

SOLUS *E. COLI* O157 ELISA

Sistema de análisis por inmunoensayo para
la detección de *E. coli* O157
en muestras de alimentos y del entorno de producción

Número del prospecto: 38
Número de versión: 2.0
Fecha de la versión: Abril de 2020
Código del producto: EC-048S
Organismo de certificación: AFNOR





SOL 37/03-10/15
MÉTODOS ANALÍTICOS ALTERNATIVOS PARA LA AGROINDUSTRIA
<http://nf-validation.afnor.org/en>

Este método ha sido certificado por AFNOR para la detección de *E. coli* O157, incluido el serotipo H7, en productos cárnicos de vacuno crudos (condimentados o no), productos de leche cruda y productos lácteos, verduras y muestras del entorno de producción (núm. de ref. de validación: **SOL 37/03-10/15**).

1. INTRODUCCIÓN

El método Solus *E. coli* O157 ELISA proporciona un resultado negativo o presuntamente positivo a partir de un único medio de enriquecimiento en un plazo de 18 a 22 horas, incluido el tiempo del ensayo.

2. USOS PREVISTOS

El método Solus *E. coli* O157 ELISA sirve para la detección de *E. coli* O157 en determinados alimentos y muestras de superficies del entorno de producción. El análisis es fácil de realizar aunque requiere instalaciones de laboratorio y personal cualificado y formado. Se recomienda que los nuevos usuarios realicen el curso de formación básico impartido por Solus Scientific Solutions Ltd.

La utilización de este método incluye el cumplimiento de las normas de buena práctica de laboratorio (GLP) (véase EN ISO 7218).

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS

La mayoría de los componentes del kit de análisis se suministran estabilizados y listos para usar en la concentración de trabajo, solo el tampón de lavado concentrado requiere dilución. Todos los kits de análisis contienen material suficiente para 1 x 93 determinaciones, más los controles. La fecha de caducidad del kit de análisis se muestra en la etiqueta del producto.

Componente	Aspecto	Volumen	Comentarios
Placa de ensayo	Microplaca de 96 pocillos con formato de tira extraíble o rompible	1	Los pocillos están recubiertos por anticuerpos contra <i>E. coli</i> O157
Control negativo	Líquido incoloro/transparente. Etiqueta verde.	3 ml	Concentración de trabajo. Contiene el diluyente con conservante.
Control positivo	Líquido negro. Etiqueta roja.	3 ml	Concentración de trabajo. Contiene <i>E. coli</i> O157 termoinactivada en un diluyente con conservante.
Conjugado	Líquido incoloro o con coloración pajiza muy pálida. Etiqueta naranja.	11 ml	Concentración de trabajo. Contiene un conjugado de anticuerpo-peroxidasa de rábano picante en el diluyente con conservante.
Sustrato	Líquido incoloro o de color azul muy pálido. Etiqueta azul.	11 ml	Concentración de trabajo. Contiene 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrógeno y estabilizadores.
Solución stop	Líquido incoloro. Etiqueta amarilla.	11 ml	Concentración de trabajo. Contiene 0,2 M de ácido sulfúrico.
Tampón de lavado concentrado	Líquido incoloro/amarillo/naranja. Etiqueta blanca.	10 ml x 6	Concentrado. Diluir antes de usar.

Filtros de frita	Discos blancos y planos de plástico ~12 mm de diámetro	100	Los filtros de frita deben aplicarse en cada tubo de muestra después del termotratamiento una vez que la muestra se haya enfriado a temperatura ambiente (18-25 °C). Véase el apartado 7 para obtener información.
------------------	---	-----	--

4. MATERIALES Y EQUIPOS NECESARIOS QUE NO SE SUMINISTRAN

Frigorífico a 2-8 °C	Temporizador
Agua desionizada o destilada	Estufa de incubación a 37±1 °C
Caldo de triptona-soja modificado + novobiocina (20 mg/l)	Estufa de incubación a 41,5±1 °C
Probetas cilíndricas de varios volúmenes (p. ej.: 250 ml, 1 l)	Aparato para calentar (p. ej.: termobloque) capaz de calentar hasta 85-100 °C
Tubos de ensayo estériles de 10 ml aptos para enriquecimiento selectivo	
Homogeneizador (o aparato similar) y bolsas de filtro	Pipetas y puntas (1 ml; 0,1 ml)
Pipetas de transferencia de 3 ml (estériles)	Dynex DS2 o equipo de limpieza de microplacas y lector de microplacas con filtro de 450 nm
Agitador vórtex	
Tubos para ebullición de muestras (p. ej.: tubos de polipropileno sin borde de 5 ml, 12 x 75 mm)	Autoclave para la descontaminación de las muestras

5. PREPARACIÓN DEL REACTIVO

5.1 Tampón de lavado:

Añada el contenido de un frasco de tampón de lavado (10 ml) a 240 ml de agua desionizada para preparar el tampón de lavado con la concentración necesaria para el ensayo. Distribuya y etiquete como corresponda. La solución preparada se puede guardar durante un máximo de 4 semanas a 2-8 °C.

5.2 Caldo de cultivo (medio de cultivo):

Prepare el caldo triptona-soja modificado siguiendo las instrucciones del fabricante. Deje enfriar a temperatura ambiente (18-30 °C) antes de añadir el suplemento de novobiocina a 20 mg/l (mTSBn).

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ENRIQUECIMIENTO: método estándar

Homogeneice 25 g de la muestra para análisis, con un homogeneizador si fuera necesario, en 225 ml de caldo triptona-soja modificado (mTSB) + novobiocina (20 mg/l) e incube durante 16-20 horas a 41,5±1 °C. En el marco de la VALIDACIÓN NF, las porciones de prueba que pesen más de 25 g no se han analizado.

7. TERMOINACTIVACIÓN POSENRIQUECIMIENTO

- 7.1. Cuando el periodo de incubación de una muestra finalice, transfiera una alícuota de 1-2 ml (evitar partículas) a un tubo para ebullición de muestras (p. ej.: un tubo de polipropileno de 5 ml).
- 7.2. Caliente la alícuota a 85-100 °C durante 15-20 minutos en el tubo. Después de calentar deje enfriar la muestra a temperatura ambiente (18-30 °C). El proceso se puede acelerar colocando los tubos en agua fría del grifo durante ~5 minutos.

- 7.3. Para evitar problemas con el pipeteado, especialmente con el instrumento Dynex DS2, añada un filtro de fritas directamente en cada tubo de muestra y empújelo hacia abajo suavemente para poder pipetear una muestra relativamente clara del nivel superior de la fritas.

NOTA: la fritas debe insertarse después de la fase de calentamiento y una vez se haya enfriado el tubo a temperatura ambiente (18-30 °C).

Las muestras que no se han termoinactivado deben conservarse para verificación hasta que se obtengan los resultados del análisis ELISA. Estas muestras deben mantenerse a $41,5 \pm 1$ °C si el análisis ELISA se va a realizar en un plazo de 2 horas. Si esto no fuera posible, mantenga los caldos hasta un máximo de 72 horas a 2-8 °C antes del análisis ELISA.

8. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO ELISA

- 8.1. Saque uno de los kits de análisis al menos una hora antes de usar para que sus componentes alcancen la temperatura ambiente (18-30 °C). Determine el número de pocillos que necesita para el análisis. Saque el número de tiras que necesite del sobre y colóquelas en el soporte proporcionado. Las tiras que no se usen se pueden volver a meter en el sobre y guardar a 2-8 °C.
- 8.2. Prepare el tampón de lavado como se ha descrito en el apartado 5.1.
- 8.3. Deje el primer pocillo de la tira vacío para usar como «blanco» para medir la absorbancia del sustrato.
- 8.4. Pipetee 0,1 ml de control negativo (etiqueta verde) en el segundo pocillo.
- 8.5. Pipetee 0,1 ml de control positivo (etiqueta roja) en el tercer pocillo.
- 8.6. Pipetee 0,1 ml de cada muestra termoinactivada por separado en pocillos consecutivos de la tira. Si quedan pocillos vacíos al final de la tira de análisis, puede repetir los controles positivo y negativo. †
- 8.7. Ponga la placa a incubar (con las tiras) a 37 ± 1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.8. Después de incubar, aspire el contenido de los pocillos eliminando todo el líquido posible. Lave los pocillos 5 veces con el tampón de lavado asegurándose de que llena y vacía los pocillos durante cada ciclo de lavado. La técnica de lavado es crítica para el funcionamiento del ensayo por lo que se recomienda usar un instrumento de lavado de microplacas.
- 8.9. Pipetee 0,1 ml de conjugado (etiqueta naranja) en todos los pocillos menos en el «blanco».
- 8.10. Ponga la placa a incubar a 37 ± 1 °C durante 30-35 minutos.
- 8.11. Repita los ciclos de lavado como se describe en el apartado 8.8.
- 8.12. Pipetee 0,1 ml de sustrato (etiqueta azul) en todos los pocillos, incluido el «blanco».
- 8.13. Incube la placa a temperatura ambiente (18-30 °C) durante 10 minutos a oscuras.
- 8.14. Después de incubar pare la reacción añadiendo 0,1 ml de solución stop (etiqueta amarilla) en todos los pocillos, incluido el «blanco». La solución stop hará que el color azul de los pocillos cambie a amarillo.
- 8.15. Lea las densidades ópticas de los pocillos en un plazo de 10 minutos en un lector de placas utilizando un filtro de 450 nm. Antes de proceder con la lectura inspeccione los pocillos para ver si se han formado burbujas de aire y, si las hubiera, elimínelas con una aguja. El lector debe ponerse a cero con el pocillo «blanco» antes de leer el resto de los pocillos. No utilice el filtro de referencia. Es preferible usar equipos ELISA automáticos y deben configurarse y validarse en conformidad con este protocolo.

† Si se va a utilizar un equipo Dynex deberá tenerse cuidado y evitar que se formen burbujas en la muestra y en los tubos de reactivos, o la formación de películas en el tubo por encima del nivel del líquido. Es esencial comprobar que el sistema ha pipeteado correctamente las muestras en la placa de ensayo antes de empezar.

9. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en medidas de densidad óptica (DO_{450}) utilizando un lector de microplacas.

Criterios de aceptación:

DO_{450} del control negativo	<0,100
DO_{450} del control positivo	>0,500

Siempre debe sustraerse el valor del pocillo «blanco» (normalmente en A1 cuando se procesa manualmente). Si el valor de los controles positivo o negativo no cumple estos criterios, el análisis no se considera válido y debe repetirse.

Las muestras con lecturas de DO_{450} <0,200 se consideran negativas y en este caso el análisis ha concluido; los resultados se pueden notificar y las muestras que no se han inactivado térmicamente se pueden desechar siguiendo la normativa o las directrices locales.

Los pocillos de muestra con $DO_{450} \geq 0,200$ se consideran presuntamente positivos para *E. coli* O157. Los resultados positivos deben verificarse utilizando un método de cultivo reconocido.

10. CONFIRMACIÓN DE LOS RESULTADOS POSITIVOS DEL ENSAYO ELISA PARA *E. COLI* O157

En el marco de la VALIDACIÓN NF, todas las muestras identificadas como positivas con un método alternativo deben confirmarse utilizando uno de los análisis siguientes:

- Utilizando los análisis descritos en los métodos normalizados CEN o ISO. Este paso de confirmación debe empezar con el caldo no termoinactivado de mTSB+n conservado a 41,5 °C o 2-8 °C. (Véase ISO 16654:2001 Método horizontal para la detección de *Escherichia coli* O157).
- Sembrando el caldo mTSB+n (10 µl) en CT-SMAC y en una placa de agar cromogénico (como CHROMagar O157) e incubando las placas a 37±1 °C durante 18-24 horas. Realice una identificación serológica de las colonias características, con o sin el paso de purificación, utilizando una prueba de aglutinación en látex para O157 (Microgen *E. coli* O157 M44) y después realice el paso de purificación utilizando la prueba en látex para H7 (Wellcolex *E. coli* O157:H7 R30959601).

En caso de obtener resultados que no coincidan (presuntos resultados positivos con ELISA y un resultado negativo en el cultivo) se deberá utilizar el paso IMS como paso confirmatorio tomando 1 ml de mTSB+n (sin calentar) y siguiendo el método descrito en el ISO 16654:2001 antes de sembrar las partículas magnéticas en ambas placas de agar. Este método es más sensible que la siembra directa en placas y puede ayudar a confirmar muestras que contienen niveles bajos del organismo buscado.

En caso de obtener resultados no coincidentes (presunto resultado positivo con ELISA que no se confirma con ninguno de los métodos descritos anteriormente, y especialmente con los análisis en látex) el laboratorio deberá seguir los pasos necesarios para garantizar la validez del resultado obtenido.

11. CONSERVACIÓN Y VENCIMIENTO DEL KIT DE ANÁLISIS

El kit de análisis y cualquier componente sin utilizar del mismo deberán conservarse a 2-8 °C. NO CONGELAR. La fecha de vencimiento del kit se muestra en la caja y en todos los componentes incluidos en la caja. El tampón de lavado diluido sobrante se puede conservar durante 4 semanas si se mantiene a 2-8 °C. Todas las tiras de microplaca sin utilizar deberán devolverse al sobre de papel metalizado con el sobrecito de desecante cerrando bien el precinto y, a continuación, guardar a 2-8 °C.

12. SEGURIDAD

Aunque los procedimientos detallados son sencillos y fáciles de realizar, requieren instalaciones de laboratorio con personal cualificado formado en la manipulación de organismos potencialmente patógenos. Se recomienda que los nuevos usuarios realicen el curso de formación básico impartido por Solus Scientific Solutions Ltd.

- La solución stop contiene ácido sulfúrico que es un compuesto corrosivo. Si la solución entra en contacto con la piel o con las membranas mucosas, lávese inmediatamente con agua abundante.

Como guía, se deberán tomar las precauciones siguientes como mínimo:

- Se deberá utilizar ropa de protección, incluida la bata de laboratorio, gafas de seguridad, máscara y guantes cuando sea apropiado.
- No pipetee con la boca.
- Evite contacto con la piel.
- No coma, beba o utilice cosméticos en el laboratorio.
- Siga todas las normativas aplicables locales, estatales/provinciales y/o nacionales relacionadas con la eliminación de residuos biológicos.

13. PRECAUCIONES

- Los reactivos se suministran con una concentración de trabajo fija. La sensibilidad y especificidad óptimas disminuirán si los reactivos se modifican o no se conservan en las condiciones recomendadas.
- No mezcle lotes de reactivos distintos.
- Evite la contaminación microbiana en los frascos de reactivos abiertos.
- Asegúrese de que no se produce contaminación cruzada entre los pocillos.
- Para que el funcionamiento del análisis sea correcto, es esencial que el anticuerpo conjugado con enzimas no entre en contacto con otros reactivos y equipos.
- Asegúrese de que los componentes del kit no se exponen a temperaturas superiores a 40 °C.
- Las soluciones que contienen azida sódica no se deben utilizar para limpiar equipos, especialmente los de lavado (la azida sódica inactiva la enzima peroxidasa utilizada en el kit).
- No utilice este análisis para usos diagnósticos de muestras clínicas.

14. INFORMACIÓN FDSM

Las fichas de datos de seguridad de materiales (FDSM) para este análisis están disponibles previa solicitud.

15. GARANTÍA

La precisión de los resultados depende del uso correcto del kit y de haber seguido las instrucciones de uso detenidamente. Si el desempeño del kit no se ajusta a la especificación, póngase en contacto con:

Solus Scientific Solutions Ltd

9 Mansfield Networkcentre
Millennium Business Park
Concorde Way
Mansfield
Nottinghamshire
NG19 7JZ

Tel - +44 (0)1623 429701

Fax - +44 (0)1623 620977

Correo electrónico: info@solusscientific.com

Información de copyright

Este documento, incluidas las fotografías e ilustraciones, contiene información patentada protegida por *copyright*. Se prohíbe la reproducción total o parcial de esta publicación, de ninguna forma ni por cualquier medio, y la traducción a cualquier idioma sin el permiso previo y por escrito de PerkinElmer. ©2020 PerkinElmer, Inc. Todos los derechos reservados.

Marcas comerciales

PerkinElmer es una marca registrada de PerkinElmer, Inc. El resto de las marcas comerciales son propiedad de sus propietarios respectivos.

Resumen de cambios

Fecha del cambio	Número de versión	Resumen del cambio
Enero 2020	1	Reposicionamiento de marca de Solus <i>E.coli</i> O157 ELISA – QCF49 – Versión 1.3 – 07/16.
Abril 2020	2	Adición del colorante negro al control positivo e inclusión de los filtros de fritada en el kit de análisis.

NOTA: Los cambios menores (p. ej.: de formato, gramática, tipográficos) no se incluyen en el resumen de cambios.

Si desea más información visite www.solusscientific.com

Fabricado en:

Solus Scientific Solutions Ltd.

9 Mansfield Networkcentre,
Millennium Business Park, Concorde Way,
Mansfield, Nottinghamshire
NG19 7JZ
Reino Unido
Tel - +44 (0)1623 429701

PerkinElmer, Inc

940 Winter Street,
Waltham, MA 02451 USA
P: (800) 762-4000 o
(+1) 203-925-4602
www.perkinelmer.com



Si desea una lista completa de nuestras oficinas globales visite www.perkinelmer.com/ContactUs