



CERTEST *E.coli* O157:H7
One Step *E.coli* O157:H7 Card test

INTENDED USE

The CerTest *E.coli* O157:H7 is a one step coloured chromatographic immunoassay for the qualitative detection of *Escherichia coli* O157 in stool samples.

INTRODUCTION

Infection with *Escherichia coli* O157:H7 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*) presents with a wide spectrum of clinical manifestations, including asymptomatic carriage, nonbloody diarrhea, hemorrhagic colitis, the hemolytic-uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Not only is *E. coli* O157:H7 an important agent for hemorrhagic colitis, it is also one of the leading causes of bacterial diarrhea. Transmission of *E. coli* O157:H7 is primarily food-borne. Undercooked meat is the most common culprit, dairy products and secondary person-to-person spread are also important. The organism produces at least two Shiga-like toxins. These toxins are thought to have direct pathogenic significance in *E. coli* O157:H7 infection. This infection is usually diagnosed from a positive stool culture, from the presence of Shiga toxins, or both. Timely collection (within 7 days of illness onset) of a stool sample for culture is imperative for a high recovery rate.

CerTest *E. coli* O157:H7 provides a rapid detection of *E. coli* O157:H7 directly from the stool samples.

PRINCIPLE OF THE TEST

The CerTest *E. coli* O157:H7 is a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *E. coli* O157:H7 in stool samples. The membrane is pre-coated with mouse polyclonal antibodies, on the test band region, to recognize this serotype (polyclonal antibodies against O157:H7 antigens).

During testing, the sample is allowed to react with the coloured conjugate (anti-*E. coli* O157:H7 antibodies-red microspheres) which was pre-dried on the test. The mixture then moves upward on the membrane by capillary action. As the sample flows through the test membrane, the coloured particles migrate. In the case of a positive result the specific antibodies present on the membrane will capture the coloured conjugate (result region). The mixture continues to move across the membrane to the immobilized antibody placed in the control band region, a GREEN coloured band always appears. The presence of this GREEN band serves as 1) verification that sufficient volume is added, 2) that proper flow is obtained and 3) as an internal control for the reagents.

STORAGE AND STABILITY

Store as packaged in the sealed pouch at 2-30°C. The test is stable through the expiration date printed on the sealed pouch. The test must remain in the sealed pouch until use. Do not freeze.

PRECAUTIONS

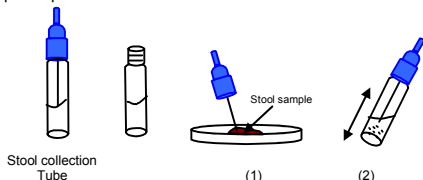
- For professional *in vitro* diagnostic use only.
- Do not use after expiration date.
- All the specimens should be considered potentially hazardous and handled in the same manner as an infectious agent.
- The tests should be discarded in a proper biohazard container after testing.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples should be collected in clean containers and the assay should be done right after collection. The samples can be stored in the refrigerator (2-4 °C) for 1-2 days prior to testing. For longer storage, maximum 1 year, the specimen must be kept frozen at -20°C. In this case, the sample will be totally thawed, and brought to room temperature before testing.

Specimen preparation (see illustration):

- (1) Unscrew the cap and use the stick to pick up a little sample (approx. 100mg), if the stool sample was liquid take 100 µL using a pipette, and add the sample into the stool collection tube.
- (2) Close the tube with the diluent and stool sample. Shake the tube in order to assure good sample dispersion.



Note: Because it is possible for the *E. coli* content in the stool to be too small, a negative result cannot be considered to be the same as a negative EHEC finding. It is recommended to carry out enrichment in TSB medium with Mitomycin C additive overnight on a shaker at 37°C.

MATERIALS PROVIDED

- Device tests (CerTest *E. coli* O157:H7)
- Instructions for use
- Stool collection tubes with sample diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer

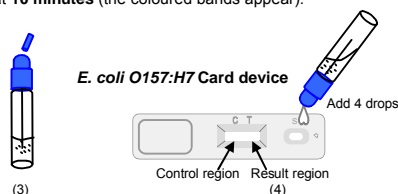
TEST PROCEDURE

Allow the tests, stool or enrichment samples and controls to reach to room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until ready to perform the assay.

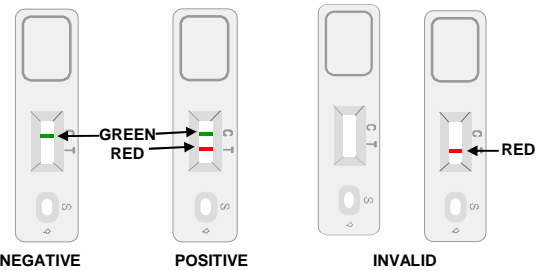
1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion. Cut the end of the cap (3).
2. Remove the CerTest *E. coli* O157:H7 device from its sealed bag just before using.
3. Use a separate stool collection tube and device for each sample or control. Dispense exactly 4 drops or 100 µL into the circular window marked with an arrow (4).

In case the test did not run due to solid particles fallen into the round window, stir the sample added or dispense a drop of extraction buffer until seeing the liquid running through the reaction zone.

- 4.- Read the result at **10 minutes** (the coloured bands appear).



INTERPRETATION OF RESULTS (please refer to the illustration below)



NEGATIVE: Only one GREEN band appears across the central window in the site marked with the letter C (control line).

POSITIVE: In addition to the GREEN control band, a distinguishable RED band also appears in the site marked with the letter T (result line).

INVALID: A total absence of the control coloured band (GREEN) regardless of the appearance or not of the result line (RED). Insufficient specimen volume or incorrect procedural techniques are the most likely reasons for control line failure. Review the procedure and repeat the tests with a new test. If the problem persists, discontinue using the test kit and contact you local distributor.

NOTES ON THE INTERPRETATION OF RESULTS

The intensity of the red coloured band in the result line region (T) will vary depending on the concentration of antigen present in the specimen. However, neither the quantitative value, nor the rate of increase in antigen can be determined by this qualitative test.

QUALITY CONTROL

A green line appearing in the control region (C) is the internal procedural control. It confirms sufficient specimen volume and correct procedural technique.

LIMITATIONS

1. The test must be carried out within 2 hours of opening the sealed bag.
2. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the buffer and repeat the test.
3. Some stool samples can decrease the intensity of the control green line.
4. A negative result is not meaningful because it is possible the *E.coli* content in the stool sample to be too small. A *E. coli* determination should be carried out on a sample from a enrichment culture.
5. This test provides a presumptive diagnosis of *E. coli* infections. A confirmed infection diagnosis should only be made by a physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated must be based in the correlation of the results with further clinical observations.

PERFORMANCE

CerTest *E. coli* O157:H7 was evaluated to determine: sensibility in stool samples directly and in selective enrichment cultures, specificity with producers organisms of Shiga toxins, non-Shiga toxins producers and other *Enterobacteriaceae* species.

Sensitivity

The detection of *E. coli* O157:H7 showed a 100% of concordance in sensitivity.

Specificity

The detection of *E. coli* O157:H7 showed a 85% of concordance in specificity.

PPV showed a 70% and NPV showed a 100%.

Exactitude

The detection of *E. coli* O157:H7 showed a 94% of concordance in exactitude.

REFERENCES

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* Verotoxigenicos (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

	In vitro diagnostic device		Batch code
	Consult instructions for use		Catalogue number
	Keep dry		Contains sufficient for <n> tests
	Temperature limitation		Manufacturer
	Use by		Sample diluent



CerTest BIOTEC S.L. C/María de Luna 11, nave 16 E-50018 Zaragoza (SPAIN) www.cer-test.es



USO PREVISTO

CerTest *E. coli* O157:H7 es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección de la cualitativa de *Escherichia coli* O157:H7 en heces.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Escherichia coli* O157:H7 (*Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)) se presenta mediante diferentes manifestaciones clínicas, incluyendo una forma asintomática, diarrea no sangrante, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombótica trombocitopenia. *E. coli* O157:H7 es también una de las causas más frecuente de diarreas de origen bacteriano. Principalmente se transmite a través de los alimentos. La carne poco cocinada, los productos lácteos y también el contacto entre personas son las formas de transmisión. Esta bacteria produce al menos dos toxinas (Shiga-like toxins) que son las causantes del daño producido por la infección por *E. coli* O157:H7 en el organismo. Esta infección se diagnostica a partir de un cultivo positivo de heces o por detección de la presencia de toxinas. 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.

CerTest *E. coli* O157:H7 proporciona una rápida detección de *E. coli* O157:H7 directamente en muestras de heces.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *E. coli* O157:H7 es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la determinación de *E. coli* O157:H7 en muestras de heces. Durante la prueba, la muestra reacciona con los conjugados coloreados (anticuerpos policlonales de ratón anti-antígeno O157:H7-microesferas rojas) previamente secados en el test. Este complejo avanza por capilaridad a través de la membrana del test. Para dar el resultado como positivo, una línea de color ROJO aparecerá en la zona de resultado de la membrana. La ausencia de esta línea sugiere un resultado negativo. Independientemente de que haya presencia o no de *E. coli* O157:H7, la mezcla de conjugado va avanzando por la membrana hasta la región de control donde se han inmovilizado anticuerpos y siempre aparecerá una línea de color VERDE (línea de control). La aparición de esta línea se utiliza: 1) para verificar que se ha añadido el volumen de muestra suficiente y 2) que el flujo ha sido el apropiado; y 3) como control interno de los reactivos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El producto debe ser almacenado entre 2 y 30° C en su envase original sellado, para conseguir un óptimo funcionamiento hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. 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.
- Los tests usados deben ser gestionados como residuos sanitarios (contenedor de residuos sanitarios).

RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio y la prueba debe realizarse lo más pronto posible después de la recogida. Las muestras se deben conservar en frío (sólo 1 ó 2 días a 2-4° C) hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20° C. La muestra debe descongelarse totalmente y alcanzar la temperatura ambiente para poder utilizarla en la prueba.

Preparación de la muestra (ver dibujo):

- (1) Desenroskar el tape y con ayuda del palito se toma una muestra de las heces recogidas. Para ello se pasa el palito por la muestra recogiendo una pequeña cantidad de heces, si la muestra fuera líquida se tomarán 100 µL de la misma con una pipeta, introducir la muestra en el tubo para dilución.
- (2) Cerrar el tubo que contiene la muestra y el diluyente. Agitar para facilitar la dispersión de la muestra.



Nota: Es posible que el contenido de *E. coli* en la muestra de heces sea muy bajo por lo que un resultado negativo no significa que sea negativo para EHEC. Por lo que se recomienda realizar un enriquecimiento de la muestra en medio TSB con Mitomicina C durante toda la noche bajo agitación a 37°C.

MATERIALES SUMINISTRADOS

- Dispositivos de reacción (CerTest *E. coli* O157:H7)
- Instrucciones de uso
- Tubos de dilución de muestras con tampón de extracción

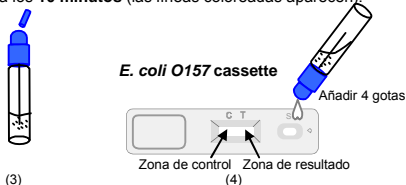
MATERIALES NECESARIOS-NO SUMINISTRADOS

- Recipiente para la recogida de la muestra de heces
- Guantes desechables
- Cronómetro

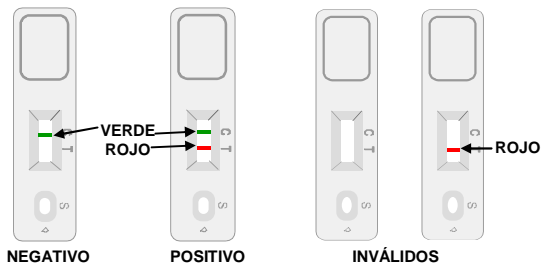
PROCEDIMIENTO

Previamente el dispositivo, las muestras de heces, las muestras enriquecidas y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30 °C). No abrir el envase hasta el momento de la prueba. Pasos a seguir:

1. Agitar el tubo de dilución de la muestra para asegurar una buena dispersión. Cortar la punta del tapón (3).
2. Sacar el dispositivo de reacción CerTest *E. coli* O157:H7 de su envase para utilizarlo inmediatamente.
3. Para cada muestra o control se debe usar un tubo de dilución de la muestra y un dispositivo diferente. Tomar 4 gotas o 100 µL del líquido y depositarlas en la ventana circular marcada con una flecha o una S en el dispositivo, evitando añadir partículas sólidas con el líquido (4). Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas en la ventana circular, retirarlas y añadir una gota de tampón hasta que se vea avanzar al líquido (zona de reacción y de control).
4. Leer el resultado a los **10 minutos** (las líneas coloreadas aparecen).



INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



NEGATIVO: Una sola línea de color VERDE aparece en la ventana central del dispositivo de reacción, en la zona marcada con la letra C (línea de control)

POSITIVO: Además de la línea de control VERDE, también aparece una línea ROJA en la zona marcada con la letra T (línea de resultado).

INVÁLIDO: Cuando la línea de control (VERDE) no aparece independientemente de que aparezca o no la línea de resultado (ROJA). Las causas más comunes por las que puede aparecer un resultado inválido son: una cantidad insuficiente de muestra, una forma de proceder incorrecta o un deterioro de los reactivos. Si ocurriera esto, debe revisarse el procedimiento y repetir la prueba con un nuevo dispositivo de reacción. Si persistiese el problema, debe contactar con su proveedor y dejar de utilizar la prueba.

OBSERVACIONES

La intensidad de la línea de color rojo en la zona de resultado (T) del dispositivo de reacción variará dependiendo de la concentración de antígeno presente en la muestra. Sin embargo, esta prueba es cualitativa, por lo que, ni la cantidad ni la tasa de aumento del antígeno pueden ser determinados por la misma.

CONTROL DE CALIDAD

El control interno de funcionamiento viene incluido en la prueba. La línea verde que aparece en la zona de control (C) es el control interno 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 dispositivo no debe usarse después de 2 horas.
2. Un exceso de muestra puede dar resultados negativos, dando líneas no muy definidas de color pardo que no tienen ningún valor diagnóstico. Diluir la muestra en más tampón y repetir el ensayo.
3. Algunas muestras de heces pueden disminuir la intensidad de la línea de control verde.
4. Un resultado negativo no se debe considerar como concluyente, puede darse que el contenido de *E. coli* en la muestra de heces sea muy bajo. Por lo que, se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento.
5. Esta prueba diagnostica una posible infección por *E. coli* situación que debe confirmarse por un especialista o médico cualificado, teniendo en cuenta las pruebas clínicas y de laboratorio evaluadas.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Se han realizado ensayos para determinar: la sensibilidad del test en muestras de heces directamente y en cultivos de enriquecimiento selectivos y, la especificidad sobre cepas productoras de toxina (Shiga toxin), no productoras de esa toxina y cepas de otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*.

Sensibilidad

La detección de *E. coli* O157:H7 presenta un 100% de concordancia en sensibilidad.

Especificidad

La detección de *E. coli* O157:H7 presenta un 85% de concordancia en especificidad.

VPP es un 70% y VPN es un 100%.

Exactitud del la prueba fue de un 94%.

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

SÍMBOLOS PARA REACTIVOS Y PRODUCTOS PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*

	Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>		Número de lote
	Consultar las instrucciones de uso		Número de referencia
	Almacenar en lugar seco		Contiene <n> test
	Limitación de temperatura		Fabricante
	Fecha de caducidad		Diluyente para muestra