

RIDA[®] Anreicherungsbouillon

mTSB para el enriquecimiento de bacterias E. coli productoras
de shigatoxinas

Art. n°.: Z1000

Art. n°.: Z1003



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany

Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Área de aplicación

Para el diagnóstico *in vitro*. El RIDA® Anreicherungsbouillon sirve para enriquecer las bacterias *E. coli* productoras de shigatoxinas a partir de muestras de heces.

2. Resumen y explicación del test

Entre las diferentes variantes patógenas para el hombre de la bacteria intestinal *Escherichia coli* se destacan las de tipo enterohemorrágico (EHEC), entre otras razones, debido a que son productoras de las llamadas shigatoxinas o verotoxinas. El uso de ambos nombres sinónimos está basado por un lado en su alta homología con la toxina *Shigella* (también el concepto de Shiga-Like-Toxin es usado) y por otro lado en su toxicidad frente a las células Vero. Se denominan por tanto como EHEC aquellas STEC / VTEC (*E. coli* productoras de shigatoxina / *E. coli* productoras de verotoxina) que son capaces de provocar enfermedades y por tanto representan variantes patogénicas para el hombre. Debido a su estructura antigénica se les asigna también a diferentes serotipos. Debido a su estructura antigénica se les asigna también a diferentes serotipos. Algunos serotipos se encuentran con mayor frecuencia que otros en los enfermos. Tampoco todos poseen la misma capacidad en marcadores de virulencia, valga mencionar entre los que se destacan, junto a las dos shigatoxinas Stx 1 y Stx 2, principalmente a la intimina y a la enterohemolisina. La información para la producción de shigatoxina está situada en un bacteriófago integrado en el cromosoma de la bacteria. La producción de shigatoxina tiene distintos grados de intensidad en las diferentes cepas STEC, de tal forma que no es posible recomendar un examen para detectar la presencia de estas toxinas directamente en las muestras de heces de pacientes enfermos de EHEC. Es preciso antes, como primer paso, enriquecer los patógenos en las muestras de heces de los pacientes aplicando un cultivo en un medio adecuado. Los medios apropiados son aquellos en los cuales se activen, además de los factores de selectividad para la *Escherichia coli*, especialmente también el potencial existente para la producción de la shigatoxina. La relación de gérmenes EHEC con respecto a la flora intestinal fisiológica comensal de *E. coli* es de aproximadamente 1 : 200. Por tanto un enriquecimiento efectivo con estimulación en la generación de shigatoxina es la condición fundamental para una detección exitosa en el ELISA. El presente caldo de enriquecimiento contribuye a cumplir con esta exigencia.

3. Fundamento del test

El RIDA® Anreicherungsbouillon promueve selectivamente el crecimiento de gérmenes de *E. coli* debido a la proporción en sales biliares que contiene y al mismo tiempo inhibe los gérmenes grampositivos.

La adición de mitomicina C estimula particularmente la producción de shigatoxina mediante la inducción de los profagos lambdaoideos del cromosoma bacteriano y por citólisis su liberación, de forma tal que también en los generadores débiles de toxina es posible la identificación segura de éstas en el cribado con ELISA utilizando el sobrenadante del cultivo de

enriquecimiento. Esto es especialmente importante en pacientes de SUH en los cuales con frecuencia sólo es posible encontrar un contenido muy bajo de gérmenes EHEC en las heces.

4. Contenido del envase

Los reactivos de un envase alcanzan para 100 determinaciones.

Tube	100 (25)	Tubos con 4 ml de caldo de enriquecimiento cada uno; contiene mTSB y mitomicina C
-------------	----------	---

5. Reactivos y su almacenamiento

Los tubos conteniendo el caldo de enriquecimiento se deben guardar entre 2 – 8 °C y pueden usarse hasta la fecha de vencimiento impresa en las etiquetas. La contaminación microbiana se debe evitar. Después de la fecha de vencimiento no se asumen garantías de calidad. Una turbidez apreciable en el caldo de enriquecimiento amarillo y transparente es un indicio de contaminación microbiana. Los tubos con ella no deben ser usados y deben eliminarse como se describe en el punto 10.2.

6. Reactivos adicionales necesarios – accesorios requeridos

6.1. Reactivos

- Buffer PBS o solución salina fisiológica (opcional)
- Solución de eliminación de residuos (Punto 10.1.)

6.2. Accesorios

- Pipetas desechables (Art. n°.: Z 0001)
- Micropipeta de 100 µl
- Torundas finas de algodón
- Vibrador oscilante horizontal o mezclador rotatorio con soporte para tubos de ensayo de tamaño 16,5 x 105 mm
- Incubadora para 37 °C

7. Medidas de seguridad

Sólo para el diagnóstico *in vitro*.

Este test debe ser realizado solamente por personal calificado de laboratorio. Se deben observar las líneas directivas de trabajo para laboratorios médicos. Las instrucciones para el uso del test deben cumplirse estrictamente.

El medio de enriquecimiento contiene mitomicina C. El contacto con la piel y mucosas debe ser totalmente evitado. Si accidentalmente se tiene contacto con el producto se debe enjuagar con agua en abundancia y cambiarse la ropa contaminada.

Los materiales (puntas de pipetas, torundas) que entren en contacto con el caldo de enriqueci-

miento se deben eliminar en la misma forma que éste (Punto 10.3.). Se deben respetar las normas de eliminación del caldo de enriquecimiento (Punto 10.2.).

8. Recolección y conservación de las muestras

Las muestras de heces donde se desean detectar la shigatoxina y verotoxina pueden conservarse como se describe a continuación, en caso que no se introduzcan de inmediato en el caldo de enriquecimiento:

- si es hasta 24 horas, a temperatura ambiente o entre 2 - 8 °C
- si es hasta 72 horas, entre 2 - 8 °C

La congelación de las muestras no es recomendable, ya que las bacterias EHEC se afectan y no se multiplican bien o en lo absoluto en el cultivo de enriquecimiento.

9. Realización del test

Para lograr un enriquecimiento exitoso se debe cumplir el procedimiento que se describe seguidamente y observar las cantidades a pipetear lo más exacto posible. Estas reglas corresponden al más actual estado de conocimientos y han sido coordinadas estrechamente con las autoridades de referencia correspondientes del RKI (Robert-Koch-Institut) y del BfR (Instituto Federal de Evaluación de Riesgos). Solamente se deben utilizar muestras de heces frescas o conservadas como máximo 3 días entre 2 - 8 °C.

9.1. Muestras líquidas o acuosas de heces

Se transfieren 100 µl (si se usan pipetas desechables Art.-n°. Z 0001 esto corresponde a una cantidad ligeramente por encima del segundo espesamiento) o una torunda fina embebida en la muestra a 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon y se resuspenden mediante suficiente agitación.

9.2. Muestras sólidas de heces

Se toman de 50 - 100 mg de muestra con una espátula o asa de siembra desechable y se suspenden en 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon. De forma alternativa es posible también frotar y absorber con una torunda fina (preferiblemente en distintas partes de la muestra de heces) una cantidad equivalente y suspenderla con agitación fuerte en 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon. Igualmente es apropiado el uso de una suspensión de heces preparada previamente en PBS (50 - 100 mg en 1 ml de buffer), de la cual se toman 500 µl y se siembran en 4 ml de RIDA® Anreicherungsbouillon.

9.3. Enriquecimiento

El caldo de enriquecimiento inoculado según 9.1. o 9.2. se incuba en posición inclinada durante 18 - 24 h a 37 °C bajo agitación (120 - 160 rpm) y suficiente entrada de oxígeno (medio giro del tapón de cierre). Se debe observar que no haya escape de líquido. Para el mezclado son

igualmente adecuados un agitador oscilante horizontal o un mezclador rotativo. Después de 24 h como máximo se centrifuga el caldo de enriquecimiento a 2500 g a 5 min. Se toman 100 µl del sobrenadante y sin previa dilución se utilizan en el test RIDASCREEN® Verotoxin ELISA.

Atención:

Si en la superficie del caldo de enriquecimiento se ha formado una biopelícula densa, entonces se debe eliminar ésta cuidadosamente para no transferirla a la microplaca. Esta biopelícula puede dar origen a resultados falsos positivos debido a que por su textura altamente pegajosa se adhiere a las cavidades de la microplaca.

Si en caso de obtener resultados positivos en el ELISA se planea enviar material de muestra para la verificación en un laboratorio certificado de referencia (PCR e identificación de gérmenes), se recomienda seguir este procedimiento:

1. Decantar el sobrenadante residual del tubo después de la centrifugación
2. Extraer totalmente el aglomerado con una torunda
3. Transferir el material adherido a la torunda a un medio apropiado de transporte (Cary Blair, Stuart o Amies)
4. Envío (la forma óptima es en frío) al laboratorio especial correspondiente para los análisis de comprobación.

Atención:

la torunda que ha estado en contacto directo con la muestra de heces también puede enviarse en los medios de transporte mencionados para ser examinada.

10. Eliminación de los medios y materiales conteniendo mitomicina C

La mitomicina C es cancerígena y se requiere que los medios nutrientes y materiales que han estado en contacto con ella sean eliminados según las directivas para sustancias peligrosas vigentes en Alemania (residuales especiales), o en el extranjero de acuerdo a las normas específicas nacionales.

10.1. Disolución para residuales

Wofasteril® al 0,5 % (o ácido peracético al 0,2 %) en ácido acético al 5 %

o sea: 50 ml de ácido acético

+ 5 ml de Wofasteril® (o 2 ml de ácido peracético)

en 1 litro de agua destilada

Conservar entre 2 - 8 °C

Aviso:

Wofasteril® se puede adquirir en la firma Kesla Hygiene AG, D-06803 Greppin, Alemania

Telf.: +49 (0) 3494 69950 ; www.kesla.de/hygiene

10.2. Eliminación del Caldo de enriquecimiento

Añadir igual volumen de la solución de eliminación al cultivo de enriquecimiento (o sea 4 ml de

cultivo + 4 ml de solución de eliminación), dejar actuar el reactivo durante toda la noche a temperatura ambiente y entonces someter a autoclave por lo menos una hora a 121 °C.

10.3. Eliminación de materiales

Las puntas de pipetas y torundas se deben eliminar junto con el caldo de enriquecimiento según el Punto 10.2.

11. Resultado clínicos

En una validación de medios de enriquecimiento realizada por el Inst. Fed. de Med. Veterin. y Protección Sanitaria al Consumidor (BGVV) el RIDA[®] Anreicherungsbouillon con adición de mitomicina evidenció ser claramente superior frente a otros medios que no la contienen, independientemente de si estos medios estaban complementados solo con antibióticos (Novobiocina, Cefsoludina), o con sales biliares o con ambos suplementos. En las muestras clínicas de heces de pacientes con SUH la adición de mitomicina conllevó un aumento promedio de 37,5 %. En muestras de heces inoculadas artificialmente con aislados de cepas (conocidas como productoras de shigatoxina) el suplemento de mitomicina coadyuvó a una elevación en la detección de shigatoxina entre un 40 - 50 % frente a medios de enriquecimiento sin mitomicina. La concentración de mitomicina aplicada al caldo de enriquecimiento demostró en un estudio de mutagenicidad llevado a cabo recientemente (no publicado) ser solo mutagénico en muy bajo grado, de forma tal que su utilización para el logro de un diagnóstico sensible de shigatoxina está justificado. Actualmente no se conocen otros inductores mejores y al mismo tiempo menos inofensivos para la liberación de shigatoxina.