

PET-RPLA KIT para DETECCIÓN de TOXINAS

Código: TD0930

Kit para detección de enterotoxina tipo A de Clostridium perfringens en muestras fecales o en filtrados de cultivos por aglutinación pasiva de látex en fase reversa

INTRODUCCIÓN

La ingestión de alimentos contaminados con *Clostridium perfringens* pueden producir intoxicación alimentaria. Las células ingeridas se multiplican en el intestino del paciente y producen esporas. La producción de enterotoxina se asocia con el proceso de formación de esporas. Es, por tanto, de gran importancia la detección de enterotoxina en las muestras fecales obtenidas de pacientes o en los cultivos líquidos de los aislados bacterianos.

La detección directa de enterotoxinas de *Cl.perfringens* en las heces es el método más eficaz debido a la gran cantidad de toxina que se forma *in vivo*. El método en cultivo es menos eficaz debido a los problemas en estimular a *Cl. perfringens* en medios artificiales a la producción de suficiente toxina.

Se ha reconocido la aglutinación pasiva en fase reversa (RPLA) como un método eficaz para la detección de la enterotoxina de *Cl.perfringens*.¹ La técnica de aglutinación de látex en fase reversa (RPLA) capacita que la detección de antígenos solubles como las toxinas bacterianas puedan ser detectados por 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**.

PRINCIPIOS de la PRUEBA

Partículas de látex de poliestireno se sensibilizan con antisuero purificado de conejo inmunizado² con enterotoxina *Cl. perfringens* purificada. Estas partículas aglutinarán en presencia de enterotoxina de *Cl. perfringens*. Se suministra 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 filtrado de cultivo en dos filas de pocillos, se añade un volumen de la suspensión de látex a cada pocillo y se mezcla el contenido. Si la enterotoxina de *Cl. perfringens* está presente, 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 la enterotoxina de *Cl. perfringens* está ausente 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.

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 PET-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, el control de enterotoxina debe conservarse a 2-8°C. Bajo estas condiciones el control de enterotoxina reconstituida retendrá su actividad durante 3 meses, ó hasta la fecha que figure en la caja del kit, la que sea antes.

PREPARACIÓN de la MUESTRA

La detección de enterotoxina de *Cl. perfringens* directamente de las heces, es el método mas fiable y debe utilizarse siempre a menos que se disponga de poca materia fecal. Es mas rápido que el método en cultivo, tomando aproximadamente tan solo 24 horas en obtener un resultado.

Si se va a emplear el método a partir del cultivo para el diagnóstico de infección alimentaria por *Cl. Perfringens*, ha de tenerse en cuenta que *Cl. perfringens* es un habitante común del intestino. Se recomienda que al menos 6 colonias se ensayen separadamente con objeto de asegurar una mayor probabilidad de detección de aquellas cepas productoras de enterotoxina.

No hay un único procedimiento de cultivo que sea adecuado para todas las cepas de *Cl.perfringens* productoras de enterotoxina. Cualquier método de cultivo puede fallar debido a una insuficiente producción de toxina. Esto puede ser debido a un crecimiento inadecuado, pobre formación de esporas o a la baja producción de toxina. Debe resaltarse que algunas cepas enterotoxina positiva pueden morir por el tratamiento con calor y por tanto no producirán enterotoxina en el segundo medio. Se recomienda que se compruebe la viabilidad de cada cultivo tras el calentamiento. Es conveniente la utilización de cepas productoras de enterotoxina tales como *Cl. perfringens* NCTC 8239 ó *Cl. perfringens* ATCC® 12917 ante la utilización de cualquier medio de cultivo particular.

Material requerido pero no suministrado

Placas de microtitulación (pocillos en “V”) y tapas

Pipetas fijas o variables y puntas (25µl)

Centrífuga capaz de generar 900g (habitualmente 3000 rpm en una centrífuga pequeña de mesa)

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)

Medio de cultivo que promocióne la producción de enterotoxina de cepas de *Cl. Perfringens* (un medio muy apropiado es el desarrollado por Duncan y Strong³ modificado por Harmon y Kautter¹ (ver Apéndice).

Solución de hipoclorito sódico (>1,3% p/p)

Goteador de 25µl (opcional)

Diluidor de 25µl (opcional)

Micromezclador (opcional)

Caja húmeda (opcional)

Componentes del Kit

Folleto de Instrucciones

TD931 Látex sensibilizado. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a enterotoxina de *Cl. perfringens* .

TD932 Látex control. Suspensión de látex sensibilizado con globulinas de conejo no inmune.

TD933 Enterotoxina control. Enterotoxina de *Cl. perfringens* desecada.

TD934 Diluyente. Buffer fosfato salino conteniendo albúmina de suero bovino.

Producción o Detección de Toxina

Extracción a partir de Heces

A un volumen de heces, añadir un volumen similar de buffer fosfato salino (Oxoid BR14A).

Homogenizar completamente y centrifugar a 1300g durante 20 minutos a 4° C, filtrar por membrana utilizando un filtro de 0,2µm – 0,45µm de baja unión a proteínas y **usar el filtrado como muestra a ensayar.**

Producción de Enterotoxina en Cultivos Líquidos

Cultivar el microorganismo aislado en Cooked Meat Medium (Oxoid CM81) a 37° C durante 18-20 horas, inactivarlo por calentamiento a 75° C durante 20 minutos.

Subcultivar en un medio diseñado para promocionar la producción^{3,4} de enterotoxina.

Medio Modificado de Duncan y Strong^{3,4}

Fórmula	g/litro
Extracto de levadura (Oxoid L21)	4,0
Proteosa Peptona (Oxoid L85)	15,0
Almidón soluble	4,0
Tioglicolato sódico	1,0
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	10,0

Autoclavar a 121° C durante 15 minutos.

Añadir la suficiente cantidad de carbonato sódico 0,66M esterilizado por filtración, para incrementar el pH a 7,8 ± 0,1.

Inocular de 16 a 18ml de medio con 0,8ml de un cultivo en Cooked Meat Medium (tomados del fondo del tubo). **NOTA:** Si el ratio de dilución es mayor que 1:20, los constituyentes del Cooked Meat Medium pueden ser transferidos en cantidad suficiente como para inhibir la formación de esporas.

Incubar a 37° C durante 24 horas. Tras la incubación, bien centrifugar a 900g a 4°C durante 20 minutos y usar el sobrenadante como muestra o filtrar por membrana utilizando un filtro de 0,2µm – 0,45µm de baja unión a proteínas y usar el filtrado como muestra a ensayar.

Control

El control de toxina reconstituido aglutinará con el látex sensibilizado. El uso del control de toxina proporcionará las referencias para los patrones positivos ilustrados mas abajo. (ver Interpretación de Resultados). El control debe utilizarse de vez en cuando solo para confirmar el correcto funcionamiento de la prueba de látex. El control de toxina no se suministra a un nivel especificado y por tanto no debe usarse como medio para cuantificar los niveles de toxina detectados en la muestra.

Método de Ensayo

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 el control de enterotoxina, añadir 0,5ml de diluyente (TD934) a cada vial. Agitar suavemente hasta disolver completamente el contenido. Distribuir la placa de forma que cada fila tenga 8 pocillos. Cada muestra necesita el empleo de 2 de tales filas.

Por medio de una pipeta o goteador, dispensar 25µl del Diluyente en cada pocillo de las dos filas **excepto** en el primer pocillo de cada fila.

Añadir 25µl de la muestra al primer y segundo pocillo de cada fila.

Utilizando una pipeta o diluidor y comenzando por el **segundo pocillo** de cada fila, recoger 25µl y llevar a cabo diluciones dobles a lo largo de cada una de las dos filas. Parar en el 7° pocillo para dejarlo solo con diluyente. A cada pocillo de la primera fila, añadir 25µl de látex sensibilizado.

A cada pocillo de la segunda fila, añadir 25µl de control de látex.

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.

Para evitar la evaporación, cubrir la placa con la tapa. Poner la placa en una caja húmeda es una alternativa aceptable. **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. Examinar la aglutinación de cada pocillo de cada fila contra un fondo negro.

Los tubos de centrifuga, filtros de membranas, placas de microtitulación, tapas y puntas de pipetas deben esterilizarse por autoclave a 121°C durante 15 minutos o desinfectar antes de desecharlos en solución de hipoclorito sódico (>1,3% w/w).

Desechar los controles de toxina y los extractos de cultivo en solución de hipoclorito sódico (>1,3% p/p).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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. Si las muestras fecales o los filtrados de cultivos reaccionan con el látex sensibilizado a una dilución mayor que la observada con el látex control, el resultado del test debe considerarse positivo. 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.

LIMITACIONES DEL TEST

La sensibilidad de la prueba en detectar la enterotoxina es aproximadamente de 2ng/ml. La enterotoxina presente a concentraciones mas bajas dará, por tanto, un resultado negativo. El kit no está diseñado para la detección de otros tipos de enterotoxinas de *Clostridium perfringens*.

REFERENCIAS

1. Harmon, S M and Kautter, D A (1986). *J. Food Prot.* **49**: 523.
2. Sakaguchi, G. Vemura, T. and Riemann, H.P. (1973). *J Appl. Microbiol.* **26**: 762.
3. Duncan, C.L. and Strong, D H (1968). *J. Appl. Microbiol.* **1** : 82
4. Harmon, S.M. and Kautter, D.A. (1986). *J. Food Protection* **49**: 706.