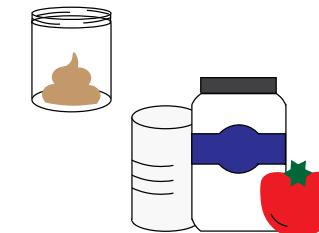




ESQUEMA SIMPLIFICADO DE TODO EL PROCESO

PASO UNO:

Obtención de la muestra



Ver página 4

PASO DOS:

Extracción del ADN de la muestra



Ver página 4-6

PASO TRES:

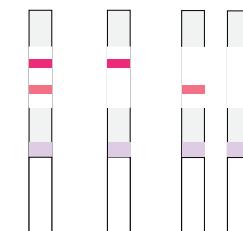
Detección de ADN de *E. coli* O157:H7



Ver página 6-7

PASO CUATRO:

Visualización del resultado



Ver página 7-8



ECOHEM-ADN

REF DLECO01

Almacene según su etiqueta individual



Uso deseado

ECOHEM-ADN incluye lo necesario para extraer ADN a partir de una amplia variedad de muestras (de origen humano, animal e industriales como las de alimentos o farmacéutica) usando MagnetiDNA, detectar la presencia de ADN de *Escherichia coli* serogrup O157:H7 y la posterior visualización de los resultados mediante las tiras de Bionet multi.

Introducción

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria con presencia frecuente en el intestino distal de los organismos de sangre caliente (aves/mamíferos). La mayoría de estas cepas 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 el 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 shiga, 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, immunoensayos enzimáticos y ensayos de PCR [5]. Los ensayos moleculares basados en amplificación isotérmica han demostrado tener una alta sensibilidad y especificidad [6].

Principio

Extracción de ADN: Este kit incluye el producto MagnetiDNA plus (REF BMPUR01), el cual tiene la función de obtener ADN aprovechando la carga de este, una propiedad química de los ácidos nucleicos, ya que estos poseen una carga negativa debido a los grupos fosfato presentes en su estructura, lo que permite capturar dicho material utilizando moléculas cargadas positivamente [7]. Las perlas magnéticas consisten en un centro de hierro recubierto por resina que confiere una carga positiva en su superficie, éstas se encuentran suspendidas en un buffer con cierto pH para mantener las cargas tanto de la superficie de las perlas magnéticas como la de los ácidos nucleicos, con ayuda del buffer de lisis celular (contiene agentes desnaturalizantes de proteínas y lípidos) tendrá la función de lisar las células presentes en la muestra, de esta forma facilitará a las perlas magnéticas capturar los ácidos nucleicos, una vez realizado dicho proceso con ayuda de un imán o magneto se atraerán los núcleos de hierro permitiendo la separación de las perlas del resto de componentes de la muestra (proteínas, lípidos entre otros) para luego eliminar dichos componentes por pipeteo. Mientras las perlas son retenidas en la pared del microtubo por el imán/magneto, se realizará un proceso de lavado con el buffer de lavado, el cual, tiene la función de eliminar todos los componentes no deseados posteriormente se elimina todo el buffer de lavado para finalmente eluir las perlas magnéticas en una solución acuosa con pH básico con el fin de neutralizar el pH de las perlas liberando los ácidos nucleicos capturados [8].

Detección de ADN: El ECOHEM-ADN (REF DLENT01), es un ensayo basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP por sus siglas en inglés) que permite detectar la presencia de ADN de *E. coli* O157:H7. La reacción de LAMP se realiza mezclando la muestra (ADN) en un tubo con reactivo seco, luego se incuba a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra de ADN contiene ADN de *E. coli* O157:H7 en una concentración mayor al límite de detección se llevará a cabo el proceso de amplificación durante el cual se incorporan las marcas biotina-FAM. En caso contrario, de no estar presente o se encuentre por debajo del límite de detección no se realizará el proceso de amplificación ni tampoco el marcaje (etiquetado).

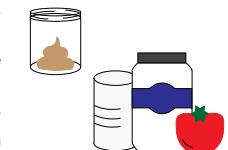
Visualización del resultado: Una vez concluido la detección, se utiliza el producto BIONET MULTI (REF DLBIO01) incluido. Para ello el producto de la amplificación es diluido en reactivo de corrimiento en el cual se colocará la prueba para que la muestra migre a través de ésta por acción capilar. Si la muestra contenía ADN de *E. coli* O157:H7 las marcas biotina-FAM reaccionarán con las partículas recubiertas de anticuerpos anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos anti-biotina en la región de prueba (T), estos reaccionarán formando una línea de color en dicha región T, esto indica un resultado positivo debido a que fue detectada la presencia de ADN de *E. coli* O157:H7. Por el contrario, si no hay ADN de *E. coli* O157:H7 no habrá marcas de biotina-FAM y por lo tanto no se formará la línea de color en la región T, esto indica un resultado negativo. La prueba posee un control (C) que indica que se ha agregado la cantidad de muestra correcta y el procedimiento se ha realizado con éxito.

INSTRUCCIONES DE USO

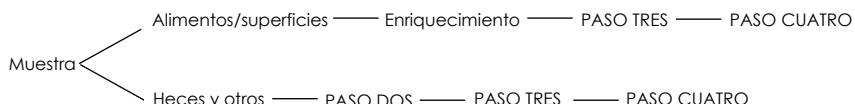
PASO UNO: OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Obtención: Esto dependerá del tipo de muestra, por lo tanto, considere lo siguiente.

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



Preparación: Particularmente en el caso de los alimentos/superficies se requiere realizar un proceso de **enriquecimiento** para la detección de un número bajo de bacterias o células estresadas de *E. coli*, siga lo estipulado en el apartado H.7 de la **NOM-210-SSA1-2014** según el alimento y considere lo siguiente:



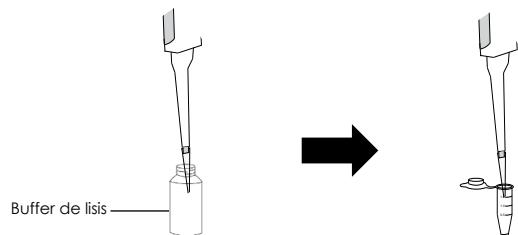
PASO DOS: EXTRACCIÓN DE ADN DE LA MUESTRA

PRECAUCIÓN: Las muestras clínicas deben almacenarse máximo dos horas a temperatura ambiente previo al ensayo y en refrigeración (4 °C) hasta por 5 días. Sin embargo, para obtener un mejor desempeño se recomienda que las muestras sean analizadas inmediatamente después de su recolección, una manipulación, almacenamiento o transporte incorrecto puede generar desviaciones en los resultados.

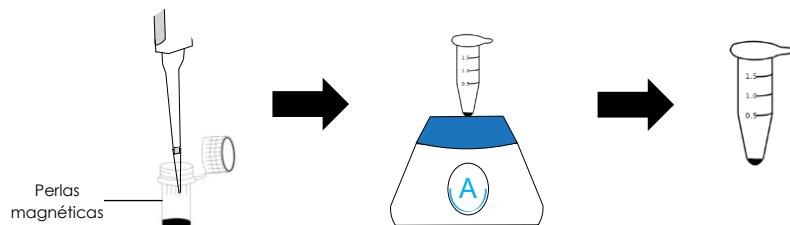
A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

- I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el kit de extracción MagnetiDNA y asegúrese de contar con todo lo necesario.
- II. Para muestras clínicas como heces:
 - Para muestras **sólidas** recolecte 25 mg (miligramos) o menos de ¼ de un chícharo de 3 sitios diferentes con una espátula o palillo estéril y depositelos en un tubo nuevo de 1.5-2 mL.
 - Para muestras **líquidas** recolecte 25 µL (microlitros) y depositelos en un tubo nuevo de 1.5-2 mL.
 - Agregue 600 µL de agua libre de nucleasas y mezcle por vortex hasta obtener una apariencia homogénea.

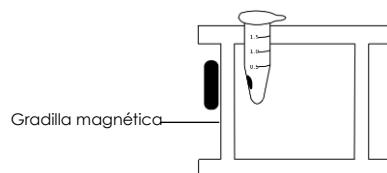
III. Utilizando una micropipeta y puntas (nuevas) tome 50 μ L de la suspensión de la muestra y transfírelas a un tubo de 1.5-2 mL estéril. Posteriormente adicione 500 μ L de buffer de lisis al tubo de 1.5-2 mL donde previamente colocó la muestra, mezcle por vortex o pipeteo e incube por 5 minutos a 65 °C.



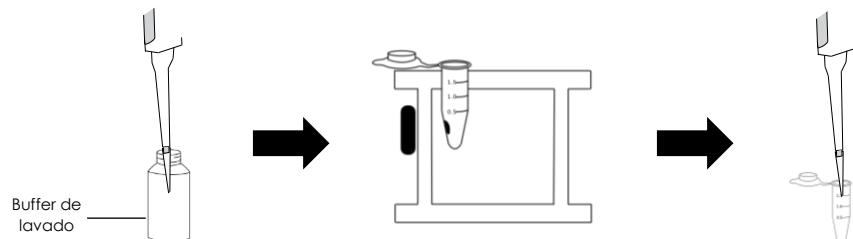
IV. Tome y agite el contenedor de perlas magnéticas de forma vertical por 10 segundos o hasta que su contenido sea homogéneo luego tome 20 μ L de las perlas magnéticas y depositelas en el tubo con la muestra. Cierre perfectamente y mezcle con ayuda de un vortex por 1 minuto, al finalizar deje reposar el tubo por 5 minutos a temperatura ambiente.



V. Coloque el tubo en una gradilla magnética, déjelo en esa posición hasta que se aprecie que la mayoría de las perlas magnéticas se han aglomerado cerca del imán (aproximadamente 5 minutos), posteriormente retire completamente el sobrenadante sin quitar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas.

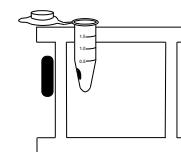


VI. Agregue 500 μ L de buffer de lavado y mezcle por vortex durante 10 segundos luego regrese el tubo a la gradilla magnética y déjelo hasta que la mezcla se aclare (aproximadamente 1-2 minutos), proceda a remover el sobrenadante sin retirar el tubo de la gradilla y sin llevarse las perlas magnéticas. Evite dejar residuos.



VII. Repita nuevamente el paso anterior (VI).

VIII. A continuación, deje el tubo abierto en la gradilla para eliminar cualquier residuo del buffer de lavado, esto hasta por 2 minutos y asegúrese de que no existan microgotas en el tubo. NOTA: Si no se remueve por completo el buffer de lavado puede inhibir las reacciones posteriores.



IX. En un tubo de 200 μ L caliente 50 μ L del buffer de elución a 65°C durante 3 minutos, después agréguelos al tubo de 1.5-2 mL y mezcle por vortex durante 30 segundos, luego regrese el tubo a la gradilla magnética y deje por 2 minutos. Al finalizar recolecte completamente el sobrenadante (ADN purificado) después transfíralo a un tubo nuevo de 1.5-2 mL, finalmente rotúlelo para identificarlo.

X. ¡Felicitaciones ha obtenido su ADN!



PASO TRES: DETECCIÓN DE ADN DE *E. COLI* O157:H7

PRECAUCIÓN: La muestra enriquecida o ADN purificado puede ser utilizado luego de su obtención, de lo contrario almacénelo a -20 °C y permita que alcance temperatura ambiente antes utilizarlo.

A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto ECOHEM-ADN y asegúrese de contar con todo lo necesario.

II. Prepare cada tubo por separado según lo descrito.

• **Muestra (S):**

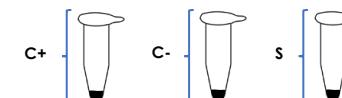
- **Si realizó el enriquecimiento de la muestra:** Transfiera 10 μ L de sobrenadante a un tubo de 1.5-2 mL (nuevo) luego añada 90 μ L de agua libre de nucleasas y caliente a 95 °C por 10 minutos. Posteriormente tome un tubo con **reactivo seco** y agregue 20 μ L de reactivo diluyente, 5 μ L de muestra y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule de tal forma que pueda identificarse.

- **Si realizó la extracción de ADN de la muestra:** Tome un tubo con **reactivo seco** y agregue 20 μ L de reactivo diluyente, 5 μ L de muestra (ADN purificado) y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule de tal forma que pueda identificarse.

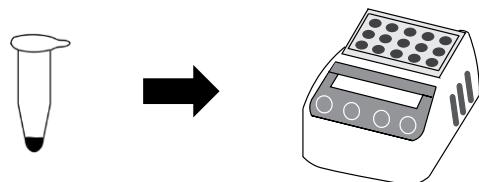
Nota: se recomienda realizar duplicados por cada muestra a analizar.

• **Control positivo (C+)** **del ensayo:** Tome un tubo con **reactivo seco** y agregue 20 μ L de reactivo diluyente, 5 μ L de control positivo y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C+.

• **Control negativo (C-) del ensayo:** Tome un tubo con **reactivo seco** y agregue 20 μ L de reactivo diluyente, 5 μ L de control negativo y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule con C-.



III. Coloque cada uno de los tubos generados (C+, C- y S) a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar saque los tubos del equipo.



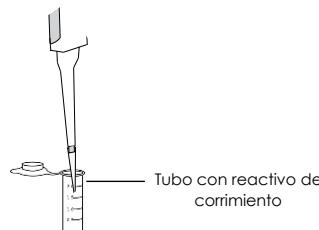
PASO CUATRO: VISUALIZACIÓN DEL RESULTADO

PRECAUCIÓN: Cada uno de los tubos generados del **paso tres** pueden ser utilizados inmediatamente, en caso contrario deben ser almacenados a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes de utilizarlos.

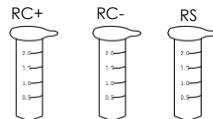
A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

I. Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto Bionet multi y asegúrese de contar con todo lo necesario.

II. Recolete 10 µL del tubo C+ y transfíralos a un tubo con reactivo de corrimiento, mezcle vortex por 5 segundos, cierre perfectamente y rotule nuevamente con RC+.



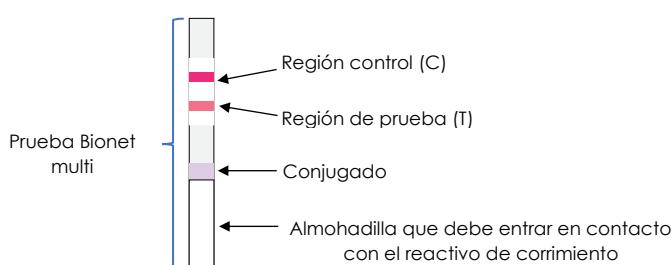
III. Repita este mismo procedimiento para cada uno de los tubos generados restantes según corresponde.



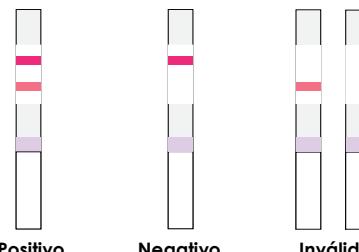
IV. Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según el tubo con reactivo de corrimiento en el que la colocará (tubo elaborado en el paso anterior):

- Tira **S** para el tubo con reactivo de corrimiento que tiene la **muestra**.
- Tira **C+** para el tubo con reactivo de corrimiento que tiene el **control positivo**.
- Tira **C-** para el tubo con reactivo de corrimiento que tiene el **control negativo**.

Programe un temporizador por 3 minutos.



V. Una vez hayan pasado los 3 minutos, saque la prueba del tubo y colóquela sobre una superficie plana y limpia (limpie el excedente si es necesario), interprete los resultados.



Resultados

Control positivo (C+)	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 (C-)	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 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 de <i>E. coli</i> O157:H7.
Inválido	No se visualiza la línea de color en la región control (C).

Contenido

Esta prueba proporciona los reactivos en las cantidades necesarias para procesar un total de 10 muestras con extracción, reacción y revelado. A continuación, se presenta el contenido por separado de los productos:

INCLUIDOS

- **MagnetiDNA**
 - Buffer de lisis
 - Perlas magnéticas
 - Buffer de lavado
 - Buffer de elución
 - Tubos de 2 mL
- **ECOHEM-ADN**
 - Reactivo seco
 - Reactivo diluyente
 - Control negativo (C-)
 - Control positivo (C+)
 - Agua libre de nucleasas
- **Bionet multi**
 - Prueba en tira
 - Tubos con reactivo de corrimiento

REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Vortex
- Soporte magnético o imán de alta potencia
- Tubos de 1.5-2 mL
- Tubos de 200 µL
- Confenedor de RPBI
- Termobloque, baño seco o incubadora

NOTA: Algunos de los reactivos/equipos pueden ser adquiridos en conjunto o por separado, para ello visite www.amunet.com.mx

Estabilidad y almacenamiento de los reactivos

- Almacene cada componente según lo indicado su etiqueta impresa.
- La prueba es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la bolsa.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad.

Control de calidad

Un control interno está incluido en cada prueba de 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.
- 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 de *E. coli* O157:H7.
- Esta prueba ha sido evaluada para la detección de ADN de *E. coli* O157:H7 y solo debe ser usada para su detección y no para otros tipos de patógenos.
- ECOHEM-ADN sólo indica la presencia de ADN 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 de *E. coli* O157:H7, se utilizó reactivo de corrimiento como muestra. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Inter-Ensaya

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 de *E. coli* O157:H7. Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

Sustancias interferentes

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

- Ácido ascórbico
- Ácido úrico
- Glucosa
- Ácido 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, estreptomicina, ciprofloxacino, gentamicina, detergentes, ácido cítrico, contaminantes ambientales entre otros.

Reactividad cruzada

ECOHEM-ADN ha sido evaluado con los microorganismos de la siguiente tabla, no se presentó reactividad cruzada positiva.

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

Desempeño

Se utilizó ECOHEM-ADN para analizar diferentes tipos de muestras 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 con *E. coli* O157:H7. Todos los resultados fueron comparados con qPCR. A continuación, se reportan los resultados:

MÉTODO	qPCR			
	Resultados	Positivo	Negativo	Total
ECOHEM-ADN	Positivo	152	8	160
	Negativo	6	260	266
	Total	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

Beneficios

- **Rapidez:** Mayor ahorro de tiempo con una alta reproducibilidad.
- **Simple:** Fácil operación con procesos cortos y escalable.
- **Eficiencia:** Una sola metodología que engloba el procesamiento, detección y visualización de los resultados.
- **Seguridad:** Ningún producto químico de este kit es tóxico.
- **Versatilidad:** El ADN purificado con este kit es funcional no solo para su propio ensayo (LAMP) sino también para una gran variedad de aplicaciones como: PCR convencional y variantes, RPA, NGS, secuenciación con bisulfito entre otros.

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.
- Es necesaria la purificación de ADN previo al análisis para obtener mejores resultados.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes ni use reactivos de otras pruebas disponibles comercialmente. Los componentes de esta prueba se combinan con precisión para un rendimiento óptimo.
- Las micropipetas y consumibles deben ser nuevas. Se recomienda irradiar con luz UV por 15 minutos antes de su uso, las micropipetas previamente limpiadas con cloro y etanol asegúrese de no dejar residuos.
- Se recomienda el uso de equipo de protección al trabajar muestras.
- 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 a su temperatura de almacenamiento después de su uso.
- PRECAUCIÓN: No deje abierto el contenedor de las pruebas Bionet multi, 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 las micropipetas con frecuencia para asegurar la precisión de la distribución de muestras/reactivos. Use puntas diferentes de micropipeta en cada muestra y reactivo para evitar contaminación cruzada.
- La prueba podría verse afectada por el polvo, reactivos químicos y/o sustancias como hipoclorito de sodio, ácidos, álcalis, etanol, etc. No realice el ensayo en presencia de estas sustancias y utilice puntas nuevas de preferencia 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 esta prueba deben disponerse de acuerdo a la NOM-087 vigente sobre el manejo de Residuos Biológico infecciosos.

Dudas, preguntas y consejos

- **¿Puedo utilizar muestras de ADN purificado con otros kits?** R: No, el ensayo LAMP puede verse inhibido por determinadas sustancias presentes en algunos buffers de elución incluidos en dichos kits, solo si puede eluir el ADN en el paso final en agua grado biología molecular o Tris-HCl 10 mM pH 8 es que será posible usar ese ADN independientemente del método utilizado.
- **¿Cuánto tiempo es viable si guardo a -20°C el ADN purificado con el producto MagnetiDNA?** R: Puede ser viable hasta dos años como máximo, si desea que sea viable por tiempo indefinido debe almacenarlo a -80°C. Evite realizar muchos ciclos de congelamiento y descongelamiento.
- **¿Por qué no debo llevarme las perlas magnéticas?** R: Las perlas magnéticas mantienen la unión de forma directa con el ADN que se desea extraer, si durante el proceso se llevan dichas perlas causará que el ADN obtenido sea muy poco y puede no ser funcional para el ensayo.
- **¿Cuándo puedo retirar el tubo de la gradilla magnética durante el proceso de extracción de ADN?** R: El imán de la gradilla magnética tiene la función de aglomerar todas las perlas magnéticas para hacer más sencilla la tarea de retirar el sobrenadante en cada uno de los pasos, por lo tanto, puede retirar el tubo una vez que haya retirado el sobrenadante indicado para agregar el siguiente reactivo.
- **¿Debo incluir controles cada vez que analizó una muestra?** R: Sí, los controles aseguran que el proceso llevado a cabo fue el correcto. Es por ello que puede esperar hasta obtener más muestras e ir extrayendo su ADN para su posterior uso en el ensayo LAMP.
- **¿Cómo puedo ser más eficiente al momento de realizar los ensayos?** R: Puede colocar los reactivos que comparten todos en vez de uno por uno como sucede con el reactivo diluyente del **paso tres**, pero no mezcle ya que eso lo hará cuando al final

coloque la muestra o control con su respectivo cambio de punta de micropipeta para evitar reactividad cruzada.

- **¿Qué pasa si dejo mis tubos por más tiempo o temperatura indicada en el termobloque, baño seco o incubador?** R: El ensayo LAMP es sensible, en caso de que esto ocurra, los resultados obtenidos pueden verse afectados y será necesario repetir el ensayo y descartar esos tubos.

Referencias

1. WHO. E. coli. Fact Sheet. 2018.
2. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews. Microbiology, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
3. Wong, A. R., Pearson, J. S., Bright, M. D., Munera, D., Robinson, K. S., Lee, S. F., Frankel, G., & Hartland, E. L. (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. Molecular microbiology, 80(6), 1420–1438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>
4. Lee, K. S., Jeong, Y. J., & Lee, M. S. (2021). *Escherichia coli* Shiga Toxins and Gut Microbiota Interactions. Toxins, 13(6), 416. <https://doi.org/10.3390/toxins13060416>
5. Li, B., Liu, H., & Wang, W. (2017). Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. BMC microbiology, 17(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1123-2>
6. Yinur, Degisew & Eskeziyaw, Biniam & Hassen, Aliyi & Tessema, Tesfaye. (2022). Application and evaluation of Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) diagnostic assay for detection of Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (O157:H7). 10.21203/rs.3.rs-1956647/v1.
7. Sambrook J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU.
8. Dundass N., N. K. Leos, M. Mitui, P. Revell y B. B. Rogers. 2008. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. Journal of Molecular Diagnostics 10: 311-316.

Índice de símbolos

	Consultar el instructivo de uso
	Solo para evaluación de desempeño <i>in vitro</i>
	Almacenar entre 2 – 30 °C
	No utilizar si el paquete está dañado