

"STAPHYLOCOCCAL TOXIC SHOCK SYNDROME"

Kit para detección de la toxina estafilocócica del síndrome del shock tóxico en filtrados de cultivos por aglutinación pasiva de látex en fase reversa.

INTRODUCCIÓN

Todd et al.¹ fueron los primeros en describir la enfermedad conocida como síndrome del shock tóxico. Se han reportado cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes con este síndrome como productoras de toxina, toxina-uno del síndrome del shock tóxico (TSST-1)^{2,3}. La prueba TST-RPLA para la detección de TSST-1 en filtrados de cultivos de *Staphylococcus aureus* se desarrolló bajo las directrices del Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health. 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 antisero purificado de conejo inmunizado con enterotoxina purificada de TSST-1. Estas partículas aglutinarán en presencia de TSST-1. 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 toxina TSST-1 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 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 TSE-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 TST debe conservarse a 2-8°C. Bajo estas condiciones el control de TST reconstituido retendrá su actividad durante 3 meses, ó hasta la fecha que figure en la caja del kit, la que sea antes.

PREPARACIÓN

Los *Staphylococcus aureus* que se vayan a ensayar pueden recogerse de hisopos, etc. y ser identificados por técnicas adecuadas descritas en los textos estándar. Si el estafilococo es aislado de sitios del cuerpo tales como la vagina que normalmente está colonizada por estafilococos, se recomienda ensayar varias colonias separadamente para asegurar una mayor probabilidad de detectar una cepa productora de TSST-1.

MÉTODO DE UTILIZACIÓN**1. Material requerido y no suministrado**

Placas de microtitulación (pocillos en "V") y tapas Pipetas fijas o variables y puntas 25µl)

Centrifuga capaz de generar 900g (habitualmente 3000 rpm en una centrifuga pequeña de mesa) o 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).

Brain Heart Infusion Broth (Oxoid CM225)

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

TD941 Látex sensibilizado- Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a la TSST-1 estafilocócica.

TD942 Latex Control - Suspensión de látex sensibilizado globulinas de conejo no inmune.

TD943 TST Control - Toxina del síndrome del shock tóxico deshidratada.

TD924 Diluyente - Fosfato buffer salino conteniendo albúmina de suero bovino.

3. Producción de Toxina en Cultivo Líquido

Inocular el aislado en Brain Heart Infusion Broth (CM225). Incubar a 37°C durante 18 a 24 horas, preferentemente con agitación. Tras la incubación, o bien centrifugar a 900g durante 20 minutos a 4°C y usar el sobrenadante como muestra a ensayar o bien filtrar por membrana utilizando un filtro de 0,2µm - 0,45µm de baja unión a proteínas y usar el filtrado como muestra a ensayar.

4. 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 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 el control de TST, añadir 0,5ml de diluyente (TD944) al 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 2 de tales filas.

5.3 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.

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

5.5 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 7º pocillo** para dejarlo solo con diluyente.

5.6 A cada pocillo de la primera fila, añadir 25µl de látex sensibilizado .

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

5.8 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.

5.9 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.

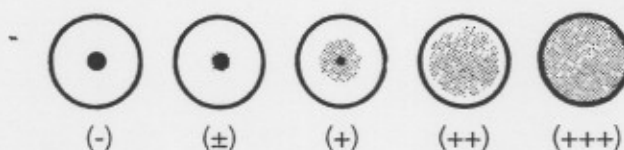
5.10 Examinar la aglutinación de cada pocillo de cada fila contra un fondo negro.

5.11 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% p/p).

5.12 Desechar los controles de toxina y los extractos de cultivo 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.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

La sensibilidad de esta prueba para detectar TSST-1 es aproximadamente de 2ng/ml en el extracto. TSST-1 presente a concentraciones inferiores darán por tanto un resultado negativo.

La producción de TSST-1 por una cepa de *Staphylococcus aureus* aislada de un paciente no constituye un diagnóstico de síndrome de shock tóxico. Se han aislado cepas productoras de TSST-1 de individuos sanos, aunque con una frecuencia considerablemente menor que de pacientes de síndrome del shock tóxico.