

*Producto Número:*  
9755

**Reveal<sup>®</sup>**

*para E. coli O157:H7*

AOAC Official Methods of Analysis<sup>SM</sup>  
2000.13  
2000.14

# Reveal<sup>®</sup> para *E. coli* O157:H7

Producto Número: 9755

## Propósito de uso

El sistema de prueba de Reveal<sup>®</sup> para *E. coli* O157:H7 proporciona una recuperación rápida del organismo *E. coli* O157:H7 en una variedad de alimentos, permitiendo la detección e identificación presuntiva del organismo de prueba en tan sólo 8 horas.

En un estudio oficial de la AOAC<sup>™</sup> (2000.13) se encontró que la prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7 de 8 horas es un procedimiento efectivo para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne de vaca cruda molida, cubos de carne cruda de vaca y agua de enjuague de lechuga. En un segundo estudio oficial de la AOAC (2000.14) se encontró que la prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7 de 20 horas es un procedimiento efectivo para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne de vaca cruda molida, cubos de carne cruda de vaca, sidra o jugo de manzana, agua de enjuague de lechuga e hisopos usados en pruebas ambientales en superficies de acero inoxidable.

## Fundamento del análisis

El sistema puede utilizar una variedad de medios de enriquecimiento para proporcionar al *E. coli* O157:H7 con un suministro de nutrientes fácilmente accesible y otros factores requeridos para la supervivencia y un crecimiento rápido. Con el uso del medio de Reveal, el sistema puede proporcionar resultados para muestras de 25 g dentro de 8 o 20 horas y resultados para muestras de 375 g dentro de 12 o 20 horas.

Una porción (120 µL) del cultivo de enriquecimiento se coloca en el puerto de muestreo redondo del dispositivo de prueba de Reveal. La muestra pasa, por acción capilar, a través de una zona de reacción que contiene anticuerpos específicos (anti-*E. coli* O157:H7) conjugados con partículas de oro coloidales. Si el antígeno objetivo está presente en la muestra, se unirá a los anticuerpos conjugados con oro. Este complejo de antígeno-anticuerpo fluye hacia la zona de reacción y pasa a través de una membrana de nitrocelulosa que contiene una zona de anticuerpos anti-*E. coli* O157:H7. El complejo inmune conjugado con oro es capturado y agregado en esta zona, formando una línea visible. El resto de la muestra continúa fluyendo hasta el final de la membrana en donde es almacenada en un depósito de residuos.

La zona de reacción también contiene un conjugado de oro con un antígeno propietario, que es eluido por la solución de muestra independiente de la presencia del antígeno de *E. coli* O157:H7. El indicador de control conjugado con oro migra a través de la membrana hasta la zona de captura negativa (anticuerpo del antígeno propietario), donde es capturado y agregado formando una línea visible. La línea de control se formará en la zona de control independiente de la presencia o ausencia del antígeno de *E. coli* O157:H7, garantizando que la prueba esté funcionando apropiadamente.

## Usuario previsto

Este sistema de prueba está diseñado para ser usado por personal familiarizado con las técnicas asépticas apropiadas para el aislamiento e identificación de *E. coli* O157:H7. Hay disponibilidad de entrenamiento por medio de Neogen<sup>®</sup>, es recomendado para aquellas personas que no tienen un conocimiento básico en el área de microbiología.

## Materiales suministrados

### Kit de prueba de Reveal

1. 20 dispositivos de prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7
2. 20 pipetas de transferencia

## **Materiales requeridos (no suministrados)**

1. Bolsas homogeneizadoras (Producto Neogen 9736)
2. Bolsas de muestra, 3500 mL (Producto Neogen 9738)
3. Balanza o báscula (Producto Neogen 9427)
4. Cronómetro (Producto Neogen 9426)
5. Agua estéril

### **Para el sistema de prueba de 8 horas:**

1. 13 x 100 mm tubos de polipropileno o vidrio (Producto Neogen 9438)
2. Incubadora apta para mantener una temperatura de  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  (Producto Neogen 9735)
3. Pipetas desechables y estériles aptas para transferir muestras de 5 mL (Producto Neogen 9415)
4. Baño de maría o una fuente de calentamiento equivalente (por ejemplo., mechero Bunsen, bloque de calor (Producto Neogen 9412), horno microondas)

### **Para el sistema de prueba de 20 horas:**

Incubadora apta para mantener una temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  (Producto Neogen 9735)

## **Materiales opcionales**

Mezclador o Stomacher 400 (máquina homogeneizadora) o alguna máquina equivalente

## **Almacenamiento**

Almacene los dispositivos de Reveal entre  $2\text{--}30^\circ\text{C}$  cuando no estén en uso. Almacene los medios de cultivo deshidratados a una temperatura ambiental entre ( $15\text{--}30^\circ\text{C}$ ).

## **Pruebas en diferentes productos**

La prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7 es efectiva en una variedad de productos. Por favor, contacte a un representante de Neogen para obtener la lista actualizada de los productos validados para esta prueba, o para los estudios de validación de productos específicos.

## **Precauciones**

1. No use medios expirados.
2. Permita que los dispositivos de prueba alcancen una temperatura ambiental antes de abrir la bolsa.
3. Use el medio rehidratado dentro de las 6 horas después de su preparación.
4. El uso de períodos de incubación o tiempos diferentes a los especificados puede dar lugar a resultados erróneos.
5. Las bolsas de muestra no deben ser cerradas completamente con el fin de permitir el intercambio de aire durante la incubación, el cual es vital para la supervivencia y expresión antigénica de *E. coli* O157:H7.
6. El agua estéril debe ser precalentada antes de su uso a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  cuando se utiliza el medio de 8 Horas.
7. Realice la prueba de los cultivos dentro de 4 horas después de la incubación cuando se utiliza el sistema de prueba de 8 Horas, y dentro de 8 horas después de la incubación cuando se utiliza el sistema de prueba de 20 Horas.
8. Siga las buenas prácticas de microbiología en el laboratorio.

## Preparación y cultivación de las muestras

### Sistema de prueba de 8 horas

#### 1a. Muestras de 25 g

- a. Preparación del medio. Transfiera el contenido de una bolsa de aluminio del medio Reveal de 8 Horas (Producto Neogen 9760) o 8.9 g del medio de Reveal de 8-Horas a granel (Producto Neogen 9765) a una bolsa homogeneizadora. Agregue 225 mL de agua esterilizada a 42°C. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, soporte la parte inferior, y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva el medio. Coloque la bolsa homogeneizadora en un estante u otro soporte. El medio se puede mantener a 42°C hasta el momento de usarlo, pero por no más de 6 horas. Para obtener los mejores resultados, use el medio tan pronto como es preparado.
- b. Adición de la muestra. Combine 25 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente de la parte superior y amase hasta que se mezcle. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar un completo mezclado.

**Alternativa:** Coloque la bolsa en un homogeneizador y mezcle por 2 minutos a velocidad normal.

#### 1b. Muestras de 375 g

- a. Preparación del medio. Agregue 133,5 g del medio de Reveal de 8 Horas (Productos Neogen 9765, 9765B) a una bolsa de muestra de 3500 mL (Producto Neogen 9738) y agregue 3375 mL de agua estéril a 42°C. Ruede la parte de arriba de la bolsa a 2–3 pulgadas de la parte superior y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva. Coloque la bolsa en un balde de 2 galones u otro soporte. El medio se puede mantener a 42°C hasta el momento de usarlo. Para obtener los mejores resultados, use el medio tan pronto como es preparado.
- b. Adición de la muestra. Combine 375 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente en la parte superior y amase hasta que se mezcle. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar un completo mezclado.

2. Incubación. Cierre la bolsa (no muy apretada). Incube muestras de 25 g a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  por 8 horas. Incube muestras de 375 g a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  por 12 horas. No apriete mucho la bolsa al cerrarla, para permitir el intercambio de aire quees requerido para un crecimiento óptimo y expresión antigénica.

3. Mezcla. Retire la bolsa de la incubadora después de 8 horas o 12 horas dependiendo del tamaño de la muestra. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, sostenga la parte inferior y mezcle gentilmente el contenido de la bolsa efectuando movimientos laterales repetitivos.

#### 4. Tratamiento de la muestra.

- a. Usando una pipeta estéril, transfiera 5 mL de la muestra a un tubo de polipropileno o vidrio. Caliente la muestra empleando una de las siguientes maneras:
  - Colocando el tubo en agua hirviendo por 20 minutos si está usando un tubo de polipropileno, o por 10 minutos si está usando un tubo de vidrio.
  - o
  - Tapando el tubo firmemente, colóquelo en el microondas hasta que hierva y rápidamente apague el microondas.
- b. Permita que el tubo alcance una temperatura ambiental entre 15–30°C. Para enfriar el tubo más rápidamente se puede colocar debajo de agua fría. Asegúrese de que no penetre agua en el tubo.

La muestra está lista para realizar la prueba. Proceda al procedimiento de prueba del dispositivo de Reveal.

## Sistema de prueba de 20 horas

### 1a. Muestras de 25 g

- a. Preparación del medio. Transfiera el contenido de una bolsa de aluminio del medio Reveal de 20 Horas (Producto Neogen 9770) o 8,3 g del medio Reveal de 20-Horas a granel (Producto Neogen 9758) a una bolsa homogeneizadora. Agregue 225 mL de agua esterilizada a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ . Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, soporte la parte inferior, y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva el medio (más o menos 1 minuto). Coloque la bolsa homogeneizadora en un estante u otro soporte. El medio se puede mantener a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta que esté listo para su uso, pero por no sobrepase un tiempo de más de 6 horas. Para obtener los mejores resultados, use el medio inmediatamente después de su preparación.
- b. Adición de la muestra. Combine 25 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente de la parte superior y amase hasta que se mezcle completamente. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar un mezclado completo.

**Alternativa:** Coloque la bolsa en un homogeneizador y mezcle por 2 minutos a velocidad normal.

### 1b. Muestras de 375 g

- a. Preparación del medio. Agregue 124,5 g del medio de Reveal de 20-Horas (Productos Neogen 9758 o 9758B) a una bolsa de muestra 3500 mL (Producto Neogen 9738) y agregue 3375 mL de agua estéril a  $36^\circ\text{C}$ . Ruede la parte de arriba de la bolsa a 2–3 pulgadas de la parte superior y mezcle vigorosamente hasta que se disuelva. Coloque la bolsa en un balde de 2 galones u otro soporte. El medio se puede mantener a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  hasta el momento de usarlo, pero no sobrepase un tiempo de más de 6 horas. Para obtener los mejores resultados, use el medio inmediatamente después de su preparación.
  - b. Adición de la muestra. Combine 375 g de la muestra con el medio, sujete la bolsa firmemente de la parte superior y amase hasta que se mezcle. Agite la bolsa vigorosamente efectuando movimientos laterales repetitivos para asegurar una mezcla completa.
2. Incubación. Cierre la bolsa (no muy apretada). Incube la muestra a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for 20 horas. No apriete la bolsa mucho al cerrarla, ya que el intercambio de aire es requerido para un crecimiento óptimo.
  3. Mezcla. Retire la bolsa de la incubadora después de 20 horas. Sujete la bolsa firmemente a 2–3 pulgadas de la parte superior, soporte la parte inferior, y mezcle gentilmente el contenido de la bolsa efectuando movimientos laterales repetitivos.

Por favor siga las instrucciones que fueron descritas arriba, para muestras que no sean de carne molida, cubos de carne, sidra de manzana o extracto puro de manzanas e hisopados ambientales: Para muestras que contengan altos niveles de microflora, incremente la temperatura de incubación a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Enriquecimientos alternativos:** Enriquecimientos de 20-Horas alternativos para la recuperación de *E. coli* O157:H7 incluye el Caldo Triptona de Soja, Modificado con Novobiocina (Producto Neogen 7694); Caldo Triptona de Soja Modificado con Novobiocina y la Digestión Ácida de Caseína (Producto Neogen 7731); y Medio EC, Modificado con Novobiocina (Producto Neogen 7700). Todos los tres enriquecimientos han sido o están siendo usados por la USDA/FSIS y están disponibles como medios de cultivo deshidratados de Neogen y como parte de la línea de productos de Acumedia.<sup>4,5,6,7</sup>

La muestra está lista para ser analizada. Proceda con el procedimiento de prueba del dispositivo de Reveal.

## Procedimiento de prueba del dispositivo de Reveal

1. Permita que los dispositivos alcancen una temperatura ambiental (si están almacenados en el refrigerador, de más o menos a 25°C) antes de uso.
2. Retire el número necesario de dispositivos de prueba de Reveal para *E. coli* O157:H7 de la bolsa de aluminio. Coloque el dispositivo sobre una superficie plana y márkelo con la identificación de muestra apropiada.
3. Apriete la bomba de la pipeta de transferencia e inserte el vástago en la muestra. Libere la presión de la bomba y succione la muestra no más allá del vástago.

**Precaución:** Para muestras de 8 horas hervidas:

- No perturbe la muestra al usar el vortex, o por mezcla o agitación.
- No perturbe las partículas en la base de la muestra.
- Retire sólo el líquido, no los residuos, de la muestra.

4. Sostenga la pipeta de transferencia verticalmente encima del puerto de muestreo en el dispositivo y administre 5 gotas al porte cuando use los sistemas de prueba de 8 o 20 horas.

**Alternativa:** Usando una pipeta, agregue 120 µL del líquido de muestra al puerto de muestreo.

5. Observe y registre los resultados de la prueba inmediatamente (dentro de 60 segundos) después de 15 minutos.

## Nota respecto al procedimiento: si existe un problema de flujo en el dispositivo

Si no hay flujo en el dispositivo después de agregar el número de gotas de muestra apropiados al dispositivo, agregue una gota más. El material particulado puede desplazar una parte del volumen necesario para iniciar el flujo cromatográfico de la prueba.

## Interpretación de los resultados

Interpretación visual .....	Resultados
Línea en las zonas C y T en 15 minutos .....	Positivo
Línea en la zona C pero no aparece una línea en zona T .....	Negativo
No aparece una línea en zona C, independientemente de la línea en la zona T .....	Inválido

## Confirmación (opcional)

Neogen sugiere verificar muestras presuntamente positivas por medio de un cultivo de la muestra enriquecida con el medio siguiendo los procedimientos <sup>4,5,6,7</sup> descritos en BAM1 o FSIS.

**Nota:** El realizar pruebas en diferentes muestras usando los procedimientos alternativos de BAM o FSIS pueden reflejar resultados diferentes. Las bacterias no están uniformemente distribuidas en una muestra (especialmente en muestras sólidas y secas), por lo tanto su muestra puede que no contenga el organismo objetivo.

## Eliminación

Deseche (autoclave, cloro, etc.) los dispositivos de Reveal, pipetas, y medio de acuerdo con todas las regulaciones locales, estatales y federales.

## Servicio al cliente

Puede contactar a los Servicios Técnicos y al Cliente de Neogen a través de Neogen.com y la capacitación del producto está disponible por solicitud.

## Información de SDS disponible

Hay fichas de datos de seguridad (SDS) disponibles para todos los kits de prueba en Neogen.com o llamando a Neogen al 800.234.5333 o al 517.372.9200.

## Términos y condiciones

Para ver los términos y las condiciones completas de Neogen, visite Neogen.com.

## Garantía

Neogen Corporation no emite garantías de ningún tipo, expresas o implícitas, excepto respecto a que los materiales que constituyen sus productos son de calidad estándar. En caso de un material defectuoso, Neogen reemplazará el producto. El comprador asume todos los riesgos y la responsabilidad resultante del uso de este producto. No hay garantía de perspectivas de comercialización de este producto o la idoneidad del producto para cualquier propósito. Neogen no será responsable de ningún daño, incluyendo daños especiales o consecuentes, o gastos surgidos directa o indirectamente del uso de este producto.

## Referencias

- <sup>[1]</sup>Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8th Edition (1998), published and distributed by AOAC International, 481 N. Frederick Ave., Suite 500, Gaithersburg, MD 20877-2504 USA.
- <sup>[2]</sup>Edwards, P.R., and Ewing, W.H., Identification of Enterobacteriaceae, 3rd Ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN (1972).
- <sup>[3]</sup>Gray, L.D., Manual of Clinical Microbiology, 6th Ed., Edited by Murray, P.R., Baron, J.B., Tenover, F.C., and Tenover, R.H., American Society of Microbiology, Washington, D.C. pages 450-456 (1995).
- <sup>[4]</sup>Sharar, A. and Rose, B.; Revision 4 of Laboratory Communication #38 Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat; FSIS publication (1994).
- <sup>[5]</sup>Cray Jr., W., et al.; Revision #1; 9-6-99 of Laboratory Communication, Chapter 5: Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat; FSIS publication (1999).
- <sup>[6]</sup>USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd Ed., Rev. 3 (10/25/02), [www.fsis.gov/OPHS/microlab/mlg5.03.pdf](http://www.fsis.gov/OPHS/microlab/mlg5.03.pdf).
- <sup>[7]</sup>FSIS Constituent Update, Protecting Public Health Through Food Safety and Food Defense, Volume 9, Issue 3 (01/25/08).