

## VET-RPLA KIT para DETECCIÓN de TOXINAS

Kit para detección de enterotoxina de *Vibrio cholerae* y enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* en filtrados de cultivos por aglutinación de látex en fase reversa.

### INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que ciertas cepas de *Escherichia coli* producen enterotoxinas. Estas cepas de *Esch. coli* (ETEC) enterotoxigénicas son causa común de diarrea en países desarrollados y también de la diarrea del viajero. Las razas de ETEC producen una o dos diferentes enterotoxinas, una termolábil (LT) y una termoestable (ST). La enterotoxina LT tiene una estructura antigénica similar a la enterotoxina (CT) encontrada en *Vibrio cholerae*. Los antisueros obtenidos en conejos inmunizados con CT reaccionarán, por tanto con ambas, CT y LT<sup>1</sup>.

La prueba VET-RPLA está diseñada para la detección de LT ó CT en cultivos líquidos. Un test con resultado positivo indica que el microorganismo produce la enterotoxina correspondiente. 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 inmunizado con enterotoxina purificada de *Vibrio cholerae*. Estas partículas aglutinarán en presencia de enterotoxina (CT) de *V. cholerae* o enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*. 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 alguna de las toxinas 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 las enterotoxinas 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.

### 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 VET-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, ó hasta la fecha que figure en la caja del kit, la que sea antes.

### PREPARACIÓN de la MUESTRA

Las cepas de *V. cholerae* y *E. coli* para ensayar deben ser recogidas de muestras clínicas e identificadas por las técnicas apropiadas que se describen en los libros de texto.

Debe resaltarse que *E. coli* es un habitante normal del intestino y puede haber mas de un serotipo presente en la muestra. Es por tanto recomendable que se ensayen separadamente al menos 6 colonias aisladas para asegurar una mayor probabilidad de detección de razas productoras de enterotoxina. Algunas cepas ETEC producen en cultivo LT a bajo nivel. El tratamiento en el caldo de cultivo con polimixina B liberará suficiente LT para su detección. *V. cholerae* normalmente produce en cultivo grandes cantidades de enterotoxina y no se requieren medios ni técnicas de extracción especiales.

### MÉTODO DE UTILIZACIÓN

#### 1. Material requerido y 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 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)

Agitador orbital

Medio de cultivo que promueva la producción de enterotoxina (Peptona Water (Oxoid CM9) es un medio apropiado), ajustado a pH 8,4 para cepas de *V. cholerae* y también el Mundell's Medium<sup>2</sup>

#### Formulación Mundell's Medium<sup>2</sup>

Formulación Mundell's Medium <sup>2</sup>	Fórmula g/litro
Peptona de Caseína (Oxoid L42)	20.0
Cloruro sódico	2.5
Extracto de Levadura (Oxoid L21)	6.0
Fosfato dipotásico	8.7
Dextrosa	2.5
Cloruro férrico	0.005
Cloruro de manganeso	0.005
Sulfato de magnesio	0.05

pH 8,5 ± 0,2

Polimixina B  
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

### Folleto de instrucciones

#### TD921 Látex Sensibilizado

Suspensión de látex sensibilizado con anticuerpos específicos (IgG de conejo) frente a enterotoxina de *V.cholerae*.

#### TD922 Látex control

Suspensión de látex sensibilizada con globulinas de conejo no inmune.

#### TD923 Enterotoxina control

Enterotoxina deshidratada de *V.cholerae*.

#### TD924 Diluyente

Fosfato buffer salino conteniendo albúmina de suero bovino.

## 3. Producción de Toxina en Cultivo Líquido

### Enterotoxina de *Vibrio cholerae*

- 3.1 Un medio adecuado será Peptone Water (Oxoid CM9) ajustado a pH 8,4.
- 3.2 Inocular la cepa a ensayar en el medio de cultivo e incubar, preferiblemente con agitación a más de 110 rpm en un agitador orbital, a 30°C durante 24 horas.
- 3.3 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.

### Enterotoxina de *Escherichia coli*

- 3.4 Un medio adecuado es Mundell's medium<sup>2</sup> (descrito en el Apéndice).
- 3.5 Inocular la cepa a ensayar en el medio de cultivo (volúmenes apropiados de medio serán de 2 a 20ml) e incubar, preferentemente con agitación, a 37°C, 18 - 24 horas.
- 3.6 Tras la incubación añadir al cultivo o a una porción de él\* polimixina B a una concentración de 10.000 unidades/ml. Incubar a 37°C durante 4 horas. 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.

**Nota:** Es recomendable el control del método particular de cultivo con cepas estándar productoras de toxinas, *V.cholerae* o *E. coli* tal como *E.coli* NCTC11601.

## 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 más 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 reactivo control, añadir 0,5ml de diluyente (TD924) 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 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 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.
- 5.10 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 resulta 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:** Cuando hay una cantidad excesiva de CT, puede observarse un efecto prozona, por ejem. Se da un patrón negativo en pocillos que contienen la muestra y el látex sensibilizado. No obstante, como resultado de las dobles diluciones, la concentración de CT en cada pocillo a lo largo de la fila se ve reducida progresivamente y por tanto el efecto prozona debido a un exceso de CT desaparece. Un patrón positivo de aglutinación puede ser observado tras haber visto patrones negativos en los primeros pocillos de la fila. Con tales resultados, la muestra debe reportarse como positiva.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

La sensibilidad de esta prueba en detectar CT es 1-2ng/ml. Si la enterotoxina está presente a concentraciones inferiores dará por tanto un resultado negativo.