

## **KIT VTEC-RPLA para DETECCIÓN de TOXINAS**

**Código: TD0960**

*Prueba de aglutinación pasiva en fase reversa de látex para detección de verocitotoxinas VT1 y VT2 producidas por Escherichia a partir de aislados de cultivos de alimentos y de muestras fecales.*

### **INTRODUCCIÓN**

La verocitotoxina producida por *E. coli* (VTEC) es transmitida a través de alimentos, agua y por contacto persona a persona, y se la reconoce como causante de una amplia variedad de enfermedades desde diarrea acuosa autolimitada y colitis hemorrágica a síndrome urémico hemolítico (HUS) y púrpura trombótica trombocitopénica.<sup>1,2,3,4,5</sup>

Estas enfermedades pueden ser fatales, haciendo del incremento de la incidencia de contaminación por VTEC causa de preocupación mundial.

A diferencia de otros tests que detectan la presencia de cepas tales como las de *E. coli* O157 (de las cuales algunas, pero no todas, producen verocitotoxinas), el kit Oxoid VTEC-RPLA detecta las propias toxinas, proporcionando una clara y específica indicación de la producción de VT1 ó VT2 . Esto solventa el problema de los resultados positivos de otros látex y ensayos de cultivo (por ej. aquellos que detectan el organismo en vez de la toxina) cuando cepas de *E. coli* O157 no productoras de toxina están presentes. Igualmente, también soluciona el problema de los resultados negativos en casos en que cepas no-O157 sean responsables de la producción de toxina.

La prueba puede emplearse con aislados cultivados a partir de alimentos y de muestras fecales.

### **PRINCIPIOS de la PRUEBA**

Partículas de látex de poliestireno se sensibilizan con antisuero purificado de conejo inmunizado reactivo a verocitotoxina de *E. coli* VT1 ó VT2. Estas partículas aglutinarán en presencia de una o ambas verocitotoxinas de *E. coli*. La aglutinación dará la formación de un entramado lechoso. Al sedimentar formará una capa difusa en la base de los pocillos en “V” de la placa de microtitulación. Si las verocitotoxinas 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 uso de una solución de polimixina B facilita la liberación de verocitotoxinas.<sup>6,7</sup>

### **PREPARACIÓN de la MUESTRA**

Los aislados de *E. coli* se recogen a partir de alimentos o de muestras clínicas y se identifican por procedimientos estándar.

El serogrupo O157 puede identificarse utilizando Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid CM813), dado que es incapaz de fermentar el sorbitol. Otros serogrupos de *E. coli* , no obstante, producen verocitotoxina.

### **MÉTODO DE UTILIZACIÓN**

#### **1.Material requerido y no suministrado**

Placas de microtitulación (pocillos en “V”) y

tapas  
puntas (25µl)  
capaz de generar 900g (habitualmente 4000 rpm en una centrífuga de mesa pequeña) 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).  
CA-YE Broth ó Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM375).  
Polimixina B (ver 3.2.2).  
Solución de hipoclorito sódico (>1,3% p/

Pipetas fijas o variables y  
Centrífuga

Goteador de 25µl

(opcional)

Diluidor de 25µ l (opcional)

Micromezclador (opcional)

Caja húmeda (opcional)

## 2. Componentes del kit:

**TD 961** Látex sensibilizado VT1. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a verocitotoxina tipo 1 de *E. coli* .

**TD 962** Látex sensibilizado VT2. Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a verocitotoxina tipo 2 de *E. coli* .

**TD 963** Latex Control. Suspensión de látex sensibilizado con globulinas de conejo no inmunizado.

**TD 964** Verotoxina Control (VT1). Verocitotoxina tipo 1 de *E. coli* deshidratada.

**TD 965** Verotoxina Control (VT2). Verocitotoxina tipo 2 de *E. coli* deshidratada.

**TD 966** Diluyente. Fosfato buffer salino.

Folleto de instrucciones.

## 3. Producción y Extracción de Toxina

*E. coli* puede ensayarse para la producción de toxina verocitotoxigénica por crecimiento en medios de cultivo. El crecimiento del microorganismo puede hacerse en medio líquido (CA-YE broth), o en Brain Heart Infusion Agar. El crecimiento en agar va seguido por extracción en una solución de polimixina B.

### 3.1 Método de cultivo en caldo

**3.1.1** El microorganismo aislado se inocula en caldo CA-YE y se incuba a 37° C durante 18-20 horas con agitación vigorosa (120-150 oscilaciones por minuto).

**3.1.2** Tras el crecimiento el cultivo puede bien centrifugarse a 4.000 rpm durante 20 minutos a 4° C o filtrarse por medio de filtros de membrana de baja unión a proteínas de 0,2µ m -0,45µ m (tal como Millipore SLGV). Se retiene el filtrado para el ensayo de verocitotoxina.

### 3.2 Método de cultivo en medio sólido

**3.2.1** El microorganismo aislado se inocula en tubos con Brain Heart Infusion Agar (Oxoid CM375) en pendiente (volúmenes de 10ml ) y se incuba a 37° C durante 18-20 horas.

**3.2.2** Tras la incubación, se recoge el crecimiento con un asa microbiológica y se suspende en 1 ml de una solución 0,85% de cloruro sódico conteniendo polimixina B a una concentración de 5.000 unidades por ml.

**3.2.3** Se continua la extracción durante 30 minutos a 37° C, agitando ocasionalmente.

**3.2.4** Tras la extracción el cultivo puede bien centrifugarse a 4.000 rpm durante 20 minutos a 4° C o filtrarse por medio de filtros de membrana de baja unión a proteínas de 0,2µ m -0,45µ m (tal como Millipore SLGV). Se retiene el filtrado para el ensayo de verocitotoxina.

#### **4.Control**

Cada control de toxina reconstituido aglutinará con su látex homólogo. El uso de los controles 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 del Ensayo**

**5.1** 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 toxina, añadir 0,5ml de diluyente a cada vial. Agitar suavemente hasta disolver completamente el contenido.

**5.2** La placa se dispone de tal forma que haya 3 columnas, cada una de 8 pocillos.

**5.3** Por medio de una pipeta o goteador dispensar 25µ l de diluyente en cada pocillo.

**5.4** Añadir 25µ l de sobrenadante de la muestra problema al primer pocillo de cada columna.

**5.5** Comenzando por el primer pocillo de cada columna y por medio de una pipeta o diluidor, recoger 25µ l y realizar dobles diluciones en cada columna hasta el pocillo 7 inclusive. (Nota: 25µ l de la mezcla muestra-buffer deben desecharse del 7° pocillo). La última fila de pocillos contiene solo diluyente.

**5.6** Se añaden 25µ l del test de látex VT1 a cada pocillo de la primera columna.

**5.7** Se añaden 25µ l del test de látex VT2 a cada pocillo de la segunda columna .

**5.8** Se añaden 25µ l del látex control a cada pocillo de la tercera columna con el fin de detectar falsas reacciones de aglutinación.

**5.9** Los controles de toxinas se ensayan de la misma manera que las muestras.

**5.10** 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.

**5.11** 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.

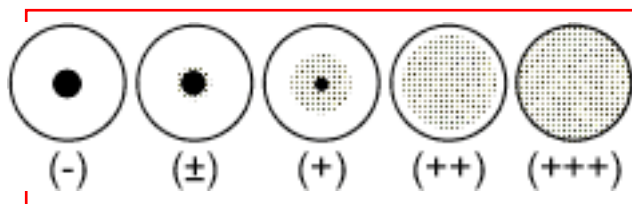
**5.12** Examinar la aglutinación de cada pocillo de cada fila contra un fondo negro.

**5.13** Los tubos de centrífuga, 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).

**5.14** Desechar los extractos de cultivos, extractos de alimentos, muestras y controles de toxina 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 clasificados como (±) y (-) se consideran como negativos.

Los resultados en la fila de pocillos de la tercera columna conteniendo látex control deben ser negativos así como en la 8ª fila de las columnas 1 y 2 que no contienen muestra. Si se observan patrones positivos en estos pocillos la reacción debe considerarse no válida. 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 cuatro veces mayor con la muestra que la vista con el control de látex.

En muestras procedentes de cepas altamente productoras de verocitotoxinas, se pueden observar patrones negativos de aglutinación en los pocillos de baja dilución debido a un exceso de antígeno (efecto prozona), no obstante dado que la cantidad de toxina en cada pocillo se reduce dos veces en cada dilución, se resuelve la inhibición de la aglutinación y puede leerse un verdadero positivo.

### LIMITACIONES DE LA PRUEBA

La sensibilidad del test es de 1 a 2 ng/ml de verocitotoxina de *E.coli*. La verocitotoxina presente a concentraciones inferiores dará por tanto un resultado negativo. La producción de VT1 y VT2 por *E. coli* aislado de muestras clínicas o de alimentos no constituye un diagnóstico de enfermedad. Se han aislado cepas productoras de verocitotoxinas de individuos sanos y de animales de granja. Se deben usar placas con pocillos en “V” nuevas, ya que las placas arañadas pueden causar resultados inconsistentes. Los reactivos con diferente número de lote no deben intercambiarse ni mezclarse.

### APÉNDICE

#### Formulación del caldo CA-YE<sup>8</sup>

	Gramos por Litro
Hidrolizado de caseína (Oxoid L 41 )	20,00
Extracto de levadura (Oxoid L 21)	6,00
Cloruro sódico (NaCl)	2,50
Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8,71
Solución de sales	1 ml

Para preparar la solución de sales, disolver lo siguiente en agua destilada:

Sulfato magnésico (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	5,0%
Cloruro de manganeso (MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	0,5%
Cloruro férrico (FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O)	0,5%

Ajustar el pH a 8,0 – 8,2 con 0,1N NaOH, dispensar en volúmenes adecuados (2-10 ml), autoclavar a

121°C durante 15 minutos.

## REFERENCIAS

1. Centers for Disease Control -United States, (1982) *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, **31**:580-585.
2. Konowalchuk, J., Speirs, J.I. and Stavric, S.(1977) *Inf. Immun.*, **18**:775-779
3. Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M. and Lim, C (1983) *Lancet* **1**:619-620
4. Pal, C.H., Gordon., Sims, H.V. & Briant, L.E., (1984) *Ann. Intern. Med.*, **101**:738-742
5. Waters, J.R., (1985) *Con. Dis. Wkly.Rep.*, **11**:123-124
6. Karmali, M.A., Petric, M., Lim C.,Fleming, RC., Arbus, G.S. and Lior, H. (1985) *J. InL Dis.*, **151**:775-782
7. Cerny, G. andTenber, M. (1971) *Arch.Microbiol.* **78**:166-179
8. Evans, D.G., Evans, D.J. and Gorbach, S.L. (1973) *Inf. and Immun.*, **8**: 731-735