiendo de la concentración de antígenos presentes en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento de antígenos pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

Los controles internos de funcionamiento vienen incluidos en la prueba. Las líneas verdes que aparecen en las líneas de control (C) en las ventanas de resultados son los controles internos del proceso, comprobando que el volumen de muestra es suficiente y que el procedimiento seguido ha sido el adecuado.

LIMITACIONES

1. Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
2. Utilizar únicamente muestras frescas o muestras frescas congeladas sin conservantes ni fijadores.
3. Un exceso de muestra puede dar resultados erróneos, dando líneas no muy definidas de color pardo, que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra con el diluyente y repetir el test.
4. La intensidad de la línea de test puede variar desde muy fuerte a alta concentración de antígenos a débil cuando la concentración de antígenos está cerca del valor del límite de detección del test.
5. Después de una semana de infección la presencia de bacterias eliminadas en heces disminuye considerablemente por lo que es probable una menor concentración en la muestra. Se debe tomar la muestra de heces dentro de la primera semana de aparición de los síntomas.
6. CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 debería utilizarse sólo con muestras de heces humanas. El uso de otras muestras no ha sido determinado. La calidad del test depende de la calidad de la muestra; por lo que se debe realizar una adecuada toma de muestras fecales.
7. Los resultados positivos determinan la presencia de *Escherichia coli* O157:H7, VT1 y VT2 en muestras de heces (incluidas las cepas no-O157 STEC); sin embargo, un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas diagnósticas (métodos bioquímicos o PCR) para confirmar los resultados y las cepas. La infección debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, tras evaluar las pruebas clínicas y los hallazgos de laboratorio teniendo en cuenta la correlación que puede existir con todas las observaciones clínicas.
8. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que la concentración de antígenos en la muestra de heces sea inferior al valor del límite de detección. Si los síntomas o la situación persisten, para la determinación de EHEC se debería realizar mediante cultivo de enriquecimiento.
9. Verotoxina 1 (Shiga-like toxin 1) producida por EHEC es muy similar a una producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 (Shiga toxina). Verotoxina 1 se diferencia con la verdadera Shiga toxina en uno de los siete aminoácidos de los que se componen. CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 podría dar una resultado positivo con Shiga toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1. La determinación de EHEC y *Shigella dysenteriae* tipo 1 debe llevarse a cabo mediante un cultivo selectivo y con análisis bioquímicos.

VALORES ESPERADOS

Escherichia coli O157:H7 provoca anualmente 73.000 casos de enfermedad en los Estados Unidos. Significa unos 8.598 casos, de los cuales el 17% requiere hospitalización, 4% son casos que presentan el síndrome urémico hemolítico y el 0,5% provoca la muerte.

Las principales rutas de transmisión son: 52% provocadas por los alimentos, 21% causa desconocida, 14% contacto persona a persona, 31% provocada por el agua, 3% contacto animal y 0.3% relacionados con laboratorio.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, del test inmunocromatográfico (CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2, CerTest) y los resultados fueron confirmados mediante cultivos (muestras positivas). Los resultados se muestran a continuación:

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

		Cultivo		
IC test: CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 (*E. coli* O157:H7)		+	-	Total
	+	5	0	5
	-	0	60	60
	Total	5	60	65

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 (*E. coli* O157:H7) vs cultivo	**>99%**	**>99%**	**>99%**	**>99%**

Se llevó a cabo una evaluación, con muestras de heces, con un test inmunocromatográfico (CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2, CerTest) y estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos por un test comercializado (Shiga Toxin Quik Chek, TechLab®) para Verotoxina 1 y 2. Los resultados se muestran a continuación:

		Shiga Toxin Quik Chek, TechLab®		
CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 (VT1 y VT2)		+	-	Total
	+	4	0	4
	-	0	30	30
	Total	4	30	34

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 vs Shiga Toxin Quik Chek	**>99%**	**>99%**	**>99%**	**>99%**

Los resultados mostraron que CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2 presentan una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Escherichia coli* O157:H7 y Verotoxinas 1 y 2 de *Escherichia coli*.

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas de CerTest *E. coli* O157+VT1+VT2; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales ocasionalmente presentes en las heces:

Campylobacter coli	*Listeria monocytogenes*	*Shigella flexneri*
Campylobacter jejuni	*Salmonella enteritidis*	*Shigella sonnei*
Clostridium difficile	*Salmonella paratyphi*	*Staphylococcus aureus*
E. coli O157:H7 (Tira B y C)	*Salmonella typhi*	Verotoxin 1 EHEC *(Tira A y C)*
E. coli O26	*Salmonella typhimurium*	Verotoxin 2 EHEC *(Tira A y B)*
E. coli O111	*Shigella boydii*	*Yersinia enterocolitica*
Helicobacter pylori	*Shigella dysenteriae*	

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

1. THOMPSON, J., HODGE, D. and BORCZYK, A.; "Rapid Biochemical Test to Identify Verocytotoxin-Positive Strains of Escherichia coli Serotype O157"; Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1990, Vol. 28, No. 10, pp 2165-2168.
2. VALLANCE B.A. and FINLAY B.B., "Exploitation of host cells by enteropathogenic Escherichia coli", PNAS, August 2000, Vol. 97, No. 16, pp. 8799-8806.
3. BLANCO, M. et al. "Escherichia coli Verotoxigénicos (ECVT) en España: ECVT O157:H7 y NO-O157 en humanos y alimentos. El ganado bovino y ovino como reservorio. Técnicas para detección de ECVT" Laboratorio de Referencia de Escherichia coli (LREC), Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo.

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS/SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

IVD *In vitro* diagnostic device Producto para diagnóstico *in vitro*	Keep dry Almacenar en lugar seco	Use by Fecha de caducidad	Manufacturer Fabricante	LOT Batch code Número de lote
Consult instructions for use Consultar las instrucciones de uso	Temperature limitation Limitación de temperatura	Contains sufficient for <n> test Contiene <n> test	DIL Sample diluent Diluyente de muestra	REF Catalogue number Número de referencia

CerTest BIOTEC S.L.
Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es

CerTest
BIOTEC

CerTest
BIOTEC

CerTest
BIOTEC

CerTest
BIOTEC S.L.

Pol. Industrial Río Gállego II, Calle J, Nº 1,
50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza (SPAIN)
www.certest.es