
CERTEST
Shigella
dysenteriae
+ STX

ONE STEP
Shigella dysenteriae +
Shiga toxin (STX) COMBO
CARD TEST

CERTEST BIOTEC S.L.





CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

ENGLISH

INTENDED USE

CerTest *Shigella dysenteriae*+STX one step combo card test is a coloured chromatographic immunoassay for the simultaneous qualitative detection of *Shigella dysenteriae* type 1 and Shiga toxin (STX) produced by *Shigella dysenteriae* in stool samples and *Shigella dysenteriae* suspected colonies in stool culture.

CerTest *Shigella dysenteriae*+STX combo card test offers a simple and highly sensitive screening assay to make a presumptive diagnosis of *Shigella dysenteriae* infection (shigellosis) and it could be used to identify of suspected isolates of *Shigella dysenteriae* from selective media (stool culture).

INTRODUCTION

The four species of the genus *Shigella*; *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* and *S. sonnei* cause a wide spectrum of illness from watery diarrhoea to fulminant dysentery. The low infectious inoculum, as few as 10 organisms, render *Shigella* highly contagious. Shigellosis therefore occurs as an endemic disease in populations characterized by over-crowding, poor housing, poor sanitation and inadequate water supply. The predominant serogroups of *Shigella* occurring in a region also appears to be related to the socioeconomic development; and evidence also indicates that the severity of shigellosis is related to the infecting serogroup.

S. dysenteriae serotype 1 (also known as *S. dysenteriae* type 1 or *S. dysenteriae* 1), has been recognized as the major cause of epidemic dysentery for nearly 100 years. Pandemics of Shiga dysentery have spread across Central America, Bangladesh, South Asia and Central and East Africa.

All four species of *Shigella*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* and *Shigella sonnei*, contain large plasmids, which are required for the invasion of bacteria into epithelial cells, as well as virulence loci encoded on the chromosome. However, only one species of *Shigella*, *S. dysenteriae* serotype 1, has been demonstrated to produce a toxin, called Shiga toxin (STX).

Infections with Shiga toxin-producing bacteria are known to cause bloody diarrhea (hemorrhagic colitis). In some patients, most often children and the elderly, infections are accompanied by a more serious disease, the hemolytic uremic syndrome (HUS), which is characterized by acute renal failure, thrombocytopenia and microangiopathic hemolytic anemia.

TEST PRINCIPLE

CerTest *Shigella dysenteriae*+STX is based on the principle of a qualitative immunochromatographic assay for the determination of *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) produced by *Shigella dysenteriae* in stool samples and *Shigella dysenteriae* 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 *Shigella dysenteriae* 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-*Shigella dysenteriae*) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming 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 STX 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-STX) conjugated to red polystyrene latex and control label solution (specific binding protein) conjugated to green polystyrene latex, forming coloured conjugate complexes.

If the sample is *Shigella dysenteriae* positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-*Shigella dysenteriae* monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in the strip A, and if the sample is STX positive, the antigens of the diluted sample react with the red-coloured conjugate complex (anti-STX monoclonal antibodies-red polystyrene microspheres) in strip B, 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-*Shigella dysenteriae* antibodies present on the membrane of strip A (test line) and the anti-STX antibodies present on the membrane of strip B (test line) capture the coloured conjugate and the red line will be visible in both strips. These bands are used to interpret the result.

If the sample is negative, there is no *Shigella dysenteriae* and STX antigens presence and yet, the antigens may be present in a concentration lower than the detection limit values, for which the reaction will not take place with any red-coloured conjugate complex. The anti-*Shigella dysenteriae* and the anti-STX 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 both 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 both membranes will capture control green-conjugate





CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

complex and both 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 2-30°C. 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 combo card 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 provided in the kit are approved for use in the CerTest *Shigella dysenteriae*+STX 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.

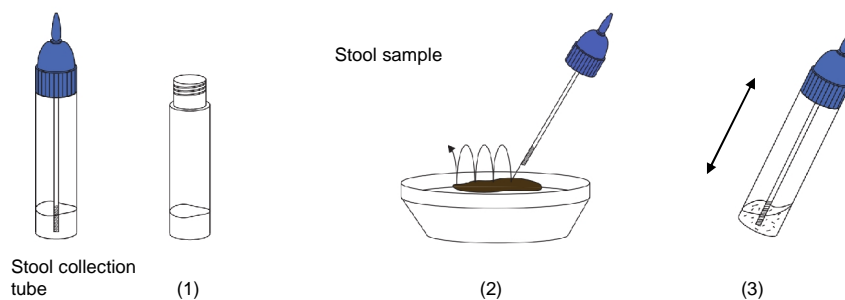
SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Stool samples

Samples should be collected in clean containers. The samples can be stored in the refrigerator (2-8°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. 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):

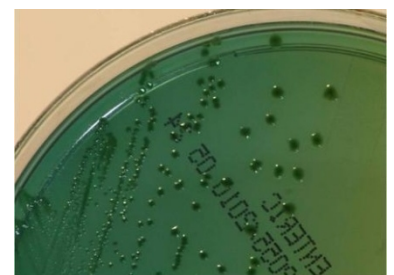
1. Take out the cap of the stool collection tube (1) and use the stick to pick up sufficient sample quantity. Then, introduce the stick once into 4 different parts of the stool sample (2), to collect faecal sample (approx. 125mg) and add it to the stool collection tube. For liquid samples, add approx. 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).



Suspected *Shigella dysenteriae* colonies in stool culture

The Hektoen Enteric Agar (HEA) is the method of choice for the isolation of *Shigella dysenteriae* (aerobic atmosphere, 24 hours/37°C). After 24 hours of incubation in Hektoen the typical *Shigella dysenteriae* colonies will be green or bluish without any black centre.

1. Examine Hektoen plates after 1 day incubation. Select *Shigella dysenteriae* typical colonies. Take out the cap of the collection tube (1). Use the stick or an inoculating needle to pick up 3 or 4 suspected *Shigella dysenteriae* colonies (2) and add them to the collection tube.
2. Close the tube with the diluent and suspected colonies. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).

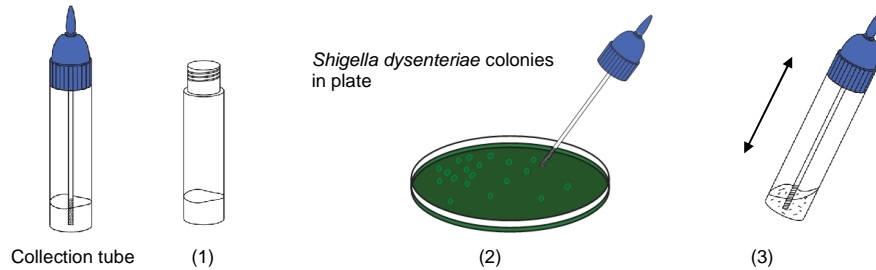


Shigella dysenteriae colonies in Hektoen Enteric Agar



CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

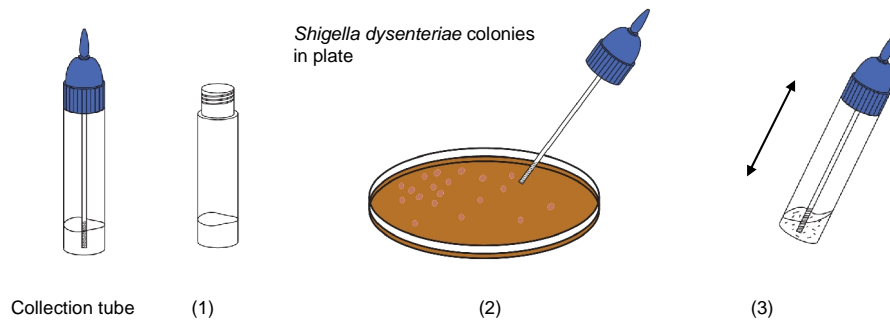


Salmonella Shigella Agar (SS) is another method for the isolation of *Shigella dysenteriae* (aerobic atmosphere, 24-48 hours/35-37°C). After the incubation period in SS the typical *Shigella dysenteriae* colonies will be transparent without any black center. The SS agar is a very inhibitor that sometimes prevents the growth of certain species of *Shigella*. We recommend using this medium unless accompanied by another inhibitor (HEA).

1. Examine SS plates after incubation period. Select *Shigella* typical colonies. Take out the cap of the collection tube (1). Use the stick or an inoculating needle to pick up 3 or 4 suspected *Shigella dysenteriae* colonies (2) and add them to the collection tube.
2. Close the tube with the diluent and suspected colonies. Shake the tube in order to assure good sample dispersion (3).



Shigella dysenteriae colonies in Salmonella Shigella Agar



MATERIALS

MATERIALS PROVIDED

- CerTest *Shigella dysenteriae*+STX combo card tests
- Instructions for use
- Stool collection tubes with diluent

MATERIALS REQUIRED BUT NO PROVIDED

- Specimen collection container
- Disposable gloves
- Timer
- Hektoen Enteric Agar (HEA)/Salmonella Shigella Agar (SS)

TEST PROCEDURE

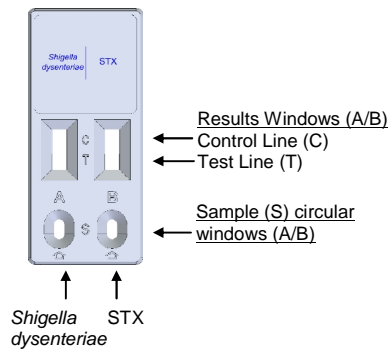
Allow tests, stool samples and controls to reach room temperature (15-30°C) prior to testing. Do not open pouches until the performance of the assay.

1. Proceed to shake the stool collection tube in order to assure good sample dispersion.
2. Remove CerTest *Shigella dysenteriae*+STX 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) and 4 drops, using the same tube, in the circular window marked with the letter B (6). Avoid adding solid particles with the liquid.
4. **Read the results at 10 minutes.** Do not read the test result later than 10 minutes.

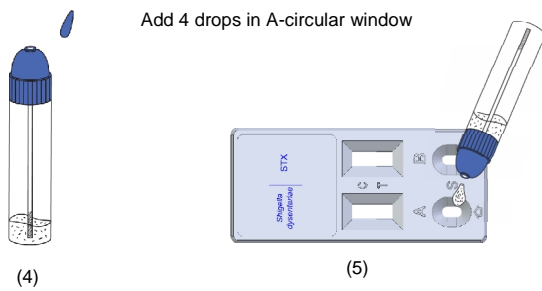
If the test does not run due to solid particles, stir the sample added in the sample window (S) with the stick. If it doesn't work, dispense a drop of extraction diluent until seeing the liquid running through the reaction zone.

CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

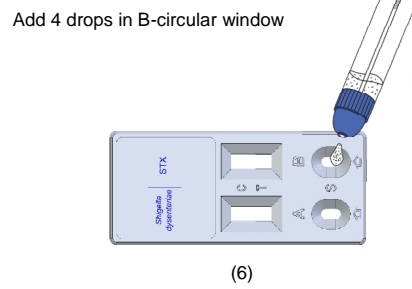
One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
 Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette



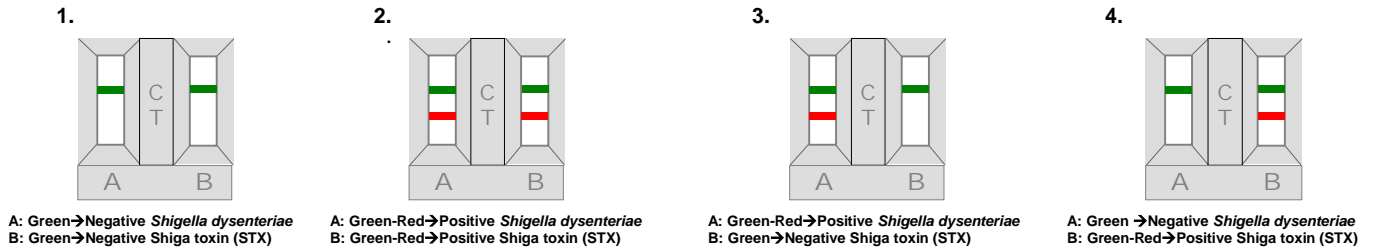
Shigella dysenteriae Strip A-procedure



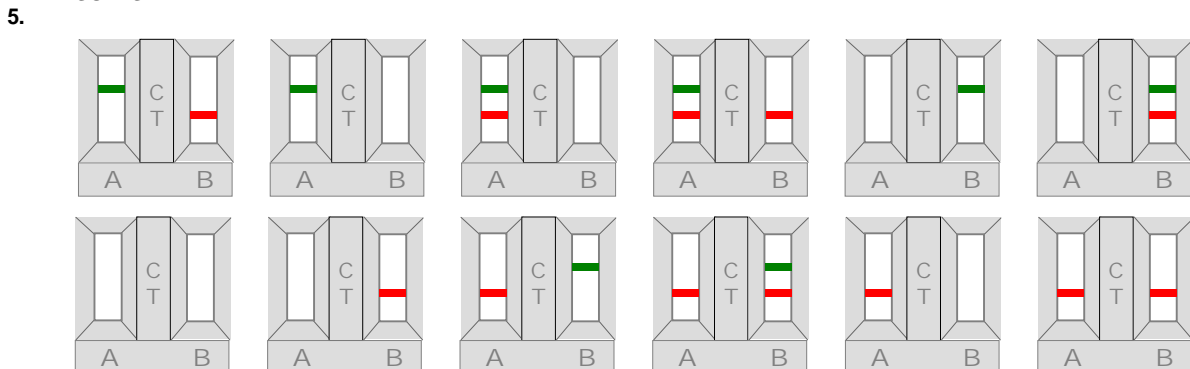
Shiga toxin Strip B-procedure



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



INVALID RESULTS





CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

	A (<i>Shigella dysenteriae</i>)	B (Shiga toxin (STX))	Interpretation of the results
1.	- GREEN	- GREEN	There is no <i>Shigella dysenteriae</i> presence. No infection caused by <i>Shigella dysenteriae</i> .
2.	+ GREEN-RED	+ GREEN-RED	There is <i>Shigella dysenteriae</i> and Shiga toxin (STX) presence. Infection caused by <i>Shigella dysenteriae</i> .
3.	+ GREEN-RED	- GREEN	There is <i>Shigella dysenteriae</i> presence. Infection caused by <i>Shigella dysenteriae</i> .
4.	- GREEN	+ GREEN-RED	There is Shiga toxin (STX) presence. Infection caused by <i>Shigella dysenteriae</i> or by enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC).
5.	Any other result	Any other result	Invalid result, either A or B, 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 result 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 persists, 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.

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. An excess of sample could cause wrong results (brown bands appear). Dilute the sample with the diluent and repeat the test.
3. 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.
4. CerTest *Shigella dysenteriae*+STX 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.
5. Positive results determine the presence of *Shigella dysenteriae* and/or STX of *Shigella dysenteriae* in faecal samples; nevertheless, it can be due to several causes and/or species. A positive result should be followed up with additional laboratory techniques (biochemical and serological methods) to confirm the results. 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.
6. 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 persist, a *Shigella dysenteriae* determination should be carried out, on a sample from an enrichment culture.
7. Shiga toxin (STX) produced by *Shigella dysenteriae* is very similar to one produced by EHEC (verotoxin 1). Verotoxin 1 differs from Shiga toxin by one to seven aminoacids differences. CerTest *Shigella dysenteriae*+STX may give a positive result with Verotoxin1 produced by EHEC. *Shigella dysenteriae* type 1 and EHEC determination should be carried out on selective culture and with biochemical analysis.

EXPECTED VALUES

Bacillary dysentery caused by *Shigella dysenteriae* type 1 is a major public health problem in many developing countries. There are four known species of *Shigella* which are pathogenic and infection with *S. dysenteriae* type 1 usually progresses to the most severe form of dysentery with life-threatening complications. The most common underlying cause of death in fatal shigellosis is severe colitis and the immediate associated causes are septicemia and pneumonia. Infection with *S. dysenteriae* type 1 can occur in an epidemic form, and *Shigella*-contaminated food and drink are often the source of epidemic spread.





CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical sensitivity (detection limit)

Detection limit value of CerTest *Shigella dysenteriae*+STX is 3.125×10^4 CFU/mL for *Shigella dysenteriae* and 20.66ng/mL for STX.

Clinical sensitivity and specificity

An evaluation, with prepared faecal samples, was performed using bacteria cultures *in vitro* to determine the detection of *Shigella dysenteriae*. The results were as follows:

Clinical sensitivity and specificity (Strip A)

IC test: CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX (<i>Shigella dysenteriae</i>)	Culture confirmation			Total
		+	-	
+		5	0	5
-		0	10	10
Total		5	10	15

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX vs Culture (<i>Shigella dysenteriae</i>)	>99%	>99%	>99%	>99%

Clinical sensitivity and specificity (Strip B)

IC test: CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX (STX)	Culture confirmation			Total
		+	-	
+		3	0	3
-		0	40	40
Total		3	40	43

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX vs Culture (STX)	>99%	>99%	>99%	>99%

The results showed a high sensitivity and specificity to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) using CerTest *Shigella dysenteriae*+STX.

Cross reactivity

An evaluation was performed to determine the cross reactivity of CerTest *Shigella dysenteriae*+STX; no cross reactivity against gastrointestinal pathogens occasionally present in faeces:

<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>



ESPAÑOL**USO PREVISTO**

CerTest *Shigella dysenteriae*+STX combo card test es una prueba inmunocromatográfica de un solo paso para la detección cualitativa simultánea de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y Shiga toxina (STX) producida por *Shigella dysenteriae* en muestras de heces y de colonias sospechosas de *Shigella dysenteriae* en coprocultivo.

CerTest *Shigella dysenteriae*+STX combo card test ofrece un ensayo de cribado sencillo y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico presuntivo de infección por *Shigella dysenteriae* y podría ser utilizado para identificar aislados sospechosos de *Shigella dysenteriae* a partir de un medio selectivo (coprocultivo).

INTRODUCCIÓN

El género *Shigella* tiene cuatro especies *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*, las cuales pueden provocar un amplio espectro de enfermedades, desde diarrea hasta una disentería fulminante. *Shigella* es altamente contagiosa, únicamente se necesita una pequeña cantidad de inóculo infeccioso (solo unos 10 organismos) para ocasionar la infección. La mayor incidencia de shigelosis como enfermedad endémica se da en poblaciones de sobre-población, con edificaciones pobres, baja salubridad e inadecuado suministro de agua. Se ha establecido que los serogrupos predominantes de *Shigella* en una zona concreta están relacionados con el desarrollo socio-económico y la gravedad de la shigelosis también se asocia al tipo de serogrupo que infecte. Por ejemplo, *S. dysenteriae* tipo 1, también llamado Shiga bacillus, ha sido reconocido como la causa principal de la disentería epidémica durante los últimos 100 años. Las pandemias causadas por *Shigella dysenteriae* se han propagado por América Central, Bangladesh, Sur de Asia y África Central y Este.

Las cuatro especies de *Shigella*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*, contienen grandes plásmidos, que son necesarios para la invasión de las bacterias en las células epiteliales, así como *loci* de virulencia codificados en el cromosoma. Sin embargo, sólo una especie de *Shigella*, *S. dysenteriae* tipo 1, se ha demostrado que produce una toxina STX (toxina Shiga o Shiga toxina).

Las infecciones con bacterias productoras de toxinas Shiga son conocidas por causar diarrea con sangre (colitis hemorrágica). En algunos pacientes, más frecuentemente en niños y ancianos, las infecciones se acompañan de una enfermedad más grave, el síndrome urémico hemolítico (SUH), que se caracteriza por la insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática.

FUNDAMENTO DEL TEST

CerTest *Shigella dysenteriae*+STX es una prueba cualitativa inmunocromatográfica para la detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxina (STX) producidas por *Shigella dysenteriae* en muestras de heces y de colonias sospechosas de *Shigella dysenteriae* en coprocultivo.

Tira A consiste en una membrana de nitrocelulosa fijada previamente con anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Shigella dysenteriae* 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 para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a *Shigella dysenteriae*) 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 STX 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 para la línea de test (anticuerpos monoclonales de ratón frente a STX) 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 *Shigella dysenteriae* positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-*Shigella dysenteriae*-microesferas rojas de látex) en la tira A, y si la muestra es STX positiva, los antígenos de la muestra diluida reaccionan con el complejo conjugado coloreado rojo (anticuerpos monoclonales anti-STX-microesferas rojas de látex) en la tira B, 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. Los anticuerpos anti-*Shigella dysenteriae* presentes en la membrana de la tira A (línea de test) y los anticuerpos anti-STX presentes en la membrana de la tira B (línea de test) capturarán el complejo coloreado del test y la línea roja aparecerá en ambas tiras. Estas líneas se usarán para interpretación del resultado.

Si la muestra es negativa, no hay presencia de antígenos de *Shigella dysenteriae* y STX, o los antígenos están presentes en una concentración inferior al límite de detección y no se producirá reacción con ningún complejo coloreado rojo. Los anticuerpos anti-*Shigella dysenteriae* 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 ambas 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 ambas 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 30°C 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 *Shigella dysenteriae*+STX 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.

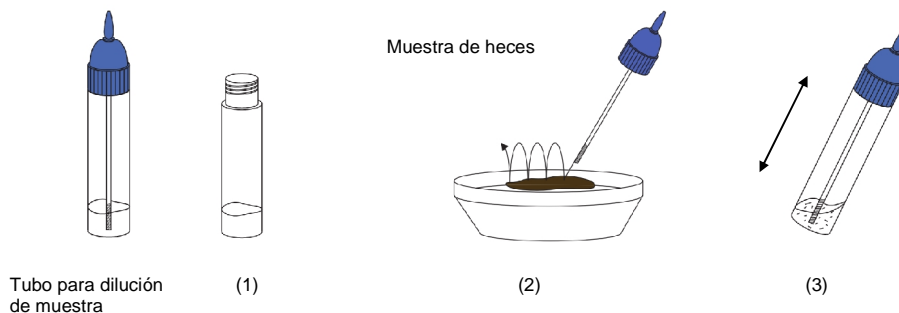
RECOGIDA DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN

Muestras de heces

Las muestras deben ser recogidas en un recipiente limpio. Las muestras se pueden conservar en frío (2-8°C), máximo durante 1-2 días, hasta el momento de utilizarlas. Para conservar las muestras durante un tiempo prolongado, como máximo 1 año, deben mantenerse congeladas a -20°C. 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):

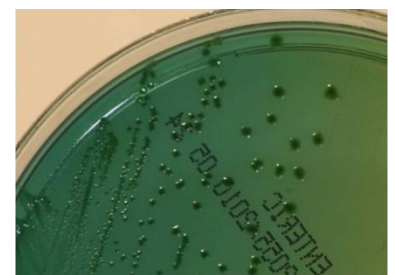
1. Abrir el tubo para dilución de muestra (1) y con ayuda del palito tomar suficiente cantidad de muestra de las heces recogidas. Para ello se introducirá el palito una sola vez en 4 zonas distintas de la muestra (2), tomando una cantidad de heces (aprox. 125mg) y posteriormente se introducirá la muestra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



Colonias sospechosas de *Shigella dysenteriae* en coprocultivo

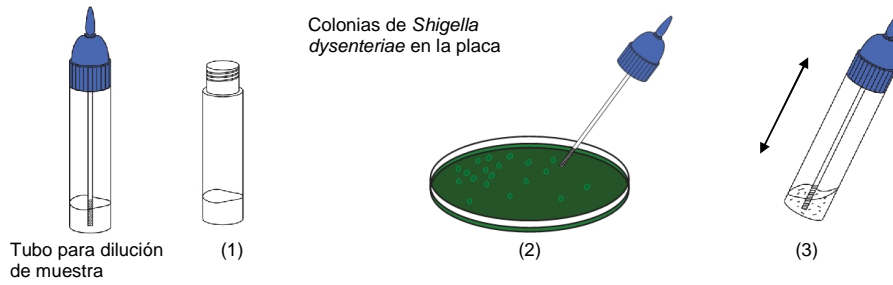
El Agar Entérico Hektoen (AEH) es uno de los métodos de elección para el aislamiento de *Shigella dysenteriae* (atmósfera aeróbica, 24 horas/37°C). Tras 24 horas de incubación en Hektoen las típicas colonias de *Shigella dysenteriae* serán verdes o azuladas sin ningún centro negro.

1. Examinar las placas Hektoen tras 1 día de incubación. Seleccionar colonias típicas de *Shigella dysenteriae*. Abrir el tubo para dilución de muestra (1). Usar el palito o una aguja de siembra para "picar" en 3 o 4 colonias sospechosas de *Shigella dysenteriae* (2) y añadir al tubo para dilución de muestra.



Colonias de *Shigella dysenteriae* en Agar Entérico Hektoen

2. Cerrar el tubo con el diluyente y con las colonias sospechosas. Agitar el tubo para asegurar una buena dispersión de la muestra (3).

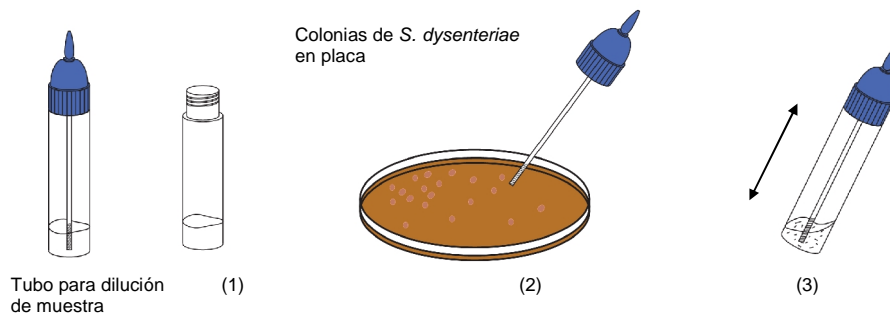


El Agar *Salmonella Shigella* (SS) es otro método para el aislamiento de *Shigella dysenteriae* (atmósfera aeróbica, 24-48 horas/35-37°C). Tras el periodo de incubación en SS las típicas colonias de *Shigella dysenteriae* serán transparentes sin ningún centro negro. El agar SS es un medio muy inhibitor que a veces impide el crecimiento de ciertas especies de *Shigella*. Se recomienda utilizar este medio acompañado de otro menos inhibitor (AEH).



Colonias de *Shigella dysenteriae* en Agar *Salmonella Shigella*

- 1.Examinar las placas SS tras el período de incubación. Seleccionar colonias típicas de *Shigella dysenteriae*. Abrir el tubo para dilución de muestra (1). Usar el palito o una aguja de siembra para “picar” en 3 o 4 colonias sospechosas de *Shigella dysenteriae* (2) y añadir al tubo para dilución de muestra.
- 2.Cerrar el tubo con el diluyente y con las colonias sospechosas. Agitar el tubo para asegurar una buena dispersión de la muestra (3).



MATERIALES

MATERIALES SUMINISTRADOS

- CerTest *Shigella dysenteriae*+STX combo card tests
- Instrucciones de uso
- Tubos para dilución de muestra con diluyente

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

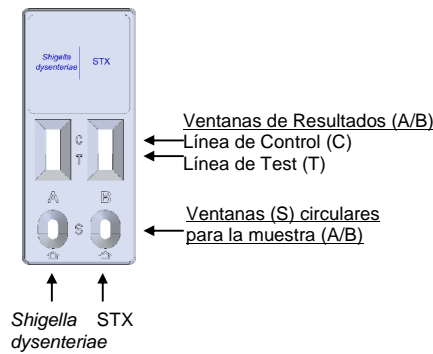
- Recipiente para recogida de muestras
- Guantes desechables
- Cronómetro
- Agar Entérico Hektoen (AEH)/Agar *Salmonella Shigella* (SS)

PROCEDIMIENTO

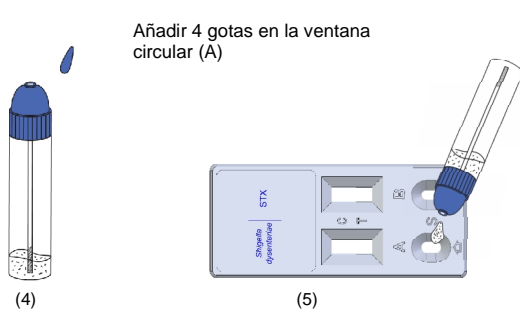
Previamente los test, las muestras y los controles se deben acondicionar a la temperatura ambiente (15-30°C). No abrir los envases hasta el momento de la prueba.

1. Agitar el tubo para dilución de muestra para asegurar una buena dispersión.
2. Sacar el test CerTest *Shigella dysenteriae*+STX 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), y añadir 4 gotas, con el mismo tubo, en la ventana circular marcada con la letra B (6), evitando añadir partículas sólidas con el líquido.
4. **Leer el resultado a los 10 minutos.** No leer el resultado superados los 10 minutos.

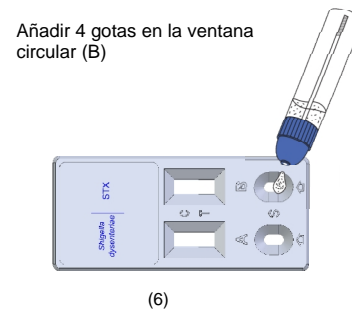
Si se da el caso de que el test no funciona debido a la presencia de partículas sólidas, agitar con el palito la muestra en la ventana (S). Si no funciona, añadir una gota de diluyente hasta que se vea avanzar el líquido por la zona de resultados.



Procedimiento para la tira A de *Shigella dysenteriae*



Procedimiento para la tira B de STX

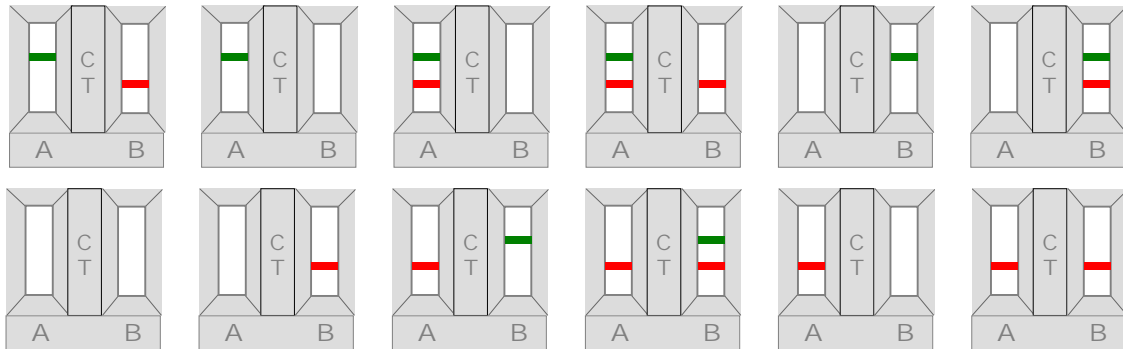


INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (por favor, fíjese en el siguiente dibujo)

1.	2.	3.	4.
A: Verde→Negativo <i>Shigella dysenteriae</i> B: Verde→Negativo Shiga toxin (STX)	A: Verde-Rojo→Positivo <i>Shigella dysenteriae</i> B: Verde-Rojo→Positivo Shiga toxin (STX)	A: Verde-Rojo→Positivo <i>Shigella dysenteriae</i> B: Verde→Negativo Shiga toxin (STX)	A: Verde →Negativo <i>Shigella dysenteriae</i> B: Verde-Rojo→Positivo Shiga toxin (STX)

RESULTADOS INVÁLIDOS

5.



	A (<i>Shigella dysenteriae</i>)	B (Shiga toxin (STX))	Interpretación de los resultados
1.	- VERDE	- VERDE	No hay presencia de <i>Shigella dysenteriae</i> o Shiga toxina (STX). No hay infección causada por <i>Shigella dysenteriae</i> .
2.	+ VERDE-ROJO	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de <i>Shigella dysenteriae</i> y Shiga toxina (STX). Hay infección causada por <i>Shigella dysenteriae</i> .
3.	+ VERDE-ROJO	- VERDE	Hay presencia de <i>Shigella dysenteriae</i> . Hay infección causada por <i>Shigella dysenteriae</i> .
4.	- VERDE	+ VERDE-ROJO	Hay presencia de Shiga toxin (STX). Hay infección causada por <i>Shigella dysenteriae</i> o por <i>E. coli enterohaemorrhagic</i> (EHEC).
5.	Cualquier otro resultado	Cualquier otro resultado	Cualquier resultado inválido, en A o en B, se recomienda repetir la prueba con la misma muestra y otro test.

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 la línea de test (T) en la ventana 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

- Una vez abierto, el test no debe usarse después de 2 horas.
- Un exceso de muestra de heces 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.
- La intensidad de la línea del 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.
- CerTest *Shigella dysenteriae*+STX debería utilizarse sólo con muestras provenientes 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.



CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

- Los resultados positivos determinan la presencia de *Shigella dysenteriae* en muestras de heces; sin embargo, ésta puede ser debida a varias causas y/o especies. Un resultado positivo debería ser contrastado con otras técnicas de laboratorio (métodos bioquímicos y serológicos) para confirmar los resultados. 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.
- Un resultado negativo no se puede 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 *Shigella dysenteriae* se debería repetir la prueba con la muestra previamente sometida a enriquecimiento.
- Shiga toxina (STX) producida por *Shigella dysenteriae* es muy similar a la producida por EHEC (Verotoxina 1). Verotoxina 1 se diferencia con la Shiga toxina (STX) en uno de los siete aminoácidos de los que se compone. CerTest *Shigella dysenteriae*+STX podría dar un resultado positivo con la Verotoxina 1 producida por EHEC. La determinación de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y EHEC debe llevarse a cabo mediante un cultivo selectivo y con análisis bioquímicos.

VALORES ESPERADOS

La disentería bacteriana causada por *Shigella dysenteriae* tipo 1 es uno de los principales problemas de salud pública en muchos países en desarrollo. Hay cuatro especies conocidas de *Shigella* patogénicas y la infección con *S. dysenteriae* tipo 1 normalmente suele progresar hacia la forma de disentería más grave con riesgo para la vida. La causa fundamental más común de muerte en shigelosis es la colitis severa y otra causa paralela es la septicemia y la neumonía. Las infecciones con *S. dysenteriae* tipo 1 ocasionar epidemias y a menudo son los alimentos y agua contaminados con *Shigella* la fuente de la propagación de la epidemia.

CARACTERÍSTICAS DEL TEST

Sensibilidad analítica (límite de detección)

El límite de detección para CerTest *Shigella dysenteriae*+STX son 3.125×10^4 UFC/mL para *Shigella dysenteriae* y 20.66ng/mL para Shiga toxina (STX).

Sensibilidad y especificidad clínica

Se llevó a cabo una evaluación clínica, con muestras fecales preparadas y con cultivo de bacterias *in vitro* para determinar la detección de *Shigella dysenteriae*. Los resultados se muestran a continuación:

Sensibilidad y especificidad clínica (Tira A)

IC test: CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX (<i>Shigella dysenteriae</i>)	Cultivo			Total
		+	-	
+	5	0	5	
-	0	10	10	
Total	5	10	15	

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX vs Cultivo (<i>S. dysenteriae</i>)	>99%	>99%	>99%	>99%

Sensibilidad y especificidad clínica (Tira B)

IC test: CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX (STX)	Cultivo			Total
		+	-	
+	3	0	3	
-	0	40	40	
Total	3	40	43	





CERTEST *Shigella dysenteriae*+STX

One Step test to detect *Shigella dysenteriae* and Shiga toxin (STX) in combo card format/
Prueba combo de un solo paso para detección de *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX) en formato cassette

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
CerTest <i>Shigella dysenteriae</i> +STX vs. cultivo (STX)	>99%	>99%	>99%	>99%

Los resultados mostraron que CerTest *Shigella dysenteriae*+STX presenta una alta sensibilidad y especificidad para detectar *Shigella dysenteriae* y Shiga toxin (STX).

Reacciones cruzadas

Se realizó una evaluación para determinar posibles reacciones cruzadas del test CerTest *Shigella dysenteriae*+STX; no se detectó reacción cruzada con patógenos gastrointestinales comunes ocasionalmente presentes en las heces:

<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>

REFERENCES/BIBLIOGRAFÍA

- OPINTAN J.A., et al. "Distribution of Serogroups and Serotypes of Multiple Drug Resistant *Shigella* Isolates" *Ghana Medical Association* 2007.
- Welton I., et al. "Isolation of *Shigellae*. VI. Performance of Media with Stool Specimens. *Applied Microbiology*, Sept. 1968, Vol. 16, No. 9, p. 1387-1393.
- Marie A. McDonough and Joan R. Buterton "Spontaneous tandem amplification and deletion of the Shiga toxin operon in *Shigella dysenteriae* 1. *Molecular Microbiology* (1999) 34 (5), 1058-1069.
- Jonas Bergan, Anne Berit Dyve Lingelem, Roger Simm, Tore Skotland, Kirsten Sandvig "Shiga toxins" *Toxicon* 60 (2012) 1085-1107, Elsevier Ltd.

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

IVD <i>In vitro</i> diagnostic device Producto para diagnóstico <i>in vitro</i>	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

