

## ESQUEMA SIMPLIFICADO DE TODO EL PROCESO

**PASO UNO:**  
Obtención de la muestra



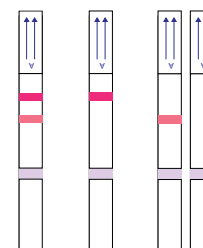
Ver página 4

**PASO DOS:**  
Detección de ADN de  
*L. monocytogenes*



Ver página 4-5

**PASO TRES:**  
Visualización del resultado



Ver página 5



# ISOLISTER-ADN

REF DMSILO01

Versión 3.2

Almacene según su etiqueta individual

**\*Almacene los controles incluidos a -20 °C ±5 °C\***



### Uso deseado

ISOLISTER-ADN incluye lo necesario para detectar la presencia de ADN de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) y posteriormente visualizar los resultados mediante las tiras de Bionet multi a partir una variedad de alimentos de acuerdo al apartado **C** de la **NOM-210-SSA1-2014**.

### Introducción

*Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) es una bacteria gram positiva, anaerobia e intracelular facultativa, de disposición cocobacilar, posee tolerancia a la salinidad y es patógena en humanos, pues es responsable de causar una enfermedad llamada listeriosis [1]. La infección por *L. monocytogenes* tiene dos formas de presentarse: listeriosis no invasiva e invasiva, la primera es la forma leve de la enfermedad, la segunda es la forma grave de la enfermedad, en esta puede causar septicemia o meningitis, lo que la lleva a ser mortal [2]. Este microorganismo se transmite por medio del consumo de alimentos contaminados. Si bien la mayoría de los casos de listeriosis son esporádicos, los brotes de origen alimentario generados por esta bacteria se han asociado con una amplia gama de matrices como: alimentos (queso, carne fermentada, helado, leche cruda, carne cruda y cocida, verduras crudas, mariscos (crudos y ahumados), aguas residuales, ensilaje y material fecal [3]. Debido a que se transmite a través de los alimentos es considerada un problema de salud pública. Actualmente la *L. monocytogenes* es una de las mayores preocupaciones en la industria alimentaria, especialmente en aquellos alimentos conocidos como listo para el consumo (ready to eat), ya que no hay cocción o paso de inactivación microbiana entre la producción y el consumo final, por lo que el monitoreo de estos es de importancia regulatoria. Para la detección de esta bacteria se utilizan técnicas microbiológicas que pueden dar un resultado después de tres días, dada su importancia se han desarrollado técnicas de biología molecular con la capacidad de detectarla en menos de un día [4,5].

### Principio

**Detección de ADN:** El ISOLISTER-ADN (REF DMISLO01), 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 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). La reacción de LAMP se realiza mezclando la muestra en un tubo con reactivo seco, luego se incuba a 65 °C en condiciones isotérmicas, si la muestra contiene ADN de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) 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 solución 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 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) 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 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Por el contrario, si no hay ADN de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) 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.



Nota: Se recomienda encarecidamente que asegure la temperatura requerida en cada ensayo antes de emplear el termobloque, baño seco o incubadora para mayor información consulte el **inciso K** de la sección 'Consideraciones adicionales' pág. 9.

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 *L. monocytogenes*, siga lo estipulado en el apéndice **C** de la **NOM-210-SSA1-2014** según el alimento.

#### PASO DOS: DETECCIÓN DE ADN DE *L. MONOCYTOGENES*

**PRECAUCIÓN:** La muestra enriquecida puede ser utilizada luego de su obtención, de lo contrario almacénela 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 ISOLISTER-ADN y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pág. 6, sección **Contenido**.

II. Prepare cada tubo por separado según lo descrito.

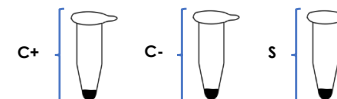
##### • Muestra enriquecida (S):

- Transfiera 10 µL de sobrenadante a un tubo de 200 µL (nuevo) luego añada 90 µL de agua libre de nucleasas y caliente a 95 °C por 10 minutos. Posteriormente tome un tubo con reactivo seco y agregue 20 µL de reactivo diluyente, 5 µL de muestra y mezcle por pipeteo hasta obtener una consistencia homogénea. Al finalizar cierre el tubo y rotule de tal forma que pueda identificarla.

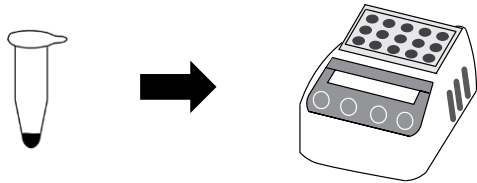
Nota: se recomienda realizar duplicados por cada muestra a analizar.

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



III. Con ayuda del gotero con aceite mineral, coloque una gota de aceite en el interior de cada uno de los tubos, solo sobre su superficie sin mezclar. Posteriormente, colóquelos a 65 °C por 30 minutos en alguno de los siguientes equipos: termobloque, baño seco o incubador. Al finalizar el tiempo saque los tubos del equipo.

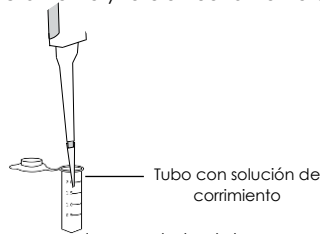


### PASO TRES: VISUALIZACIÓN DEL RESULTADO

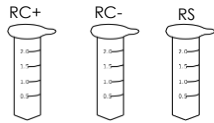
**PRECAUCIÓN:** Cada uno de los tubos generados del PASO DOS pueden ser utilizados inmediatamente, en caso contrario deben ser almacenados a -20 °C y luego permitir que alcance temperatura ambiente antes de utilizarlos.

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, consulte la pág. 6, sección **Contenido**.
- II. Recolecte **10 µL** del tubo **C+** y transfíralos a un tubo con solución de corrimiento, mezcle vortex por 5 segundos, cierre perfectamente y rotule nuevamente con RC+.



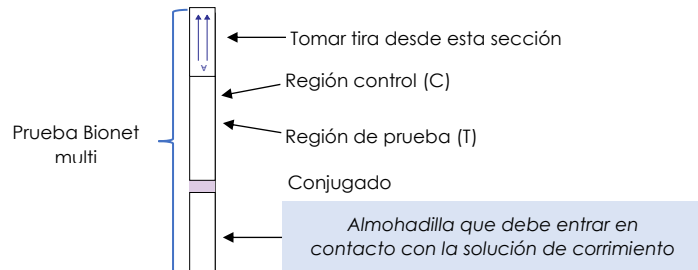
III. Repita este mismo procedimiento para cada uno de los tubos generados restantes según corresponde.



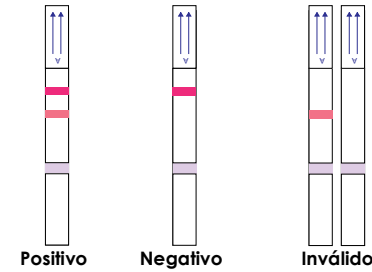
IV. Tome una prueba Bionet multi y rotúlela según el tubo con solución de corrimiento en el que la colocará (tubo elaborado en el paso anterior):

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

Programa 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

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <b>Control positivo (C+)</b> | <b>Resultado:</b> 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.   |
| <b>Control negativo (C-)</b> | <b>Resultado:</b> 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.   |
| <b>Muestra</b>               | <b>Positivo:</b> 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>Listeria monocytogenes</i> ( <i>L. monocytogenes</i> ).<br><b>Nota:</b> Se considera un resultado positivo sin importar la intensidad de la línea de color en la región de prueba (T) siempre que sea visible.<br><b>Negativo:</b> 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>Listeria monocytogenes</i> ( <i>L. monocytogenes</i> ). |
| <b>Inválido</b>              | 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

- **ISOLISTER-ADN**

- Reactivo seco
- Reactivo diluyente
- Control negativo (C-)
- Control positivo (C+)
- Gotero con aceite mineral
- Agua libre de nucleasas
- Tubos de 200 µL

- **Bionet multi**

#### Reg. Sanitario 0037R2024 SSA

- Prueba en tira
- Tubos con solución de corrimiento

#### REQUERIDOS, PERO NO INCLUIDOS

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Vortex
- Soporte magnético o imán de alta potencia
- Contenedor de RPBI
- Termobloque, baño seco o incubadora
- solución isotónica de cloruro de sodio

**NOTA:** Algunos de los reactivos/equipos pueden ser adquiridos en conjunto o por separado, para ello visite [www.amunet.com.mx](http://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.
- ISOLISTER-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 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*).
- Esta prueba ha sido evaluada para la detección de ADN de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) y solo debe ser usada para su detección y no para otros tipos de patógenos.
- 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 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), se utilizó solución 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 de *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) Las muestras fueron correctamente identificadas el 99% de las veces.

#### Sustancias interferentes

Los siguientes compuestos han sido probados usando ISOLISTER-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, estreptomina, ciprofloxacino, gentamicina, detergentes, ácido cítrico, contaminantes ambientales entre otros.

### Reactividad cruzada

ISOLISTER-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*
  - 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*
- *Escherichia 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 *ivanovii*
  - 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 *pnueamoniae*
- *Vibrio*
  - o *aestuarianus*
  - o *cholerae*
  - o *harveyi*
  - o *mimicus*
  - o *parahaemolyticus*
  - o *vulmificus*
- *Yersinia enterocolitica*

### Desempeño

Se utilizó ISOLISTER-ADN para analizar muestras de alimentos de consumo para humanos y para animales libres y contaminados con *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Todos los resultados fueron comparados con qPCR. A continuación, se reportan los resultados:

| MÉTODO        | qPCR         |          |          | Total |
|---------------|--------------|----------|----------|-------|
|               | Resultados   | Positivo | Negativo |       |
| ISOLISTER-ADN | Positivo     | 120      | 6        | 126   |
|               | Negativo     | 4        | 200      | 204   |
|               | <b>Total</b> | 124      | 206      | 330   |

Sensibilidad Relativa: 96.77% (95% IC: 94.27% - 98.21%)

Especificidad Relativa: 97.09% (95% IC: 94.66% - 98.43%)

Precisión Global: 96.97% (95% IC: 94.51% - 98.35%)

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.

## 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.
- 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 estériles. 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.
- 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.
- Coloque un tubo de 1.5-2 mL con 1 mL de agua destilada en el termobloque, baño seco o incubadora con la temperatura deseada a usar, espere 10 minutos y coloque un termómetro en el interior del tubo, si el termómetro indica la temperatura deseada a utilizar proceda a emplearlo para su ensayo. En caso contrario ajuste, espere y vuelva a medir hasta alcanzar la temperatura deseada.





## Dudas, preguntas y consejos



- **¿Cuánto tiempo es viable si guardo a -20°C mi muestra enriquecida?** 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.
- **¿Debo incluir controles cada vez que analizó una muestra?** R: Sí, los controles aseguran que el proceso llevado a cabo fue el correcto.
- **¿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 dos**, 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

- Chanqueo, L., Gutiérrez, C., Armas, R., Urriola, G., Bustos, M., Tapia, C., Vásquez, P., 2008. Bacteriemia primaria por *Listeria monocytogenes* en paciente con cirrosis hepática: Caso clínico. Revista médica de Chile 136, 225-229.
- WHO. *Listeria* (Listeriosis) Fact Sheet. 2017.
- Osimani, A., Clementi, F., 2016. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in mass catering: An overview in the European Union. International Journal of Hospitality Management 57, 9-17.
- Shan, X., Zhang, Y., Zhang, Z. et al. Rapid detection of food-borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. Food Sci Biotechnol 21, 101–106 (2012).
- Wu, R., Liu, X., Guo, B. et al. Development of Double Loop-Mediated Isothermal Amplification to Detect *Listeria monocytogenes* in Food. Curr Microbiol 69, 839–845 (2014).
- 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.
- 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 – 8 °C                          |
|  | No utilizar si el paquete está dañado             |
| <b>UPI</b>  | Uso para investigación                            |

|   |                    |
|---|--------------------|
|  | Caducidad          |
| <b>REF</b>  | Número de catálogo |
| <b>LOT</b>  | Número de lote     |
|  | No reutilizar      |

