

Uso deseado

La prueba ECOHEM-ADN es un ensayo basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) que permite detectar cualitativamente ADN bacteriano correspondiente a los genomas de *Escherichia coli* serogrupo O157:H7 en una amplia variedad de muestras (humanas, animales e industriales alimentaria o farmacéutica).

Resumen

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria presente frecuentemente en el intestino distal de los organismos de sangre caliente (aves o mamíferos). La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias [1]. Las cepas patógenas de *E. coli* se han categorizado por serogrupos, mecanismos de patogenicidad, síntomas clínicos o factores de virulencia de la bacteria [2]. La *E. coli* enterohemorrágica se ha asociado con colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, esta bacteria tiene la capacidad de adherirse íntimamente a la membrana del huésped, destruirla y posteriormente producir diarrea sanguinolenta. Las *E. coli* enterohemorrágicas se caracterizan por su capacidad de producir grandes cantidades de toxina sigA, la cual es responsable de dañar el revestimiento intestinal del huésped, la cepa más común que produce esta toxina es la O17:H7, la cual se ha encontrado en todo el mundo en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y agua [3, 4]. Debido a su fácil frecuencia su detección es de importancia epidemiológica y es necesario su monitoreo en alimentos y agua de consumo humano. Actualmente se han desarrollado diferentes métodos para su detección como por ejemplo medios de cultivo selectivos, inmunoensayos enzimáticos y ensayos de PCR [5]. Los ensayos moleculares basados en amplificación isotérmica han demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad [6].

Principio

La prueba ECOHEM-ADN se basa en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) empleando sets de primers dirigidos a determinadas regiones del ADN bacteriano correspondiente a los genomas de *E. coli* O157:H7 para su detección cualitativa en una amplia variedad de muestras. Una vez extraído el ADN de la muestra se procede con el ensayo LAMP. La reacción LAMP se realiza mezclando la muestra (ADN purificado) con el reactivo seco y se incuba a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra contiene ADN de *E. coli* O157:H7 en una concentración mayor al límite de detección se llevará a cabo el proceso de amplificación y al mismo tiempo se incorporarán etiquetas biotina-FAM. En caso contrario, de no estar presente dicho ADN o se encuentre por debajo del límite de detección no se realizará el proceso de amplificación ni tampoco el etiquetado. Para poder revelar el resultado es necesario utilizar el producto **BIONET MULTI** (REF DLBIO01) **producto vendido por separado**.

Materiales

Incluidos (según presentación):

Presentación / Material	10 reacciones / cantidad	20 reacciones / cantidad	30 reacciones / cantidad
Instructivo de uso	1 pieza	1 pieza	1 pieza
Reactivo seco	10 tubos	20 tubos	30 tubos
Reactivo diluyente	1 tubo/ 250 µL	1 tubo/ 500 µL	1 tubo/ 750 µL
Control negativo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL
Control positivo	1 tubo/ 25 µL	1 tubo/ 50 µL	1 tubo/ 75 µL

No incluidos:

- Kit de purificación de ADN
- Cronómetro
- Contenedor de RPBI
- Micropipetas
- Puntas nuevas y estériles para micropipeta.
- Termobloque, baño seco o incubador
- Guantes de nitrilo
- Equipo de protección personal
- Material para toma de muestra

Almacenamiento y estabilidad de la prueba

- Almacene la prueba de acuerdo con las indicaciones de cada componente impresos en su etiqueta individual.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice la prueba después de la fecha de caducidad.

Recolección de la muestra

La recolección dependerá del tipo de muestra, por lo tanto, considere que:

- La muestra deberá recolectarse y almacenarse en un recipiente estéril, esto incluye bolsas herméticas.
- Los hisopos y soluciones utilizados para la toma de muestra de superficies deberán ser estériles.

Almacenamiento de la muestra

- Para muestras clínicas:
 - Una vez recolectada solo puede almacenarse hasta por dos horas a temperatura ambiente y hasta por 5 días en refrigeración (4 °C).
 - Para un mejor desempeño analice las muestras inmediatamente después de su recolección, una manipulación, almacenamiento o transporte incorrecto puede generar desviaciones en los resultados.
- Para muestras de alimentos:
 - Seguir las recomendaciones aplicables a cada alimento especificadas en la NOM 210 SSA1-2014.

Preparación de la muestra

En el caso de alimentos, una vez que la muestra es obtenida es necesario el enriquecimiento para permitir la detección de un número bajo de bacterias o células estresadas de *E. coli* O157:H7, siguiendo lo estipulado en los apartados H.7 de la NOM-210-SSA1-2014, para los diferentes alimentos.

Se recomienda realizar la purificación antes de iniciar el ensayo.

- **Purificación de ADN:**
Se sugiere purificar el ADN de la muestra siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de purificación, al final eluya el ADN purificado (preferentemente) en H₂O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8.
- **Sin purificación de ADN:**
 - Inactive la muestra a 95 °C por 5 minutos.
 - Centrifugue para precipitar restos sólidos
 - Diluya la muestra 1:10 en H₂O grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8 para su uso en la reacción.

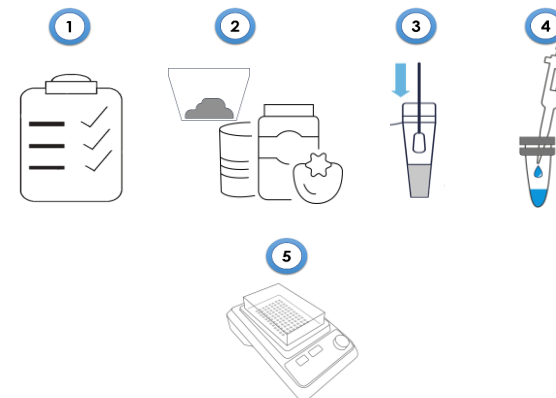
Instrucciones de uso

Permita que los componentes se atemperen o alcancen temperatura ambiente (18-30 °C) antes de su uso. Prepare una superficie limpia y nivelada para realizar el procedimiento.

1. Reconozca cada uno de los materiales y asegúrese que cuenta con todo lo necesario.
2. Recolecte la muestra cómo se menciona en la sección 'recolección de la muestra'.
3. Enriquezca y/o prepare la muestra cómo se indica en la sección 'preparación de la muestra'.
4. Para la reacción LAMP prepare de forma independiente cada tubo:
 - **Control positivo (C+):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control positivo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.
 - **Control negativo (C-):** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de control negativo y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.
 - **Muestra:** Coloque 20 µL de reactivo diluyente a un tubo de reactivo seco, luego 5 µL de muestra y mezcle por pipeteo, al finalizar cierre el tubo y rotule con M1.

Nota: se recomienda realizar duplicados (dos tubos de cada uno) por cada muestra a analizar. Cualquier cambio en el volumen de los reactivos, muestras o controles puede generar resultados erróneos.

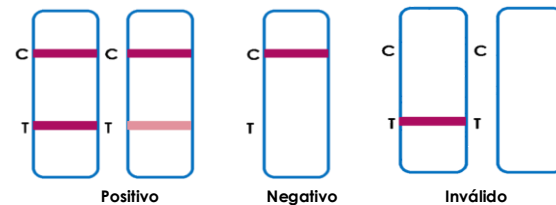
5. Coloque los tubos generados a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.
6. Siga las instrucciones descritas en el instructivo de uso de **BIONET MULTI**.



ATENCIÓN: Un esquema simplificado de las instrucciones de uso se encuentran detallados e ilustrados en la página 3 de 3 de este instructivo.

Interpretación de resultados

- **Identifique según lo proporcionado por BIONET MULTI**



Emita un dictamen en función de la siguiente tabla:

Resultado	Descripción
Control positivo	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Un resultado positivo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Control negativo	Resultado: Únicamente se visualiza una línea de color en la región de control (C). Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Muestra	Positivo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C) y otra línea de color en la región de prueba (T). Este resultado indica que se detectó el ADN genómico de <i>E. coli</i> O157:H7. Negativo: Se visualiza una línea de color en la región de control (C). No se observa ninguna línea de color en la región de prueba (T). Un resultado negativo indica que no se detectó el ADN genómico de <i>E. coli</i> O157:H7.
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Control de calidad

Un control interno está incluido en el producto BIONET MULTI. Una línea de color aparece en la región control (C), este es el control interno del procedimiento, su función es confirmar que hubo suficiente cantidad de muestra y el procedimiento fue correcto. Esta prueba incluye controles, por lo que, se recomienda emplearlos en cada análisis de muestra como buena práctica de laboratorio.

Limitaciones

- Los resultados deben ser interpretados por personal calificado.
- Esta prueba depende completamente del producto **BIONET MULTI**, por lo que solo con se obtendrá el mejor desempeño.
- La prueba ECOHEM-ADN es solo para uso profesional *in vitro*. Esta prueba cualitativa no puede determinar el valor cuantitativo ni la tasa de aumento en la concentración de ADN genómico de *E. coli* O157:H7.
- Esta prueba ha sido evaluada para la detección de ADN genómico de *E. coli* O157:H7 y solo debe ser usada para su detección y no para otros tipos de patógenos.
- La prueba ECOHEM-ADN sólo indica la presencia del genoma de *E. coli* O157:H7 en la muestra.
- Como con todas las pruebas de tamizaje, los resultados deben considerarse con toda información clínica disponible para el médico o personal calificado.
- Si el resultado de la prueba es negativo y los síntomas clínicos persisten se sugieren pruebas de seguimiento adicionales con otros métodos clínicos como las pruebas de cultivo, los resultados deben ser interpretados por un médico.
- La tonalidad que adquiera la membrana no interfiere en el resultado. Mientras la línea en la región control se visualice, el resultado es válido.
- Las pruebas no están autorizadas para vigilancia epidemiológica.
- El desempeño de la prueba se ha evaluado bajo las condiciones y características mencionadas en este manual. Se recomienda seguir las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.

Características de presentación

Precisión Intra-ensayo

La repetibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas por cada concentración incluyendo una libre de ADN genómico de *E. coli* O157:H7, se utilizó reactivo de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-Ensayo

La reproducibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas de 3 lotes diferentes de la prueba en dos días distintos por cada concentración incluyendo una libre de ADN genómico de *E. coli* O157:H7 Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Sustancias interferentes

Los siguientes compuestos han sido probados usando la prueba ECOHEM-ADN, no se observó interferencia.

- Ácido ascórbico
- Ácido úrico
- Glucosa
- Acido oxálico
- Aspirina
- Bilirrubina
- Urea
- Cafeína
- Omeprazol
- Albumina

Existen sustancias que pueden interferir durante la detección debido a una disminución de la carga bacteriana en las muestras dando lugar a resultados falsos negativos como el uso de medios de transporte con antibióticos como: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, estreptomycin, ciprofloxacino, gentamicina, detergentes, ácido cítrico, contaminantes ambientales entre otros.

Reactividad cruzada

La prueba ECOHEM-ADN se ha probado con muestras positivas para el siguiente panel. Ninguno presentó reactividad cruzada.

- *Acinetobacter baumannii*
- *Aeromonas hydrophila*
- *Arcobacter butzei*
- *Bacillus cereus*
- *Campylobacter*
 - o *coli*
 - o jejuni
 - o lari
- *Citrobacter freundii*
- *Cronobacter sakazakii*
- *Edwardsiella tarda*
- *Enterobacter*
 - o aerogenes
 - o cloacae
- *Enterococcus*
 - o faecium
- *Hafnia alvei*
- *Klebsiella*
 - o oxytoca
 - o pneumoniae
- *Escheichia coli*
 - o O26:H11
 - o O45:H2
 - o O55:H7
 - o O103:H2
 - o O111:NM
 - o O121:H19
 - o O145:H28
- *Lactobacillus brevis*
- *Listeria*
 - o grayi
 - o innocua
 - o ivanovi
 - o seeligeri
 - o welshimeri
- *Listonella anguillarum*
- *Morganella morganii*
- *Proteus*
 - o Hauseri
 - o mirabilis
- *Pseudomonas*
 - o aeruginosa
 - o fluorescens
- *Serratia marcescens*
- *Shigella*
 - o Dysenteriae
 - o Flexneri
 - o Sonnei
- *Streptococcus*
 - o bovis
 - o prueaemoniae
- *Vibrio*
 - o aestuarianus
 - o cholerae
 - o harveyi
 - o mimicus
 - o parahaemolyticus
 - o vulnificus
- *Yersinia enterocolitica*

Desempeño

La prueba ECOHEM-ADN se evaluó con diferentes tipos de muestras de como: fecales de pacientes positivos y negativos a *E. coli* O157:H7, muestras de alimentos de consumo para humanos y para animales libres y contaminados de *E. coli* O157:H7. Todos los resultados fueron comparados con qPCR. A continuación, se reportan los resultados:

Prueba ECOHEM-ADN	Método	qPCR		Resultados totales
	Resultado	Positivo	Negativo	
		Positivo	152	
	Negativo	6	260	266
Resultados totales		158	268	426

Sensibilidad Relativa: 96.20% (95% IC: 93.94% - 97.64%)
 Especificidad Relativa: 97.01% (95% IC: 94.93% - 98.26%)
 Precisión Global: 96.71% (95% IC: 94.56% - 98.03%)
 IC: Intervalo de confianza

Consideraciones adicionales

- Asegúrese de utilizar la cantidad indicada de muestra para la prueba, ya que demasiada o muy poca muestra puede conducir a una desviación de los resultados.
- Se recomienda realizar una purificación de ADN genómico previo al análisis para obtener mejores resultados.
- La preparación de la reacción LAMP es sensible al tiempo y la temperatura. Para evitar resultados incorrectos, se recomienda seguir los pasos del procedimiento de ensayo.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otros kits disponibles comercialmente. Los componentes del kit se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser estériles. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, si limpió las micropipetas previamente con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de gabinetes de bioseguridad para la preparación de la reacción LAMP.
- PRECAUCIÓN: Permita que los reactivos y las muestras se descongelen completamente antes de su uso. Mezcle el reactivo suavemente antes de usar teniendo la precaución de no generar espuma. Regrese el reactivo a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN: No deje abierto el contenedor de la prueba, solo ábrala hasta su uso, la presencia de humedad puede afectar el desempeño de la prueba.
- Evite interrupciones prolongadas de los pasos del ensayo. Asegure las mismas condiciones de trabajo para todos los tubos.

- Calibre micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas para micropipeta diferentes para cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo y los reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice siempre puntas nuevas con filtro.
- Todas las muestras de origen humano deben considerarse potencialmente infecciosas. El cumplimiento estricto de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) puede garantizar la seguridad del personal.
- Todos los productos de desecho generados por este Kit deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.
- Se recomienda utilizar equipo de protección personal al momento de manipular las muestras.

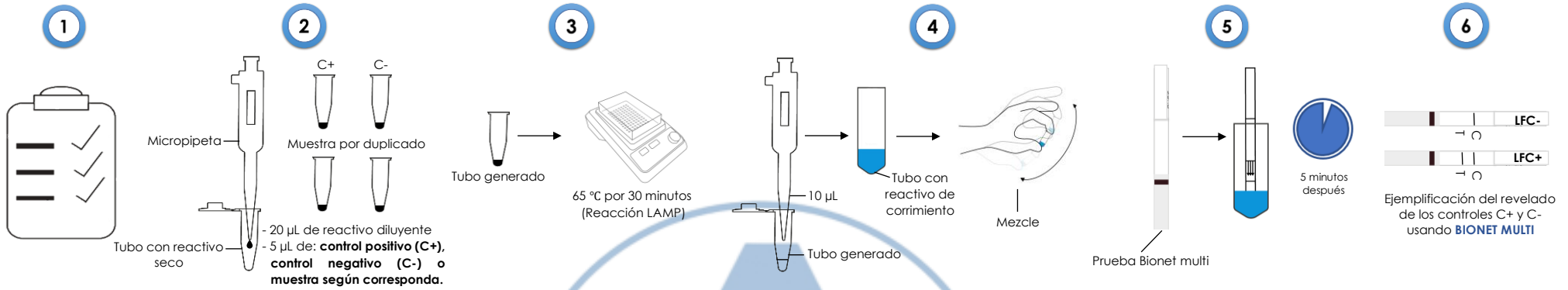
Referencias

- [1]. Jay, J. M. Microbiología moderna de los alimentos. (5a. edición.). Zaragoza, España: Acribia.
- [2]. DeLeo FR, Cámaras HF. Resurgimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a los antibióticos en la era de la genómica. J Clin Invest. 2009; 119 :2464-74.
- [3]. Sharma, N. K., Garg, R., Baliga, S., & Bhat K, G. (2013). Nosocomial Infections and Drug Susceptibility Patterns in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 7(10), 2178-2180.

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso		Caducidad
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>		Número de catálogo
	Almacenar entre 2 - 30 °C		Número de lote
	No utilizar si el paquete está dañado		No reutilizar

Esquema de instrucciones de uso completo



• Identifique cada material y asegúrese de tener todo lo necesario.

- Preparación de muestra:**
- Tome un tubo con reactivo seco.
 - Agregue 20 µL de reactivo diluyente al tubo.
 - Agregue 5 µL de muestra (se recomienda hacer duplicado por cada muestra a analizar).
- Preparación de controles:**
- Tome un tubo con reactivo seco y agregue 5 µL del control positivo (C+).
 - Tome un tubo con reactivo seco y agregue 5 µL del control negativo (C-).

- Tome cada tubo generado (C+, C- y muestra) y colóquelos en cualquiera de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador.
- Programe el equipo para que alcance una temperatura de 65 °C y déjelos por 30 minutos.

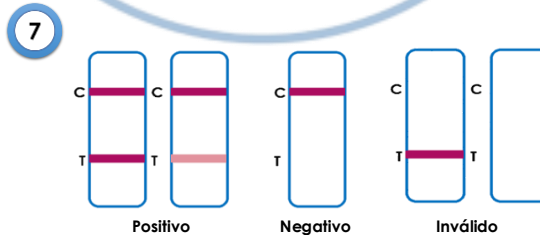
- Tome uno de los tubos generados (C+, C- o muestra) y con ayuda de una micropipeta recolecte 10 µL después transfíralos a un tubo con reactivo de corrimiento, cierre perfectamente y rotule.
- Mezcle por medio de pipeteo o agite el tubo 5 segundos.
- Repita este paso para cada uno de los tubos generados restantes.

- Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según el tubo con reactivo de corrimiento correspondiente elaborado en el paso anterior:
- Tira LF para el tubo con reactivo de corrimiento con **muestra**.
 - Tira LFC+ en el tubo con reactivo de corrimiento con **C+**.
 - Tira LFC- en el tubo con reactivo de corrimiento con **C-**.
- Inicie un cronómetro.

- Una vez hayan pasado 5 minutos saque la prueba del tubo, colóquela sobre una superficie plana y limpia

PRUEBA ECOHEM-ADN

BIONET MULTI



- Interprete los resultados conforme a la imagen superior.
 Nota: No interprete los resultados después de 5 minutos.

BIONET MULTI