

Antisueros *E. coli* Difco

USO PREVISTO Difco *E. coli* O Antisuero O157 y Difco *E. coli* H Antisuero H7 son antisueros que se utilizan para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7.

RESUMEN Y EXPLICACION

E. coli O157:H7 es un patógeno de transmisión alimentaria que puede causar enfermedades entéricas potencialmente fatales en los seres humanos¹⁻⁷. Esta enfermedad se caracteriza por la aparición repentina de calambres y dolores abdominal graves, seguidos de heces líquidas posiblemente con gran cantidad de sangre. Una serie de 107 brotes que incluyeron a 387 personas fue rastreada hasta dar con un queso Camembert importado en los Estados Unidos en 19718.

E. coli O157:H7 fue reconocida como causa de colitis hemorrágica en 19824 y de síndrome urémico hemolítico en 19839. El brote de 1982 fue debido a la ingestión de hamburguesas^{4,10}.

La incidencia de la enfermedad causada por este organismo se ha incrementado significativamente en la última década^{3,11}. El brote más importante de la enfermedad por *E. coli* O157:H7 ocurrió en enero de 1993, en el estado de Washington, en el que se confirmaron más de 600 casos de colitis hemorrágica¹. El origen del brote fue identificado como la hamburguesa poco cocida en varios puntos de venta de la misma cadena de restaurantes de comida rápida.

E. coli O157:H7 es un patógeno entérico que requiere sólo una pequeña cantidad de inóculo para causar la enfermedad. Generalmente se transmite por alimentos elaborados en grandes cantidades, cuya preparación no siempre está sujeta a controles estrictos y se sirven a una clientela objetivo (los niños y los ancianos constituyen el grupo de mayor riesgo de complicaciones por la enfermedad). El organismo se ha aislado en varios alimentos, incluidos los siguientes: hamburguesa poco cocida, agua potable, patatas nuevas, panecillo con pavo, leche cruda y sidra de manzana. La determinación de serotipos de *E. coli* entérica hemorrágica es útil para la documentación epidemiológica de la propagación de una cepa en particular en un brote por transmisión alimentaria¹¹.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Difco *E. coli* O Antisuero O157 se utiliza en la técnica de aglutinación en tubo para la valoración del antígeno O.

Difco *E. coli* H Antisuero H7 se utiliza en la técnica de aglutinación en tubo para la detección de antígenos H. Estos antisueros se utilizan para confirmar la presencia de *E. coli* O157:H7 después del aislamiento selectivo.

La técnica serológica se basa en la reacción de un antisuero específico con su antígeno homólogo. Mientras que la especificidad de los métodos serológicos no es absoluta, la determinación de serotipos de *E. coli*, junto con las características bioquímicas, puede proporcionar una identificación exacta del agente etiológico.

REACTIVOS

Difco *E. coli* O Antisuero O157 y **Difco** *E. coli* H Antisuero H7 son antisueros de conejo policlonales y liofilizados que contienen aproximadamente 0,2% de azida sódica como conservante.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

El envase de este producto contiene caucho natural seco.

Emplee una técnica aséptica y siga las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todo el proceso. Después del uso, se deberán esterilizar muestras, envases, portaobjetos, tubos y demás material contaminado en autoclave. Es necesario seguir al pie de la letra las instrucciones de uso.

ADVERTENCIA: Este producto contiene azida sódica, la cual es tóxica en caso de inhalación, contacto con la piel e ingestión. El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico. En caso de contacto con la piel, lavar de inmediato el área afectada con abundante agua. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al eliminar el material por el desagüe, utilizar un gran volumen de agua para evitar la acumulación de azidas.

Almacenamiento: Conservar los antisueros **Difco** *E. coli*, liofilizados y rehidratados, a una temperatura de 2 – 8 °C. Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes de las especificadas es perjudicial para los productos.

La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada.

Deterioro del producto: No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro.

RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Para aislamiento de *E. coli* O157 en muestras fecales con sangre macroscópica, utilizar agar MacConkey sorbitol. Para aislar este organismo de los alimentos, utilizar SMAC-CT (agar MacConkey sorbitol con cefixima y telurito)12. Sin embargo, los niveles altos de organismos coliformes contaminantes ocultarán las tinciones de O15713. Los procedimientos para la confirmación serológica mediante antisueros **Difco** *E. coli* requieren un cultivo puro del organismo de prueba aislado en agar infusión de ternera u otro medio sólido enriquecido.

PROCEDIMIENTOS

Materiales suministrados: **Difco** *E. Coli* O Antisuero O157 y **Difco** *E. Coli* H Antisuero H7.

Materiales necesarios pero no suministrados: Agar infusión de ternera, medio para motilidad GI (Motility GI Medium), baño María a 50 ± 2 °C, formalina, patrón N° 3 de McFarland de sulfato de bario, tubos de cultivo de 12 x 75 mm y gradilla, pipetas serológicas de 1 mL, solución de NaCl al 0,85% estéril.

Preparación del reactivo

Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas.

Asegúrese de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos, como, por ejemplo, detergente.

Antisueros **Difco** *E. Coli*: Para rehidratar, agregar 3 mL de solución de NaCl al 0,85% estéril a cada vial. Girar suavemente para disolver el contenido por completo. Los antisueros rehidratados se consideran como diluciones de trabajo 1:2.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

En el momento de uso, analizar los cultivos de control tanto positivos como negativos para comprobar el rendimiento de los antisueros, las técnicas y la metodología.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones de CLSI (antes NCCLS) y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Procedimiento de análisis

Prueba en tubo para valoración del antígeno O

- 1-Preparar cultivos puros del organismo de prueba mediante preparación en placa de agar infusión de ternera e incubación a 35 ± 2 °C durante 16 – 18 h.
- 2-Suspender el crecimiento del aislado de prueba obtenido del medio de agar sólido en solución de NaCl al 0,85% para lograr una suspensión homogénea.
- 3-Calentar la suspensión de organismo en baño María (hirviendo) durante 30 – 60 min. El cultivo debe ser homogéneo. Si se genera precipitado, el cultivo es rugoso y debe descartarse la suspensión.
- 4-Dejar enfriar la suspensión; diluir con solución de NaCl al 0,85% a una densidad aproximada al patrón N° 3 de McFarland de sulfato de bario.
- 5-Agregar formalina a la concentración final de 0,5% por volumen.
- 6-En una gradilla, preparar una fila de 8 tubos de ensayo para cada suspensión de organismo que se ha de analizar.
- 7- Dispensar 0,9 mL de solución de NaCl al 0,85% al primer tubo en cada fila y 0,5 mL a los tubos restantes.
- 8-Preparar una serie de diluciones con **Difco** *E. Coli* O Antisuero O157 rehidratado. Con una pipeta serológica de 1 mL, agregar 0,1 mL de antisuero al tubo 1 de cada fila y mezclar bien. Transferir 0,5 mL del tubo 1 al tubo 2 y mezclar bien. De manera similar, continuar transfiriendo 0,5 mL hasta el tubo 7 y descartar 0,5 mL del tubo 7 después de mezclar. El tubo 8 es un tubo de control negativo solamente con solución de NaCl al 0,85%.
- 9-Agregar 0,5 mL de suspensión del organismo de prueba a cada uno de los 8 tubos. Al agregar la suspensión del organismo de prueba, las diluciones finales serán desde 1:40 hasta 1:2.560 para los tubos 1 a 7, respectivamente.
- 10-Agitar la gradilla para mezclar. Incubar en baño María a 50 ± 2 °C durante 18 – 24 h.
- 11-Efectuar una lectura para determinar la aglutinación.

Prueba en tubo para detección del antígeno H

- 1-Preparar un cultivo con motilidad activa del cultivo en el que se sospecha la presencia de *E. coli*, mediante las transferencias sucesivas de medio para motilidad GI. Se necesitan al menos 2 – 3 pasadas por el medio para motilidad GI antes de intentar establecer la presencia y la identidad de los antígenos H. Las cepas aisladas recientes de *E. coli* por lo general tienen flagelos poco desarrollados.
- 2- Inocular un asa llena de cultivo de medio para motilidad GI en un tubo de caldo infusión de ternera. Incubar de 6 – 8 h a 35 ± 2 °C o hasta la mañana siguiente, si es necesario.
- 3-Inactivar el cultivo agregando formalina a una concentración final de 0,3% (0,3 partes de formaldehído por 100 partes de cultivo de caldo de infusión de ternera). Si es necesario, ajustar la densidad de la suspensión con solución

salina tratada con formalina para aproximar al patrón N° 3 de McFarland de sulfato de bario. Este cultivo de caldo se utilizará como antígeno de prueba en el paso 6.

4-Preparar una dilución 1:500 de **Difco E. coli** H Antisuero H7 agregando 0,2 mL de solución de trabajo 1:2 rehidratada a 49,8 mL de solución de NaCl al 0,85%.

5-Pipetear 0,5 mL de antisuero diluido en un tubo de ensayo.

6-Agregar 0,5 mL del cultivo de caldo del organismo de prueba del paso 3 y mezclar bien. La dilución de antisuero resultante será de 1:1000.

7- Incubar en baño María a 50 ± 2 °C durante 1 h.

8-Efectuar una lectura para determinar la aglutinación.

RESULTADOS

Observar el resultado de la prueba con luz indirecta contra un fondo oscuro. Registrar la aglutinación de la manera siguiente: 4+ 100% de aglutinación de células; líquido sobrenadante transparente a ligeramente lechoso. 3+ 75% de aglutinación de células; líquido sobrenadante ligeramente turbio. 2+ 50% de aglutinación de células; líquido sobrenadante moderadamente turbio. 1+ 25% de aglutinación de células; líquido sobrenadante turbio. ± Menos de 25% de aglutinación de células.

Sin aglutinación:

Difco E. coli O Antisuero O157: los tubos con 2+ o más de aglutinación en 1:320 o más se consideran positivos.

Difco E. coli H Antisuero H7: los tubos con 2+ o más de aglutinación se consideran positivos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1- Las técnicas serológicas con antisueros de *E. Coli* sirven como evidencia para corroborar la identificación de *E. coli* O157:H7. No se puede realizar una identificación final sin considerar la caracterización morfológica, serológica y bioquímica.

2-El calor excesivo proveniente de fuentes externas (asa bacteriológica caliente, llama del mechero, fuente de luz, etc.) puede impedir la formación de una suspensión uniforme del microorganismo o causar la evaporación o precipitación de la mezcla de análisis. Pueden ocurrir reacciones positivas falsas.

3-Se generan aislados de cultivos rugosos que se aglutinarán espontáneamente, lo que causa aglutinación en un suero normal (autoaglutinación). Es necesario seleccionar y analizar colonias uniformes en los procedimientos serológicos.

4-Una exposición prolongada de los reactivos a temperaturas diferentes a las especificadas es perjudicial para los productos.

5-En esta prueba es importante respetar el tiempo y la temperatura de incubación recomendados. Además, se debe comprobar que el baño María se encuentre en un lugar libre de vibraciones mecánicas.

6-Descarte los antisueros **Difco E. Coli** con turbidez o precipitado después de la rehidratación o almacenamiento.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

El rendimiento de **Difco E. coli** O Antisuero O157, fabricado por Difco Laboratories, se comparó con una prueba de látex disponible comercialmente, en un estudio publicado por Chapman¹⁴. Se analizaron cultivos puros de 91 aislados bacterianos^{14,15}.

En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos. Todos las muestras de *E. coli* anteriormente confirmadas como O157 dieron resultado positivo con el método de aglutinación en tubo de **Difco**. Todos los demás organismos analizados dieron resultado negativo con el método de aglutinación en tubo de **Difco**.

Cantidad de muestras	Cepa	Positivos a la prueba de aglutinación en tubo con Difco E. Coli Antisuero O157	Positivos a la prueba de látex disponible comercialmente
30	<i>E. coli</i> O157	30	30
30	<i>E. coli</i> non-O157	0	0
30	Organismos no fermentadores de sorbitol	0	0
1	<i>Escherichia hermannii</i>	0	0

DISPONIBILIDAD

N.ºref.	Descripción
229701	Difco E. coli O Antisuero O157, 1 x 3 mL
21591	Difco E. coli H Antisuero H7, 1 x 3 mL