



ESQUEMA SIMPLIFICADO DE TODO EL PROCESO

PASO UNO:

Obtención de la muestra



Ver página 4

PASO DOS:

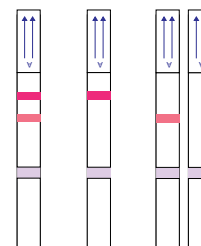
Detección de ADN de
E. coli O157:H7



Ver página 4-5

PASO TRES:

Visualización del resultado



Ver página 5



ECOHEM-ADN

REF DLECO01

Versión 3.5

Almacene según su etiqueta individual

***Almacene el control positivo incluido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ***



Uso deseado

ECOHEM-ADN incluye lo necesario para detectar la presencia de ADN de *Escherichia coli* serogrupo O157:H7 y posteriormente visualizar los resultados mediante las tiras de Bionet Multi a partir una variedad de alimentos de acuerdo al apartado **H.7** de la **NOM-210-SSA1-2014**.

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 O157: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

Detección de ADN: ECOHEM-ADN (REF DLECO01), 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 en un tubo con reactivo seco, luego 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 durante el cual se incorporan las marcas biotina-FAM (marcage). 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 marcage.

Visualización del resultado: Una vez concluida la detección, se utiliza el producto Bionet Multi 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 *E. coli* O157:H7 las marcas biotina-FAM reaccionarán con las nanopartículas de oro coloidal recubiertas con anticuerpos de detección anti-fluoresceína presentes en el conjugado, luego continuará migrando hasta encontrarse con los anticuerpos de captura anti-biotina impresos en la región de prueba 'T', estos reaccionarán formando una línea de color, 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 una región 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** pag. 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 *E. coli*, siga lo estipulado en el apartado **H.7** de la **NOM-210-SSA1-2014** según el alimento.

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

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 utilizarla.

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.

- Identifique cada uno de los materiales provistos por el producto ECOHEM-ADN y asegúrese de contar con todo lo necesario, consulte la pag. 6, sección **Contenido**.

ANTES DE CONTINUAR

Coloque 50 µL de reactivo diluyente en el control positivo, homogenice por pipeteo y almacene a -20 °C ± 5 °C hasta el momento de su uso.

- Prepare cada tubo por separado según lo descrito.

• Muestra enriquecida (S):

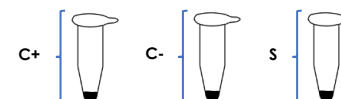
- Transfiera 10 µL de buffer de lisis a un tubo de 200 µL (nuevo), añada 80 µL de agua grado HPLC y al final coloque 10 µL de sobrenadante, deje reposar por 5-10 minutos y caliente a 95 °C por 10 minutos, después permita que alcance temperatura ambiente. Posteriormente tome un tubo con reactivo seco 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-.

ANTES DE CONTINUAR: Visualice que cada uno de los tubos haya sido correctamente homogeneizado, es decir que no se vean zonas secas en el interior de los tubos



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. Antes de que finalice el tiempo, prepare un recipiente con hielo triturado para que cuando termine el tiempo, saque los tubos del equipo y los coloque en dicho recipiente.



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 alcancen temperatura ambiente antes de utilizarlos.

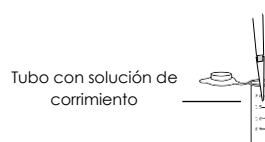
A continuación, siga cada uno de los pasos que se describen, recuerde no modificar y/o alterar ninguno de los pasos o cantidades que se indican.

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**.

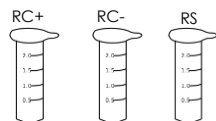
II. Tome los tubos con solución de corrimiento y asegure que toda la solución quede en el fondo, realizando movimientos fuertes al tubo.



III. Recolecte **10 µL** del **tubo C+** y transfíralos a un tubo con solución de corrimiento, cierre perfectamente y mezcle con vortex por 5 segundos. Rotule nuevamente con RC+.



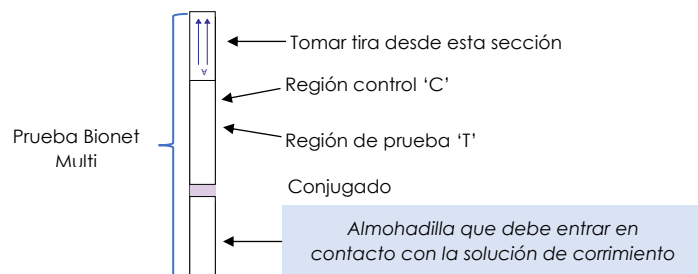
IV. Repita este mismo procedimiento para cada uno de los tubos generados restantes según corresponde.



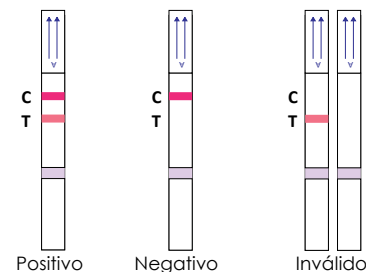
V. Tome una prueba en tira Bionet Multi y rotúlela según el tubo con solución de corrimiento en el que la colocará (tubo elaborado en el paso anterior):

- 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**.



VI. Una vez hayan pasado los 3 minutos, saque la prueba del tubo con solución de corrimiento y colóquela sobre una superficie plana y limpia (limpie el excedente de muestra en la tira si es necesario), interprete los resultados.



Resultados

Control positivo (C+)	Resultado: Se visualiza una línea de color en la región 'C' y otra línea de color en la región '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 'C'. Un resultado negativo indica que se siguió de manera correcta el procedimiento.
Muestra	Positivo: Se visualiza una línea de color en la región 'C' y otra línea de color en la región 'T'. Este resultado indica que se detectó el ADN de <i>E. coli</i> O157:H7. Nota: Se considera un resultado positivo sin importar la intensidad de la línea de color en la región 'T' siempre que sea visible. Negativo: Se visualiza una línea de color en la región 'C'. No se observa ninguna línea de color en la región '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 'C'.

Contenido

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

SUMINISTRADOS

• ECOHEM-ADN

- Instructivo de uso
- Reactivo seco
- Reactivo diluyente
- Control negativo (C-)
- Control positivo (C+)
- Agua grado HPLC
- Tubos de 200 µL
- Buffer de lisis
- Gotero con aceite mineral

• Bionet Multi

Reg. Sanitario 0037R2024 SSA

- Prueba en tira
- Tubos con solución de corrimiento

REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Micropipetas
- Puntas para micropipetas
- Guantes de nitrilo
- Vortex
- Contenedor de RPBI
- Termobloque, baño seco o incubadora
- Solución salina isotónica

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 su empaque.
- 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 '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 (BPL).

Limitaciones

- 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.
- La tonalidad que adquiera la membrana no interfiere en el resultado. Mientras la línea en la región 'C' 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 instructivo. Se recomienda seguir las instrucciones para asegurar la precisión de los resultados.
- La ejecución e interpretación deben ser realizados por personal capacitado.

Características de presentación

Precisión Intra-ensayo

La repetibilidad de la prueba se determinó realizando 20 réplicas empleando muestras positivas y negativas a ADN de *E. coli* O157:H7. Estas 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 empleando las mismas muestras. Estas 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, estreptomina, 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*
 - *vulnificus*
- *Yersinia enterocolitica*

Desempeño

Se utilizó ECOHEM-ADN para analizar muestras de alimentos de consumo humano y animal positivas y negativas para *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.

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 Peligrosos Biológico infecciosos (RPBI).
- 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 analizo 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

1. WHO. *E. coli*. Fact Sheet. 2018.
2. Ruiz Herrero, E., Caro, R., & Ortega Hernández, N. (2023). *Resistencia fenotípica y genotípica en los patotipos AIEC, STEC y EAEC de Escherichia coli*. Anales de Veterinaria de Murcia.
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.

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
UPI	Uso para investigación

	Caducidad
REF	Número de catálogo
LOT	Número de lote
	No reutilizar

