

CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA



Kit de ELISA indirecto para la detección en forma combinada y simultánea de anticuerpos IgM e IgG anti Escherichia coli O157, O145, O121 y O103 en muestras de suero humano.

Indirect ELISA kit for the combined and simultaneous detection of IgM and IgG antibodies against Escherichia coli O157, O145, O121 and O103 in human serum.



Elisa



Humano

 Chemtest S.A.

Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.
info@chemtest.net - chemtest.net

CHEMLIS®
E. coli Combi Glyco-iELISA

Contenido

<i>Microplaca de análisis</i>	Microplacas de 96 pocillos recubiertas con los antígenos, selladas y almacenadas en seco	4 microplacas (18 muestras por duplicado o 36 por simplificado)
<i>Conjugado anti-IgM</i>	Liofilizado (anticuerpos anti-IgM humana conjugados con peroxidasa de rábano)	2 unidades
<i>Conjugado anti-IgG</i>	Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano)	2 unidades
<i>Solución sustrato-cromógeno</i>	Lista para usar [3,3',5,5'-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)] – CONSERVAR EN OSCURIDAD	1 x 60 ml
<i>Solución de frenado</i>	Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO	1 x 60 ml
<i>Solución de lavado</i>	Concentrada 10X	1 x 120 ml, 10X (c. s. p. 1,2 litros)
<i>Diluyente de muestra</i>	Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 120 ml
<i>Control positivo O157</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,03 ml
<i>Control positivo O145</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,03 ml
<i>Control positivo O121</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,03 ml
<i>Control positivo O103</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,03 ml
<i>Control negativo</i>	Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timmerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0,01%]	1 x 0,10 ml
<i>Manual de instrucciones</i>		1

Nombre y aplicación

CHEMLIS®

E. coli Combi Glyco-iELISA

Kit de ELISA indirecto para la detección en forma combinada y simultánea de anticuerpos IgM e IgG anti Escherichia coli O157, O145, O121 y O103 en muestras de suero humano.

El kit CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA es un kit de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirecto para la detección en forma combinada y simultánea de anticuerpos IgM e IgG específicos contra el polisacárido O del lipopolisacárido (LPS) de Escherichia coli O157, O145, O121 y O103 en muestras de suero humano. Gracias a la incorporación de la exclusiva tecnología GlycoEng, el kit posee un excelente desempeño diagnóstico, minimiza las reacciones cruzadas con otras bacterias Gram-negativas y es el primer ensayo seroespecífico para O157, O145, O121 y O103 que permite diferenciar la infección producida por estos serogrupos de E. coli de aquellas ocasionadas por otros serogrupos.

Introducción

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno importante transmitido por alimentos asociado con casos esporádicos y brotes de diarrea, diarrea sanguinolenta (DS) y síndrome urémico hemolítico (SUH), un trastorno caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. El SUH asociado a diarrea es causado principalmente por serotipos particulares de STEC. Las cepas de STEC se caracterizan por la producción de las toxinas Shiga, Shiga 1 (Stx1) y/o Shiga 2 (Stx2), y la producción de estas toxinas es esencial en la patogénesis de la DS y el SUH. E. coli O157: H7 es el serotipo STEC dominante asociado a casos esporádicos y brotes de DS y SUH en

diferentes partes del mundo; sin embargo, otros serogrupos STEC no-O157 como O145, O121 y O103, entre otros, pueden causar una enfermedad similar.

El SUH asociado a STEC es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños en todo el mundo y representa el 90% de todos los casos de SUH en esta población. Entre el 5 y 10% de los niños con infección por STEC desarrollan SUH. La tasa de incidencia de SUH postdiarreico varía según el país y Argentina tiene la incidencia más alta en todo el mundo con 12-14 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años, por año. Esta incidencia es diez veces más alta que en otros países industrializados y representa más de 400 casos nuevos de SUH por año con una tasa de mortalidad de 2 a 5%. En Argentina, el SUH es endémico y constituye una de las principales causas de insuficiencia renal aguda en niños. El 70% de los casos es causado por STEC O157, el 12% por O145, 1,8% por O121 y aproximadamente un 2% por STEC O103. Un porcentaje elevado de estos niños (20-30%) presentan secuelas renales a largo plazo lo que determina que esta enfermedad sea una causa muy importante de falla renal crónica y la sexta causa de trasplantes renales en adolescentes y la novena causa en el total de la población de pacientes trasplantados.

El diagnóstico de infección por STEC se basa en el aislamiento y caracterización de la cepa STEC, y la detección de toxina Shiga libre (Stx1 y/o Stx2) en materia fecal (FFStx). Sin embargo, con frecuencia se observan casos de SUH con aislamiento negativo y la prueba FFSTx negativa. Se ha demostrado que STEC se elimina rápidamente durante el pródromo diarreico y con frecuencia cesa antes del inicio del SUH; por estas razones, con frecuencia no se logra aislar el patógeno ni detectar sus toxinas. Como alternativa se han utilizado métodos de diagnóstico serológicos que permiten la detección de anticuerpos contra el LPS de las cepas STEC. Todos estos ensayos serológicos

disponibles usan como antígeno la bacteria inactivada, extractos bacterianos que contienen altas concentraciones de LPS o LPS purificado. En consecuencia, presentan una tasa de reacciones falso positivas muy elevada debido a la presencia de anticuerpos dirigidos contra epitopes compartidos por diferentes cepas STEC y otras bacterias, presentes en el lípido A y el core del LPS.

Los métodos bacteriológicos solos o en combinación con las pruebas de detección de las toxinas Shiga en materia fecal proporcionan evidencia de infección por STEC solo en el 20 a 50% de los niños con diagnóstico clínico de SUH. La combinación de las técnicas bacteriológicas y/o de detección de Shiga toxinas con el análisis serológico mediante el kit CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA permite elevar drásticamente la eficacia diagnóstica en pacientes con infecciones por STEC (Boletín Integrado de Vigilancia, N° 329 - SE 39 - Septiembre de 2016. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Ministerio de Salud - Presidencia de la Nación. ISSN 2422-698X). La tecnología exclusiva GlycoEng incorporada en el kit CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA le confiere máxima especificidad y sensibilidad para la detección de anticuerpos IgM e IgG anti-O157, O145, O121 y O103 en suero. Esto permite diferenciar las infecciones producidas por E. coli O157, O145, O121 y O103 de aquellas ocasionadas por otros serogrupos de E. coli relevantes como agentes causales de SUH.

Principio de la técnica

El kit CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA es el primer ensayo inmunoenzimático indirecto en fase sólida basado exclusivamente en la detección de anticuerpos IgM e IgG anti-polisacárido O de E. coli O157, O145, O121 y O103. Un resultado positivo para alguno de los serogrupos indica la presencia de anticuerpos anti el polisacárido O correspondiente. Estos anticuerpos constituyen un excelente

marcador específico de infección por E. coli O157, O145, O121 y/o O103 lo que permite confirmar el diagnóstico de la infección eliminando el riesgo de reacciones falso-positivas debido a reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos dirigidos contra epitopes comunes presentes en el lípido A y el core oligosacárido del LPS de otras bacterias Gram-negativas u otros serogrupos de E. coli.

En este ensayo las muestras de suero son expuestas a pocillos recubiertos con el antígeno de E. coli O157, E. coli O145, E. coli O121 o E. coli O103 (glicoproteínas recombinantes purificadas). Si la muestra contiene anticuerpos anti-polisacárido O, estos se unen al antígeno correspondiente en el pocillo. Al añadir los anticuerpos anti-IgM o anti-IgG humana conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), se forma un complejo con los anticuerpos IgM o IgG unidos al pocillo. El material libre es eliminado mediante lavados antes de agregar la solución sustrato-cromógeno. El color azul que aparece es el producto de la reacción del sustrato-cromógeno con el conjugado en aquellas muestras que resulten positivas. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra que reaccionan con el antígeno. Cuanto mayor es el título de anticuerpos presentes en la muestra, más intenso es el desarrollo de color en los pocillos de ensayo. La reacción se detiene mediante el agregado de la solución de frenado y se observa un cambio de color al amarillo. La lectura de los resultados se realiza en un espectrofotómetro de microplacas midiendo la absorbancia (Abs) a 450 nm.

Componentes del kit

- Microplaca de análisis
Microplacas de 96 pocillos recubiertas con los antígenos, selladas y almacenadas en seco.
- Solución de lavado
Concentrada 10X.
- Conjugado anti-IgM

Liofilizado (anticuerpos anti-IgM humana conjugados con peroxidasa de rábano).

-Conjugado anti-IgG

Liofilizado (anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa de rábano).

-Solución sustrato-cromógeno

Lista para usar [3,3,5,5-Tetrametilbencidina en solución de sustrato con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)] - CONSERVAR EN OSCURIDAD.

-Solución de frenado

Lista para usar (contiene ácido clorhídrico 1%) - CORROSIVO.

-Diluyente de muestra

Para reconstituir - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0,01%].

-Control positivo O157

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0,01%].

-Control positivo O145

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0,01%].

-Control positivo O121

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0,01%].

-Control positivo O103

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0,01%].

-Control negativo

Suero - CONTIENE CONSERVANTE [Timerosal (C₉H₉HgNaO₂S) 0,01%].

-Manual de instrucciones

Almacenamiento y vencimiento

Conservar a temperatura entre 2 y 8°C. Temperatura de transporte: 4 a 15°C hasta 72 horas. La conservación correcta de todos los componentes del kit permitirá el uso del mismo hasta la fecha de caducidad.

Vencimiento: 12 meses. No utilizar componentes de diferentes lotes o después de la fecha de vencimiento.

Materiales necesarios que no se suministran

-Pipeta multicanal y micropipetas (10, 100 y 1000 µl) de alta precisión.

-Contenedores para pipeta multicanal.

-Puntas de pipetas desechables.

-Lector de microplacas capaz de medir la absorbancia (Abs) a 450 nm.

-Agitador orbital.

-Cronómetro.

-Tubos para la dilución de los controles y muestras.

-Recipiente de 1 litro para preparación de solución de lavado.

-Agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

-Cobertor para microplacas (tapa, papel aluminio o film adhesivo).

Precauciones de uso

1. Leer atentamente y seguir todas las instrucciones de uso ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.

2. Conservar el kit y todos sus componentes a 2-8°C.

3. Antes de usar dejar que todos los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente (20-25°C), y colocar nuevamente a 2-8°C después de su uso.

4. Manipular todos los reactivos siguiendo la Buenas Prácticas de Laboratorio.

5. Las muestras de suero, como así también los controles positivo y negativo, deben considerarse potencialmente infecciosas y, por lo tanto, estas y los componentes del kit que las contactan deben manipularse con guantes y descartarse como residuo patológico según normativa legal vigente. La Solución de frenado contiene ácido clorhídrico (corrosivo). Su contacto con la piel genera irritación y debe manipularse con guantes. El resto de los componentes del kit no representan ningún riesgo potencial para la salud y el medio ambiente.

6. No usar el kit pasada la fecha de caducidad o si los componentes no fueron conservados en las condiciones indicadas arriba.

7. No mezclar componentes o manuales de instrucciones de kits de distintos lotes.

8. Manipule los componentes del kit con

cuidado para evitar la contaminación de los mismos.

9. Si se reutilizan los contenedores para pipeta multicanal, los mismos deben ser lavados de forma exhaustiva con agua de alta calidad e identificados para ser reutilizados con la misma solución.

10. Usar puntas de pipetas distintas para cada reactivo y para cada muestra.

11. Incluir los controles positivo y negativo, y el blanco de muestra al menos por duplicado en cada serie de análisis.

12. Para la reconstitución de los reactivos usar solamente agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I).

Preparación de reactivos para una microplaca de análisis (según esquema de la Figura 1)

a. Solución de lavado 1X

Llevar la Solución de lavado concentrada 10X a temperatura ambiente (20- 25°C) y agitar muy bien para garantizar la completa disolución de posibles precipitados.

La Solución de lavado concentrada 10X debe diluirse 1/10 con agua destilada (Tipo II) o ultrapura (Tipo I); por ejemplo, agregando 30 ml de Solución de lavado 10X a 270 ml de agua (cantidad suficiente de Solución de lavado 1X para procesar una microplaca: 20 ml para reconstituir los conjugados IgM e IgG, 120 ml para reconstituir el Diluyente de muestra y el resto para los lavados). Mezclar muy bien antes de usar. Una vez preparada, la Solución de lavado 1X se puede conservar a 2-8°C durante 7 días.

b. Conjugados

Reconstituir cada conjugado liofilizado añadiendo 10 ml (por frasco) de la Solución de lavado 1X preparada previamente (ver ítem anterior). Añadir la solución de lavado cuidadosamente. Dejar reposar el frasco un minuto y mezclar muy bien. Preparar inmediatamente antes de usar.

Para una mayor exactitud, se recomienda pipetear los 10 ml utilizando dos marcas de calibración de la pipeta (por ejemplo: pipeteando dos veces de cero a 5 ml, o una vez de la posición -1 a 9 de la pipeta).

La solución de conjugado sobrante se puede alicuotar en tubos tipo eppendorf y conservar a -20°C (no se puede conservar en el refrigerador) durante un tiempo máximo de 30 días. En este período de tiempo cada alícuota se puede congelar y descongelar una sola vez.

c. Diluyente de muestra

Reconstituir el Diluyente de muestra agregando la Solución de lavado 1X preparada previamente hasta el nivel indicado en el frasco correspondiente y mezclar muy bien hasta lograr una completa disolución. Preparar inmediatamente antes de usar.

El Diluyente de muestra remanente se puede conservar en el refrigerador (2 a 8°C) hasta 3 meses o a -20°C durante un año. Antes de usar, descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y mezclar muy bien hasta completa disolución.

Preparación de los controles para una microplaca de análisis (96 reacciones)

Para una microplaca según Opción 1 o para dos microplacas según Opción 2 (ver Figura 1).

a. Controles positivos (CP)

Controles positivos para O157, O121 y O103. Se utiliza la misma dilución del CP para la determinación de IgM e IgG. En tubos de 1,5 ml agregar 5 µl de cada CP a 500 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:100).

Control positivo para O145. Se utiliza una dilución 1:100 para la determinación de IgM y una dilución 1:1000 para IgG.

-CPO145 para IgM: agregar 5 µl de CPO145 a 500 µl de Diluyente de muestra (dilución, 1:100). Mezclar muy bien.

-CPO145 para IgG: agregar 50 µl de la

dilución 1:100 de CPO145 preparado previamente para IgM a 450 µl de Diluyente de muestra (dilución final: 1:1.000).

Mezclar muy bien antes de usar. En cada microplaca cada control positivo se ensaya por duplicado (100 µl por pocillo) según el esquema de la Figura 1.

b. Control negativo (CN)

Se utiliza el mismo CN para todos los serogrupos tanto para la determinación de anticuerpos IgM como IgG.

En tubos de 2 ml (o más) agregar 20 µl del CN a 2.000 µl de Diluyente de muestra (dilución 1:100). Mezclar bien antes de usar. En cada placa el control negativo se ensaya por duplicado (100 µl por pocillo) para IgM e IgG y para cada antígeno según el esquema de la Figura 1.

c. Blanco de muestra (BM)

En cada placa se debe agregar un blanco de muestra (BM) constituido por el Diluyente de muestra. Dispensar directamente y por duplicado 100 µl por pocillo del Diluyente de muestra.

Preparación de las muestras

Para una microplaca según Opción 1 o para dos microplacas según Opción 2 (ver Figura 1).

Serogrupos O157, O145 y O121: las muestras de suero deben diluirse 1:100 utilizando el Diluyente de muestra. Por ejemplo, agregar 10 µl de suero a 1.000 µl de Diluyente de muestra (para análisis por simplificado) o 20 µl en 2000 µl (análisis por duplicado). Se utilizan 100 µl de muestra diluida por pocillo.

Serogrupo O103: las muestras de suero deben diluirse 1:400 utilizando el Diluyente de muestra. Por ejemplo, agregar 2,5 µl de suero a 1.000 µl de Diluyente de muestra (análisis por simplificado) o 5 µl en 2.000 µl (análisis por duplicado). Se utilizan 100 µl de muestra diluida por pocillo.

Notas:

-Pueden analizarse sueros frescos, refrigerados o congelados, libres de turbidez. Las muestras se pue-

den guardar en heladera durante 1 o 2 días. Para una conservación más prolongada, las muestras se deben conservar a -20°C y, en estos casos, se deben descongelar totalmente, llevar a temperatura ambiente y homogeneizar antes de realizar el análisis.

-Se recomienda analizar las muestras por duplicado.

-Las muestras contaminadas y/o en mal estado pueden producir resultados erróneos.

Instrucciones de uso

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20-25°C). No retirar la placa de su envoltorio hasta que la misma haya alcanzado la temperatura ambiente.

Nota: una vez abierto el envoltorio original de la placa los strips se pueden conservar en la bolsa de polietileno hemáticamente cerrada y en el refrigerador (2-8°C) hasta 30 días.

2. Agregar por duplicado 100 µl por pocillo de los controles positivos, control negativo y blanco de muestra según el esquema de la Figura 1. Ver ítem-Preparación de los controles.

3. Agregar 100 µl por pocillo de cada muestra de suero según el esquema de la Figura 1. Ver ítem-Preparación de las muestras.

4. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

5. Lavar 4 veces con 200 µl de Solución de lavado 1X por pocillo. Ver ítem Preparación de reactivos.

Nota: Retirar el líquido completamente después de cada lavado por volcado y golpeando la placa sobre material absorbente o aspiración con pipeta. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de agregar el reactivo siguiente.

6. Agregar 100 µl del Conjugado correspondiente a cada pocillo según el esquema de la Figura 1. Ver ítem-Preparación del conjugado. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente (20-25°C) con agitación orbital suave durante 1 hora.

7. Repetir el paso 5.

8. Agregar 100 µl de Solución sustrato-cromógeno en cada pocillo e incu-

bar con agitación orbital suave durante 10 minutos (± 1 minuto) a temperatura ambiente (20-25°C) y en oscuridad (por ejemplo, cubrir la placa con papel aluminio). Comenzar a contar el tiempo luego de llenar el primer pocillo.

9. Detener la reacción agregando 100 μ l de Solución de frenado en cada pocillo y mezclar cuidadosamente aplicando ligeros golpes en los bordes de la placa. La Solución de frenado debe agregarse en el mismo orden y velocidad que la Solución sustrato-cromógeno (ver paso 8).

10. Medir la absorbancia a 450 nm utilizando un espectrofotómetro de placas. No es necesario realizar una lectura de blanco. Realizar la lectura dentro de los 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

Nota: muestras con altos valores de reactividad pueden dar lugar a la aparición de un precipitado del color negro debido a la precipitación del sustrato.

Cálculos

Expresión de los resultados

Los resultados se expresan como porcentaje de reactividad (PR) con respecto al control positivo incluido en cada ensayo ($PR_{CP} = 100\%$). Los valores de absorbancia medidos a 450 nm (Abs_{450}) de cada muestra y del control negativo (CN) se relacionan con el valor de Abs_{450} del control positivo (CP) de la siguiente forma:

<u>Determinación de anticuerpos IgM</u>	
$PR (CN-X_{IgM}) = \frac{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CN-}X_{IgM}}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP-}X_{IgM}} \times 100$	
$PR (Mtran-X_{IgM}) = \frac{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ Mtran-}X_{IgM}}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP-}X_{IgM}} \times 100$	

Mtra, muestra.

n, número de muestra.

X, serogrupo: O157, O145, O121 u O103.

<u>Determinación de anticuerpos IgG</u>	
$PR (CN-X_{IgG}) = \frac{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CN-}X_{IgG}}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP-}X_{IgG}} \times 100$	
$PR (Mtran-X_{IgG}) = \frac{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ Mtran-}X_{IgG}}{\text{Promedio } Abs_{450} \text{ CP-}X_{IgG}} \times 100$	

Mtra, muestra.

n, número de muestra.

X, serogrupo: O157, O145, O121 u O103.

Ejemplo

En la siguiente tabla se muestra un ejemplo de los cálculos para el serogrupo O157 para la determinación de anticuerpos IgM:

	Abs ₄₅₀ IgM O157	PR IgM O157
Muestra 1	1,20	= (1,2/1,15) x 100 = 104,3%
Muestra 2	0,11	= (0,11/1,15) x 100 = 9,6%
CP O157	1,15	
CN O157	0,06	
BM	0,05	

Criterios de validez de la prueba

Para confirmar la validez del ensayo de detección de anticuerpos IgM deben cumplirse los siguientes criterios:

Sero-grupo	Abs ₄₅₀ CP (*)	Abs ₄₅₀ CN	Abs ₄₅₀ BM	Abs ₄₅₀ CP / Abs ₄₅₀ CN
O157	> 0,9	< 0,1	< 0,1	> 9
O145	> 0,6	< 0,1	< 0,1	> 6
O121	> 0,8	< 0,1	< 0,1	> 8
O103	> 0,6	< 0,1	< 0,1	> 6

(*)En todos los casos considerar el valor promedio de la Abs.

Para confirmar la validez del ensayo de detección de anticuerpos IgG deben cumplirse los siguientes criterios:

Sero-grupo	Abs ₄₅₀ CP (*)	Abs ₄₅₀ CN	Abs ₄₅₀ BM	Abs ₄₅₀ CP / Abs ₄₅₀ CN
O157	> 1,3	< 0,2	< 0,1	> 6,5
O145	> 1,0	< 0,1	< 0,1	> 10
O121	> 1,8	< 0,2	< 0,1	> 9
O103	> 0,9	< 0,2	< 0,1	> 4,5

(*)En todos los casos considerar el valor promedio de la Abs.

-En todos los casos los valores de Abs₄₅₀ de los duplicados de los controles (CP y CN) y las muestras no deben diferir en más del 20% con respecto al promedio del duplicado.

-Si no se cumple alguno de estos criterios, la prueba no se puede considerar válida. En este caso la prueba debe repetirse ajustándose estrictamente al procedimiento detallado en el manual de instrucciones incluido en el kit.

Interpretación de los resultados

Los resultados de las muestras deben interpretarse como se indica en la Tabla 1.

En caso de obtener un resultado "indeterminado" o cercano al valor de corte (para O121 IgG), la prueba se debe repetir con la misma muestra. Además, se recomienda ensayar una o más muestras obtenidas en los días subsiguientes.

Sensibilidad y especificidad diagnóstica

Para determinar la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) diagnóstica del ensayo, se analizaron más de 150 muestras de suero obtenidas de niños menores de 12 años de edad. El grupo de muestras positivas incluyó muestras de pacientes con diagnóstico clínico de Diarrea Sanguinolenta (DS) o Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y aislamiento positivo para STEC O157, STEC O145, STEC O121 o STEC O103. El grupo de muestras negativas incluyó muestras obtenidas de niños sanos o con patologías no relacionadas del mismo grupo etario.

A partir de los resultados obtenidos con estas muestras se realizó un ensayo por curvas ROC (receiver-operating-analy-

sis). Este análisis permitió determinar el valor de corte que maximiza simultáneamente la Se y Sp, el valor de corte para el cual la Se es 100% y el punto de corte para alcanzar una Sp del 100% (ver Tabla 2).

Para O103 los valores de corte se calcularon en base a la media y el desvío estándar de los valores de reactividad de las muestras negativas (muestras obtenidas de niños menores de 12 años de edad sanos o con patologías no relacionadas) (ver Tabla 2).

Referencias

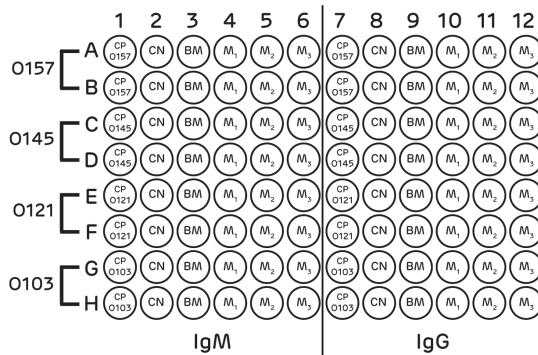
-Luciano J. Melli, Andrés E. Ciocchini, Ana J. Caillava; Nicolás Voza, Isabel Chinen, Marta Rivas, Mario F. Feldman, Juan E. Ugalde and Diego J. Comerc. Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli-associated hemolytic uremic syndrome. J Clin Microbiol. 2015 Feb;53(2):528-38.

-Boletín Integrado de Vigilancia, N° 329 - SE 39 - Septiembre de 2016. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Ministerio de Salud - Presidencia de la Nación. ISSN 2422-698X.

Para asistencia técnica

Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)
 info@chemtest.net
 chemtest.net

Opción 1: análisis de una microplaca.



Opción 2: análisis de dos microplacas.

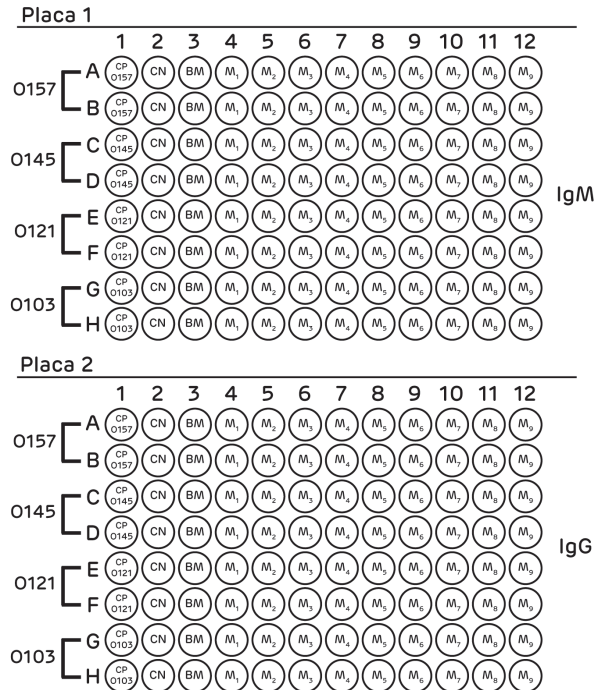


Figura 1. Esquema de las placas de ELISA para la determinación de anticuerpos IgM e IgG. Opción 1: esquema propuesto para el análisis de una microplaca (permite analizar como máximo 3 muestras por duplicado o 6 muestras por simplificado). Opción 2: esquema propuesto para el análisis de dos microplacas (permite analizar como máximo 9 muestras por duplicado o 18 muestras por simplificado). Se indica la posición de siembra de los controles positivos para cada serogrupo (CP₀₁₅₇, CP₀₁₄₅, CP₀₁₂₁ y CP₀₁₀₃), control negativo (CN) y blanco de muestra (BM). El resto de las posiciones quedan disponibles para el análisis de las muestras (M).

Tabla 1. Interpretación de los resultados.

Serogrupo O157

Determinación de anticuerpos IgM Suero (dilución 1:100)	
PR	Interpretación
≤ 24%	No reactivo
> 24% a < 43%	Indeterminado
≥ 43%	Reactivo

Determinación de anticuerpos IgG Suero (dilución 1:100)	
PR	Interpretación
≤ 47%	No reactivo
> 47% a < 60%	Indeterminado
≥ 60%	Reactivo

Serogrupo O145

Determinación de anticuerpos IgM Suero (dilución 1:100)	
PR	Interpretación
≤ 18%	No reactivo
> 18% a < 46%	Indeterminado
≥ 46%	Reactivo

Determinación de anticuerpos IgG Suero (dilución 1:100)	
PR	Interpretación
≤ 23%	No reactivo
> 23% a < 41%	Indeterminado
≥ 41%	Reactivo

Serogrupo O121

Determinación de anticuerpos IgM Suero (dilución 1:100)	
PR	Interpretación
≤ 25%	No reactivo
> 25% a < 40%	Indeterminado
≥ 40%	Reactivo

Determinación de anticuerpos IgG Suero (dilución 1:100)	
PR	Interpretación
≤ 44%	No reactivo
> 44%	Reactivo

Serogrupo O103

Determinación de anticuerpos IgM Suero (dilución 1:400)	
PR	Interpretación
≤ 16%	No reactivo
> 16% a < 40%	Indeterminado
≥ 40%	Reactivo

Determinación de anticuerpos IgG Suero (dilución 1:400)	
PR	Interpretación
≤ 50%	No reactivo
> 50% a < 80%	Indeterminado
≥ 80%	Reactivo

Tabla 2. Sensibilidad, especificidad e índice de Youden de los ensayos para distintos valores de corte seleccionados.

Serogrupo O157				
Glyco-iELISA	Valor de corte (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
IgM	> 24	100 (91,0 - 100)	94,6 (86,7 - 98,5)	0,946
	> 43	92,3 (79,1 - 98,4)	100 (95,1 - 100)	0,923
IgG	> 47	100 (91,0 - 100)	95,9 (88,6 - 99,2)	0,956
	> 60	94,9 (82,7 - 99,4)	100 (95,1 - 100)	0,949
Serogrupo O145				
Glyco-iELISA	Valor de corte (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
IgM	> 18	100 (87,2 - 100)	98,6 (92,7 - 100)	0,986
	> 46	85,2 (66,3 - 95,8)	100 (95,1 - 100)	0,852
IgG	> 23	100 (87,2 - 100)	82,4 (71,8 - 90,3)	0,824
	> 41	96,3 (81,0 - 99,9)	100 (95,1 - 100)	0,963
Serogrupo O121				
Glyco-iELISA	Valor de corte (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
IgM	> 25	100 (66,4 - 100)	97,3 (90,6 - 99,7)	0,973
	> 40	88,9 (51,8 - 99,7)	100 (95,1 - 100)	0,889
IgG	> 44	100 (66,4 - 100)	100 (95,1 - 100)	1,000
Serogrupo O103				
Glyco-iELISA	Valor de corte (PR) ^a	Se (%) ^b	Sp (%) ^b	J ^c
IgM	> 16	100 (87,2 - 100)	96,3 (87,2 - 99,5)	0,963
	> 40	66,7 (9,4 - 99,2)	100 (93,3 - 100)	0,667
IgG	> 50	100 (29,2 - 100)	96,3 (87,2 - 99,5)	0,963
	> 80	66,7 (9,3 - 99,3)	100 (93,4 - 100)	0,667

(a) PR, porcentaje de reactividad. (b) Se, sensibilidad (TP/TP+FN) x100; Sp, especificidad (TN/TN+FP) x100. Los valores entre paréntesis indican el intervalo de 95% de confianza. TP, positivo verdadero; TN, negativo verdadero; FP, falso positivo; FN, false negativo. (c) J, índice de Youden (Se+Sp-1).

CHEMLIS®
E. coli Combi Glyco-iELISA

Kit components

<i>Microplate</i>	96-well microtitre plate coated with the antigens, sealed and stored dry	4 microplates (18 samples in duplicate or 36 in single well)
<i>Conjugate anti-IgM</i>	Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgM antibodies)	2 units
<i>Conjugate anti-IgG</i>	Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies)	2 units
<i>Substrate-chromogen solution</i>	Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)]- STORE IN THE DARK	1 x 60 ml
<i>Stop solution</i>	Ready to use (contains HCl 1%) – CORROSIVE	1 x 60 ml
<i>Wash solution</i>	10X concentrated	1 x 120 ml, 10X (sufficient for 1.2 litros)
<i>Sample diluent</i>	To reconstitute - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%].	1 x 120 ml
<i>Positive control O157</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.03 ml
<i>Positive control O145</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.03 ml
<i>Positive control O121</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.03 ml
<i>Positive control O103</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.03 ml
<i>Negative control</i>	Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal (C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S) 0.01%]	1 x 0.10 ml
<i>Instruction manual</i>		1

Name and application

CHEMLIS®

E. coli Combi Glyco-iELISA

Indirect ELISA kit for the combined and simultaneous detection of IgM and IgG antibodies against *Escherichia coli* O157, O145, O121 and O103 in human serum.

CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA is an indirect ELISA kit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the detection of IgM and IgG specific antibodies against the O polysaccharide of the lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* O157, O145, O121 and O103 lipopolysaccharide (LPS) in human serum. Thanks to its exclusive **GlycoEng** technology, the kit has an excellent diagnostic performance, minimizes cross-reaction with other Gram-negative bacteria and it is the first serospecific assay that allows to differentiate O157, O145, O121 and O103 *E. coli* infections from those caused by other *E. coli* serogroups.

Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an important foodborne pathogen associated with sporadic cases and outbreaks of diarrhea, bloody diarrhea (BD) and hemolytic uremic syndrome (HUS), a disorder characterized by microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure. Diarrhea associated HUS is caused mainly by particular STEC serotypes. STEC strains are characterized by the production of Shiga toxins, Shiga 1 (Stx1) and/or Shiga 2 (Stx2), and the production of these toxins is essential in the pathogenesis of BD and HUS. *E. coli* O157: H7 is the dominant STEC serotype associated with sporadic cases and outbreaks of BD and HUS in different parts of the world; however, other STEC non-O157 serogroups such as O145, O121 and O103, among others, can

cause a similar disease.

STEC associated HUS is the most common cause of acute renal failure in children worldwide and accounts for 90% of all cases of HUS in this population. Between 5 and 10 percent of children with a STEC infection develop HUS. The incidence rate of post-diarrheal HUS varies according to the country and Argentina shows the highest incidence worldwide with 12-14 cases per 100,000 children less than 5 years of age per year. This incidence rate is ten times higher than in other industrialized countries with more than 400 new cases of HUS per year and a mortality rate of 2 to 5%. In Argentina, HUS is endemic and constitutes one of the main causes of acute renal failure in children. In this country, more than 70% of cases are caused by STEC O157, 12% by O145, 1.8% by O121 and approximately 2% by STEC O103. A high percentage of these children (20 - 30%) have long-term renal sequelae, which determine that this disease is a very important cause of chronic renal failure and the sixth cause of renal transplants in adolescents and the ninth cause in the entire population of transplanted patients.

The diagnosis of STEC infections is based on the isolation and characterization of STEC strains, and the detection of free fecal Shiga toxin (FFStx). However, cases of HUS without STEC isolation and negative FFSTx are frequently observed. It has been shown that STEC is shed rapidly during the diarrheal prodrome and often ceases before the onset of HUS, with the consequence that the detection of the pathogen or its toxins results extremely difficult, if not impossible. For these reasons, alternative laboratory diagnostic methods have been used such as the detection of antibodies against the LPS of STEC strains. All available serologic tests use inactivated bacteria, bacterial extracts that contain high concentrations of LPS or purified LPS as antigen. Consequently, these assays show high rates of false positive reactions due to the pres-

ence of antibodies directed against epitopes present in the lipid A and the core of LPS shared by different STEC strains as well as other bacteria.

Bacteriological methods, alone or in combination with tests for the detection of Shiga toxins in stool samples, provide evidence of STEC infection in only 20 to 50% of children with a clinical diagnosis of HUS. The combination of bacteriological and/or Shiga toxins detection techniques with the serological analysis using the CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA kit allows to drastically increase the diagnostic efficiency in patients with STEC infections (Boletín Integrado de Vigilancia, N° 329 - SE 39 - Septiembre de 2016. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Ministerio de Salud - Presidencia de la Nación. ISSN 2422-698X). The exclusive GlycoEng technology incorporated in the CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA kit confers maximum specificity and sensitivity for the detection of anti-O157, O145, O121 and O103 antibodies in serum. This makes possible to differentiate the infections caused by E. coli O157, O145, O121 and O103 from those caused by other E. coli serogroups relevant as causative agents of HUS.

Principles of the technique

CHEMLIS® E. coli Combi Glyco-iELISA kit is the first indirect solid phase enzyme immunoassay based exclusively on the detection of IgM and IgG specific antibodies against the O polysaccharide of E. coli O157, O145, O121 and O103. A positive result for one of the serogroups indicates the presence of antibodies against the corresponding O polysaccharide. These antibodies are an excellent specific marker of E. coli O157, O145, O121 and/or O103 infection which can confirm the diagnosis of infection by eliminating the risk of false-positive cross-reactions due to the presence of antibodies directed against common epitopes present in the lipid A and the core of the LPS of other Gram-negative bacteria and oth-

er E. coli serogroups.

In this assay, serum samples are exposed to the wells coated with the E. coli O157, E. coli O145, E. coli O121 or E. coli O103 antigens (purified recombinant glycoproteins). If the sample contains anti-O polysaccharide antibodies, they bind to the corresponding antigen in the well. Upon addition of the horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, a complex is formed with the IgM or IgG antibodies attached to the antigen in the well. Free antibodies are removed by washing before adding the substrate-chromogen solution. The blue color that appears is the product of the reaction of the substrate-chromogen with the conjugate in those samples that are positive. The color intensity is directly proportional to the amount of antibodies present in the sample reacting with the antigen. The higher the antibody titer present in the sample, the more intense color develops in the test wells. Adding the stop solution, upon which a color change to yellow is observed, stops the reaction. The results are measured in a microplate spectrophotometer determining the absorbance (Abs) at 450 nm.

Kit components

-Microplate

96-well microtitre plate coated with the antigens, sealed and stored dry. Each plate is functionalized with the four antigens distributed in different wells.

-Wash solution

10X concentrated.

-Conjugate anti-IgM

Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgM antibodies).

-Conjugate anti-IgG

Lyophilized (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG antibodies).

-Substrate-chromogen solution

Ready to use [3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in substrate buffer containing hydrogen peroxide (H₂O₂)]- STORE IN THE DARK.

-Stop solution

Ready to use (contains HCl 1%) – CORROSIVE.

-Sample diluent

To reconstitute - CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Positive Control O157

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Positive Control O145

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Positive Control O121

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Positive Control O103

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Negative Control

Serum – CONTAINS PRESERVATIVE [Thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) 0.01%].

-Instruction manual

Storage and expiration

Store at room temperature between 2 and 8°C. Transport temperature: 4 to 15°C for 72 hours. Proper storage of the kit and all reagents will allow the use until the expiration date.

Expiration: 12 months. Do not use reagents from different lots or after the expiration date.

Materials needed but not provided

-High precision multichannel pipette and micropipettes (10, 100 and 1000 μ l).

-Containers for multichannel pipette.

-Disposable pipette tips.

-Microplate reader for absorbance determination at 450 nm.

-Orbital rotator.

-Timer.

-Tubes for the dilutions of the controls and samples.

-1 liter container for the preparation of the wash solution.

-Distilled water (Type II) or ultrapure water (Type I).

-Microplate covers (lid, aluminium foil or adhesive).

Precautions

1. Carefully read and strictly follow all instructions detailed in the leaflet included in the kit.

2. Store the kit and all reagents at 2-8 °C.

3. All reagents should equilibrate at room temperature (20-25°C) before use, and return to 2-8 °C following use.

4. Handle all materials and reagents according to the Good Laboratory Practices.

5. Serum samples, as well as positive and negative controls, should be considered potentially infectious and, therefore, the kit components that contact them should be handled with gloves and disposed as pathological waste according to legal regulations. The stop solution contains hydrochloric acid (corrosive). Skin contact generates irritation and should be handled with gloves. The rest of the kit components does not represent any potential risk for health and the environment.

6. Do not use the kit beyond expiration date or if the kit components were not kept in the conditions indicated above.

7. Do not mix components or instruction manuals from different test kits batches.

8. Care should be taken to avoid contamination of kit components.

9. If multichannel pipette containers are reused, they should be washed thoroughly with high quality water for reuse and identified to be used with the same solution.

10. Use different pipettes tips for each reagent and for each sample.

11. Include positive and negative controls, and the target sample in duplicate in each test.

12. For reconstitution of the reagents use only distilled water (Type II) or ultrapure water (Type I).

Preparation of reagents

a. Wash solution 1X

The 10X concentrated Wash solution should be brought to room temperature (20-25°C) and mixed to ensure dissolution of any precipitated salts.

The 10X concentrated Wash solution must be diluted 1/10 with distilled (Type II) or ultrapure (Type I) water; for example, adding 30 ml of 10X Wash solution to 270 ml of water (sufficient quantity of Wash solution 1X to process one microplate: 20 ml to reconstitute the IgM and IgG conjugates, 120 ml to reconstitute the Sample diluent and rest for the washes). Mix very well before using. Once prepared, the 1X Wash solution can be stored at 2-8°C for up to 7 days.

b. Conjugates

Reconstitute each conjugate by adding 10 ml (per flask) of 1X Wash solution previously prepared (see previous item). Add the Washing solution carefully. Allow to stand for a minute and mix well. Prepare immediately before use.

For greater accuracy it is recommended to pipet the 10 ml using two calibration marks of the pipette (for example: pipetting twice from zero to 5 ml, or once from position -1 to 9 of the pipette).

The remaining conjugate can be aliquoted in Eppendorf type tubes and stored at -20°C (cannot be stored in the refrigerator) for up to 30 days. During this period of time each aliquot can be thaw and re-frozen one time.

c. Sample diluent

Reconstitute the Sample diluent by adding the 1X Wash solution previously prepared (see previous item) up to the level indicated in the corresponding bottle (approximately 120 ml) and mix very well. Prepare immediately before use.

The remaining Sample diluent can be stored in the refrigerator (2 to 8°C) up to 3 months or at -20°C for a year. Thaw it completely, bring to room temperature and mix very well until complete dissolution before using.

Preparation of controls

For one microplate according to Option 1 or for two microplates according to Option 2 (see Figure 1).

a. Positive controls (PC)

Positive controls for O157, O121 and O103. The same dilution of the PC is used for the determination of IgM and IgG. In 1.5 ml tubes add 5 µl of each PC to 500 µl of Sample Diluent (1:100 dilution).

Positive control for O145. It is diluted 1:100 for the determination of IgM and 1:1000 for IgG.

-PC_{O145} for IgM: add 5 µl de PC_{O145} to 500 µl of Sample diluent (1:100 dilution). Mix very well.

-PC_{O145} for IgG: add 50 µl of the 1:100 dilution of the PC_{O145} previously prepared for IgM to 450 µl of the Sample diluent (final dilution: 1:1,000).

Mix very well before using. In each microplate all the positive controls are assayed in duplicate (100 µl per well) according to the scheme of Figure 1.

b. Negative control (NC)

In tubes of 2 ml (or more volume) add 20 µl of the NC to 2,000 µl of Sample diluent (1:100 dilution). Mix well before using. In each microplate the NC is assayed in duplicate (100 µl per well) for IgM and IgG, and for each antigen according to the scheme of Figure 1.

c. Sample blank (SB)

On each plate a sample blank consisting of Sample diluent should be added. Dispense directly and in duplicate 100 µl per well of Sample diluent according to the scheme of Figure 1.

Sample preparation

For one microplate according to Option 1 or for two microplates according to Option 2 (see Figure 1).

Serogroups O157, O145 and O121: serum

samples should be diluted 1:100 using the Sample diluent. For example, add 10 µl of serum to 1,000 µl of Sample diluent (for single analysis) or 20 µl in 2,000 µl (for analysis in duplicate). Use 100 µl of diluted sample per well.

Serogroup O103: serum samples should be diluted 1:400 using the Sample diluent. For example, add 2.5 µl of serum to 1,000 µl of Sample diluent (for single analysis) or 5 µl in 2,000 µl (for analysis in duplicate). Use 100 µl of diluted sample per well.

Notes:

- Fresh, chilled or frozen serum samples, free of turbidity, can be analyzed. Samples can be stored in a refrigerator for 1 or 2 days. For longer periods store at -20°C and, in these cases, the samples should be completely thawed, bringing them to room temperature, and homogenized before performing the analysis.
- It is recommended to analyze the samples at least in duplicate.
- Samples contaminated and/or not well conserved may produce erroneous results.

Instructions for the analysis

1. Allow the reagents equilibrate to room temperature (20-25°C). Do not remove the plate from its pouch until it has reached room temperature. If the entire plate is not used, separate only the 8-well strips needed to analyze the controls and samples. Store the rest of the strips, together with the desiccants, in the polyethylene bag with hermetic seal included in the kit and store it again in the refrigerator (2-8°C).

Note: once the original packaging of the plate has been opened, the strips can be kept in the closed polyethylene bag and in the refrigerator (2-8 °C) up to 30 days.

2. Add in duplicate 100 µl per well of the positive control, negative control and sample blank. See Item Preparation of controls.

3. Add 100 µl per well of each serum sample. See Item Sample preparation.

Note: samples can be processed in a single well or in duplicate. However, to obtain more reliable results it is recommended to run samples at least in duplicates.

4. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) with gentle orbital shaking for 1 hour.

5. Wash/rinse the plates 4 times with 200 µl of 1X Wash Solution per well. See item Reagents preparation.

Note: Remove the liquid completely after each washing by dump and tapping onto absorbent material or aspiration with pipette. Avoid plate drying between plate washings and before adding the next reagent.

6. Add 100 µl of Conjugate to each well. See item Preparation of the conjugate. Cover the plate and incubate at room temperature (20-25°C) with gentle orbital shaking for 1 hour.

7. Repeat step 5.

8. Add 100 µl of Substrate-chromogen solution to each well, and incubated with gentle orbital shaking for 10 minutes (\pm 1 min) at room temperature (20-25°C) and in the dark (for example, cover the plate with aluminum foil). Start counting the time after filling the first well.

9. Stop the reaction by adding 100 µl of Stop solution into each well and mix thoroughly by lightly tapping the edges of the plate. This solution must be added in the same order and speed as the Substrate-chromogen solution (see Step 8).

10. Measure the absorbance at 450 nm using a plate spectrophotometer. There is no need to perform a blank reading. Perform the reading within 15 minutes after adding the stop solution.

Note: samples with high reactivity values can lead to the appearance of a black precipitate due to the precipitation of the substrate.

Calculations

Expression of results

Results are expressed as the percentage of reactivity ($PR_{PC} = 100\%$) with respect to the positive control included in each test. The absorbance values measured at 450 nm (Abs450) of each sample and the negative control (NC) are related to the Abs450 value of the positive control (PC) as follows:

Determination of IgM antibodies

$$PR (NC-X_{IgM}) = \frac{\text{Average Abs}_{450} \text{ NC-X}_{IgM}}{\text{Average Abs}_{450} \text{ PC-X}_{IgM}} \times 100$$

$$PR (S_n-X_{IgM}) = \frac{\text{Average Abs}_{450} \text{ S}_n-X_{IgM}}{\text{Average Abs}_{450} \text{ PC-X}_{IgM}} \times 100$$

Determination of IgG antibodies

$$PR (NC-X_{IgG}) = \frac{\text{Average Abs}_{450} \text{ NC-X}_{IgG}}{\text{Average Abs}_{450} \text{ PC-X}_{IgG}} \times 100$$

$$PR (S_n-X_{IgG}) = \frac{\text{Average Abs}_{450} \text{ S}_n-X_{IgG}}{\text{Average Abs}_{450} \text{ PC-X}_{IgG}} \times 100$$

S, sample.

n, sample number.

X, serogroup: O157, O145, O121 or O103.

Example:

The following table show an example of calculation for serogroup O157 with possible results for the determination of IgM antibodies.

	Abs ₄₅₀ IgM O157	PR IgM O157
Sample 1	1.20	= (1.2/1.15) x 100 = 104.3%
Sample 2	0.11	= (0.11/1.15) x 100 = 9.6%
PC O157	1.15	
NC O157	0.06	
SB	0.05	

Validity criteria

To confirm the validity of the **IgM test** the following criteria must be met:

Sero-group	Abs ₄₅₀ PC (*)	Abs ₄₅₀ NC	Abs ₄₅₀ SB	Abs ₄₅₀ PC / Abs ₄₅₀ NC
O157	> 0,9	< 0,1	< 0,1	> 9
O145	> 0,6	< 0,1	< 0,1	> 6
O121	> 0,8	< 0,1	< 0,1	> 8
O103	> 0,6	< 0,1	< 0,1	> 6

(*) In all cases consider the average value of Abs.

To confirm the validity of the **IgG test** the following criteria must be met:

Sero-grupo	Abs ₄₅₀ CP (*)	Abs ₄₅₀ CN	Abs ₄₅₀ BM	Abs ₄₅₀ CP / Abs ₄₅₀ CN
O157	> 1,3	< 0,2	< 0,1	> 6,5
O145	> 1,0	< 0,1	< 0,1	> 10
O121	> 1,8	< 0,2	< 0,1	> 9
O103	> 0,9	< 0,2	< 0,1	> 4,5

(*) In all cases consider the average value of Abs.

-In all the cases, the Abs₄₅₀ values of the controls (PC and NC) and samples duplicate must not differ by more than 20% of the corresponding average.

-If any of these criteria is not fulfilled, the test is considered invalid. In this case, the test should be repeated strictly following the instructions detailed in the instruction manual included in the kit.

Interpretation of results

The test sample results should be interpreted as indicated in Table 1.

In the case of obtaining an "Indeterminate" result or near the cut-off value (for O121 IgG), the sample should be re-tested. If the result is still indeterminate, it is recommended to test one or more samples obtained in the following days. If with the new samples the results are still indeterminate, the clinical and epidemiological situation should be considered and the sample should be analyzed with other technique/s if available.

Diagnostic sensitivity and specificity

More than 150 serum samples obtained from children under 8 years of age were analyzed to determine the diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the assay. The group of positive samples included samples obtained from patients with clinical diagnosis of Bloody Diarrhea (BD) or Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) and a stool culture positive for STEC O157, STEC O145, STEC O121 or STEC O103. The group of negative samples included serum samples obtained

from healthy children or from patients with other non-related infectious diseases.

Based on these results, a ROC (receiver-operating-analysis) curve analysis was performed. This analysis allowed us to select the cut-off value that concurrently optimized the Se and Sp of the assay and the cut-off values for which a 100 % Se or Sp was achieved (see Table 2).

For O103 the cut-off values were calculated based on the mean and the standard deviation of the reactivity values of the negative samples (samples obtained from healthy children under 12 years of age or with unrelated pathologies) (see Table 2).

References

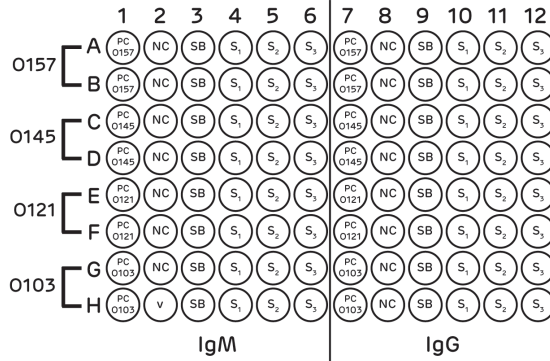
-Luciano J. Melli, Andrés E. Ciocchini, Ana J. Caillava; Nicolás Vozza, Isabel Chinen, Marta Rivas, Mario F. Feldman, Juan E. Ugalde and Diego J. Comerci. Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 2015 Feb;53(2):528-38.

-Boletín Integrado de Vigilancia, N° 329 - SE 39 - Septiembre de 2016. Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de la Situación de Salud. Ministerio de Salud - Presidencia de la Nación. ISSN 2422-698X.

For technical assistance

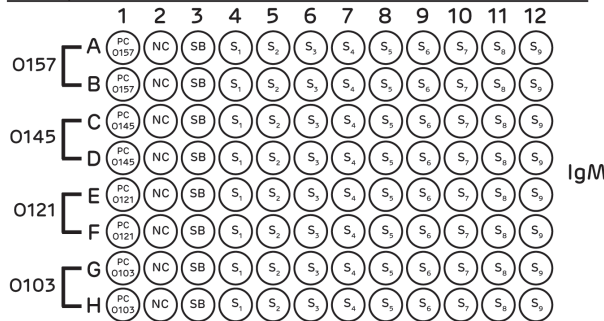
Tel: (54-11) 2033-1455 (Ext. 6028)
info@chemtest.net
chemtest.net

Option 1: analysis of one microplate.



Option 2: analysis of two microplates.

Microplate 1



Microplate 2

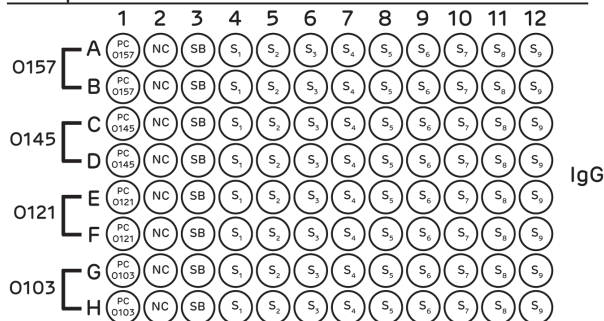


Figure 1. Scheme of the ELISA plates for the determination of IgM and IgG antibodies. Option 1: proposed scheme for the analysis of one microplate (allows to analyze a maximum of 3 samples in duplicate or 6 samples in single well). Option 2: proposed scheme for the analysis of two microplates (allows to analyze a maximum of 9 samples in duplicate or 18 samples in single well). The positions on the microplate for the positive control of each serogroup (PC₀₁₅₇, PC₀₁₄₅, PC₀₁₂₁ and PC₀₁₀₃), negative control (NC) and sample blank (SB) are indicated. The rest of the wells are available for the analysis of the serum samples (S).

Table 1. Interpretation of the results.

Serogroup O157

Determination of IgM antibodies Serum (dilution 1:100)	
PR	Interpretation
≤ 24%	Non Reactive
> 24% a < 43%	Indeterminate
≥ 43%	Reactive

Determination of IgG antibodies Serum (dilution 1:100)	
PR	Interpretation
≤ 47%	Non Reactive
> 47% a < 60%	Indeterminate
≥ 60%	Reactive

Serogroup O145

Determination of IgM antibodies Serum (dilution 1:100)	
PR	Interpretation
≤ 18%	Non Reactive
> 18% a < 46%	Indeterminate
≥ 46%	Reactive

Determination of IgG antibodies Serum (dilution 1:100)	
PR	Interpretation
≤ 23%	Non Reactive
> 23% a < 41%	Indeterminate
≥ 41%	Reactive

Serogroup O121

Determination of IgM antibodies Serum (dilution 1:100)	
PR	Interpretation
≤ 25%	Non Reactive
> 25% a < 40%	Indeterminate
≥ 40%	Reactive

Determination of IgG antibodies Serum (dilution 1:100)	
PR	Interpretation
≤ 44%	Non Reactive
> 44%	Reactive

Serogroup O103

Determination of IgM antibodies Serum (dilution 1:400)	
PR	Interpretation
≤ 16%	Non Reactive
> 16% a < 40%	Indeterminate
≥ 40%	Reactive

Determination of IgG antibodies Serum (dilution 1:400)	
PR	Interpretation
≤ 50%	Non Reactive
> 50% a < 80%	Indeterminate
≥ 80%	Reactive

Table 2. Sensitivity, specificity and Youden´s index of the assays for the selected cut-off values.

Serogroup O157				
Glyco-iELISA	Cut-off value (PR)^a	Se (%)^b	Sp (%)^b	J^c
IgM				
	> 24	100 (91.0 - 100)	94.6 (86.7 – 98.5)	0.946
	> 43	92.3 (79.1 – 98.4)	100 (95.1 - 100)	0.923
IgG				
	> 47	100 (91.0 - 100)	95.9 (88.6 – 99.2)	0.956
	> 60	94.9 (82.7 – 99.4)	100 (95.1 - 100)	0.949
Serogroup O145				
Glyco-iELISA	Cut-off value (PR)^a	Se (%)^b	Sp (%)^b	J^c
IgM				
	> 18	100 (87.2 - 100)	98.6 (92.7 – 100)	0.986
	> 46	85.2 (66.3 – 95.8)	100 (95.1 - 100)	0.852
IgG				
	> 23	100 (87.2 - 100)	82.4 (71.8 – 90.3)	0.824
	> 41	96.3 (81.0 – 99.9)	100 (95.1 - 100)	0.963
Serogroup O121				
Glyco-iELISA	Cut-off value (PR)^a	Se (%)^b	Sp (%)^b	J^c
IgM				
	> 25	100 (66.4 - 100)	97.3 (90.6 – 99.7)	0.973
	> 40	88.9 (51.8 – 99.7)	100 (95.1 - 100)	0.889
IgG				
	> 44	100 (66.4 - 100)	100 (95.1 – 100)	1,000
Serogroup O103				
Glyco-iELISA	Cut-off value (PR)^a	Se (%)^b	Sp (%)^b	J^c
IgM				
	> 16	100 (87.2 - 100)	96.3 (87.2– 99.5)	0.963
	> 40	66.7 (9.4 – 99.2)	100 (93.3 - 100)	0.667
IgG				
	> 50	100 (29.2 - 100)	96.3 (87.2 – 99.5)	0.963
	> 80	66.7 (9.3 – 99.3)	100 (93.4 - 100)	0.667

(a) PR, percentage of reactivity.

(b) Se, sensitivity (TP/TP+FN) x100; Sp, specificity (TN/TN+FP) x100. Values in parentheses indicate the 95% confidence interval. TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative.

(c) J, Youden´s index (Se+Sp-1).

 **Chemtest S.A.**

Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.
info@chemtest.net - chemtest.net



Elisa



Humano



Chemtest S.A.

Av. 25 de Mayo 1021, San Martín (C.P. 1650), Buenos Aires, Argentina.

info@chemtest.net - chemtest.net