

BCET-RPLA KIT para DETECCIÓN de TOXINAS

Código: TD0950

Kit para detección de la enterotoxina (tipo diarreico) de *Bacillus cereus* en alimentos y filtrados de cultivo por aglutinación pasiva de látex en fase reversa.

INTRODUCCIÓN

Tanto en forma esporulada como vegetativa, el microorganismo *Bacillus cereus* es un habitante común de muchos diferentes ambientes y puede con facilidad contaminar los alimentos. Si los alimentos contaminados no se enfrían suficientemente después de cocinados y se da un periodo prolongado de tiempo entre la preparación y el consumo, entonces, las esporas termorresistentes supervivientes, pueden germinar, capacitando al microorganismo a multiplicarse y producir toxinas. Bajo estas circunstancias, *B. cereus* puede causar intoxicación alimentaria. Alimentos que se han implicado en casos de intoxicación por *B. cereus* son arroz, pasta, carne, aves de corral, vegetales, varias sopas, flanes y salsas.^{1,2,3}

El microorganismo puede causar dos tipos distintos de enfermedades: un comienzo brusco, "síndrome emético" que se asocia fundamentalmente con el consumo de arroz cocinado; y un comienzo más prolongado "síndrome diarreico" en el cual se han implicado a una amplia variedad de alimentos. Los síntomas característicos de las dos formas de enfermedad son causados por diferentes toxinas: la toxina emética y la enterotoxina diarreica⁴.

El propósito de este kit es la detección de la enterotoxina diarreica por aglutinación pasiva de látex en fase reversa (RPLA). 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.

La prueba BCET-RPLA puede emplearse para detectar enterotoxina de *B. cereus* en una variedad de alimentos y dar un resultado semi-cuantitativo. La prueba puede usarse también para demostrar la producción de enterotoxina en aislados de *B. cereus* creciendo en medios de cultivo.

PRINCIPIOS de la PRUEBA

Partículas de látex de poliestireno se sensibilizan con antisuero purificado de conejo inmunizado con enterotoxina diarreica de *B. cereus* purificada. Estas partículas aglutinarán en presencia de enterotoxina de *B. cereus*. 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 extracto del alimento o 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 *B. cereus* 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 BCET-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 deben conservarse a 2-8°C. Bajo estas condiciones el control de enterotoxina reconstituidos retendrán su actividad durante 3 meses, ó hasta la fecha que figure en la caja del kit, la que sea antes.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Matrices Alimentarias

Se pueden analizar una amplia variedad de alimentos para ensayar enterotoxinas; 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.

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

Filtrados de Cultivo

B. cereus puede aislarse de alimentos o muestras fecales e identificarse por medio de las técnicas apropiadas descritas en los libros estándar. El uso de *Bacillus cereus* Selective Agar (Oxoid CM617 y SR99) ayudará al aislamiento e identificación presuntiva de *B. cereus* previa a la detección de toxina⁵.

Material requerido pero no suministrado

Mezclador u Homogenizador (requerido para matrices alimentarias únicamente)

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)

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 Infusión (Oxoid CM 225)
Solución de cloruro sódico (0,85%)
Solución de hipoclorito sódico (>1,3% p/p)(desinfectante)
Goteador de 25µl (opcional)
Diluidor de 25µl (opcional)
Micromezclador (opcional)
Caja húmeda (opcional)

Componentes del Kit

TD951 Látex Sensibilizado. Látex sensibilizado con anti-enterotoxina (IgG de conejo) específica de *B. cereus*.

TD952 Látex control. Suspensión de látex sensibilizado con globulinas de conejo no inmune.

TD953 Enterotoxina control (liofilizado). Enterotoxina liofilizada de *B. cereus*.

TD954 Diluyente. Buffer fosfato salino conteniendo albúmina de suero bovino.

Folleto de instrucciones

Extracción o Producción de Toxina

Extracción a partir de Matrices Alimentarias

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

Centrifugar la muestra homogenizada 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.

Filtrar por membrana el sobrenadante 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

Inocular el microorganismo aislado en Brain Heart Infusion (CM225) e incubar a 32-37° C durante 6-18 horas, preferiblemente con agitación (250 ciclos/min).

Tras el crecimiento, bien centrifugar a 900g durante 20 minutos a 4°C 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.

NOTA: Se recomienda controlar el funcionamiento de cualquier método de cultivo particular con el uso de una cepa estandar productora de enterotoxina como *B. cereus* NCTC 11145.

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.

Método de Ensayo

Reactivos de Trabajo

Los reactivos de látex(TD 951, TD 952) y el diluyente(TD954) 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 (TD953), añadir 0,5ml de diluyente (TD954) 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 7º pocillo para dejarlo solo con diluyente (TD954 únicamente)

A cada pocillo de la primera fila, añadir 25ml de látex sensibilizado (TD951).

A cada pocillo de la segunda fila, añadir 25ml de control de látex (TD952).

Para mezclar el contenido de cada pocillo, rotar la placa con un microagitador o agiténdola 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% p/p).

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 (TD 952) 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 (TD 951) es positiva a una dilución mayor con la muestra que la vista con el control de látex (TD952). 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 de 2ng/ml en el extracto de la prueba. Cuando un extracto de alimento se hace con un ratio de dilución 1:1 con diluyente (TD954), la sensibilidad será por tanto de 4ng/g de matriz alimentaria. El límite de detección variará de acuerdo a cualquier condición de dilución extra dictada por el tipo de matriz alimentaria. La concentración de enterotoxina en el extracto del alimento puede verse afectado por una variedad de métodos tales como la ultrafiltración.

La producción de enterotoxina en filtrados de cultivos dependerá de las condiciones de crecimiento. Un resultado positivo obtenido de ésta manera demuestra la producción de enterotoxina; no implica la producción *in vivo* de toxina a esos niveles.