

BD Antisueros y Antígenos Listeria Difco

USO PREVISTO

Difco Listeria O Antisueros (antisueros para Listeria O) tipos 1, 4 y Poly se utilizan para identificar *Listeria monocytogenes* en la prueba de aglutinación en portaobjetos.

Difco Listeria O Antígenos tipos 1 y 4 (portaobjetos) se utilizan como controles positivos en la prueba de aglutinación en portaobjetos.

RESUMEN Y EXPLICACION

Descrita por primera vez en 1926 por Murray, Webb y Swann, *Listeria monocytogenes* supone un problema generalizado para la salud pública y las industrias alimentarias. Este organismo puede causar enfermedad y muerte en los seres humanos, particularmente en las personas inmunodeprimidas y las mujeres embarazadas. El primer brote por vía alimentaria detectado de listeriosis fue en 1985 y, desde ese entonces, las pruebas microbiológicas y epidemiológicas de listeriosis, tanto de casos esporádicos como epidémicos, han demostrado que la vía principal de transmisión es a través de los alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. El organismo se ha aislado en plantas de elaboración de productos lácteos y otros productos alimentarios; es omnipresente en el medio ambiente natural y se encuentra en un amplio espectro de alimentos sin procesar, así como en el suelo, alcantarillados, ensilaje y aguas fluviales.

Listeria spp. se cultiva en un intervalo de pH de 4,4 - 9,6 y sobrevive en productos alimentarios con niveles de pH fuera de estos parámetros⁶. *Listeria* spp. son bacilos microaerofílicos, gram positivos, asporógenos, no encapsulados, no ramificados, regulares y cortos. La movilidad es más pronunciada a una temperatura de 20 °C. Las cepas de *Listeria* spp. se dividen en serotipos basados en antígenos celulares (O) y flagelares (H)⁷. Se conocen trece serotipos de *L. monocytogenes*. La mayoría de las enfermedades humanas son causadas por los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b⁸.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

La identificación de *L. monocytogenes* incluye confirmación tanto bioquímica como serológica.

La confirmación serológica requiere que el microorganismo (antígeno) reaccione con su correspondiente anticuerpo. Esta reacción *in vitro* produce la formación de grumos macroscópicos denominada aglutinación. La reacción homóloga deseada es rápida, de unión fuerte (alta afinidad) y no disociativa (alta avidéz).

Dado que un microorganismo (antígeno) puede aglutinarse con un anticuerpo producido como respuesta a alguna otra especie, son posibles las reacciones heterólogas. Éstas se caracterizan por ser débiles y de lenta formación. Dichas reacciones imprevistas y posiblemente impredecibles pueden causar confusión en la identificación serológica. Una reacción de aglutinación homóloga positiva debería apoyar la identificación morfológica y bioquímica del microorganismo.

La aglutinación del antígeno somático en la prueba en portaobjetos aparece como una aglutinación granular firme. Las reacciones homólogas son rápidas y fuertes (3+). Las reacciones heterólogas son débiles y lentas.

REACTIVOS

Difco Listeria O Antisueros tipos 1, 4 y Poly son antisueros policlonales de conejo liofilizados que contienen aproximadamente 0,1% de azida sódica como conservante. Listeria O Antisueros Tipos 1 y 4 son específicos para los serotipos respectivos de *L. Monocytogenes*, mientras Listeria O Antisero Poly contiene aglutininas para *L. monocytogenes*, serotipos 1 y 4.

Difco Listeria O Antígenos tipos 1 y 4 (portaobjetos) son suspensiones de los serotipos apropiados de *L. monocytogenes* con formaldehído al 0.3% como conservante. Cuando se utilizan de acuerdo al procedimiento sugerido, los reactivos dan los siguientes resultados:

Reactivo Frasco Número de pruebas

Listeria O Antisero	1 mL	400 pruebas en portaobjetos
Listeria O Antígeno (portaobjetos)	5 mL	100 pruebas en portaobjetos

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

El envase de este producto contiene goma natural seca.

Emplear una técnica aséptica y seguir 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, que 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:

Almacenar **Difco** Listeria O Antisueros, liofilizados y rehidratados, a una temperatura de 2-8 °C.

Almacenar **Difco** Listeria O Antígeno (portaobjetos) a una temperatura de 2-8°C.

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

Deterioro del producto: La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada. No utilizar si el producto está aglutinado o descolorido, o si evidencia otras señales de deterioro. Antes de utilizar los frascos de antígeno, examinarlos para detectar aglutinación. Las suspensiones que presenten aglutinación no son utilizables y deberán ser desechadas. Descartar los antisueros que tengan turbidez o que presenten precipitados después de la rehidratación o el almacenamiento.

RECOGIDA Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Muestras clínicas: *Listeria* puede recuperarse de medios de diferenciación selectivos tales como el agar Oxford, agar Oxford modificado, agar LPM o medio PALCAM. Consultar las referencias correspondientes para obtener recomendaciones específicas acerca del aislamiento de *Listeria* de muestras clínicas⁸⁻¹⁰. Determinar que se ha obtenido un cultivo puro del microorganismo y que las reacciones de las pruebas bioquímicas sean acordes con la identificación del organismo como *L. monocytogenes*. Después de haberse satisfecho estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

Muestras alimentarias o lácteas: Puede recuperarse *Listeria* cuando las muestras se procesan para recuperar microorganismos lesionados y evitar el crecimiento excesivo de microorganismos competidores. Consultar las referencias apropiadas para obtener los procedimientos recomendados para el aislamiento de *Listeria* a partir de alimentos^{6,11,12}. Al seguir el protocolo establecido, aislar un cultivo puro del microorganismo y confirmar que las reacciones de pruebas bioquímicas son acordes con la identificación del organismo como perteneciente a la especie *L. monocytogenes*. Después de haberse satisfecho estos criterios, se podrá realizar la identificación serológica.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: **Difco** Listeria O Antisuero tipo 1, **Difco** Listeria O Antisuero tipo 4, **Difco** Listeria O Antisuero Poly, **Difco** Listeria O Antígeno tipo 1 (portaobjetos), **Difco** Listeria O Antígeno tipo 4 (portaobjetos).

Materiales necesarios pero no suministrados:

Prueba en portaobjetos: **Difco** FA Buffer (deshidratado), portaobjetos de aglutinación, aplicadores, baño María (80 - 100 °C), droppers.

Preparación del reactivo: Equilibrar todos los materiales a temperatura ambiente antes de realizar las pruebas. Asegurarse de que el material de vidrio y las pipetas estén limpios y libres de residuos, como, por ejemplo, detergente.

Listeria O Antisueros: Para rehidratar, agregar 1 mL de agua purificada estéril a cada frasco. Girar suavemente para disolver el contenido por completo.

Listeria O Antígenos (portaobjetos) están listos para usar.

Procedimiento de análisis

Prueba en portaobjetos

1-Rehidratar **Difco** FA Buffer conforme a las instrucciones de la etiqueta.

2-Suspender un asa llena del crecimiento del aislado de prueba de un medio de agar sólido no inhibitor en aproximadamente 5 mL de **Difco** FA Buffer.

3-Calentar la suspensión de organismo a 80-100 °C (en baño María) durante 1 h.

4-Centrifugar la suspensión a 2.000-5.000 RCF durante 15-20 min y retirar el grueso del líquido sobrenadante.

5-Volver a suspender el organismo en la porción restante del líquido sobrenadante.

6-Preparar una solución de 1:20 de **Difco** Listeria Antisuero deseado en una solución de NaCl al 0,85%.

7-En un portaobjetos de aglutinación, colocar 1 gota del **Difco** Listeria Antisuero diluido deseado en cada una de las dos áreas diferentes. Colocar una gota de **Difco** FA Buffer en la tercera área del mismo portaobjetos.

La primera gota de antisuero se utilizará para el aislado de prueba y la segunda, para el control positivo. La gota de **Difco** FA Buffer se utilizará para el control negativo.

8-Colocar 1 gota de suspensión de organismo del paso 5 a la primera gota de antisuero.

9-**Control positivo:** Colocar 1 gota de **Difco** Listeria O Antígeno (portaobjetos) homólogo a la segunda gota de antisuero.

10-**Control negativo:** Colocar 1 gota de suspensión de organismo del paso 5 a la gota de **Difco** FA Buffer en el portaobjetos de aglutinación.

11-Girar el portaobjetos durante 1 - 2 min y efectuar la lectura para determinar si se ha producido aglutinación.

Control de calidad del usuario: En el momento del uso, analizar los cultivos de control tanto positivos como negativos para comprobar el rendimiento de los antisueros, las técnicas y la metodología. Si los resultados de la prueba para el control positivo o negativo no resultan tal como se describen, la prueba no es válida y los resultados no se pueden informar.

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 del control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones del CLSI (antes NCCLS) y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

Prueba de portaobjetos

1-Efectuar la lectura y registrar los resultados de la siguiente forma:

2-Para las cepas aisladas de análisis, un valor de aglutinación de 3+ o más al cabo de 1-2 min indica un resultado positivo.

3-Una aglutinación parcial (menos de 3+) o demorada debe considerarse como reacción negativa.

4+	100% de aglutinación (fondo transparente a ligeramente lechoso)
3+	75% de aglutinación (fondo ligeramente turbio)
2+	50% de aglutinación (fondo moderadamente turbio)
1+	25% de aglutinación (fondo turbio)
-	Sin aglutinación

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1-Las técnicas serológicas que utilizan **Difco** Listeria O Antisueros sirven para corroborar la identificación de *L. monocytogenes*. 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-Efectivamente ocurren cepas aisladas de cultivos rugosos, las cuales se aglutinarán espontáneamente, lo que causa la aglutinación de los controles negativos (autoaglutinación). Si ocurre autoaglutinación, el cultivo es rugoso y no se podrá analizar. Realizar un subcultivo en un medio no inhibitorio, incubar y repetir la prueba del organismo.

4-Las reacciones de aglutinación de 3+ o más se interpretan como reacciones positivas. Las reacciones cruzadas que generan aglutinación de 1+ o 2+ son posibles, dado que existen antígenos somáticos en común entre diferentes organismos, tales como estafilococos, enterococos y la especie *Bacillus*.

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

6-La exposición de Listeria O Antígenos a temperaturas por debajo de 2 °C puede causar autoaglutinación. Los antígenos deben ser suspensiones uniformes homogéneas. Inspeccionar los frascos de antígenos en busca de aglutinación antes de su utilización. Las suspensiones que presenten aglutinación no son utilizables y deberán ser desechadas.

7-Descartar cualquier **Difco** Listeria O Antisuero turbio o con precipitación después de la rehidratación o almacenamiento.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1-El control positivo con el Listeria O Antígeno apropiado debe mostrar una aglutinación de 3+ o más en la prueba en portaobjetos.

2-El control positivo con Listeria O Antígeno apropiado debe mostrar una aglutinación de 2+ o más a 1:320 en la prueba en tubo.

3-El control negativo no debe mostrar ningún indicio de aglutinación.

La sensibilidad de **Difco** Listeria O Antisueros tipos 1, 4 y Poly se determina al demostrar una reactividad apropiada en la prueba en portaobjetos, como se define en la sección "Resultados", utilizando el **Difco** Listeria O Antígeno homólogo. La especificidad se determina al demostrar la falta de reactividad frente a **Difco** Listeria O Antígenos no relacionados (heterólogos).

DISPONIBILIDAD

N° de cat. Descripción

- 223001 **Difco** Listeria O Antisuero tipo 1, 1 mL
- 223011 **Difco** Listeria O Antisuero tipo 4, 1 mL
- 223021 **Difco** Listeria O Antisuero Poly, 1 mL
- 223031 **Difco** Listeria O Antígeno tipo 1(portaobjetos), 5 mL
- 223041 **Difco** Listeria O Antígeno tipo 4 (portaobjetos), 5 mL
- 223143 **Difco** FA Buffer, deshidratado, 6 x 10 g
- 223142 **Difco** FA Buffer, deshidratado, 100 g