Consultar el modo de empleo en el prospecto del envase

Revisado: 1996.9
1995.10

Ref. K294616

Antisueros anti-*Listeria* "SEIKEN"

Listeria monocytogenes es un bacilo grampositivo corto con flagelos, que no forma endosporas. Taxonómicamente pertenecen a *Listeria* ocho cepas bacterianas. Entre estas cepas bacterianas, una, *L. monocytogenes,* se considera patógena en humanos y animales.

Estos antisueros están pensados para la tipación de los antígenos O y H de *L. monocytogenes,* y cada antisuero es un producto líquido que contiene aglutininas específicas para cada tipo de antígeno. Estos antisueros se preparan mediante hiperinmunización de conejos con células completas o flagelos inactivados por calor, calentados a 56 ºC durante 30 minutos, y eliminando las aglutininas cruzadas mediante absorción y filtración a través de una membrana esterilizada. Cada antisuero contiene un 0,1 % p/v de azida sódica como conservante.

[PRODUCTOS]

Los antisueros anti-*Listeria* proceden de conejos y contienen un 0,08% de azida sódica como conservante. Se proporcionan los siguientes tipos de sueros en volúmenes de 2 mL en viales con cuentagotas adjunto y listos para su uso.

El equipo completo consta de 12 viales de cada uno de los antisueros.
8 tipos de antisueros anti-O (I/II, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII y IX)
4 tipos de antisuero anti-H (A, AB, C y D)

[USO PREVISTO]

Determinación del serotipo de *L. monocytogenes*.

[PRINCIPIO DE MEDIDA]

Cuando se mezcla este reactivo con la cepa *L. monocytogenes* que tiene los antígenos correspondientes al reactivo, se produce la reacción antígeno-anticuerpo que provoca la aglutinación. Esta reacción se observa macroscópicamente para determinar cada serotipo.

[PROCEDIMIENTOS]

1. Material necesario, pero no suministrado

Portaobjetos de vidrio, rotulador para vidrio, tubos de ensayo pequeños, pipetas y micropipetas, asa microbiológica, solución salina fisiológica, solución salina fisiológica que contenga 1 vol% de formol, un baño María (50 ºC), un autoclave (121 ºC) o un baño María (100 ºC), centrifugadora.

2. Preparación de los reactivos

Los antisueros vienen listos para su uso.

3. Muestra

Deben serotiparse microorganismos cultivados procedentes de un cultivo puro e identificados como *L. monocytogenes* mediante pruebas bioquímicas. Si la muestra contiene cepas múltiples, puede que el serotipo no se identifique correctamente. Para la prueba de determinación del tipo H, deben utilizarse cepas móviles.

4. Procedimientos

A. **Determinación del antígeno O**

La determinación del antígeno O se lleva a cabo con bacterias inactivadas por calor utilizando el método de aglutinación en portaobjetos.

Debe prepararse una suspensión densa de antígeno bacteriano suspendiendo células cultivadas en una placa de agar BHI (infusión de cerebro corazón) con cloruro sódico al 0,2 % p/p para ajustar la concentración celular a unos 10 mg/mL, calentando la suspensión a 121 ºC durante 30 minutos, seguido de centrifugado a 3.000 rpm durante 20 minutos, y volviendo a suspender el precipitado con una pequeña cantidad de cloruro sódico al 0,2 % p/p.

1) **Prueba de aglutinación en portaobjetos utilizando antisueros polivalentes frente al tipo O**
   (1) Colocar una gota de antisuero I/II, antisuero V/VI y solución salina fisiológica (30 μ L) como control en un portaobjetos de vidrio limpio dividido en varias partes con un rotulador para vidrio.
   2) Colocar una suspensión antigénica correspondiente al grupo O (5-10 μ L) en el suero y la solución salina fisiológica sobre el portaobjetos de vidrio.
   (3) Mezclar los reactivos inclinando el portaobjetos de vidrio hacia delante y hacia atrás durante 1 minuto y observar el patrón de aglutinación. La aglutinación se observa macroscópicamente bajo luz transmitida, incluida la luz fluorescente. Debe confirmarse primero que no hay aglutinación en la reacción con la suspensión antigénica y la solución salina fisiológica. Sólo debe considerarse positiva la aglutinación fuerte observada en la reacción con cada suero en el plazo de un minuto. La aglutinación retardada o débil se considera negativa.
   (4) Si una muestra da resultados positivos con el antisuero I/II, realizar los pasos 1 a 3 anteriores utilizando un antisuero I y V. Si es positivo con el antisuero V/VI, repetirlos utilizando antisueros VI, VII, VIII y IX.

B. Determinación del antígeno H

La determinación del antígeno H se lleva a cabo utilizando el método del tubo de ensayo con bacterias cultivadas en un medio líquido. Para obtener resultados claros de la prueba, ya que *L. monocytogenes* sólo tiene de 1 a 4 flagelos, se recomienda potenciar la movilidad de los microorganismos de prueba pasándolos por un medio agar semilíquido.

Pueden utilizarse microorganismos pasados 3 a 4 veces por un medio BHI semilíquido (agar al 0,2%) con un tubo de Craigy para la inoculación del cultivo preparatorio en el medio BHI líquido. Después, debe prepararse una suspensión celular mediante cultivo en el medio BHI a 30 ºC durante la noche y añadiendo una cantidad igual de solución salina fisiológica que contenga 1 % p/v de formol.

Poner dos gotas de cada antisuero anti-H en tubos de ensayo distintos utilizando la jeringuilla adjunta a los recipientes y, después, añadir 0,5 mL de suspensión celular a cada uno. Utilizar como control un tubo que no contenga los antisueros.

Después de mezclar bien, mantener los tubos en un baño María (50 ºC – 52 ºC) durante una hora y observar a simple vista si se produce aglutinación o no. Tener cuidado de no agitar los tubos durante la observación ya que el aglutinante tiende a separarse fácilmente. El nombre del antisuero que produjo la aglutinación positiva debe considerarse el nombre del antígeno H que tiene la bacteria *L. monocytogenes* analizada.

[INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS]

El serotipo de *L. monocytogenes* debe determinarse según la combinación de los factores antigénicos O y los factores antigénicos H (consúltese la tabla siguiente).

Estructura antigénica de cada serotipo de *L. monocytogenes*

Serotipo	Antígeno O	Antígeno H
1/2a	I, II, (III)	AB
1/2b	I, II, (III)	ABC
1/2c	I, II, (III)	BD
3a	II, (III), IV	AB
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	ABC
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	BD
4a	(III), (V), VII, IX	ABC
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	ABC
4b	(III), V, VI	ABC
4c	(III), V, VII	ABC
4d	(III), (V), VI, VIII	ABC
4e	(III), V, VI, (VIII), (IX)	ABC
7	(III), XII, XIII	ABC

[RENDIMIENTO]

1. Sensibilidad

1) Sueros anti-O: cuando una gota del producto reacciona en un portaobjetos de vidrio con una cepa de referencia de un serotipo conocido suministrado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, se observó macroscópicamente una aglutinación granular.

2) Sueros anti-H: cuando 3 gotas del producto reaccionaron en un tubo de ensayo pequeño con una cepa de referencia de un serotipo conocido suministrado por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, se observó macroscópicamente una aglutinación de tipo algodón-lana .

2. Especificidad

Cuando se analizó el producto según los mismos procedimientos que los aplicados para la prueba de sensibilidad, se observó aglutinación con la única cepa de referencia del serotipo correspondiente.

SISTEMAS AVANZADOS DE ANÁLISIS, S.L.
CIF: B-47700026
C/. Cardenal Torquemada, 24
Tel. 983 251 143 • 637 596 017
47010 VALLADOLID
www.analisisavanzados.com