

Kit para detección de enterotoxinas

A, B, C y D de *Staphylococcus* en muestras de alimentos o filtrados de cultivos por aglutinación de látex en fase reversa

INTRODUCCIÓN

Las intoxicaciones alimentarias estafilocócicas están causadas por la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxinas producidas durante el crecimiento de ciertas cepas de *Staphylococcus aureus*. Se han publicado varios informes sobre la utilidad de la aglutinación de látex en fase reversa (RPLA).^{1,2,3} La técnica de la aglutinación de látex en fase reversa (RPLA) capacita a los antígenos solubles tales como las toxinas bacterianas, a ser detectados mediante un ensayo de aglutinación.

En un ensayo de aglutinación estándar, los anticuerpos solubles reaccionan con los antígenos particulados tales como las células bacterianas. No obstante, en un ensayo de aglutinación en fase REVERSA, los anticuerpos que están unidos a partículas, reaccionan con el antígeno soluble. Las partículas (en este caso el látex) no juegan por sí mismas parte en la reacción y son por tanto PASIVAS. El entramado de las partículas de látex por la reacción específica antígeno/anticuerpo da como resultado una reacción visible de AGLUTINACIÓN DE LÁTEX.

El kit SET-RPLA está basado en los informes de Shingaki et al.⁴ y Oda et al.⁵ Fue desarrollado bajo las normas del Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health.

El kit SET-RPLA puede utilizarse para detectar enterotoxinas estafilocócicas en una gran variedad de alimentos y dar un resultado semi-cuantitativo. La prueba puede usarse también para demostrar la producción de enterotoxina en aislados *S. aureus* creciendo en cultivos.

Debe notarse que se han aislado estafilococos coagulasa-negativos en intoxicaciones alimentarias que también producen enterotoxinas.⁵

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Las partículas de poliestireno se sensibilizan con antisero purificado obtenido de conejos, inmunizados individualmente con enterotoxinas A, B, C y D de estafilococo purificadas. Estas partículas de látex aglutinarán en presencia de la correspondiente enterotoxina. Se proporciona un reactivo de control que consiste en partículas de látex sensibilizadas con globulinas de conejo no inmune. La prueba se lleva a cabo en placas de microtitulación con pocillos en "V". Se hacen diluciones del extracto del alimento o del filtrado de cultivo en cinco filas de pocillos, se añade un volumen de la suspensión de látex apropiada a cada pocillo y se mezcla el contenido. Si las enterotoxinas A, B, C o D están presentes, se da la aglutinación, resultando en la formación de una estructura lechosa que, tras sedimentar, forma una capa difusa sobre la base del pocillo. Si las enterotoxinas estafilocócicas están ausentes o a una concentración por debajo del nivel de detección del ensayo, no se podrá formar tal estructura lechosa y, por tanto, lo que se observará será un depósito compacto.

El diluyente suministrado contiene hexametáfosfato sódico, el cual ha sido descrito que reduce la incidencia de las reacciones no específicas con los componentes de las matrices alimentarias.⁶

PRECAUCIONES

Este producto es para uso diagnóstico *in vitro* exclusivamente.

No congelar.

No intercambiar reactivos de diferentes números de lote.

Los reactivos y el diluyente contienen 0,1% de azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo o cobre de las tuberías y producir azidas metálicas que son explosivas por contacto detonante. Para prevenir la acumulación de azidas en el sistema de tuberías, dejar correr abundante agua por la pila inmediatamente después de desechar los reactivos que las contienen.

CONSERVACIÓN

El kit SET-RPLA debe conservarse a 2-8° C. Bajo estas condiciones los reactivos mantendrán su actividad hasta la fecha que figura en la caja del kit. Tras su reconstitución, los controles de enterotoxina deben conservarse a 2-8° C. Bajo estas condiciones los controles de enterotoxina reconstituidos retendrán su actividad durante 3 meses, o hasta la fecha que figure en la caja del kit, la que sea antes.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Matrices Alimentarias

1.1 Se pueden analizar una amplia variedad de alimentos para ensayar enterotoxinas estafilocócicas; el procedimiento de extracción puede, no obstante, requerir algunas modificaciones para algunos alimentos particulares. El principal requerimiento es obtener un extracto no turbio y libre de grasa. Un bajo factor de dilución es deseable para una sensibilidad óptima, pero si la naturaleza del alimento dicta una dilución mayor durante la extracción, la sensibilidad resultará reducida.

1.2 Para conseguir una muestra representativa de un lote, se recogen porciones de 10 g de diferentes localizaciones del lote. (ver el plan de muestreo de T.P.I., U.S.D.A. o equivalentes).

2. Filtrados de Cultivo

Los estafilococos de fuentes clínicas o bien de matrices alimentarias, pueden recolectarse e identificarse por medio de técnicas adecuadas y descritas en los libros de texto estándar.

MÉTODO DE USO

1. Material requerido pero no suministrado

Homogenizador
Placas de microtitulación (pocillos en "V") y tapas
Pipetas fijas o variables y puntas (25µl)
Centrífuga capaz de generar 900g (habitualmente 300 rpm en una centrífuga de mesa pequeña)
Unidad de filtración de membrana con filtros desechables de baja capacidad de unión a proteínas y con un tamaño de poro de 0,2µm-0,45µm (tales como Millipore SLGV)
Caldo Tristona Soya (CM 129)
Solución de cloruro sódico (0,85%)
Solución de hipoclorito sódico (>1.3% p/p)
Goteador de 25µl (opcional)
Diluidor de 25µl (opcional)
Micromezclador (opcional)
Caja húmeda (opcional)

2. Componentes del Kit

TD901 Látex sensibilizado con anti-enterotoxina A. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a enterotoxina estafilocócica A.
TD902 Látex sensibilizado con anti-enterotoxina B. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a enterotoxina estafilocócica B.
TD903 Látex sensibilizado con anti-enterotoxina C. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a enterotoxina estafilocócica C.
TD904 Látex sensibilizado con anti-enterotoxina D. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a enterotoxina estafilocócica D.
TD905 Látex control. Suspensión de látex sensibilizada con globulinas de conejo no inmunes.
TD906 Control de enterotoxina A estafilocócica.
TD907 Control de enterotoxina B estafilocócica.
TD908 Control de enterotoxina C estafilocócica.

TD909 Control de enterotoxina D estafilocócica.

TD910 Diluyente. Tampón fosfato salino que contiene albúmina de suero bovino y hexametáfosfato sódico.

Folleto de Instrucciones

3. Extacción o Producción de Toxina

Extracción a partir de Matrices Alimentarias

3.1 Mezclar 10 g de muestra con 10 ml de solución de cloruro sódico (0,85%) en un mezclador u homogenizador.

- 3.2 Centrifugar la muestra mezclada a 900g a 4°C durante 30 minutos.
 NOTA: Si no se dispone de centrifuga refrigerada, enfriar la muestra a 4°C antes de la centrifugación.
- 3.3 Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de membrana de 0,2µm-0,45µm y baja unión a proteínas. **Retener el filtrado para ensayar el contenido en toxinas.**
Producción de Enterotoxinas en Cultivo
- 3.4 Inocular el microorganismo aislado en Caldo Triptona Soja (CM129) e incubar a 37° C durante 18-24 horas, preferiblemente con agitación.
- 3.5 Tras el crecimiento, bien centrifugar a 900g durante 20 min. ó bien filtrar o a través de un filtro de membrana de 0,2µm-0,45µm y baja unión a proteínas. **Retener el filtrado para ensayar el contenido en toxinas.**

4. Control

Cada control de toxina reconstituido dará aglutinación con su respectivo látex sensibilizado. El uso de los controles de toxina proporcionará las referencias para los patrones positivos ilustrados mas abajo. (ver Interpretación de Resultados). Los controles deben utilizarse de vez en cuando solo para confirmar el correcto funcionamiento de la prueba de látex. Los controles de toxinas no se suministran a un nivel especificado y por tanto no deben usarse como medio para cuantificar los niveles de toxina detectados en la muestra objeto del ensayo.

5. Método de Ensayo

5.1 Reactivos de Trabajo

Los reactivos de látex y el diluyente vienen listos para su uso. Los reactivos de látex deben agitarse vigorosamente antes de su uso para asegurar una suspensión homogénea. Para reconstituir los reactivos control, añadir 0,5ml de diluyente (TD910) a cada vial. Agitar suavemente hasta disolver completamente el contenido.

- 5.2 Distribuir la placa de forma que cada fila tenga 8 pocillos. Cada muestra necesita el empleo de 5 de tales filas.
- 5.3 Utilizando el goteador, dispensar 25µl de diluyente en cada pocillo de las cinco filas de la placa "microtitre"
- 5.4 Por medio de una pipeta o goteador, dispensar 25µl de la muestra a ensayar al primer pocillo de cada una de las cinco filas.
- 5.5 Utilizando una pipeta o un diluidor y comenzando en el **primer pocillo** de cada fila, tomar 25µl y realizar diluciones dobles a lo largo de cada una de las cinco filas. **Parar en el séptimo pocillo** para dejar el último pocillo solo con diluyente.
- 5.6 A cada pocillo de la primera fila, añadir 25µl de látex sensibilizado con anti-enterotoxina A.
- 5.7 A cada pocillo de la segunda fila, añadir 25µl de látex sensibilizado con anti-enterotoxina B.
- 5.8 A cada pocillo de la tercera fila, añadir 25µl de látex sensibilizado con anti-enterotoxina C.
- 5.9 A cada pocillo de la cuarta fila, añadir 25µl de látex sensibilizado con anti-enterotoxina D.
- 5.10 A cada pocillo de la quinta fila, añadir 25µl de control de látex.
- 5.11 Para mezclar el contenido de cada pocillo, rotar la placa con un microagitador o agitándola con la mano. Tomar precauciones para que no se den salpicaduras desde los pocillos.
- 5.12 Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la tapa. Poner la placa en una caja húmeda es una aceptable alternativa. **Dejar la placa inmóvil** sobre una superficie libre de vibraciones a temperatura ambiente durante 20-24 horas. Ayudará a la posterior lectura si la placa se coloca sobre un papel negro durante esta incubación.
- 5.13 Examinar la aglutinación de cada pocillo de cada fila contra un fondo negro.
- 5.14 Los tubos de centrifuga, filtros de membranas, placas de microtitulación, tapas y puntas de pipetas deben esterilizarse por autoclave a 121°C ó desinfectar antes de desecharlos en solución de hipoclorito sódico (>1.3% w/w).
- 5.15 Desechar los extractos de cultivos, los extractos de los alimentos, los controles de la muestra y de las toxinas en solución de hipoclorito sódico (>1.3% p/p).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los patrones de aglutinación deben juzgarse por comparación con la siguiente ilustración.



Resultados clasificados como (+), (++) y (+++) son considerados positivos.

Los resultados en la fila de pocillos conteniendo látex control deben ser negativos. En algunos casos pueden observarse aglutinaciones no específicas. En tales casos los resultados deben interpretarse como positivos si la reacción con el látex sensibilizado es positiva a una dilución mayor con la muestra que la vista con el control de látex. El último pocillo de todas las filas debe ser negativo. Si se observan patrones positivos en algunos de estos pocillos la reacción debe considerarse no válida.

NOTA: Es conocido que ciertas cepas de estafilococos producen mas de una enterotoxina.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

La sensibilidad de esta prueba para la detección de enterotoxinas es de 0,5ng/ml en extractos. Cuando un extracto de alimentos se hace con dilución 1 : 1 con el diluyente, la sensibilidad es, por tanto, 1ng/g de la matriz alimentaria. El limite de detección variará de acuerdo con cualquier condición de extra dilución dictada por el tipo de matriz del alimento. La concentración de enterotoxina en el extracto de alimento puede verse afectada por una variedad de métodos, tales como la ultrafiltración. La producción de enterotoxinas estafilocócicas (SET) en cultivo dependerá de las condiciones de crecimiento. Un resultado positivo obtenido en el cultivo, demuestra la producción de una ó mas SET bajo esas condiciones: no implica la producción de toxina *in vivo* a esos niveles.