



**Validación intra-laboratorio de la técnica
de PCR en tiempo real para detección de
Escherichia coli del serogrupo O157 en
alimentos**

Karent Alexandra Carrero Contreras

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Área curricular Ciencias Naturales
Medellín, Colombia

2021

Validación intra-laboratorio de la técnica de PCR en tiempo real para detección de *Escherichia coli* del serogrupo O157 en alimentos

Karent Alexandra Carrero Contreras

Ingeniera Biológica

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magister en Ciencias - Química

Directora:

María Yepes Pérez, Química, M.Sc. candidata a Doctora en Biotecnología

Co-directores:

Neil Vásquez Araque, Biólogo, M.Sc., Doctor en Biotecnología

Elizabeth Correa, Microbióloga, M.Sc. candidata a Doctora en Biología

Línea de Investigación:

Bioquímica, Biología Molecular

Grupo de Investigación:

Producción, Estructura y Aplicación de Biomoléculas (PROBIOM)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Área curricular Ciencias Naturales

Medellín, Colombia

2021

*A mis padres y hermana por todo el
amor y confianza brindada en este proceso.*

Agradecimientos

Gracias a mis padres y hermana por ser mi apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo, por estar a mi lado durante cada momento de duda y miedo.

Una vez finalizado este trabajo, quiero expresar mis agradecimientos y reconocimiento a las instituciones que apoyaron económicamente y con infraestructura, el desarrollo de las actividades investigativas aquí presentadas. En primer lugar, a la Universidad Nacional de Colombia–Sede Medellín, a través de los laboratorios de Venenos Naturales, Biotecnología Animal, Genética y Biología Celular y Molecular, en donde desarrollé la mayoría de las actividades de investigación.

A la Facultad de Ciencias, a través de la convocatoria Colciencias *Convocatoria Nacional para el apoyo al Desarrollo de Tesis de Posgrado o de Trabajos finales de especialidades en el Área de la Salud de la Universidad Nacional de Colombia 2017-2018*, mediante la cual obtuve fondos para adquirir algunos de los reactivos empleados en el proyecto.

Al Área Curricular Ciencias Naturales, por el apoyo a actividades de divulgación científica de mi proyecto.

A la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, a través del grupo de investigación Biociencias y el Laboratorio LACMA, por su acompañamiento en la realización de las pruebas de verificación microbiológica y por facilitarme sus instalaciones, equipos y reactivos.

A la Universidad EIA, por apoyarme con sus instalaciones y equipos moleculares para el desarrollo de pruebas de comparación y validación.

A Tecnoparque SENA-Nodo Medellín, que me facilitó su instalación, equipos y reactivos.

Igualmente, quiero agradecer a las siguientes personas quienes pertenecen a las instituciones mencionadas anteriormente y que estuvieron siempre con la mejor

disposición y apoyo para que este proyecto se lograra finalizar: Elizabeth Correa y Neil Vásquez, mis codirectores. Mónica Durango, Juliana Tobón, Mayra Fuentes, Daniela Cuervo, Marisol Jaramillo, Kaory Barrientos, Carolina Maya, Johana Gutiérrez y Laura Rojas.

A las profesoras Blanca, Pilar y Amanda, siempre me brindaron su guía y apoyo incondicional en todo este proceso.

Finalmente, a mi directora la profesora María Yepes, una de las personas que más admiro, quiero dedicarle un agradecimiento muy especial, porque sin su apoyo académico y personal no habría podido seguir con este trabajo, gracias por acompañarme en cada dificultad que tuve que enfrentar, por motivarme, y enseñarme que con dedicación y esfuerzo se pueden lograr las cosas. Así mismo, a mis amigos que siempre están ahí para animarme Milena, Carlos, Sara, mariana, Susana, Adriana, Ledys, Paola, Alejandra, Johana, Diego y Dora V.

Resumen

Escherichia coli del serogrupo O157 pertenece al patotipo de las enterohemorrágicas, la más virulenta de *E. coli*, porque además de producir endotoxinas, libera dos exotoxinas conocidas como toxinas Shiga, Stx1 y Stx2 (Stx, *Shiga toxin*), causantes de graves patologías que pueden ser letales, como Colitis Hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), para personas con un sistema inmune deficiente o poco desarrollado (niños menores de cinco años y personas de la tercera edad). Esta STEC O157 (Shiga-Toxin producing *E. coli*) puede contaminar alimentos como productos cárnicos, derivados lácteos y vegetales, encontrándose también en aguas de consumo no tratadas.

En la actualidad, la detección y la cuantificación de microorganismos patógenos en diferentes matrices alimenticias representan un gran reto para la industria. La técnica molecular qPCR-SYBR Green, entre otras, es sensible, rápida y específica, permitiendo detectar ADN de STEC del serogrupo O157, en un proceso automatizado que reduce ampliamente los tiempos de los procedimientos, con obtención de resultados en cuestión de horas, con un mínimo de contaminaciones y falsos positivos.

En esta investigación se validaron cuatro protocolos de qPCR-SYBR Green para la detección específica de los genes *rfbE* (dos secuencias de oligonucleótidos), *stx1* y *stx2* expresados por *E. coli* del serogrupo O157 (ATCC 43895), en muestras de carne molida bovina contaminada de forma artificial. Los parámetros de validación desarrollados fueron la selectividad, la sensibilidad y la robustez. Además, se hizo una comparación entre la qPCR-SYBR Green y otros métodos tradicionales como los *gold standar*, para determinar la confiabilidad de los protocolos.

Las qPCR desarrolladas presentaron eficiencias entre 77 % y 97 % y una elevada linealidad (R^2 0,99). Los límites de corte para cada secuencia de primers fueron: $3,1667 \times 10^{-2} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para *rfbE* (primers *rfbE* y O157); $1,7228 \times 10^{-3} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para *stx1* y $3,5185 \times 10^{-3} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para *stx2*. Tanto la inclusividad y la exclusividad fueron del 100 %, así como la precisión analítica, valor predictivo positivo y negativo. Además, fueron procesos bastante robustos. En la matriz contaminada se logró detectar hasta 4 UFC mL^{-1} . Por los resultados obtenidos, los protocolos de qPCR-SYBR Green podrían implementarse para rastrear la presencia de *E. coli* O157 en el análisis rutinario de carne molida bovina, o como una prueba diagnóstica sencilla, rápida, altamente sensible y específica.

Palabras clave: STEC, qPCR- SYBR Green, Stx1, Stx2, SUH, límite de corte, inclusividad, exclusividad.

Abstract

Intra-laboratory validation of the real-time PCR technique for detection of *Escherichia coli* of serogroup O157 in food

Escherichia coli from serogroup O157 belongs to the enterohemorrhagic pathotype, the most virulent of *E. coli*, because in addition to producing endotoxins, it releases two exotoxins known as Shiga toxins, Stx1 and Stx2 (Stx, Shiga toxin), causing serious pathologies that can be lethal, such as Hemorrhagic Colitis (CH) and Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), for people with a poor or poorly developed immune system (children under five and the elderly). This STEC (Shiga-Toxin producing *E. coli*) O157 can contaminate foods such as meat products, dairy products, vegetables, and is also found in untreated drinking water.

Currently, the detection and quantification of pathogenic microorganisms in different food matrices represents a great challenge for the industry; the qPCR-SYBR Green molecular technique, among others, is sensitive, fast and specific, allowing the detection of STEC DNA from serogroup O157, in an automated process that greatly reduces procedure times, obtaining results in a matter of hours, with a minimum of contaminations and false positives.

In this investigation, four qPCR-SYBR Green protocols were validated for the specific detection of the *rfbE* (two oligonucleotide sequences), *stx1* and *stx2* genes expressed by *E. coli* from serogroup O157 (ATCC 43895), in samples of contaminated ground beef artificially. The validation parameters developed were selectivity, sensitivity and robustness. Also, a comparison was made between the qPCR-SYBR Green and other traditional methods such as the *gold standard*, to determine the reliability of the protocols.

The developed qPCRs presented efficiencies between 77% and 97% and high linearity (R^2 0.99). The cutoff limits for each sequence of primers were: 3.1667×10^{-2} ng μL^{-1} for *rfbE* (primers rfbE and O157); 1.7228×10^{-3} ng μL^{-1} for *stx1* and 3.5185×10^{-3} ng μL^{-1} for *stx2*. Both inclusivity and exclusivity were 100%, as well as analytical precision, positive and negative predictive value. They were also quite robust processes. Up to 4 CFU mL^{-1} were detected in the contaminated matrix. Based on the results obtained, the qPCR-SYBR Green protocols could be implemented to track the presence of *E. coli* O157 in the routine analysis of bovine ground beef, or as a simple, rapid, highly sensitive and specific diagnostic test.

Keywords: STEC, qPCR- SYBR Green, *Stx1*, *Stx2*, SUH, cut-off limit, inclusivity, exclusivity.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas.....	XVI
Lista de abreviaturas.....	XVII
Introducción.....	1
1. Marco Teórico.....	3
1.1 Características generales de <i>E. coli</i>	4
1.2 <i>E. coli</i> STEC.....	6
1.2.1 Reservorio.....	6
1.2.2 Vías de transmisión.....	7
1.2.3 Etapas de desarrollo, síntomas y tratamiento.....	8
1.2.4 Factores determinantes de virulencia y su patogénesis.....	9
1.3 Métodos de detección de STEC.....	12
1.3.1 Cultivo en placa.....	12
1.3.2 Pruebas bioquímicas.....	13
1.3.3 Métodos inmunológicos.....	14
1.3.4 Pruebas moleculares.....	15
1.4 Validación de técnicas moleculares.....	19
2. Objetivos.....	23
2.1 General.....	23
2.2 Específicos.....	23
3. Metodología.....	25

3.1	Reactivos y Materiales	25
3.1.1	Microorganismos	25
3.1.2	Medios de cultivo.....	27
3.1.3	Equipos.....	28
3.2	Métodos.....	28
3.2.1	Extracción de ADN bacteriano	30
3.2.2	Diseño de primers	31
3.2.3	Desarrollo de la reacción de PCR	32
3.2.4	Desarrollo de las reacciones de qPCR	34
3.2.5	Determinación de los parámetros de validación	35
3.2.6	Evaluación de qPCR en una matriz real.....	39
3.2.7	Pruebas Microbiológicas.....	42
3.2.8	Pruebas bioquímicas	42
4.	Resultados y discusión	45
4.1	Extracción de ADN.....	45
4.1.1	Calidad y pureza de ADN bacteriano.....	45
4.1.2	Integridad del ADN bacteriano	47
4.2	Determinación de las temperaturas de alineamiento de los genes	48
4.3	Validación de los protocolos de qPCR.....	50
4.3.1	Rango dinámico	50
4.3.2	Selectividad de la qPCR.....	58
4.3.3	Análisis de robustez	62
4.4	Aplicación de los protocolos qPCR en una matriz cárnica	66
4.5	Caracterización microbiológica y bioquímica de <i>E. coli</i> O157:H7	74
4.5.1	Pruebas microbiológicas	74
4.5.2	Pruebas bioquímicas	78
4.6	Resultados adicionales de la investigación	79
4.6.1	Validación intra-laboratorio de la metodología de PCR punto final.....	80
5.	Conclusiones	90
6.	Perspectivas futuras.....	93

A. Inclusividad para la técnica de qPCR evaluando los pares de oligonucleótidos rfbE, O157, Stx1 y Stx2	94
B. Pruebas bioquímicas desarrolladas para cada uno de los tratamientos del diseño experimental por bloques en carne molida bovina cruda	98
Bibliografía	129

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Microfotografía de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica tomada de un frotis	4
Figura 2. Microfotografía electrónica de <i>E. coli</i> O157.....	6
Figura 3. Evolución de la infección por <i>Escherichia coli</i> O157 ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 4. Estructura de la toxina Shiga.....	10
Figura 5. Adherencia de <i>E. coli</i> O157.....	12
Figura 6. Pruebas bioquímicas específicas para <i>Escherichia coli</i> O157:H7..	13
Figura 7. Etapas de la Reacción en cadena de la polimerasa.....	16
Figura 8. Electroforesis de PCR convencional con ADN de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	17
Figura 9. Mecanismo de acción de algunas sondas de qPCR	19
Figura 10. Diagrama de etapas para la implementación de qPCR.....	29
Figura 11. Diagrama de etapas para determinar los parámetros de validación de qPCR.	36
Figura 12. Diagrama de etapas para detección de <i>E. coli</i> O157 en una matriz real.....	40
Figura 13. Esquema de bloques propuesto como diseño experimental	42
Figura 14. Electroforesis de amplicones del gen <i>stx1</i> de <i>E. coli</i> O157:H7	48
Figura 15. Electroforesis de amplicones de los perfiles de temperatura de alineamiento	49
Figura 16. Curvas de amplificación de qPCR para los primers <i>rfbE</i> , O157, <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	53
Figura 17. Comparación de curvas estándar de regresión lineal y polinómica.....	54
Figura 18. Gráfico de residuales para las curvas estándar en qPCR	57
Figura 19. Análisis de inclusividad para la técnica de qPCR.	59
Figura 20. Análisis de exclusividad para la técnica de qPCR.....	60
Figura 21. Análisis de robustez para la técnica de qPCR	64
Figura 22. qPCRs para los genes <i>rfbE</i> , <i>stx1</i> y <i>stx2</i> en una matriz real (carne molida cruda).....	71
Figura 23. Gráfico de franjas (Strip plot) de las repeticiones <i>inter</i> -ensayo.	72
Figura 24. Cultivo en agar Cromogénico Colistant de <i>E. coli</i>	74
Figura 25. Crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en Caldo BRILA y medio SIM	76

Figura 26. Análisis microbiológicos de los tratamientos del bloque II.....	78
Figura 27. Electroforesis de las curvas estándar de PCRs	81
Figura 28. Análisis de inclusividad de PCR convencional	82
Figura 29. Análisis de exclusividad de PCR convencional.....	84
Figura 30. Análisis de robustez correspondientes a <i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> , <i>O157</i> y <i>rfbE</i>	85
Figura 31. Análisis en una matriz real (carne molida cruda) con PCR convencional.....	87

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Descripción génica de ADNs de STEC empleados para validar PCRs	26
Tabla 2. Descripción génica de ADNs bacterianos empleados para validar PCRs.....	27
Tabla 3. Medios de cultivo selectivos y diferenciales para caracterización de <i>E. coli</i> O157.....	27
Tabla 4. Equipos utilizados para el proceso de validación de las PCR.....	28
Tabla 5. Secuencias de primers para amplificación de <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>rfbE</i> de <i>E. coli</i> O157	31
Tabla 6. Perfil térmico de amplificación para cada kit de PCR	33
Tabla 7. Perfil térmico de amplificación para cada kit de qPCR	35
Tabla 8. ADNs empleados para determinar el parámetro inclusividad para cada gen.....	37
Tabla 9. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de inclusividad y exclusividad	38
Tabla 10. Características bioquímicas de <i>E. coli</i> analizadas por VITEK.....	43
Tabla 11. Relación de absorbancias para ADN de <i>E. coli</i> O157:H7.....	46
Tabla 12. Cts para gen <i>stx1</i> a partir de ADNs extraídos por diferentes protocolos	47
Tabla 13. Concentraciones de ADN establecidas como límite de detección y de corte.	51
Tabla 14. Resultados de Eficiencia y R ² para cada par de oligonucleótidos evaluados	55
Tabla 15. Comparación de resultados con investigación	56
Tabla 16. Análisis estadístico de la reproducibilidad <i>inter</i> -ensayos de qPCR.....	65
Tabla 17. Medición de UFC empleadas para contaminar muestras de carne molida bovina.....	67

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>A</i>	Absorbancia
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>AOAC</i>	Association of Official Agricultural Chemists
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection
<i>BLAST</i>	Basic Local Alignment Search Tool
<i>CH</i>	Colitis Hemorrágica
<i>Ct</i>	Cycle Threshold
<i>ETA</i>	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
<i>FRET</i>	Föster resonance energy transfer
<i>Gb3</i>	Globotriaosilceramida
<i>ISO</i>	International Standard Organization
<i>NCBI</i>	National Center for Biotechnology Information
<i>NP</i>	Número más probable
<i>NTC</i>	Norma Técnica Colombiana
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>qPCR</i>	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>STEC</i>	Shiga toxin producing E. coli
<i>Stx</i>	Toxinas Shiga
<i>SUH</i>	Síndrome Urémico Hemolítico
<i>UFC</i>	Unidades Formadoras de Colonia

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) representan un problema de salud pública a nivel mundial, sus efectos sobre los individuos varían desde síntomas de carácter leve hasta enfermedades letales, dependiendo del agente específico asociado a la infección. Países como Argentina, Chile, Canadá y Estados Unidos entre otros, se ven afectados frecuentemente por las ETAs cuyo origen es *E. coli* O157, una de las cepas de mayor virulencia (Kargar & Homayoon, 2015), considerada siempre como emergente. Las infecciones con esta STEC (por sus siglas en inglés, *Shiga-Toxin producing E. coli*) se relacionan con una gastroenteritis severa, colitis hemorrágica, trombocitopenia y en algunos casos, con Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), afectando principalmente a niños menores de cinco años o personas de la tercera edad (Goji et al., 2015; Deisingh & Thompson, 2004). Además de los decesos, el costo anual de los tratamientos de las ETAs puede superar los 5-6 billones de dólares (Deisingh & Thompson, 2004). En Colombia, seguir la incidencia de las ETAs y de las causadas por *E. coli* O157 en particular, resulta un trabajo muy difícil, porque no se cuentan con los registros necesarios para un seguimiento adecuado.

E. coli del serogrupo O157 es foco de atención de las autoridades sanitarias en diferentes sectores, como el de la salud y el de la industria de alimentos, donde el principal problema que se debe enfrentar es la limitación para realizar la detección y cuantificación confiable de esta STEC, debido a su baja concentración en comparación con otros organismos contaminantes, también presentes en un alimento dado, pero suficiente para desencadenar un fuerte episodio clínico en muy poco tiempo. Por tanto, es necesario implementar métodos que garanticen una identificación acertada, precisa y rápida de estas bacterias.

Las técnicas moleculares se están usando ampliamente en el análisis de diversos patógenos a nivel global, en especial las basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*), porque permite identificar genes característicos de los agentes patógenos, con una mínima cantidad de ADN. Para *E. coli* O157, bacteria objeto de esta investigación, la PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*) garantiza rapidez, sensibilidad y especificidad en el análisis (Sidari & Caridi, 2011) y además muestra resultados en forma paralela al desarrollo del proceso de amplificación.

El grupo de investigación Producción, Estructura y Aplicación de Biomoléculas (PROBIOM), de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ha desarrollado algunos trabajos en el área de los alimentos, y con el desarrollo de esta investigación, buscó incursionar en la validación, estandarización y desarrollo de qPCR, para la detección e identificación rápida y confiable de organismos microbianos patógenos, como *E. coli* O157, contaminantes de alimentos principalmente de origen bovino, como estrategia de apoyo a los análisis de diagnóstico en seguridad alimentaria.

Considerando la importancia lograda por las técnicas moleculares para la oportuna detección de la cepa patogénica *E. coli* del serogrupo O157, en diferentes matrices alimentarias (Elizaquível et al., 2012), esta investigación se centró en la determinación de los lineamientos básicos para la validación *intra-laboratorio* de la técnica qPCR-SYBR Green específica para la detección de STEC O157 en carne molida vacuna. El seguimiento se basó en las amplificaciones de las regiones específicas de los genes que expresan el factor de virulencia somático O157 y a las toxinas Shiga 1 y 2 (*rfbE*, *stx1* y *stx2*), desarrollándose cuatro protocolos sometidos a los procedimientos de validación.

La metodología incluyó la evaluación de diferentes procedimientos de la extracción de ADN de la cepa *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), la selección y el diseño de cuatro pares de primers de los tres genes elegidos, el desarrollo de los protocolos de qPCR considerando la construcción de curvas estándar y de melting, para determinar los coeficientes de variabilidad, la linealidad y la eficiencia de las reacciones. Para el desarrollo de la validación de cada protocolo de qPCR, dos del serogrupo (nombrados como O157 y *rfbE*), uno para toxina Shiga 1 (*stx1*) y otro para toxina Shiga 2 (*stx2*), se determinó primero el límite de detección de cada uno. Luego se procedió a encontrar los parámetros estadísticos rango dinámico (límites inferior y superior para establecer el límite de corte), la selectividad (inclusividad y exclusividad), la robustez (variando los kits de reacción, los operarios y el tiempo de la realización de los protocolos).

Finalmente, se desarrolló un diseño de bloques con muestras de carne vacuna contaminada artificialmente con la STEC para darle la aplicación a los procedimientos en validación. Así mismo, se hizo la comparación con algunas técnicas microbiológicas y bioquímicas usadas comúnmente como métodos de detección de este patógeno.

1. Marco Teórico

Escherichia coli es una bacteria que habita generalmente el tracto intestinal (intestino delgado y/o grueso) de animales, incluido el hombre; en su mayoría es no patógena y hace parte de la microbiota comensal (Mainil, 2013; Gyles, 2007; Riemann & Cliver, 1998). Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* causan enfermedades gastrointestinales leves o severas y otras dolencias que pueden ocasionar la muerte de las personas infectadas (Gomes et al., 2016; Mainil, 2013).

E. coli es objeto de numerosos estudios desde su descubrimiento (1885), porque a través de ella se han entendido muchos mecanismos genéticos relacionados con el funcionamiento del ADN, regulación génica, procesos fisiológicos, metabolismo y señalización celular (rutas bioquímicas), entre otros (Riemann & Cliver, 1998), sirviendo de base para el desarrollo de medicamentos, técnicas y estrategias, que luego se han aplicado para impedir y/o tratar infecciones bacterianas y de otros organismos patógenos.

En la actualidad, las investigaciones alrededor de *E. coli* han representado avances muy significativos en diferentes campos, tales como:

- ❖ Medicina: desarrollo de antibióticos (ej. Eritromicina), vacunas (ej. mucosales, génicas, obtención de proteína no estructural, NS1 por su sigla en inglés *non structural protein 1*, usada contra el dengue) y, las hormonas (ej. insulina, hormona del crecimiento) (Sandvig et al., 2015; AU - Jiang et al., 2013; Martínez Manrique, 2006; Spitz, 2000; López & Mota, 2000).
- ❖ Terapia génica: ha servido de plantilla base para comprender cómo actúan los genes y cómo se desarrollan sus procesos de regulación. Técnicas de ADN recombinante.
- ❖ Producción de proteínas recombinantes, enzimas de restricción (ej. EcoRI) y exonucleasas (ej. Exo VII) (Bolívar et al., 2004).
- ❖ Biorremediación, ej. en tratamiento de aguas contaminadas con Cromo VI (Panigatti et al, 2012).

- ❖ Energías alternativas ecológicas, ej. en la producción de alcohol butílico (Flórez & Mourenza, 2013).

1.1 Características generales de *E. coli*

E. coli fue descubierta por el pediatra alemán Theodor Escherich en 1885 en las heces de un niño que presentaba un cuadro de diarrea (Gomes et al., 2016; Mainil, 2013); por esta razón y haciendo honor a su descubridor, se le asignó el nombre del género *Escherichia* a un grupo específico de bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae.

Las características propias de *Escherichia* son: bacilos quimioorganotróficos, anaerobios facultativos móvil o no móvil y Gram negativo, entre otras (véase **Figura 1**) (Gomes et al., 2016; Baker et al., 2016; Rivas et al., 2015; Mainil, 2013).



Figura 1. Microfotografía de *Escherichia coli* enterotoxigénica tomada de un frotis de cultivo puro con tinción de Gram. Los bacilos forman colonias de aproximadamente 1.1-1.5 μm de diámetro y 2,6 μm de longitud. Fuente: Zerpa L., 2011

En el género *Escherichia* se incluyen siete especies: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. fergusonii*, *E. herjmannii*, *E. vulneris* y *E. blattae* (Iguchi et al., 2009; Walk et al., 2009). La especie *E. coli* es el prototipo del género, y es el centro de estudios de diferentes áreas como clínicas, ambientales, alimentos y hasta biotecnológicas; son bacterias no formadoras de esporas que pueden crecer fácilmente en el laboratorio, bajo condiciones mínimas de nutrientes, a pHs entre 5-9, sobreviviendo incluso por cortos períodos de tiempo en pHs cercanos a ~ 2 (Baker et al., 2016; Rivas et al., 2015; Elízaquivel Bárcenas, 2009). Poolman (2017) hizo una clasificación de esta especie según los efectos dentro del hospedero, (Poolman, 2017):

- ❖ *E. coli* comensales y nativas (propias del tracto gastrointestinal), no causan enfermedades.

- ❖ *E. coli* causantes de enfermedades intestinales diarreicas: ej. *E. coli* enteropatógena.
- ❖ *E. coli* causantes de enfermedades fuera del tracto intestinal: ej. *E. coli* enterohemorrágica.

Otra clasificación de *E. coli* y más utilizada, es la serotipificación de Kauffmann, desarrollada en la década de los 40 del siglo pasado (Mainil, 2013), realizada por el investigador con base en cuatro antígenos: O (lipopolisacárido), K (capsular), H (flagelar), y un antígeno fimbrial; se han descrito aproximadamente entre 174 a 186 referidos al antígeno O, 53-56 para H y 80 para K (Fratamico et al., 2016; Rivas et al., 2008; Riemann & Cliver, 1998).

Es común hacer referencia a cepas de *E. coli* como serogrupos y/o serotipos, considerando los antígenos: O para serogrupos, y O:H para serotipos (Rivas et al., 2015); hasta 2012 se reportaron entre 5×10^4 y 1×10^5 serotipos de *E. coli* (Elizaquível et al., 2012). Los serogrupos se han agrupado a su vez en seis patotipos, conectados principalmente con diarreas infantiles (Jensen et al., 2014; Ochoa et al., 2011) y, clasificados con base en sus características de patogenicidad, en los sitios de colonización y en la sintomatología (de carácter leve hasta letal) (Poolman, 2017; Gomes et al., 2016; Farfán et al., 2016; Gohar et al., 2016; Moxley, 2004):

- ❖ *E. coli* enteropatógena: EPEC, por sus siglas en inglés *Enteropathogenic E. coli*.
- ❖ *E. coli* enterohemorrágica: EHEC por sus siglas en inglés *Enterohemorrhagic E. coli*; dentro de este grupo se encuentran también *E. coli* productora de toxina shiga STEC, por sus siglas en inglés *Shiga-Toxin producing E. coli*.
- ❖ *E. coli* enterotoxigénica: ETEC, por sus siglas en inglés de *Enterotoxigenic E. coli*.
- ❖ *E. coli* enteroinvasiva: EIEC, por sus siglas en inglés de *Enteroinvasive E. coli*.
- ❖ *E. coli* enteroagregativa: EAEC, por sus siglas en inglés de *Enterocoagulative E. coli*.
- ❖ *E. coli* de adherencia difusa: DAEC, por sus siglas en inglés de *Diffusely Adherent E. coli*

La OMS advirtió en 2012, la amenaza de infecciones contraídas principalmente de los serotipos de *E. coli*: O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111: NM, O45 y O145: NM (No Móvil), debido a la mortalidad o daños permanentes en los pacientes afectados y su resistencia a los antibióticos empleados de forma habitual para tratar afecciones gastrointestinales, tales como Ampicilina (85%), Cotrimoxazol (79%), Tetraciclina (65%) y Ácido Nalidíxico (28%) (Melton-Celsa, et al., 2012; Ochoa et al., 2011). En los países en vía de desarrollo, algunos patotipos de *E. coli*, son responsables de aproximadamente el 30 % a 40 % de los episodios diarreicos infantiles (Ochoa et al., 2011).

1.2 *E. coli* STEC

Las cepas STEC son reconocidas como potentes agentes zoonóticos a nivel mundial, capaces de ocasionar un amplio espectro de enfermedades de carácter potencialmente letal para el humano (Karmali et al., 2010). La mayoría se encuentran dentro del patotipo EHEC (Farfán et al., 2016; Bryan et al., 2015; Rivas et al., 2008).

Los primeros reportes de STEC datan de los años setenta (1977), cuando Konowalchuk *et al.*, en Canadá, notaron que algunas cepas de *E. coli* tenían un efecto citotóxico irreversible sobre las células Vero (células de riñón de mono verde africano), por lo cual inicialmente este grupo se denominó *E. coli* verocitotoxigénicas (VTEC) (Farfán et al., 2016; Bryan et al., 2015; Karmali et al., 2010; Nguyen & Sperandio, 2012; Gyles, 2007; Chart, 2000). Luego O'Brien y *et al.* (1982), las identifican como *E. coli* capaces de producir toxinas similares a la familia de toxinas Shiga (SLT, por sus siglas en inglés *Shiga Like Toxin*) (Farfán et al., 2016; Bryan et al., 2015; Gomes et al., 2016; Baker et al., 2016; Melton-Celsa et al., 2012; Nguyen & Sperandio, 2012; Hunt, 2010; Karmali et al., 2010; Paton & Paton, 1998).

Se han aislado cerca de 500 serotipos de STEC en hospederos humanos y animales (Nguyen & Sperandio, 2012; Gyles, 2007). Estos microorganismos son prevalentes en muchos países incluyendo los desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Alemania entre otros; en Latinoamérica, Argentina por ejemplo, reporta 500 nuevos casos/año (Farfán et al., 2016). Una de las STEC más asociada en la mayoría de países, con los episodios de consecuencias más graves, es STEC O157 (véase **Figura 2**), en especial el serotipo *E. coli* O157:H7 considerado uno de los más virulentos (Kargar & Homayoon, 2015; Ferreira et al., 2014; Elízaquivel Bárcenas, 2009; OIE, 2018; Rivas et al., 2008).



Figura 2. Microfotografía electrónica de *E. coli* O157. Fuente: Pennington, 2010.

1.2.1 Reservorio

E. coli O157 puede encontrarse en el intestino de los rumiantes, tales como vacuno (reconocido como el reservorio principal), bisontes, cabras, corderos y ovejas, aunque no se ha reportado en

renos, camellos o llamas (Farrokh et al., 2013; Pennington, 2010); en los animales en mención, se clasifica como un organismo comensal, dado que no se observa un daño citotóxico (asintomáticos), lo que se relaciona posiblemente con la poca disponibilidad de receptores de las toxinas en los rumiantes, la influencia de su microbiota nativa intestinal, las limitaciones nutritivas y la respuesta inmunológica, entre otras (Melton-Celsa et al., 2012). No obstante, el contacto con el ganado portador, con sus heces y/o su consumo de sus productos como la carne y la leche, puede afectar a las personas y aunque en menor proporción, otros animales tanto domésticos como salvajes, que se convierten a su vez, en vectores de transmisión (Kargar & Homayoon, 2015; Baker et al., 2016; Jure et al., 2015; Piedrahita et al., 2001).

En el ganado vacuno el proceso de colonización con STEC dura menos de dos meses y es más frecuente en los ejemplares jóvenes (2 a 24 meses) que en los adultos (Rivas et al., 2008), generando en ocasiones, una diarrea sin mayores consecuencias (Mainil, 1999; Dean-Nystrom et al., 1997). Los bovinos portadores pueden expulsar hasta 10^4 UFC/g (superdiseminadores o Sheddors) mediante las cuales se diseminan las STEC a otros animales, a las fuentes hídricas, terrenos de cultivos agrícolas, incrementando así la probabilidad de infección del humano (Baker et al., 2016; Hoffman et al., 2006).

1.2.2 Vías de transmisión

La fuente principal de STEC O157 son las aguas contaminadas (60,7%) y los alimentos (42,2%) que no han sido sometidos a un adecuado proceso de cocción, pasteurización y manipulación durante el procesado (Roldán et al., 2007). Los alimentos contaminados con *E. coli* O157 son la carne molida (no cocinada correctamente), los productos lácteos (12.2%), salchichas, chorizos, embutidos, y otros productos de origen bovino, agua, semillas germinadas, productos frescos como frutas, vegetales y hortalizas contaminados de forma directa o indirecta por el contacto con animales infectados, así como por factores ambientales (2.2%), entre otros (Kargar & Homayoon, 2015; Pennington, 2010; Piedrahita et al., 2001)

El contacto con los ambientes propensos a las contaminaciones fecales como los zoológicos, corrales de ganado, granjas y las plantas de beneficio, facilita la interacción entre animales portadores de STEC y las personas, representando un 7,8% de las fuentes de transmisión (Baker et al., 2016). Entre las reses se pueden transferir las bacterias a través del contacto con su piel, además de sus heces (Omisakin et al., 2003) y de esta manera, llegan las STEC a la carcasa (Baker et al., 2016; Smith et

al., 2014; Rivas et al., 2008; Low et al., 2005; Hussein & Bollinger, 2005). Las corrientes de aire, las aves y los insectos, también se convierten en factores de diseminación del microorganismo durante la faena (Rivas et al., 2008).

1.2.3 Etapas de desarrollo, síntomas y tratamiento

El efecto de *STEC* O157 en las personas depende de la patogenicidad del serotipo específico y la susceptibilidad del individuo, no obstante se estima como dosis infectiva 10 a 100 organismos/gramo de alimento (Farrokh et al., 2013; Rivas et al., 2008; Prado J & Cavagnaro S.M, 2008). Los pacientes con un buen sistema inmunológico superan el cuadro infeccioso en una semana, mientras los niños menores de cinco años, los adultos mayores o individuos con alguna condición de inmunodeficiencia son susceptibles a las toxinas Shiga de las *STEC*, que pueden afectar temporal o definitivamente, su sistema nervioso central y en casos más severos, evolucionar a SUH, en el 5% al 10% de los pacientes (véase **Figura 3**) (Karmali et al., 2010; Deisingh & Thompson, 2004; Paton & Paton, 1998; Mead & Griffin, 1998).

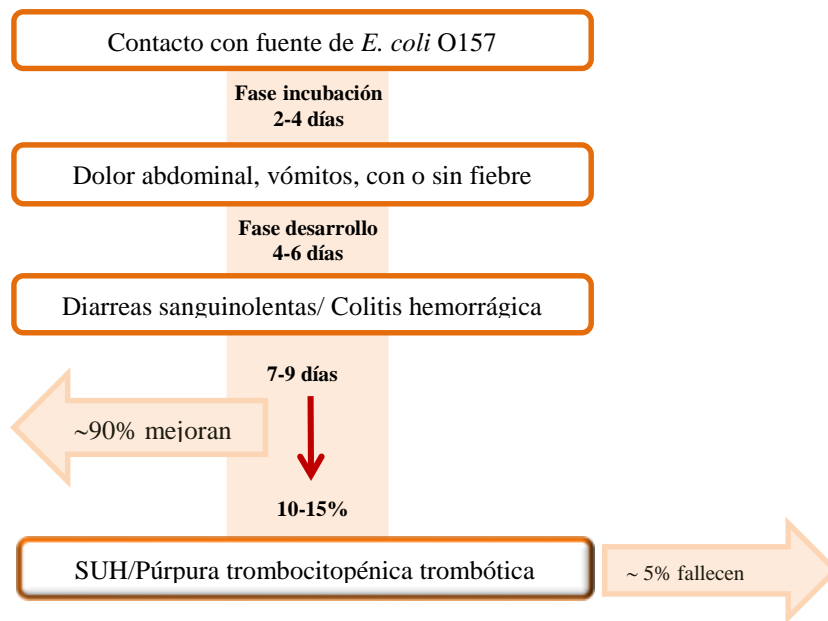


Figura 3. Evolución de la infección por *Escherichia coli* O157

El SUH es una enfermedad que engloba tres afecciones muy delicadas, la anemia hemolítica, trombocitopenia y la falla renal aguda, representando un 3 % a 5% de riesgo de mortalidad infantil (Kavaliauskiene et al., 2017; Hunt, 2010; Rivas et al., 2008; Paton & Paton, 1998). En la actualidad, no se cuenta con un tratamiento específico, solo terapia de apoyo de hidratación y diálisis peritoneal

para los pacientes en estado crítico (Farfán et al., 2016; Page & Liles, 2013; Karmali et al., 2010; Polito & Kirsztajn, 2010; Gyles, 2007; Paton & Paton, 1998). Los tratamientos comunes para manejar la gastroenteritis, cómo los antibióticos y antidiarreicos, por el contrario parecen beneficiar el crecimiento microbiano y la liberación de sus toxinas Shiga, las cuales se dirigen a las células del endotelio renal (Kavaliauskiene et al., 2017; Rivas et al., 2015; Polito & Kirsztajn, 2010; Prado J & Cavagnaro S.M, 2008; Rivas et al., 2008).

1.2.4 Factores determinantes de virulencia y su patogénesis

La diferenciación de la microbiota nativa respecto a la patogénica está determinada por sus características de virulencia (OIE, 2018); para *Escherichia coli* O157 los marcadores más importantes a nivel clínico son:

Citotoxinas, representadas por las toxinas Shiga (Stx), son reconocidas como el principal factor de virulencia asociado a la STEC O157 (Nyambe et al., 2017; Krüger & Lucchesi, 2015; Shaikh & Tarr, 2003); su descubrimiento (1896) se debe a médico y bacteriólogo japonés Kiyoshi Shiga (O'Brien et al., 1992). Las Stxs afectan principalmente las células endoteliales del riñón humano llegando a producir lesiones histopatológicas renales muy severas con el desarrollo del SUH (Johannes & Romer, 2010; Melton-Celsa et al., 2012).

En cepas STEC aisladas de los humanos y de algunos rumiantes, se han identificado dos clases de Stx, Stx₁ y Stx₂ se ha podido establecer que cada Stx está codificada en bacteriófagos de la familia lambdaoide diferentes (Krüger & Lucchesi, 2015; Allison et al., 2003). Stx₁ y Stx₂ pertenecen a la familia de toxinas AB₅, formadas por una subunidad A de 32 KDa y un pentámero de subunidades B idénticas, con una masa de 7,7 KDa cada una (véase Figura 4A), secretadas al periplasma bacteriano para su ensamblaje. Las cinco subunidades B se agrupan en forma de anillo o rosquilla (véase **Figura 4C**), con un poro central rodeando una hélice α del extremo C-terminal de la StxA, que crea la unión no covalente para mantener la estructura de la holotoxina (Chan & Ng, 2016; Sandvig et al., 2015; Cherla et al., 2003).

La subunidad A y el pentámero B constituyen respectivamente, la región biológicamente activa (actividad enzimática) y el sitio de unión al receptor celular específico, Globotriaosilceramida (Gb3 o CD77), reconociendo específicamente los trisacáridos expuestos Gal α 1-4Gal β 1-4Glc ceramida (Chan & Ng, 2016; Bergan et al., 2012; Johannes & Romer, 2010; Rivas et al., 2008). El daño celular asociado a las toxinas Shiga se debe a la acción de la subunidad A, conformada por los fragmentos

A1 (27,5 KDa) y A2 con el C-terminal (4,5 KDa) unidos por un puente disulfuro entre residuos de cisteína en la posiciones 242 y 261 (véase Figura 4B) (Sandvig et al., 2015; Bergan et al., 2012).

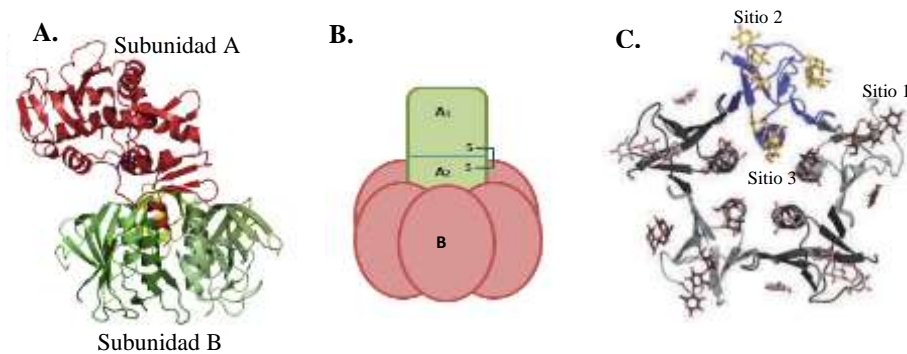


Figura 4. **A.** Estructura de la toxina Shiga. **B.** Representación de las subunidades A y B de Stx. **C.** Vista del anillo formado por las subunidades B, mostrando los sitios de unión a Gb3, sitios 1 y 2 alta afinidad, sitio 3 baja afinidad. Tomado de: Bergan, Dyve Lingelem, Simm, Skotland, & Sandvig, 2012; Johannes & Romer, 2010

En StxA, el puente disulfuro forma un loop que contiene la secuencia Arg-X-X-Arg, útil para el reconocimiento enzimático por parte de una Furina (dependiente de Ca^{2+}), la cual se encarga de clivar (a pH bajo) la región en dos partes, liberando la forma activa de la proteína A1, en la toxina Stx₁ el sitio de corte ocurre en las posiciones Arg 251 y Met 252 mientras en Stx₂ sucede en las posiciones Arg 250 y Ala 251 (Chan & Ng, 2016; Sandvig et al., 2015; Bergan et al., 2012). La forma activa de las Stxs es de N-glicosidasa, la cual es altamente selectiva, para depurar un residuo específico de adenina de la RNAr 60s, inhibiendo la síntesis de proteínas y por ende llevando a una muerte celular (Hannaoui et al., 2009).

Las Stxs expresadas por *E. coli* se clasifican generalmente en dos tipos inmunológicamente diferentes, Stx₁ (con las variantes Stx_{1c} y Stx_{1d}) y Stx₂ (con las variantes Stx_{2c} (Stx_{2vh}-A y Stx_{2vh}-B), Stx_{2d} (Stx_{2d}-Ount y Stx_{2dox3}), Stx_{2e}, Stx_{2f}, y Stx_{2g}); según datos de investigaciones de la toxicidad de las Stxs, la tipo 2 es de 100 a 1000 veces más tóxica que la Stx₁ (Rivas et al., 2008; Cherla et al., 2003; Hannaoui et al., 2009).

Plásmidos. Para STEC O157 el plásmido más estudiado es el pO157 (60 a 90 MDa), porque es portador de una serie de genes capaces de expresar los factores de virulencia responsables de la alta patogenicidad asociada a estas cepas. Se han identificado aproximadamente 19 genes, entre los

cuales se encuentran: *espP* (Serina proteasa extracelular, EspP de 104 KDa), *katP* (catalasa-peroxidasa, KatP de 82 KDa), *ehxA* (enterohemolisina, EhxA), *etp* (grupo de genes que expresa proteínas que constituyen un sistema de secreción tipo II), *stcE* (metaloproteasa, StcE) regulador de las vías inflamatorias del hospedero, *toxB* proteína de adhesión putativa que participa en la interacción con linfocitos gastrointestinales, también hay una adhesina fimbrial que tiene un papel muy importante en la colonización de intestinal, particularmente en la unión y reconocimiento de los enterocitos, responsable de la lesión A/E (por sus siglas en inglés Attaching and effacing) (Kobayashi et al., 2013; Lim et al., 2010; Rivas et al., 2008; Law, 2000).

Factores de adherencia al enterocito. *E. coli* O157 inicia el proceso de colonización y de unión a las células epiteliales del colon para evitar su eliminación por peristalsis; su adhesión genera daños a nivel de las microvellosidades del huésped, se inicia con el reconocimiento de las endotoxinas bacterianas (adhesinas putativas) como las IpfA, IhA, LifA y las fimbrias que provocan el alargamiento de las microvellosidades intestinales (Rivas et al., 2008; Szalo et al., 2002) y continuando con la formación de un canal, que le permite a la bacteria inyectar las proteínas específicas a su huésped.

Los factores de adherencia de STEC O157, son expresados por las regiones codificantes dentro de la isla de patogenicidad LEE (por sus siglas en inglés *Locus Enterocyte Effacement*) de 43 Kb, con una región adicional de 7,5 Kb (región profago). La intimina es una de las proteínas (97 kDa) más importantes expresada por el gen *eae* de la región LEE y es la responsable de la interacción íntima entre la bacteria y la membrana del enterocito (Lim et al., 2010; Rivas et al., 2008).

Una vez se fija la bacteria a las células blanco (target), libera una serie de proteínas para crear un canal de comunicación con el interior del enterocito, a través del sistema de secreción tipo III (T3SS) (Gaytán et al., 2016) codificado también en LEE, para transferir el receptor bacteriano Tir (por sus siglas en inglés *translocated intimin receptor*) a la región citoplasmática del huésped, donde induce la fosforilación en la tirosina 474, estimulando la agregación de actina de la célula invadida, para ubicarse nuevamente en la membrana y servir de receptor de la intimina. En síntesis, la bacteria activa su batería proteica para invadir los enterocitos e introduce su propio receptor (Prado J & Cavagnaro S.M, 2008) (Véase **Figura 5**).

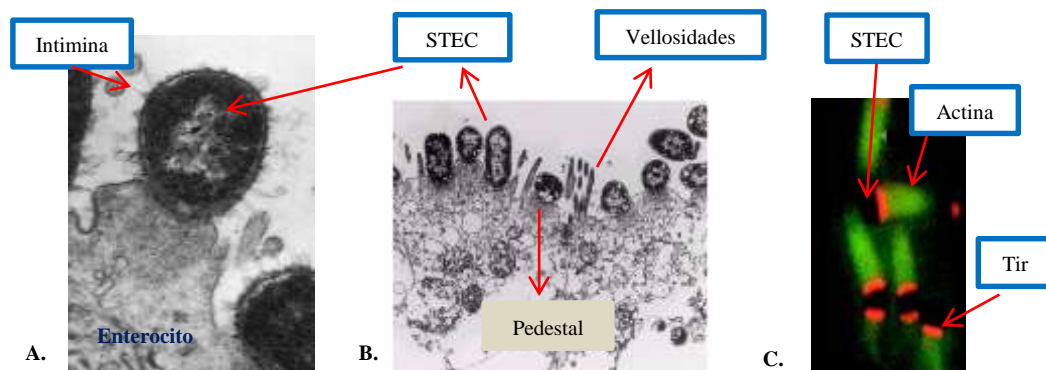


Figura 5. **A.** Interacción entre la Intimina y la membrana externa del enterocito. **B.** Formación del pedestal tras la lesión de Adhesión y borrado (A/E) en el enterocito. **C.** Inmunofluorescencia donde se muestra en verde la acumulación de actina, en naranja la TIR y en negro la STEC O157. Tomado de: Rivas et al., 2008; Frankel et al., 2001; Staley, Jones, & Corley, 1969.

1.3 Métodos de detección de STEC

E. coli O157 es reconocida como un potente patógeno asociado a brotes esporádicos que representan un problema de salud pública a nivel mundial. Generalmente, su concentración en un alimento es muy baja en comparación con otros individuos propios de la matriz, dificultando así su detección (Franco et al., 2013). Por este motivo, se necesitan metodologías de alta sensibilidad, especificidad, viabilidad y diagnóstico rápido, que puedan usarse como medidas de control en fuentes alimentarias e hídricas donde se sospeche la presencia de STEC O157.

1.3.1 Cultivo en placa

Esta metodología permite observar el crecimiento de las células bacterianas empleando medios de cultivo selectivos y específicos para el serogrupo O157; se usan caldos de enriquecimiento que contienen peptona, vancomicina, cefixima, cefsulodina y telurito de potasio para el crecimiento de los microorganismos. También, medios de cultivo específicos que garantizan el desarrollo específico de las colonias de interés, tales como agar sorbitol MacConkey (SMAC) el cual es selectivo para el serotipo O157:H7 (si ha sido enriquecido con cefixime-rhamnosa (CR-SMAC), cefixime-tellurite (CT-SMAC) y 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MSA-MUG) constituido por sales biliares, una fuente de carbohidratos, sorbitol y un indicador (Kargar & Homayoon, 2015).

Estos métodos se conocen comúnmente como “gold standard” y, son reconocidos como los protocolos base de cualquier de detección. Aunque se implementen técnicas sofisticadas es necesario usar los medios de cultivo como pruebas confirmatorias de la actividad de cualquier microorganismo; en general, son sensibles, económicos y muy útiles, si se quiere obtener información cuantitativa y cualitativa de la presencia de una cepa específica en una matriz alimentaria (Piedrahita et al., 2001).

1.3.2 Pruebas bioquímicas

Es un test con el cual se comprueba la presencia microbiana en un medio dado, aprovechando sus capacidades enzimáticas particulares. Para reconocer STEC O157 se usan dos características fenotípicas inusuales: inhabilidad para fermentar D-sorbitol y la ausencia en la actividad de la enzima β -glucuronidasa (véase **Figura 6**); también se emplean otros marcadores bioquímicos como su capacidad para fermentar la rafinosa y el dulcitol (OIE, 2018).

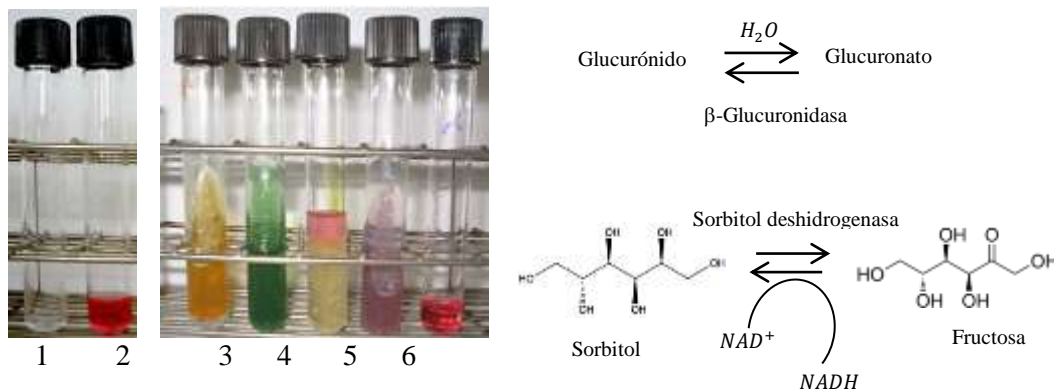


Figura 6. Izquierda: Pruebas bioquímicas específicas para *Escherichia coli* O157:H7, 1. Actividad β -glucuronidasa (negativa), 2. Fermentación del sorbitol (negativa), 3. TSI: Pico ácido/fondo ácido con producción de gas (negativo), 4. Uso del Citrato (negativo), 5. SIM: SH₂ (negativo), Indol (positivo), movilidad (positiva), 6. LIA: decarboxilación de la lisina (positiva), SH₂ (negativa), 7. Fermentación de celobiosa (negativa). Derecha arriba: Reacción característica de las bacterias que tienen actividad catalítica de β -Glucuronidasa. Derecha abajo: Reacción característica de bacterias que fermentan sorbitol. Fuente: Leotta et al., 2005.

1.3.3 Métodos inmunológicos

Se fundamentan en la unión específica de un anticuerpo a un antígeno, que en este caso son las estructuras propias de las células bacterianas (Piedrahita et al., 2001). Los resultados por esta técnica comúnmente, requieren confirmarse para garantizar la detección específica del microorganismo de interés (OIE, 2018).

- ❖ **Pruebas serológicas:** se fundamentan en la interacción entre una solución con anticuerpos específicos (antisuero) con antígeno homólogo (célula bacteriana); en el mercado están disponibles Kits comerciales de látex para: O157, O26, O91, O103, O111, O128, O145 y H7 (Deisingh & Thompson, 2004)
- ❖ **Separación inmunomagnética (IMS):** uso de esferas de micropoliestireno con propiedades paramagnéticas para aislar y recuperar de forma rápida especies que comparten características únicas en una matriz diversa. Estas esferas generalmente están cubiertas de anticuerpos específicos a los antígenos expresados en la superficie bacteriana. También se requieren procesos adicionales para confirmar la identificación (Sidari & Caridi, 2011; Gracias & McKillip, 2004)
- ❖ **Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA):** los anticuerpos se unen a una enzima marcada con una molécula fluorescente, que emite una señal como evidencia de su unión al antígeno específico (propio del patógeno), el cual se mide luego en un biosensor (Elízaquivel Bárcenas, 2009; Piedrahita et al., 2001).
- ❖ **Ensayos de hibridación en la colonia:** Se basa en el uso de sondas de ADN y de oligonucleótido sintético marcadas con digoxigénina o biotina; es muy útil en la detección de cepas patógenas asociadas al patotipo STEC en un cultivo mixto (OIE, 2018)

Piedrahita *et al.*, destaca otros métodos como (Piedrahita *et al.*, 2001):

- ❖ **Bioluminiscencia:** usa la enzima luciferasa para medir la cantidad de ATP, esta medida permite tener una idea de la carga microbiana al realizar una aproximación del número de células presentes. No es muy específico.
- ❖ **Recuento de células:** Se puede desarrollar de dos formas: midiendo la dispersión de la luz causada por la concentración de microorganismos (citometría de flujo), o con microscopía epifluorescente donde se unen el fluorocromo naranja de acridina a las cepas estudiadas.

- ❖ **Impedimetría:** Relaciona las variaciones de conductancia de un medio afectado por las reacciones asociadas al crecimiento de un microorganismo dado.

1.3.4 Pruebas moleculares

Estas técnicas se fundamentan en la interacción de secuencias de ADN de un individuo, asociadas a la expresión de un gen específico; de esta forma, se pueden detectar y/o identificar alteraciones, mutaciones, rasgos genotípicos entre otras aplicaciones, con las cuales se puede diagnosticar una enfermedad o la posibilidad de padecerla en un tiempo futuro, la relación filogenética entre iguales o diferentes especies, entre otros. En cuanto a la seguridad alimentaria, las técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), han revolucionado los procedimientos convencionales, porque en menor tiempo, se puede vigilar y controlar patógenos en materias primas o en alimentos procesados, como también en aguas de consumo; igualmente, con PCR se puede determinar la fuente alimentaria asociada a una intoxicación, como también el seguimiento de un tratamiento médico originado por infecciones microbianas (Baker et al., 2016; Elízaquivel Bárcenas, 2009).

La PCR copia la habilidad celular de duplicar el material genético, aprovechando la complementariedad de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, para el reconocimiento de las secuencias características y específicas de un organismo, valiéndose del diseño de cebadores a partir de regiones o fragmentos del genoma de interés (target). Se basa en la acción de la enzima ADN polimerasa, encargada de realizar el ensamblaje de desoxinucleótidos al OH libre en el extremo 3' de una secuencia de oligonucleótidos específica denominada primers y de forma complementaria a una cadena molde (ADN target) (Patiño & López, 2006).

Estos cebadores o primers, término inglés pero muy difundido en la biología molecular, sirven de plantilla o molde para que bajo la acción de la enzima ADN polimerasa, bases trifosfatadas de adenina, guanina, citosina y timina o uracilo (ATP, GTP, CTP, TTP o UTP), formen estructuras complementarias de la región target, dando lugar a numerosas copias o amplicones del gen objetivo (Bustin & Huggett, 2017; Baker et al., 2016; Rivas et al., 2008).

El procedimiento consta de tres etapas que dependen de un perfil de temperatura (véase **Figura 7**): 1) desnaturalización del ADN por calor (94 °C- 96 °C), o sea la separación de la doble hebra; 2) reconocimiento del target y alineamiento de los primers con el ADN del individuo que se desea detectar, con una temperatura que depende de la longitud y de la relación guanina/citosina de los

primers; 3) finalmente, viene una etapa de extensión y amplificación (polimerización) de la secuencia comprendida entre los primers, por acción de la enzima ADN polimerasa (amplicón), la cual ocurre generalmente a 72 °C (Piedrahita et al., 2001). Este proceso se repite (ciclos) y de esta manera, partiendo de poca cantidad de ADN, se puede tener un incremento exponencial de copias de la región génica de interés.

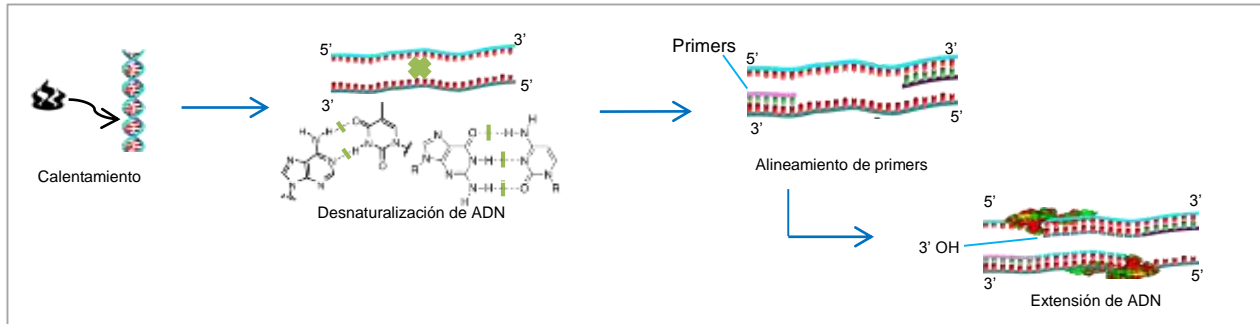


Figura 7. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa: desnaturalización de la hebra de ADN, alineamiento de primers y extensión de la cadena de ADN por acción de la enzima polimerasa.

Los resultados de la amplificación (amplicones) se revelan de varias formas y es precisamente esto lo que da lugar a los diferentes tipos de PCR:

- ❖ **PCR convencional.** Los productos de la PCR se revelan mediante el desarrollo de electroforesis: teniendo en cuenta que algunos fluorocromos actúan como agentes intercalantes del ADN de doble cadena y luego fluorescen bajo detectores de luz ultravioleta, se preparan geles de agarosa o poliacrilamida y se tiñen con estos compuestos, para que luego se asocien con los amplicones del gen objetivo sembrados en los geles. Los fluorocromos más comunes son Bromuro de Etidio, muy restringido por sus efectos cancerígenos, SYBR safe, SYBR Green y SYBR Red entre otros. Además, con el marcador de peso molecular, que siempre acompaña el revelado, se puede garantizar si el amplicón corresponde a la región de interés en función del tamaño, que debe coincidir con una de las bandas de referencia (véase **Figura 8**). De este modo, se detectan e identifican los amplicones de las regiones target (Brusa et al., 2015; Piedrahita et al., 2001).

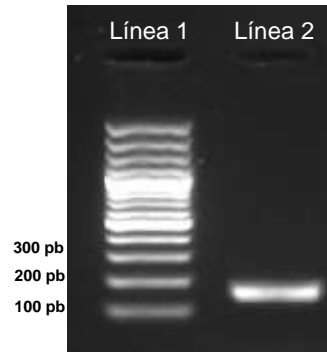


Figura 8. Electroforesis para visualizar amplicones obtenidos mediante PCR convencional, utilizando como muestra ADN de *Escherichia coli* O157:H7; el tamaño del amplicon es de 151 pb. Línea 1. Marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 2. Amplicones del gen *stx1*

- ❖ **PCR múltiple.** Los amplicones se detectan también por electroforesis, pero con la ventaja respecto a la convencional, que se pueden amplificar simultáneamente, varias secuencias de diferentes genes de interés. Sin embargo, se deben diseñar primers para las distintas regiones, con un grado de especificidad extremadamente riguroso y además, demanda mantener muy controladas las condiciones de trabajo, para evitar errores en la detección (Baker et al., 2016; Brandal et al., 2015; Deisingh & Thompson, 2004; Palomino & González, 2002).
- ❖ **PCR acoplada a ELISA.** El revelado de los amplicones es a través de la formación del complejo antígeno-anticuerpo. El proceso consiste de dos etapas: en la primera, se desarrolla la PCR normal, pero se incluye un nucleótido marcado por algún elemento o molécula tal como el esteroide digoxigenina, que puede ser reconocido luego por un anticuerpo específico; en la segunda, sobre los amplicones marcados se desarrolla el ELISA, empleando una sonda captura complementaria al amplicón de interés y luego la unión, se detecta a través del desarrollo de color, como resultado de la acción enzimática sobre un sustrato ligado a un anticuerpo que detecta la especie en el nucleótido marcado (Ge et al., 2002).
- ❖ **PCR en tiempo real o cuantitativo** (qPCR por sus siglas *quantitative PCR*). Se fundamenta en la detección de la emisión de fluorescencia procedente de sondas o intercalantes fluorescentes (fluorocromos), durante la alineación y extensión del segmento molde. El procedimiento se asemeja a la PCR convencional, pero el marcaje y detección se realizan simultáneamente durante la reacción de polimerización, lo que valida el nombre de tiempo real. A medida que transcurre la duplicación del amplicón, la señal emitida por el fluorocromo, se registra y procesa automáticamente en un espectrofluorómetro que se acopla al termociclador, sin necesidad de manipular los productos de amplificación posteriormente; por esta razón, la

qPCR asegura la inocuidad de las muestras, disminuyendo el riesgo de la contaminación cruzada (Baker et al., 2016; Deisingh & Thompson, 2004; Elízaquivel Bárcenas, 2009; Spano et al., 2005).

Es muy importante destacar la función de los agentes intercalantes de fluorescencia en la qPCR, los cuales pueden ser o no específicos en su reconocimiento del ADN molde (Rodríguez M & Rodríguez W, 2006):

No específicos: se unen indiscriminadamente al ADN de doble cadena (dsADN), a través de fuerzas intermoleculares tipo Van der Waals. Con respecto a su estado libre, los fluorocromos asociados al ADN, emiten una fluorescencia muy intensa, registrada como la señal de la amplificación. Dos representantes de este grupo, son los fluorocromos SYBR Green I y Eva Green, empleados en ensayos directos, los cuales se une al surco menor del dsADN, con espectros de excitación y emisión de aproximadamente 480 nm y 520 nm, respectivamente; estos compuestos son muy utilizados porque son relativamente económicos.

Específicos: son conocidos como sondas y consisten en secuencias específicas de oligonucleótidos, diseñadas con sumo cuidado y debidamente optimizadas, para ligar en sus extremos, dos fluorocromos: al 5' se une el fluorocromo reportero o donador de fluorescencia y al 3', el fluorocromo quencher o aceptor de fluorescencia. El reportero es una molécula que contiene un fluoróforo que se estimula con una determinada longitud de onda lumínica, para emitir luego, una fluorescencia de longitud de onda mayor (reportero); el otro fluorocromo, el quencher, funciona como un aceptor de fluorescencia.

El mecanismo de las sondas en qPCR, consiste en una transferencia de energía entre los dos fluorocromos ligados a sus secuencias, es decir, el donador y el aceptor, lo cual se denomina *transferencia de energía de resonancia de Förster* (FRET por sus siglas en inglés *Förster resonance energy transfer*). Al estar unidos a la misma secuencia de nucleótidos, los fluorocromos interactúan inicialmente, a través de un mecanismo acoplador dipolo-dipolo, característico de FRET, superponiéndose los espectros de emisión y absorción. Cuando el reportero se excita con una fuente de luz y una vez se inicia el proceso de polimerización, donde la sonda se modifica por acción correctora exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa, se aleja del quencher, lo que permite un aumento de la intensidad de emisión del reportero, bloqueándose FRET debido a la incapacidad del quencher a absorber el incremento de fotones. El incremento de emisión es la señal captada por el espectrofluorómetro.

La gran especificidad de qPCR usando sondas, radica en su capacidad de hibridar únicamente en la secuencia target, evitando acoplamiento inespecíficos. Algunas sondas y sus modos de acción, se ilustran en la **Figura 9**.

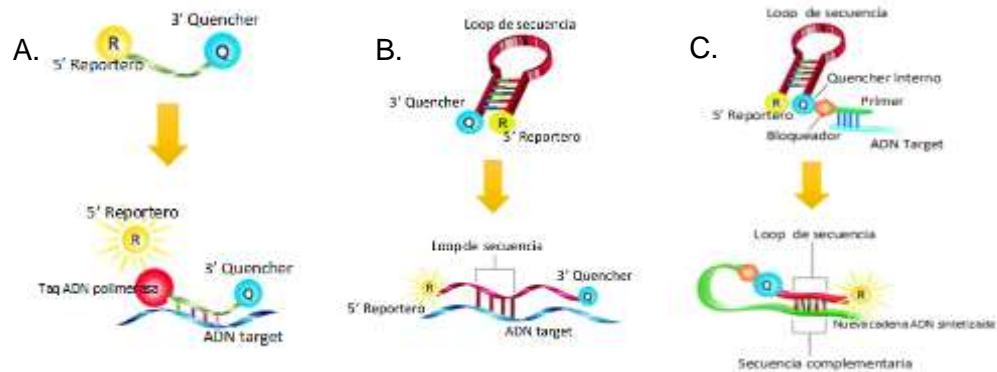


Figura 9. Mecanismo de acción de algunas sondas de qPCR: **A.** corresponde a sondas Taqman, donde el reportero se libera de la sonda por acción de la polimerasa; **B.** Sondas Beacon, durante la hibridación se separan el reportero y el quencher; **C.** Sondas Scorpion, unión de un primer a la sonda, la cual emite fluorescencia tras la hibridación. Tomado de: <https://www.sigmaldrich.com/life-science/custom-oligos.html> (consulta: 16 enero de 2020)

La qPCR es una técnica simple, rápida, específica y de alta sensibilidad, por lo cual se utiliza con frecuencia para detectar organismos patogénicos invasores de alimentos, como las STEC O157; para este caso en particular, los segmentos de ADN de interés, son los relacionados con los factores de virulencia de este serogupo: *stx1*, *stx2*, *eae*, *rfb*, entre otros, que expresan las toxinas Stx₁, Stx₂, la proteína de reconocimiento celular intimina y el lipopolisacárido que hace parte de las estructuras de membrana celular RfbE. qPCR permite también amplificar ADN tanto genómico, como plasmídico y ARN a través de la formación de ADN complementario, con la enzima transcriptasa reversa (Baker et al., 2016; Elízaquivel Bárcenas, 2009). La importancia de esta técnica, radica no sólo por su capacidad de reconocer e identificar el microorganismo de interés entre muchos otros, sino también porque los puede detectar en muy bajas concentraciones, en matrices de alta complejidad como alimentarias, secreciones humanas y en aguas de consumo, donde fácilmente podrían presentarse interferencias por componentes típicos de la misma (microbiota endógena).

1.4 Validación de técnicas moleculares

Cualquier técnica, incluidas las moleculares, deben garantizar procedimientos rigurosos, optimizados y confiables, para asegurar que sus resultados estimen la realidad de las condiciones de la muestra objetivo.

En la actualidad, se han usado ampliamente en la detección de microorganismos con alto grado de patogenicidad, entre ellos, las STEC O157; por su impacto, principalmente a nivel de seguridad alimentaria, obliga a las instituciones a desarrollar estrategias eficientes que contribuyan a identificarlos de la forma más rápida y precisa. Ante este panorama, es de fundamental importancia validar las metodologías destinadas específicamente a la detección de *E. coli* del serogrupo O157 y que a su vez, la técnica sea capaz de diferenciar entre cepas que tengan alguna cercanía filogenética, evitando falsos positivos en los resultados.

La validación es un proceso por el cual se verifica un procedimiento, con aporte de evidencias objetivas de estimaciones que satisfacen requisitos específicos para un uso previsto (NTC-ISO/IEC 17025, 2017); en este sentido, debe incluir criterios de calidad para garantizar la veracidad de los resultados en función de la eficiencia y diagnóstico de la prueba desarrollada.

La solidez de los resultados de una validación, se basa en el seguimiento riguroso de varios parámetros, entre los cuales son imprescindibles considerar la sensibilidad analítica (que incluye rango de trabajo, límites de detección y corte), especificidad diagnóstica, robustez y análisis en una matriz real. Con estos se determina la capacidad de la técnica para replicarse en cualquier lugar y momento, identificando y considerando el o los factores que pueden alterarlos, como condiciones climáticas, equipos, resultados entre diferentes analistas.

Las técnicas moleculares como PCR, identifican si hay presencia o ausencia de un target (microorganismo, gen, ADN etc.), de forma directa o indirecta, por lo cual se consideran análisis cualitativos (Leotta et al., 2005). Es posible llevar los procedimientos de las PCR cualitativas, hasta un nivel semicuantitativo, siempre y cuando se determinen los parámetros de validación mínimos requeridos, de manera muy estricta y con un gran número de ensayos, expresados en términos estadísticos.

En la norma ISO 16140-2 (por sus siglas en inglés *International Organization for Standardization*), “*Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia*”, se especifican los parámetros que se deben tener en cuenta para garantizar la confiabilidad de un protocolo dado (ISO 16140-2, 2016; Leotta et al., 2005):

- ❖ Rango de trabajo, es el intervalo de valores de concentración del target que comprende las dos medidas extremas, menor y mayor, en el cual puede detectarse el target con confiabilidad, reproducibilidad y repetibilidad. Comprende las definiciones de límite de detección y límite de corte, el primero se asocia con la menor cantidad o concentración del analito de interés detectado

y se interpreta en función de su presencia o ausencia, es “la concentración neta mínima detectable” según la ISO; el segundo, corresponde a la cantidad mínima del blanco de interés, con valores cuantificables, al cual se le determinan los parámetros estadísticos relacionados con precisión y exactitud.

- ❖ Eficiencia de la reacción, con este parámetro se verifican las condiciones óptimas del procedimiento, porque permite identificar presencia de inhibidores y errores de pipeteo por ejemplo, que llevan a interpretaciones erróneas. Este factor contribuye con un mayor nivel de confianza, en la determinación de la cantidad del target en una muestra dada (Broeders et al., 2014; Aguilera et al., 2014). Para el caso de PCR, estaría relacionada con la reacción de amplificación.
- ❖ Selectividad y/o especificidad, parámetro que define la capacidad del método de detectar exacta y específicamente, el target. En el caso de un microorganismo en particular, con este factor se puede discriminar y reconocer su presencia entre la microbiota endógena, que pueda tener relación o no con el organismo que se está analizando. Incluye los términos inclusividad (capacidad de detectar un rango de organismos verdaderamente positivos para el target) y, exclusividad (capacidad de no detectar un rango alto de organismos con cercanía filogenética al target).
- ❖ Robustez, describe la tolerancia del método, es decir, el grado de reproducibilidad de las señales medidas, cuando se realizan ensayos sobre una misma muestra y se varían algunos parámetros operacionales de este. Es necesario especificar las variables modificadas para identificar así, los factores que tienen incidencia en las respuestas del método.

Los procedimientos de la validación de los métodos utilizados para identificar y/o detectar patógenos en diferentes ambientes, como en los alimentos y en las aguas de consumo, contribuyen con las políticas de salud pública, porque ya reconocidos y garantizados tanto la veracidad como la confiabilidad de sus resultados, se puede incidir en la planificación, gestión y elaboración de medidas preventivas y de control de afecciones. Un caso importante es la validación de técnicas de PCR para detectar STEC, por el impacto que causan en la salud de la población, porque facilitan la detección segura, oportuna y cuantificable de estos patógenos y otros agentes microbianos asociados a ETAs (Goji et al., 2015; Deisingh & Thompson, 2004).

De esta manera, el estado puede apoyarse en procedimientos validados que respalden los programas de vigilancia alimentaria, con los que garantiza a sus pobladores, alimentos inocuos y de alta calidad nutricional. En esa dirección, la normativa vigente colombiana ha iniciado su lucha para prevenir ETAs relacionadas con el consumo de carnes, mediante los Decretos 2270 de 2012, 1550 de 2007 y la NTC 1325 (por sus siglas, Norma Técnica Colombiana), con los cuales se reglamenta y se definen criterios para la vigilancia y el control de la carne, los productos cárnicos comestibles y sus derivados; sin embargo, debido al impacto de carácter letal de las infecciones causadas por los serogrupos de STEC, en especial de O157, la NTC 4899 precisa puntualmente su identificación y estricto control.

Por su parte los Ministerios de Agricultura y Desarrollo Rural, de Salud y Protección Social, establecieron las directrices específicas para el planteamiento del Programa de Verificación Microbiológica del Sistema Oficial de Inspección, Vigilancia y Control de la Carne y Productos Cárnicos Comestibles, mediante la Resolución 2690 de 2015. En este acto administrativo y “considerando el riesgo para el consumidor, la especie animal, el tipo y propósito de muestreo, el establecimiento, entre otros”, se definen cuatro microorganismos como los agentes de mayor atención: *E. coli* genérico, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *E. coli* no O157 productores de toxina Shiga, los dos últimos están priorizados como de “control de microorganismos patógenos” (Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural & Ministerio de Salud y Protección Social, 2015).

Considerando la técnica molecular qPCR como mecanismo de detección rápido, sensible y preciso de los microorganismos patógenos, tales como las STEC O157 y la necesidad de contar con una herramienta que permita identificar el tipo de contaminación alimentaria, en esta investigación se desarrolló la validación de los protocolos de qPCR para detectar *E. coli* O157 a través de los tres genes de mayor virulencia *stx₁*, *stx₂* y *rfbE*. Se determinaron los parámetros de validación mencionados anteriormente y especificados en la ISO 16140-2.

2. Objetivos

2.1 General

Establecer los lineamientos básicos para la validación intra-laboratorio de la técnica qPCR específica para la detección al serogrupo *E. coli* O157 en una matriz alimentaria.

2.2 Específicos

Implementar la qPCR cómo un método de detección de *E. coli* del serogrupo O157.

Determinar el rango dinámico, límite de detección y selectividad de la técnica qPCR para la detección de *E. coli* del serogrupo O157

Detectar *E. coli* del serogrupo O157 en una matriz alimentaria contaminada artificialmente.

3. Metodología

Este proyecto de investigación se desarrolló en las instalaciones de los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín: Biología Celular y Molecular y de Venenos Naturales, adscritos a la Facultad de Ciencias; Biotecnología Animal, adscrito a la Facultad de Ciencias Agrarias. Así mismo, se contó con el apoyo de espacios y equipos de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Universidad EIA - Sede Zúñiga, y el Laboratorio de Biotecnología y Nanotecnología de Tecnoparque SENA-Nodo Medellín.

3.1 Reactivos y Materiales

3.1.1 Microorganismos

Para el desarrollo de todas las reacciones de PCR y qPCR, se utilizó ADN genómico y plasmídico procedentes de *E. coli* del serotipo O157:H7, ATCC 43895, donada por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Antioquia. Esta cepa es portadora de los tres genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*. Como control positivo de Enterobacteriaceae, se utilizó *E. coli* genérica ATCC 25922, donada por el Laboratorio de Control de Calidad (LACMA) de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

La evaluación del parámetro de validación inclusividad para las diferentes qPCR, se realizó con ADNs procedentes de cepas de *E. coli* O157 y no O157 (véase **Tabla 1**), donados por el Instituto de Genética Veterinaria “Ingeniero Fernando Noel Dulout” (IGEVET) de La Plata, Argentina. Para la exclusividad, se emplearon ADNs bacterianos diferentes a *E. coli*, fueron donados por LACMA de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia (véase **Tabla 2**).

Tabla 1. Descripción génica de ADNs de STEC empleados para validar PCRs

Código	Serotipo	Caracterización génica		
		<i>rfb</i>	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂
LAMA 448	<i>Escherichia coli</i> O157	+	+	+
LAMA 525	<i>Escherichia coli</i> O157	+	-	-
LAMA 540	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	+
LAMA 541	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	+
LAMA 543	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	-
LAMA 545	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	-
LAMA 564	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	+
LAMA 603	<i>Escherichia coli</i> O157:HNM	+	-	-
LAMA 683	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	+	+
LAMA 685	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	+	+
LAMA 840	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	+
LAMA 882	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	+	-	+
LAMA 1384	<i>Escherichia coli</i> O141:H49	-	+	-
LAMA 1438	<i>Escherichia coli</i> O130:CD	-	+	+
LAMA 1444	<i>Escherichia coli</i> O164:H8	-	+	-
LAMA 1446	<i>Escherichia coli</i> O178:H19	-	+	+
LAMA 1456	<i>Escherichia coli</i> O8:H16	-	+	+
LAMA 1462	<i>Escherichia coli</i> O174:H28	-	-	+

Los códigos de las cepas de *E. coli*, referenciados como LAMA fueron asignados por IGEVET

-: indica ausencia del gen +: indica presencia del gen

Tabla 2. Descripción génica de ADNs bacterianos empleados para validar PCRs

Código	Serotipo	Caracterización génica		
		<i>rfb</i>	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂
ATCC 10876	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
ATCC 13311	<i>Salmonella enterica subsp enterica</i> serov Typhimurium	-	-	-
ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
ATCC 27853	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	-	-	-
ATCC 25122	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
JQ712018	<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	-	-
JQ712024	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
JQ712021	<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-

Código ATCC: *American Type Culture Collection*. JQ: código registrado por Colegio Mayor de Antioquia

3.1.2 Medios de cultivo

Tabla 3. Medios de cultivo selectivos y diferenciales para caracterización de *E. coli* O157

Medio de cultivo	Marca
Caldo Trypticase de Soja (caldo TS)	Merck
Caldo Luria Bertani (caldo LB)	Merck
Agar Chromogenic Colinstant	Scharlau
Agua Peptonada Bufferada (APB)	Merck
Agar Violeta Cristal-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa (VRBD)	---
Caldo Bilis Verde Brillante (BRILA)	Merck
Medio Sulfuro Indol para Movilidad (SIM)	---
Agar Trypticase de Soja (Agar TS)	Merck
Caldo cerebro corazón (BHI)*	Merck

*Por sus siglas en inglés *Brain Heart Infusion*

3.1.3 Equipos

Tabla 4. Equipos utilizados para el proceso de validación de las PCR

Equipo	Marca
Rotor Gene Q	QUIAGEN
Termociclador S-1000 Thermal Cycler	BIORAD
Termociclador Multigene Optimax	LABNET International Inc
Fotodocumentador Gel DOC XR Imagen System	BIORAD
Nanodrop 2000 spectrophotometer	Thermo Scientific
Cámara de Electroforesis	BIORAD

3.2 Métodos

Para alcanzar los objetivos específicos planteados en esta investigación, se desarrollaron las siguientes etapas:

- 1) Extracción de ADN de las cepas *E. coli* O157:H7 y *E. coli* comensal, usados como blanco o targets en los ensayos.
- 2) Una vez se obtuvo el ADN, se plantearon los protocolos de qPCR para cada uno de los genes diana: *stx₁*, *stx₂* y *rfbE*, usando diferentes pares de primers o de cebadores. Se definieron las condiciones de operación (amplificación).
- 3) Luego de establecer las condiciones de trabajo para cada gen, se determinaron los parámetros de validación correspondientes a sensibilidad analítica, especificidad diagnóstica y la robustez, para las diferentes qPCRs.
- 4) Finalmente, se desarrolló el análisis de qPCR para detectar STEC O157 en una matriz real, para lo cual se empleó carne bovina molida cruda contaminada artificialmente con esta cepa, siguiendo un modelo factorial; este incluyó tres bloques, cada uno con 11 tratamientos. Además, se confirmó microbiológica y bioquímicamente la cepa *E. coli* O157:H7, usada en la contaminación artificial de la carne.

En el diagrama de la **Figura 10**, se describen las etapas realizadas para cumplir con el primer objetivo, correspondiente a la implementación de la qPCR como un método de detección de bacterias *E. coli* del serogrupo O157.

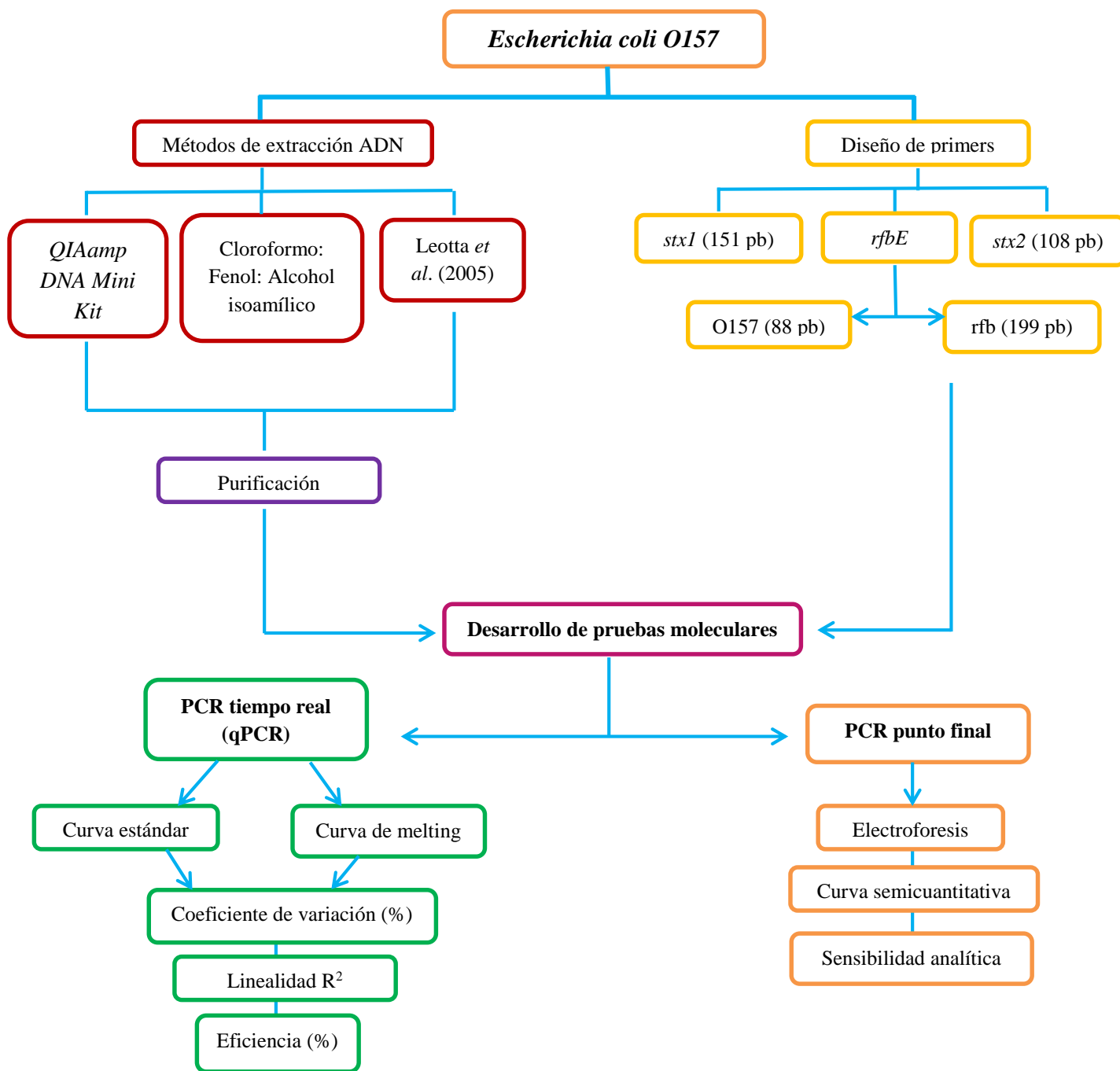


Figura 10. Diagrama de etapas para la implementación de qPCR.

3.2.1 Extracción de ADN bacteriano

Activación y enriquecimiento. Las cepas de *E. coli* estaban conservadas a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ en BHI y glicerol al 25 % (v/v); para activarlas, se llevó una asada del medio conservado al medio de cultivo líquido TS, se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Para el enriquecimiento del cultivo, se sembró un inóculo de las bacterias activas en agar TS y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 18 horas; este procedimiento se realizó por triplicado. Luego, se le hizo la extracción de ADN a cada réplica (solución enriquecida).

Procesos extracción de ADN. Se aplicaron tres protocolos para comparar y decidir cuál procedimiento era el más económico, manteniendo la calidad del ADN bacteriano.

- ❖ Extracción con *QIAamp DNA Mini Kit*: se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante (QUIAGEN, 2016), para la extracción de ADN genómico bacteriano.
- ❖ Procedimiento según Leotta *et al.* (2005), modificado: el cultivo bacteriano del caldo de enriquecimiento se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos; se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en una solución de tritón X-100 al 1 % (v/v) (Amresco, Solon, Ohio) en buffer TE 1X y se llevó a ebullición por 15 minutos. Finalmente, se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos; se tomó el sobrenadante (fracción con el ADN bacteriano), para proseguir con los análisis de PCR (Leotta *et al.*, 2005). Se hicieron dos variantes al método reportado: 1) en el procedimiento original se utilizó 12000 rpm, por 20 minutos, mientras en esta investigación se aplicaron 4000 rpm y, 2) con el fin de mejorar la calidad del ADN obtenido, se realizaron lavados volumen:volumen, con cloroformo grado reactivo, lo cual tampoco estaba incluido en el protocolo.
- ❖ Procedimiento según Amani *et al.* (2015), modificado: luego de la activación, se hizo un enriquecimiento bacteriano en caldo LB a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 horas. El cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y el pellet (conteniendo el ADN), se resuspendió con 300 μL de buffer TE; luego se agregó una solución de lisis preparada previamente de 3,5 μL lisozima, 200 μL SDS (20 % p/v) y 10 μL de proteinasa K, se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 60 minutos. Se purificó con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en perclorato de sodio 5,0 M, se agregó acetato de sodio 3,0 M y dos volúmenes de etanol para luego incubarlos a $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. El pellet, donde estaba el ADN extraído, se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se agregaron 100 μL de buffer TE. Se usó RNAasa A para eliminar residuos de ARN (Amani *et al.*, 2015).

La concentración y pureza de los extractos de ADN de los diferentes protocolos, se determinaron espectrofotométricamente (Nanodrop) a 260 nm (ADN) y las relaciones 260 nm/280 nm (relación ADN/proteína) y 260 nm/230 nm (relación ADN/fenoles).

3.2.2 Diseño de primers

Para garantizar un reconocimiento específico de los genes de *E. coli* O157 target: *stx1*, *stx2* y *rfbE*, se revisó la información, en la base de datos (Gen Bank) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), correspondientes a la región del genoma de *E. coli* O157 que codifica para los genes de interés; simultáneamente, se hizo una revisión bibliográfica de las secuencias de los primers, capaces de alinearse a las regiones de oligonucleótidos target obtenidas, que luego se analizaron a través del programa Primer-BLAST (véase **Tabla 5**). Como control interno o control positivo de amplificación, se usó el gen ARNr universal *16S* de enterobacterias. Es de anotar que para el gen *rfbE*, se contó con dos pares de primers de diferente composición, longitud y tamaño de amplicón; para así probar cuál de las secuencias mostraba mejores resultados en el proceso de validación del serogrupo O157.

Tabla 5. Secuencias de primers para amplificación de *stx1*, *stx2* y *rfbE* de *E. coli* O157 y ARNr universal *16S* de enterobacterias.

Gen	Secuencia Primer	Tm (°C)*	Longitud amplicón	Referencia
<i>stx1</i> F	5'- ATCTATCCCTCTGACATCAACTGC- 3'	59,96	151 pb	(Valat et al., 2012)
<i>stx1</i> R	5'- GACTGCAAAGACGTATGTAGATTCG -3'	60,05		
<i>stx2</i> F	5'- GATAGACATCAAGCCCTCGT -3'	56,81	108 pb	(Jothikumar & Griffiths, 2002)
<i>stx2</i> R	5'- CGACCCCTCTTGAACATA- 3'	53,19		
<i>rfbE</i> F	5'- ATTGAAGATTGCGCTGAAGC -3'	57,44	199 pb	PAE**
<i>rfbE</i> R	5'- ATGCCTATGTACAGCTAATCC -3'	55,74		

Gen	Secuencia Primer	Tm (°C)*	Longitud amplicón	Referencia
	5'-			
O157 F	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA-	58,70	88 pb	(Kagkli et al., 2011)
	3'			
O157 R	5'- CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT-3'	59,19		
16S F	5'- CATTGACGTTACCCGCACAA -3'	59,13	101 pb	(Spano et al., 2005)
16S R	5'- CGCTTTACGCCAGTAATTCC -3'	59,67		

*Tm, temperatura de melting (Fusión) obtenidas por programa NCBI/Primer-BLAST.

**Esta secuencia de primers fue diseñada como parte de un PAE (Práctica Académica Especial) desarrollado por Carolina Maya, estudiante de Ingeniería Biológica, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

3.2.3 Desarrollo de la reacción de PCR

Para verificar la amplificación del ADN con los pares de primers seleccionados, se desarrolló una PCR convencional. El procedimiento fue el siguiente:

Preparación de las reacciones. Se emplearon dos kits, PCR supermix y Dream Taq PCR Master Mix. La preparación de cada reacción fue similar:

- ❖ PCR supermix (Invitrogen, USA): 21,5 µL de mix; 1,0 µL (5,0 mM) de cada par de primer (R y F) correspondiente a cada uno de los genes diana; 1,5 µL de ADN de cada una de las *E. coli*, comensal y STEC.
- ❖ Dream Taq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA): 12,5 µL de mix; 1,0 µL (5,0 mM) de cada primer (R y F) correspondiente a cada uno de los genes diana; 9,0 µL de agua MilliQ; 1,5 µL de ADN de cada una de *E. coli*, comensal y STEC. Este mix se empleó para determinar la robustez del método.

En todos los ensayos se usó control positivo, para verificar la ausencia de inhibidores de la amplificación empleando los pares de primers correspondientes al gen *16S* (R y F), con ADN de *E. coli* O157. Como control negativo de los procedimientos de amplificación de cada uno de los genes

de virulencia evaluados, se utilizó agua MilliQ en lugar de ADN. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por duplicado y con un volumen total de 25 μ L.

Perfil térmico de la amplificación: las condiciones de temperatura de amplificación para las reacciones de acuerdo a cada kit, se presentan en la **Tabla 6**. Los procedimientos de desnaturalización, alineamiento y extensión, se programaron entre 35 y 40 ciclos.

Tabla 6. Perfil térmico de amplificación para cada kit de PCR

	PCR SuperMix	Dream Taq PCR Master Mix
Pre-desnaturalización (activación de la polimerasa)	95 °C/3 min	95 °C/1 min
Desnaturalización	94 °C/45 seg	95°C/30 seg
Alineamiento*	1 min	30 seg
Extensión	72 °C/1 min	72 °C/1 min
Extensión final	72 °C/3 min	72 °C/15 min
Hold	4 °C/ ∞	--

*se determinó para cada gen con base en los T_m de cada par de primers, como se detalla más adelante

Teniendo en cuenta que una buena amplificación de PCR, implica un buen revelado de los amplicones en la electroforesis, con bandas muy definidas, se procedió a determinar las condiciones de reacción de PCR para cada uno de los genes objetivo, analizando temperaturas de alineamiento de los pares de primers para encontrar la óptima. Se consideró la relación de la eficiencia de la reacción con la composición, el tamaño y la concentración de los primers, a través de la intensidad de las bandas obtenidas en las electroforesis.

Se programó una rampa de temperatura a través del software incorporado en el termociclador BioRad S1000 – Thermal Cycler, considerando como base los valores de T_m \pm 5 °C y el T_m menor de cada par de primers. Se evaluó cada temperatura de la rampa diseñada automáticamente, mediante reacciones de PCR, manteniendo la misma concentración de ADN (70 ng/ μ L). La elección de T_m óptima se hizo con base en la banda observada en el gel de electroforesis. Las rampas de T_m probadas por gen, fueron:

Gen	Temperatura de alineamiento evaluadas
<i>stx1</i>	55 °C; 56,1 °C; 57,5 °C; 59,4 °C; 61,9 °C; 63,9 °C; 65,2 °C y 66 °C
<i>stx2</i>	48 °C; 49,1 °C; 50,7 °C; 52,7 °C; 55,5 °C; 57,7 °C; 59,1 °C y 60 °C
<i>rfbE</i>	rfbE 50 °C; 51 °C; 52 °C; 54 °C; 56 °C; 58 °C; 60 °C; y 61 °C
	O157 52 °C; 53,3 °C; 55,2 °C; 57,5 °C; 60,8 °C; 63,3 °C; 65 °C y 66 °C
<i>16S</i>	53 °C; 54 °C; 55,5 °C; 57,4 °C; 59,9 °C; 61,9 °C; 63,2 °C y 64 °C

Nota: Para el gen *rfbE* fueron diseñados dos pares de primers diferentes, capaces de alinearse con la región de interés que expresa el lipopolisacárido O157 propio de *E. coli* O157; por esto se hizo necesario evaluar dos temperaturas de alineamiento diferentes para cada una de las secuencias.

Revelado de los amplicones. Se hizo por electroforesis, preparando geles de agarosa al 1,5 % en 50 mL de buffer TBE 1X (Amresco, Solon, Ohio). Para evidenciar el revelado, se adicionaron al gel antes de su solidificación, 5 µL del fluorocromo SYBR safe (Invitrogen, USA).

Cada amplicón se inoculó por duplicado en el gel, mezclando 9 µL del mismo con 3 µL de buffer de carga 6X (Thermo Scientific™, EU, Lithuania). El marcador de peso molecular fue de 100 pb (Thermo Scientific™, EU, Lithuania). Las condiciones de la corrida electroforética fueron: 80 V, 400 A, durante 25 minutos. La observación de los geles se hizo en el fotodocumentador bajo luz UV.

3.2.4 Desarrollo de las reacciones de qPCR

Para definir las condiciones de trabajo de cada una de las qPCR que luego se sometieron a los procedimientos de validación, se utilizaron las temperaturas de alineamientos óptimas determinadas en el numeral 3.2.3. El procedimiento general fue el siguiente:

Preparación de las reacciones. La amplificación se desarrolló en un volumen total de 25 µL por reacción. Al igual que con PCR convencional, se emplearon dos kits. El procedimiento fue el siguiente:

- ❖ QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QuantiTect, GERMANY): 12,5 µL de mix; 1,0 µL (5,0 mM) de cada primer (R y F) correspondiente a cada uno de los genes diana; 9,5 µL de agua MilliQ; 1,0 µL de ADN de cada una de las *E. coli*, comensal y STEC
- ❖ Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG (Invitrogen, USA): 12,5 µL de mix; 1,0 µL (5,0 mM) de cada primer (R y F) correspondiente a cada uno de los genes diana, 9,0 µL de

agua MilliQ, 0,5 µL de ROX y 1,0 µL de ADN de cada una de las *E. coli*, comensal y STEC. Este mix se empleó para determinar la robustez del método

Al igual que se describió para PCR convencional, se contó con controles positivo y negativo, descritos en el numeral 3.2.3. Todas las reacciones empleadas para la construcción de la curva estándar de ADN y los controles, se realizaron por triplicado.

Perfil térmico de la amplificación. Las condiciones térmicas de amplificación para las reacciones según cada uno de los kits utilizados, se presentan en la **Tabla 7**. Los procedimientos de desnaturalización, alineamiento y extensión se programaron entre 35 y 40 ciclos.

Tabla 7. Perfil térmico de amplificación para cada kit de qPCR

	QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix – UDG
Incubación enzima UDG (Uracil-ADN-N-Glicosilasa)	---	50 °C/2 min
Pre-desnaturalización	95 °C/15 min	95 °C/2 min
Desnaturalización	95 °C/15 s	95 °C/2 min
Alineamiento	Ta del gen/30 s	Ta* del gen/30 s
Extensión	72 °C/30 s	95 °C/15 s
Curva de Melting	Rampa de Ta hasta 99°C	Ta del gen/2 min 95 °C/15 s

*Ta corresponde a la temperatura de alineamiento óptima determinada para cada uno de los genes

3.2.5 Determinación de los parámetros de validación

En el diagrama de la **Figura 11**, se describen las etapas realizadas para cumplir con el segundo objetivo, mediante el cual se determinaron los parámetros de validación de la técnica qPCR para la detección del serogrupo *E. coli* O157

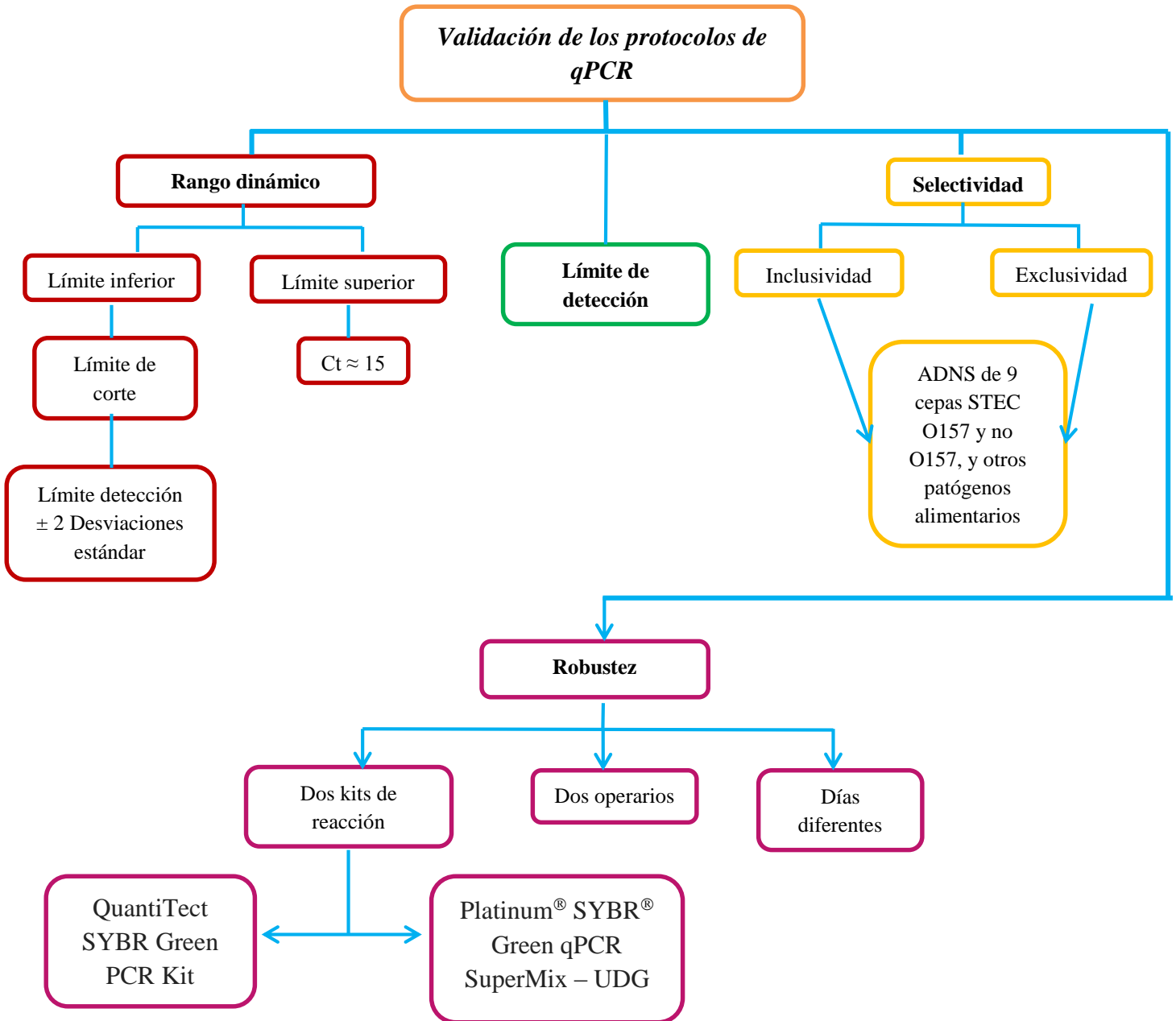


Figura 11. Diagrama de etapas para determinar los parámetros de validación de qPCR.

3.2.5.1 Rango dinámico. Para establecer los parámetros relacionados con la sensibilidad analítica, un adecuado nivel de precisión y exactitud del método qPCR aplicados a cada gen evaluado, se determinó el rango de concentraciones mínima y máxima de ADN, con una estimación de los resultados confiables. El procedimiento consistió en:

- 1) Preparación de una solución stock de ADN de 48 ng/μL.
- 2) Elaboración de tres series de diluciones del ADN blanco, con factores de dilución 1:2, 1:3 y 1:6
- 3) Construcción de las respectivas curvas de diluciones estándar correspondientes a cada gen blanco (*stx₁*, *stx₂* y *rfbE*).
- 4) Con los datos de las curvas de dilución, se establecieron los límites de detección y de corte de la técnica qPCR, a través del análisis del coeficiente de variación de las señales detectadas para los respectivos amplicones de cada gen. Con base en la relación lineal entre los valores de Ct (por sus siglas en inglés *Cycle threshold*) obtenidos y la concentración de ADN [ng μL⁻¹] de cada una de las diluciones, se definieron los parámetros de R² y porcentaje de eficiencia % E (véase **Ecuación 1**).

$$\text{Eficiencia (\%)} = \left(10^{-1/\text{pendiente}} \right) - 1 \quad (1)$$

- 5) Cada punto (dilución) se realizó por triplicado y se utilizó el software *Statgraphics* para el respectivo análisis de los datos y la construcción de las gráficas propias del modelo.

3.2.5.2 Selectividad. La especificidad o capacidad de diferenciación del analito target por parte de la qPCR desarrollada, se evaluó a través de los parámetros de inclusividad y exclusividad con respecto a los genes de virulencia *stx₁*, *stx₂* y *rfbE*. Los análisis de inclusividad y exclusividad se realizaron con los ADNs de las bacterias descritas en las **Tabla 1** y **Tabla 2**, respectivamente. Cada ensayo se hizo por duplicado y con la concentración de los ADNs blanco ajustados a valores entre 30 y 50 ng μL⁻¹.

En la **Tabla 8** se detallan los ADNs empleados para determinar la inclusividad de qPCR para cada gen target.

Tabla 8. ADNs empleados para determinar el parámetro inclusividad para cada gen

Gen	Inclusividad
<i>stx₁</i>	LAMA: 448, 683, 685, 1384, 1438, 1444, 1446, 1456 y <i>E. coli</i> O157:H7 patrón
<i>stx₂</i>	LAMA: 448, 540, 541, 564, 683, 840, 882, 1456 y 1462
<i>rfbE</i>	LAMA: 448, 525, 540, 541, 543, 545, 564, 603 y 882

La exclusividad en todos qPCR para los genes de virulencia *stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*, se evaluaron con ADN de los microorganismos descritos en la **Tabla 2**.

El análisis estadístico de la inclusividad y exclusividad, se hizo con base en una tabla de contingencia (véase **Tabla 9**), la cual fue adaptada de Leotta et al., (2005):

Tabla 9. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de inclusividad y exclusividad

Valor de Ct	<i>stx1/stx2/rfbE</i>		Σ
	Positivo	Negativo	
Positivo	A Verdadero positivo	B Falso negativo	A + B
Negativo	C Falso positivo	D Verdadero negativo	C + D
Σ	A + C	B + D	

Fuente: Leotta et al., 2005

En los ensayos de qPCR, aquellas muestras de ADN donde se detectó una señal de amplificación (Ct) asociada a alguno de los genes target evaluados (*stx*₁, *stx*₂ y/o *rfbE*), se consideró positiva. Cuando dicha señal positiva se obtuvo para muestras con ADN de un microorganismo que podía expresar uno o más genes de virulencia analizados, se asignó como *verdadero positivo*; aquellas muestras que no contenían el analito target y que mostraron una señal positiva, se consideraron *falsos positivos*. El *verdadero negativo* se asignó a la señal negativa de las muestras de ADN de microorganismos que no expresaban el gen objetivo y no registró un valor de Ct como respuesta. Las muestras con ADN de microorganismos que debían expresar los genes blanco y en los cuales no ocurrió amplificación, es decir, no dieron una señal positiva como se esperaba, se catalogaron como *falsos negativos*.

Mediante las **Ecuaciones 2, 3, 4, 5 y 6**, se calcularon la inclusividad, exclusividad y la precisión analítica de los ensayos de qPCR, considerando la tabla de contingencia (**Tabla 9**):

$$\text{Inclusividad (\%)} = \frac{\mathbf{A}}{\mathbf{A + B}} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Exclusividad (\%)} = \frac{\mathbf{D}}{\mathbf{C + D}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Precisión analítica (\%)} = \frac{\mathbf{A + D}}{\mathbf{A + B + C + D}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Valor predictivo positivo (\%)} = \frac{\mathbf{A}}{\mathbf{A + C}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Valor predictivo negativo (\%)} = \frac{\mathbf{D}}{\mathbf{B + D}} \times 100 \quad (6)$$

3.2.5.3 Robustez. Se probó la concordancia de qPCR desarrollada para cada uno de los genes de virulencia, amplificando ADN de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (positiva para *stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*). Se evaluaron tres concentraciones de ADN de acuerdo al rango de trabajo encontrado para cada uno de los genes: 24,1 ng μL⁻¹, 2,68 ng μL⁻¹ y 0,29 ng μL⁻¹. Las reacciones de amplificación se desarrollaron en días diferentes, por dos operarios distintos y se incluyeron también dos kits de PCR.

Cada una de las diluciones se evaluó por duplicado; siempre se incluyeron en cada reacción de amplificación los controles positivo y negativo. La señal de respuesta fueron los valores de Ct.

3.2.6 Evaluación de qPCR en una matriz real

En el diagrama de la **Figura 12**, se describen las etapas realizadas para cumplir con el tercer objetivo, en el cual se comprobó la capacidad de la qPCR para detectar *E. coli* del serogrupo O157 en una matriz alimentaria contaminada artificialmente.

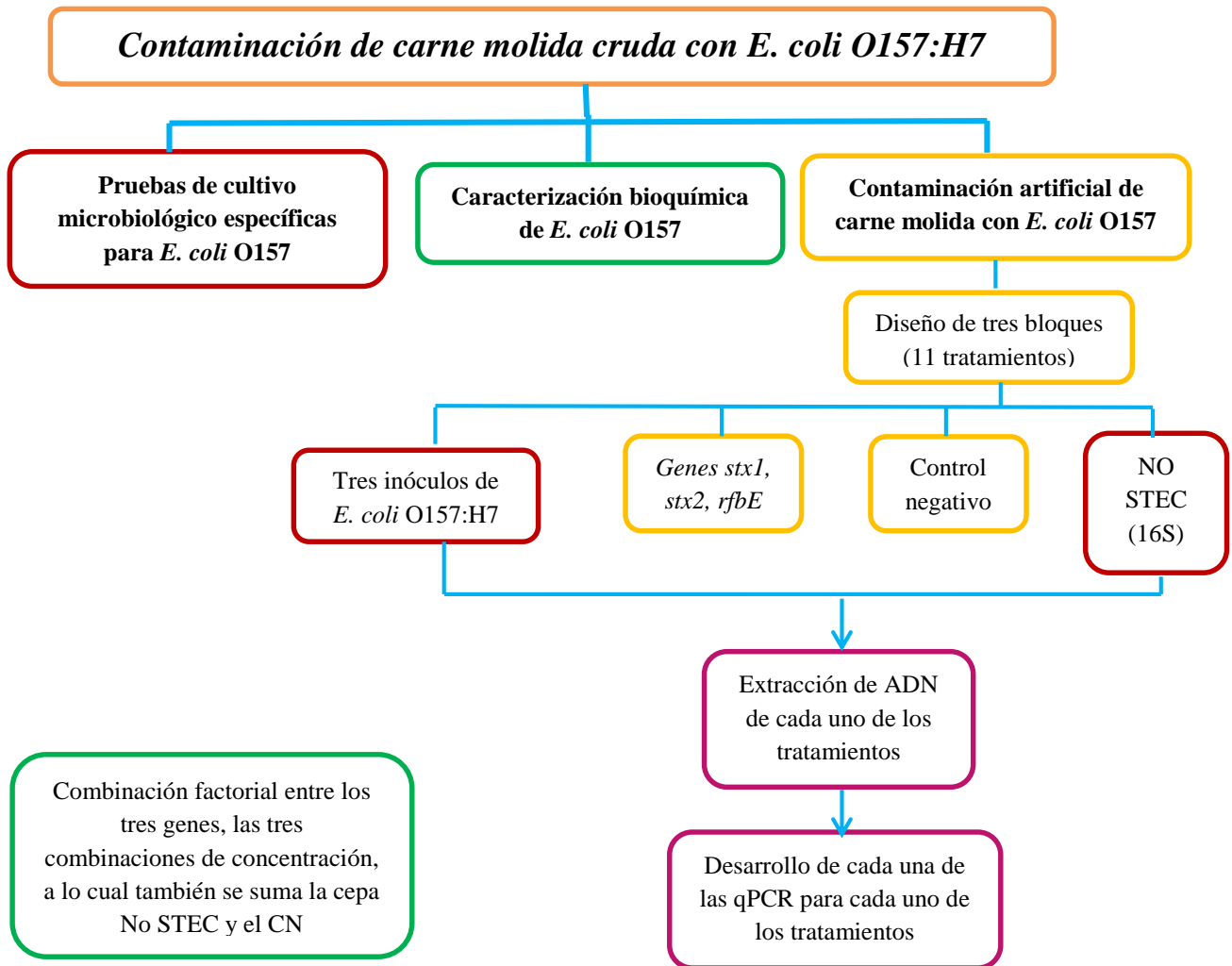


Figura 12. Diagrama de etapas desarrolladas para verificar la detección de *E. coli* O157 en una matriz real.

Como en todo proceso de validación, una vez definidos los valores de detección confiables de *E. coli* O157 para cada uno de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbE* en las qPCR, a través de sus protocolos específicos, fue necesario evaluar si estas características de desempeño de las técnicas encontradas, se podrían aplicar en matrices alimentarias reales. La manera de confirmar que efectivamente se cumplían los requisitos de aplicación prevista inicialmente, fue probar la capacidad del método para detectar el serogrupo *E. coli* O157 en una matriz compleja como la carne.

La matriz sobre la que se aplicó el procedimiento, fue carne bovina molida correspondiente a un corte de la región de la pierna del bovino (solomo extranjero). Las muestras se contaminaron

artificialmente con la bacteria prototipo de las STEC, referencia *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), capaz de expresar los genes de virulencia *stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*. Así mismo, se inocularon otras muestras con una cepa de *E. coli* comensal, en representación del grupo de las no-STECC.

Para la aplicación de la qPCR en la matriz real, se hizo la contaminación artificial de la carne bovina molida, siguiendo un diseño experimental de bloques (tres), el cual constó de una combinación factorial (3x3+2): tres genes de virulencia (*stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*), tres concentraciones de inóculo bacteriano (10⁰, 10¹ y 10²) y dos controles, uno con una cepa no-STECC y otro con agua peptonada bufferada (APB). En total, fueron 11 tratamientos para cada uno de los bloques, bajo un esquema de aleatorización completa al azar, donde el factor de bloqueo fueron 275 g de carne; la unidad experimental fue 25 g de carne bovina molida y la variable respuesta, el valor de Ct (véase **Figura 13**)

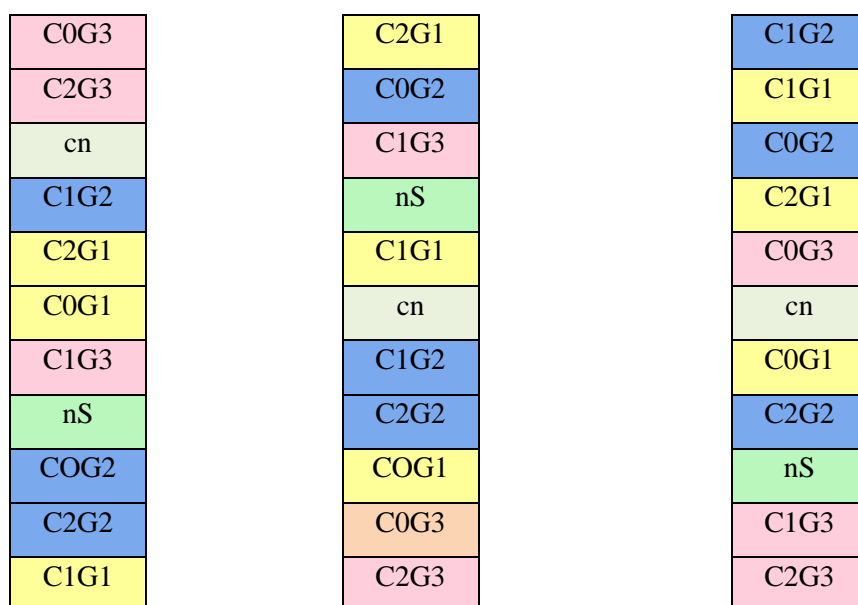


Figura 13. Esquema de bloques propuesto como diseño experimental: concentración de inóculo 10⁰ (C0), 10¹ (C1), 10² (C2); genes *stx*₁ (G1), *stx*₂ (G2), *rfbO*₁₅₇ (G3); No STECC (nS) y control negativo (cn).

La preparación de los inóculos usados en la contaminación de la carne, inició con el enriquecimiento de los cultivos de *E. coli* O157:H7, con el fin de aumentar su concentración bacteriana. Para este enriquecimiento, se inocularon en el medio de cultivo agar TS, las cepas de *E. coli* comensal y *E. coli* O157:H7, luego se incubaron a 37 °C, por 24 horas; todo el procedimiento se realizó por duplicado. Del cultivo enriquecido de *E. coli* O157:H7 se tomaron UFC para los tres inóculos

considerados en el análisis: 10^0 (rango: 1-4 UFC), 10^1 (rango: 9-15 UFC) y 10^2 (87-145 UFC) UFC mL⁻¹ de APB y para la cepa de *E. coli* comensal se tomó 10^8 UFC mL⁻¹ de APB (Brusa et al., 2015). Los dos controles negativos fueron una muestra sin ningún inóculo bacteriano (tal y como se obtuvo de la carnicería) y otra en la que se aplicó 225 mL de APB sin inóculo.

La porción de muestra de cada uno de los tratamientos de los bloques fue de 25 g de carne molida, a estos se les agregó 222,5 mL de APB y 2,5 mL de los inóculos y controles descritos anteriormente. Las muestras se homogeneizaron en un circulador Stomacher y luego se incubaron a 37 °C, durante 24 horas.

Finalmente, se tomaron alícuotas de 1 mL de cada uno de los tratamientos y se implementó el procedimiento de extracción de ADN propuesto por Leotta *et al.* (2005), descrito en la **Sección 3.2.3**; con estas muestras de ADN se desarrolló el procedimiento de qPCR detallado en la sección 3.2.6, para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbE*. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico R, considerando significativos los valores de $p < 0,05$ y $0,01$.

Para confirmar la detección correcta de *E. coli* del serogrupo O157, se hizo la comparación con pruebas microbiológicas (*gold standar*) y pruebas bioquímicas.

3.2.7 Pruebas Microbiológicas

Se hicieron cultivos en medios de cultivo selectivos y diferenciales específicos de STEC O157, proporcionando las condiciones adecuadas para su crecimiento, e inhibiendo a su vez, otras bacterias de carácter entérico que tienen similitudes con este serogrupo. Al mismo tiempo, se analizó el crecimiento de *E. coli* comensal. Los medios microbiológicos utilizados fueron: Agar Chromogenic Colinstant, Caldo BRILA, Medio SIM, y Agar VRBD.

3.2.8 Pruebas bioquímicas

La identificación microbiana *E. coli* O157:H7 con las pruebas de oro, se respaldaron con las bioquímicas, empleando las tarjetas GN TEST KIT VTK2 (BioMérieux Inc, Bogotá, D.C) y el VITEK ® 2, para confirmar las características metabólicas de la bacteria.

El procedimiento consistió en dos etapas: en la primera se inoculó el microorganismo aislado en agar VRBD y luego se incubó a 37 °C por 24 horas; en la segunda etapa estos cultivos se pasaron al agar

TS y nuevamente se incubaron a 37 °C, durante 24 horas. De cada muestra se tomó un inóculo que se aplicó en el cassette VITEK ® 2, donde la tarjeta GN y la muestra se relacionan de forma virtual. Es de notar que la lectura se inicia automáticamente. En la **Tabla 10** se resumen algunas de las características bioquímicas exploradas por el sistema VITEK correspondientes a las *E. coli* analizadas.

Tabla 10. Características bioquímicas de *E. coli* analizadas por VITEK

Prueba bioquímica	Bacteria	
	<i>E. coli</i> no O157	<i>E. coli</i> O157:H7
Fermentación glucosa	+	+
Fermentación lactosa	+	+
Fermentación sacarosa	+	+
Producción de sulfuro de hidrógeno ^a	-	-
Producción de gas	+	+
Utilización del citrato ^a	-	-
Fermentación sorbitol	+	-
Actividad β -glucuronidasa	+	-

^aPrueba negativa confirma *E. coli*, a diferencia de los demás organismos entéricos Gram negativos.

4. Resultados y discusión

El análisis de la calidad de las matrices alimentarias especialmente en la industria cárnica, presenta grandes retos a los procedimientos y a los métodos desarrollados para este fin. Particularmente STEC O157, es una cepa difícil de identificar y de cuantificar debido a varios factores: la relación de concentración entre los microorganismos endógenos y el patógeno que generalmente está en menor proporción (Sun et al., 2015; Rivas et al., 2008) y la pérdida de características fenotípicas que la diferencien de otras *E. coli* no patogénicas propias de la carne (Singh & Mustapha, 2015).

4.1 Extracción de ADN

Las técnicas moleculares son en la actualidad, una de las herramientas más importantes en la detección rápida y confiable de los microorganismos tanto patógenos, como los que no lo son. Sin embargo, en el desarrollo de un protocolo de amplificación óptimo, deben considerarse varios factores que le dan validez a los resultados (extracción de ADN, sensibilidad y especificidad). Con las metodologías de diagnóstico molecular como la qPCR, uno de los puntos más críticos en la eficiencia y viabilidad de la reacción está dado por la calidad y pureza del ADN que se emplea en el análisis de los genes target. En este trabajo se consideraron tres métodos de extracción de ADN referenciados en el ítem 3.2.3, cuyos valores de absorbancia se describen en la **Tabla 11**.

4.1.1 Calidad y pureza de ADN bacteriano

Comparando los resultados de las concentraciones del ADN de las muestras de *E. coli* O157, extraídos mediante los protocolos de Leotta *et al.* (796,6 ng μL^{-1}), Amani *et al.* (934,9 ng μL^{-1}) y con el kit de extracción comercial (138,6 ng μL^{-1}), se observó además de la cantidad, que la relación ADN/proteína, leída a 260 nm/280 nm para los procedimientos de Leotta *et al.* y el kit comercial, fueron 2,00 y 2,06, respectivamente, lo que evidenció una buena extracción del material genético, con muy poca interferencia

de las proteínas (el rango del cociente recomendado está entre 1,8 y 2,2). Con el protocolo de Amani *et al.*, aunque se obtuvo mayor concentración de ADN, la relación de pureza (ADN/proteína) fue un poco menor, con un valor de 1,70 (véase **Tabla 11**).

Tabla 11. Relación de absorbancias para ADN de *E. coli* O157:H7 extraído por diferentes métodos

	Protocolo Leotta et al (2005).	Protocolo Amani et al (2015).	Protocolo <i>QIAamp</i> <i>DNA Mini Kit</i>
ADN [ng/μL]	796,6	934,9	138,6
A ₂₆₀ (nm)	15,96	18,70	2,77
A ₂₈₀ (nm)	7,98	10,80	1,35
A _{260/280} (nm)	2,00	1,70	2,06
A _{260/230} (nm)	1,35	0,82	1,86

Las investigaciones relacionadas con la extracción de material genético, siempre buscan métodos económicos, pero confiables en relación a su pureza. En este aspecto, puede hacerse referencia a la investigación desarrollada por Lopera *et al.* (2008), que compararon dos métodos de extracción a partir de sal común y una combinación fenol:cloroformo, obteniendo valores de absorbancia (A) a 260 nm/280 nm para diferentes muestras de tejidos de peces entre 1,83 y 2,19 con sal común; 1,85 y 2,14 para fenol:cloroformo (Lopera *et al.*, 2008). Al igual que Lopera *et al.*, los protocolos de extracción desarrollados en esta investigación demostraron alta calidad y pureza del ADN de STEC O157, con valores de absorbancia que evidenciaron poca presencia de proteínas; además al obtenerse datos comparables entre los tres métodos empleados, se demostró que el proceso de extracción de ADN bacteriano no influyó sobre su pureza.

Por lo tanto y considerando los costos de los reactivos e insumos, el protocolo de Leotta *et al.*, modificado con lavados de cloroformo, brindó una extracción de ADN de buena calidad, pero mucho más económico. Además, este protocolo proporcionó una alternativa muy sencilla de desarrollar, el cual no incluyó el fenol, un solvente muy utilizado, que además de ser un contaminante, puede causar cierta degradación del ADN.

Para determinar la viabilidad de los ADNs obtenidos mediante los tres protocolos aplicados, se realizaron pruebas de qPCR específicas para el gen *stx₁*, empleando concentraciones ~ 50 ng μL⁻¹ de ADN. Los resultados se resumen en la **Tabla 12**. La menor variación de Cts se presentó con el ADN extraído siguiendo el protocolo de Leotta *et al.*, -sometido a lavados con cloroformo-; no obstante, el coeficiente de variación CV (relación entre la desviación estándar y la media) en todos los ADN fue muy bajo (< 25 %).

Tabla 12. Cts para gen *stxI* a partir de ADNs extraídos por diferentes protocolos

Protocolo extracción ADN	Ct	Coefficiente de Variación
Leotta <i>et al</i>	15,81 ± 0,08	0,55 %
Amani <i>et al.</i>	16,06 ± 0,48	3,01 %
Kit de extracción	15,25 ± 0,18	1,21 %

Kagkli *et al.* (2011), desarrollaron un estudio de validación intra-laboratorio de algunos protocolos de qPCR para la detección y la determinación de varios serogrupos STEC incluido el O157 (referido como VTEC) y concluyeron que uno de los criterios más importantes para la optimización de la metodología de qPCR, es la pureza del ADN extraído. Sus relaciones de absorbancia 260 nm/280 nm para los ADNs evaluados, estuvieron entre 1,8 y 2,2. Esos resultados fueron muy similares a los obtenidos en este trabajo, indicando que los métodos de extracción no interfirieron con la reacción de amplificación. Obviamente, es imprescindible tener en cuenta los criterios de separación adecuados de los componentes en la mezcla del material genético de partida. Otra anotación a considerar, es que el protocolo de extracción se puede evaluar y validar de forma independiente a la validación de la qPCR (Kagkli *et al.*, 2011).

4.1.2 Integridad del ADN bacteriano

Luego de analizar los resultados de los tres protocolos de extracción de ADN, con un nivel muy similar de pureza, se eligió el protocolo de Leotta *et al.* (2005), para proseguir con la extracción del ADN de STEC O157 y realizar los procedimientos de validación para cada qPCR correspondiente a los genes de interés. Este método, además de proporcionar un volumen de ADN considerable, de concentración relativamente alta, fue una opción simple, reproducible, rápida y económica.

El análisis de la integridad de dicho ADN de STEC, se hizo a través del revelado por electroforesis de los amplicones resultantes de las PCRs. En la **Figura 14**, se ilustra una electroforesis donde puede observarse una única banda y con alta intensidad (comprendida entre 100 pb y 200 pb), para el amplicón del gen *stxI* obtenido por PCR convencional, coincidiendo con el tamaño esperado de 151 pb.

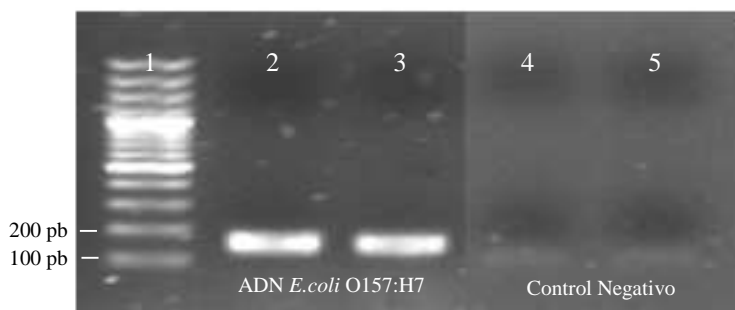


Figura 14. Electroforesis de amplicones de PCR convencional, del gen *stx1* de *E. coli* O157:H7 ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$): carril 1, con el marcador de peso de 100 pb (*ladder*); carriles 2 y 3, con los amplicones correspondientes al gen *stx1*; carriles 4 y 5 con los controles negativos del ensayo (con agua MilliQ en lugar del ADN target o blanco).

Al igual que en esta investigación, otros investigadores han recurrido a la electroforesis para corroborar la integridad del ADN, por ejemplo, Solano *et al.* (2009) con ADN genómico de *Passiflora ligularis* y Lopera *et al.* (2008) con ADN procedente de tejidos de peces, emplearon electroforesis para determinar si la lisis celular, el método de colecta y preservación de sus muestras, afectaban la integridad de los ADN en estudio (Solano *et al.*, 2009; Lopera *et al.*, 2008). Cabe resaltar que los investigadores mencionados, también confirmaron el mínimo efecto del método de extracción sobre la integridad del ADN extraído, dado que se encuentran bandas completas, con buena intensidad y homogéneas.

4.2 Determinación de las temperaturas de alineamiento de los genes

El perfil térmico en el desarrollo de cualquier PCR, define una amplificación adecuada del gen, siendo crítica la determinación de la temperatura óptima de alineación de cada par de primers. Para el desarrollo de las PCRs, en esta investigación se emplearon las rampas de temperatura programadas a través del software incorporado en el termociclador BioRad S1000 – Thermal Cycler (**Sección 3.2.3**). Los amplicones obtenidos en cada reacción se revelaron por electroforesis (véase **Figura 15**).

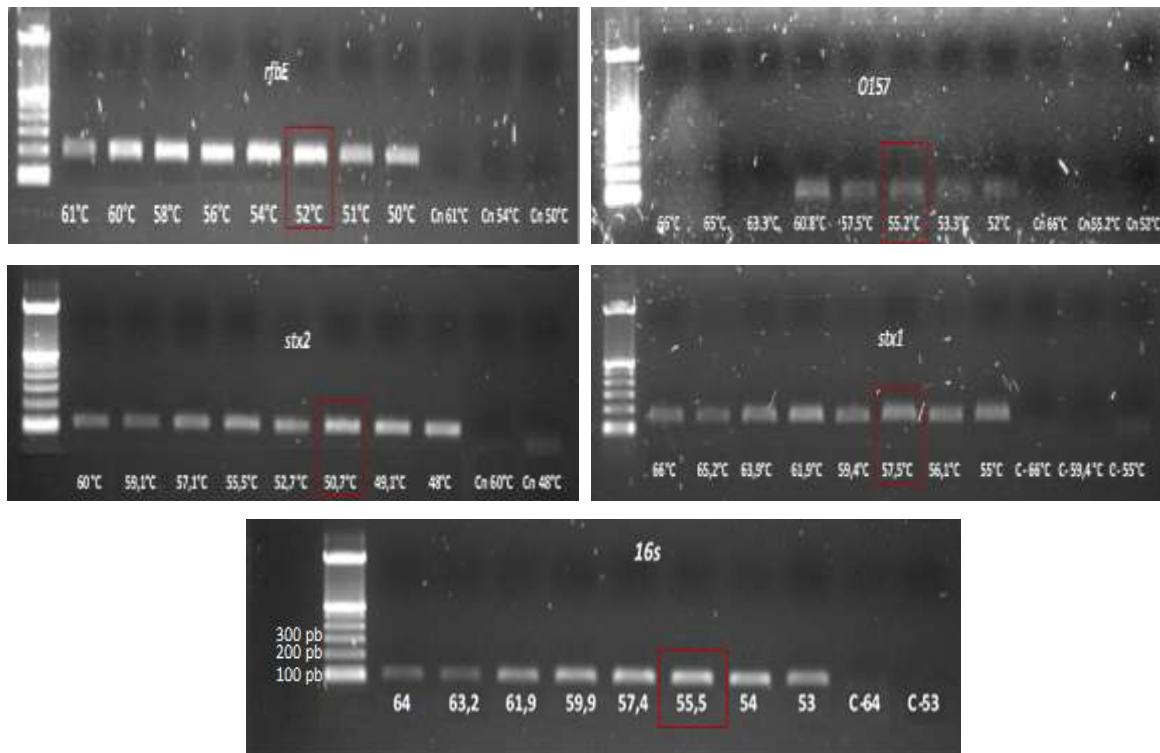


Figura 15. Electroforesis en geles de agarosa 1,5 % (w/v), de los amplicones obtenidos de las PCR correspondientes a los perfiles de temperatura de alineamiento, desarrolladas para los pares de primers *stx1*, *stx2*, *rfbE*, O157 y 16S. Los controles negativos con agua milliQ en lugar del ADN target.

De acuerdo a la definición e intensidad de las bandas de los amplicones revelados por electroforesis, se eligieron las siguientes temperaturas de alineamiento: 58 °C para *stx1*; 50 °C para *stx2*; 52 °C para *rfbE* y 55 °C para O157. Con respecto al gen *16S* (control positivo de todas las amplificaciones), se observó una buena señal (electroforesis), en cualquier rango de temperatura de alineamiento evaluado.

Es de anotar que los controles negativos no amplificaron en las PCRs, indicando la especificidad de las reacciones con respecto a cada gen evaluado: para *stx1* (rango 55 °C - 61,9 °C), se evaluaron controles negativos (C-) a tres temperaturas de amplificación, 55 °C; 59,4 °C y 66 °C; para *stx2* (rango 48 °C - 50,7 °C) se incluyeron controles negativos en dos temperaturas de amplificación, 48 °C y 60 °C; en cuanto a *rfbE* (rango 52 °C - 58 °C), se analizaron tres temperaturas de amplificación para el control negativo, 50 °C, 54 °C y 61 °C; para O157 (rango 55,2 °C - 60,8 °C) el control negativo se monitoreó en tres temperaturas de amplificación, 52 °C, 55,2 °C y 66 °C.

4.3 Validación de los protocolos de qPCR

Las reacciones de qPCR para los cuatro genes evaluados (*stx1*, *stx2*, *rfbE* y *O157*) se desarrollaron con las diluciones 1:6 de ADN purificado, dado que después de analizar los datos obtenidos de las qPCR las diluciones 1:2 y 1:3 no permitieron una buena diferenciación de los puntos donde se esperaba mayor variabilidad, no eran consistentes en las repeticiones de los ensayos.

4.3.1 Rango dinámico

También referido como rango de trabajo, mediante el cual se determinaron los límites superior e inferior de las lecturas de concentraciones del ADN, con respecto a los genes de virulencia de interés de esta investigación. Este parámetro resulta de gran importancia, porque evidencia la correlación lineal entre la señal detectada y el número de targets de la muestra, cuando se evalúan diferentes concentraciones de ADN (Kagkli et al., 2011).

Por esto, los rangos establecidos, indicaron los valores de ADN que al ser evaluados, representan lecturas confiables bajo las mismas condiciones, esto hizo referencia a la sensibilidad de la qPCR donde se tuvieron en cuenta factores como: el tamaño de los primers, los kits de reacción, la calidad del ADN y el estado de los equipos.

Límite superior. La dilución de ADN de concentración $48,2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ se fijó como el límite superior para todos los rangos de trabajo, debido a su valor de absorbancia cercano a la unidad, con lo cual se aseguró un valor de referencia contemplado dentro de las curvas de A vs concentración, construidas bajo la ecuación de Lambert – Beer. La señal de amplificación en función del valor de Ct para esta concentración, estuvo entre 15 y 20 ciclos, según cada secuencia de primers.

Límites inferiores. Para determinar el límite inferior en las reacciones de qPCR para cada gen evaluado, y con el fin de eliminar las interferencias de ruido propias del equipo de qPCR y/o por efectos de la reacción misma, que podrían alterar la interpretación de los resultados, se establecieron primero los límites de detección. A partir de estos valores, se calcularon los límites de corte (o de cuantificación) para cada par de primers, el cual garantizó la repetibilidad y confiabilidad de cada una de las mediciones.

En la **Tabla 13**, se presentan los respectivos valores de límites de detección y de corte, para cada par de oligonucleótidos evaluados, correspondientes a los genes target *stx1*, *stx2* y *rfbE*.

Tabla 13. Concentraciones de ADN establecidas como límites de detección y de corte.

Oligonucleótidos	Límite detección [ng μL^{-1}]	CV (%)	Límite de corte [ng μL^{-1}]	CV (%)
rfbE	$1,7284 \times 10^{-3}$	0,12	$3,1667 \times 10^{-2}$	0,29
O157	$1,7284 \times 10^{-3}$	4,87	$3,1667 \times 10^{-2}$	1,68
stx ₁	$1,3032 \times 10^{-4}$	2,96	$1,7228 \times 10^{-3}$	0,64
stx ₂	$1,3032 \times 10^{-4}$	2,92	$3,5185 \times 10^{-3}$	0,29

Los valores de cada límite de detección reportados en la **Tabla 13**, hacen referencia a la menor cantidad de analito (ADN) de cada ensayo, que presentó poca variabilidad en las mediciones. Estos pequeños cambios se reflejaron en bajos porcentajes de CV, menores al 25%. Los valores de detección no se tomaron como los límites de corte a pesar de ser una medida de la capacidad del método para detectar una mínima concentración del analito (ADN), porque la probabilidad de que dicha detección sea fiable y repetitiva es menor del 95 %. Como lo enfatizan Forootan *et al.* (2017), y Kralik *et al.* (2017), en sus publicaciones referentes a la validación de qPCR, una señal detectada fuera de este límite, no implica la ausencia del target (*E. coli* O157, en este trabajo); de hecho, es válido asociar estas señales con la presencia del analito en la muestra, pero no puede incluirse dentro de una curva de cuantificación, por la variabilidad de sus resultados (Forootan *et al.*, 2017; Kralik & Ricchi, 2017).

Con los límites de detección ya determinados, se procedió a establecer los de corte para los cuatro pares de cebadores (véase **Tabla 13**), definidos como los límites inferiores de cada rango de trabajo. Estos límites garantizaron una interpretación cuantitativa, con mayor confianza y repetibilidad, confirmado con la poca variabilidad entre las repeticiones realizadas, para cada uno de los primers evaluados y medida a través de los CV, expresados en porcentaje, cuya variación fue menor al 25 %.

En relación a la sensibilidad de las qPCRs desarrolladas, se observó buena repetibilidad para los cuatro cebadores evaluados reflejada en un bajo porcentaje de CV. Respecto a la menor concentración de ADN detectada, la mayor sensibilidad se apreció con los cebadores del gen *stx*₁, puesto que con sus amplicones se alcanzaron menores límites de detección y corte, $1,3032 \times 10^{-4}$ ng μL^{-1} y $1,7228 \times 10^{-3}$ ng μL^{-1} respectivamente. Es decir, la cepa STEC O157 que exprese la toxina Stx1 se puede detectar en concentraciones más bajas, con mejor repetibilidad asociada a un valor de CV pequeño (0,64 %), mucho menor al propuesto por investigadores como Kralik *et al.*, que toman como referente para los procesos biológicos valores < 25 % (Kralik & Ricchi, 2017).

Varios microorganismos pueden expresar la toxina Stx1, por lo tanto para garantizar que la *E. coli* analizada fuera del serogrupo O157, fue de gran importancia identificar también el gen que expresa este antígeno, target principal en este trabajo, con los pares de oligonucleótidos rfbE y O157. Con ambos se observó buena sensibilidad basado en un límite de corte de $3,1667 \times 10^{-2} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y límite de detección de $1,7284 \times 10^{-3} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, aunque con rfbE se obtuvo menor variabilidad en las réplicas (menor CV), indicando que este par de primers podría contribuir con una detección más confiable.

Se confirmó el buen funcionamiento de los protocolos seguidos en cada qPCR, porque siempre amplificó el gen *I6S*, tomado como control positivo, además de verificarse una sola señal en la región del Tm esperado (Temperatura de melting). La manipulación adecuada de las muestras se corroboró con los controles negativos, porque no amplificaron en ninguna de las pruebas, demostrando que no ocurrió contaminación entre ellas (véase **Figura 16**).

Construcción de curvas de dilución de las muestras de ADN bacteriano. Una vez determinado el rango dinámico para cada par de primers, se construyeron curvas estándar, para obtener una representación gráfica de la relación proporcional entre cinco concentraciones de ADN bacteriano y la señal obtenida en la qPCR (véase **Figura 16**). Se detectó amplificación en todos los puntos evaluados de cada secuencia de oligonucleótidos, y no se detectó señal de los controles negativos de la reacción.

Como lo referenciaron Heid *et al.* (1996), las curvas estándar permitieron establecer una relación inversa entre la señal de fluorescencia (Ct) como respuesta de detección de amplicones asociados al gen target y la concentración de ADN bacteriano inicial, para cada par de cebadores (véase **Figura 17, izquierda**). Aplicando el análisis estadístico (ANAVA) a las secuencias de oligonucleótidos correspondientes a los genes *rfbE*, *stx1* y *stx2*, se obtuvieron valores $p < 0,05$, indicando una relación estadísticamente significativa entre el valor del Ct y Log [ng μL^{-1}], con un nivel de confianza del 95 % (Heid *et al.*, 1996).

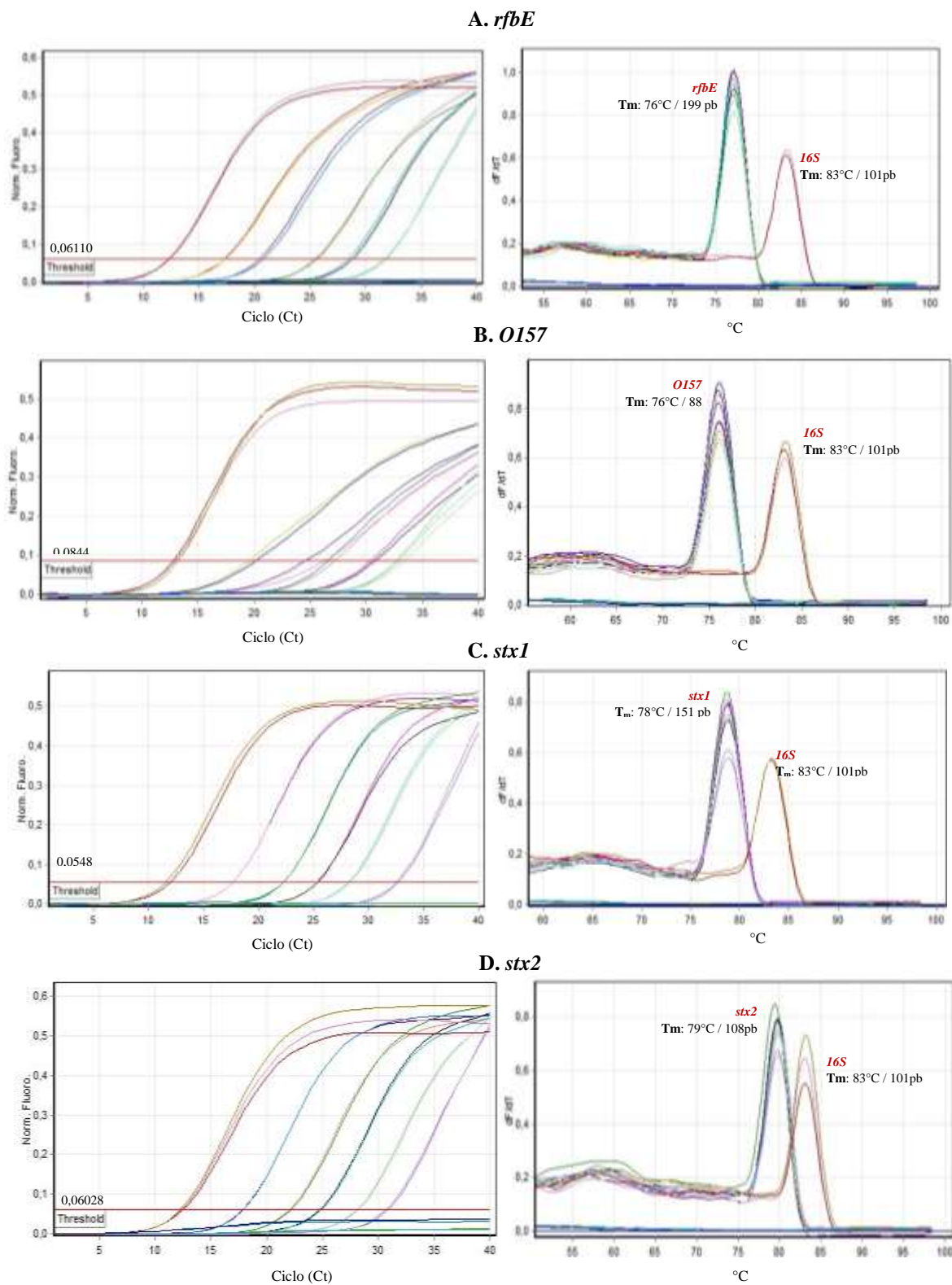


Figura 16. Curvas de amplificación y disociación obtenidas de la qPCR correspondiente a los primers *rfbE* (A), O157 (B), *stx1* (C) y *stx2* (D). El control positivo de cada una de las pruebas es *16S* y se incluyeron controles negativos por triplicado con agua milliQ en lugar de ADN target.

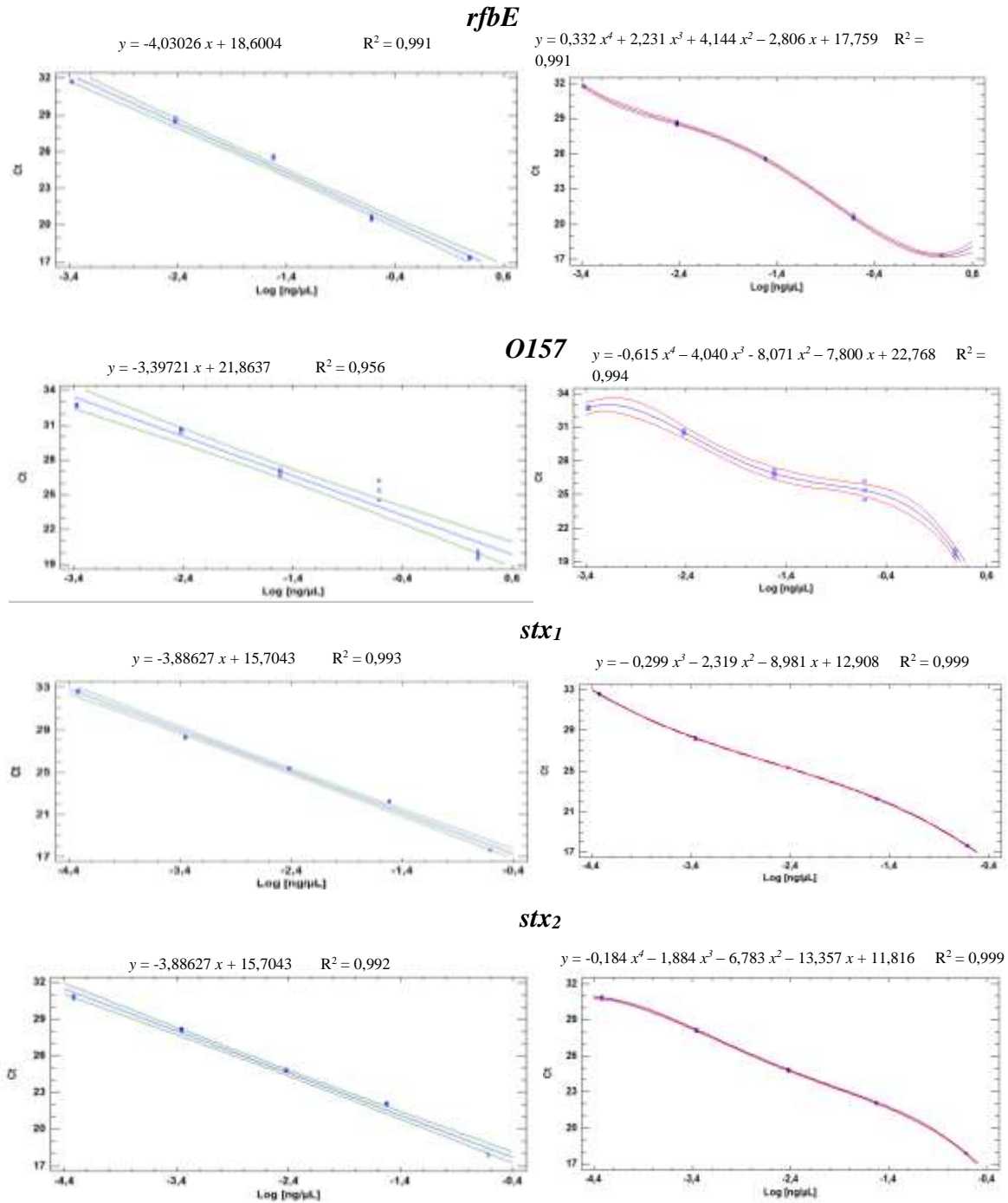


Figura 17. Comparación de curvas estándar ajustadas a un modelo de regresión lineal (gráfica izquierda) y regresión polinómica (gráfica derecha), para cada par de oligonucleótidos evaluados por qPCR y obtención de las ecuaciones de cada modelo, con su correspondiente valor de R^2 .

En cuanto a la eficiencia de cada una de las qPCR absolutas, mediante la cual se determinó no sólo la cantidad de ADN en una muestra dada a partir del valor de Ct, sino también la evaluación cualitativa de la presencia y ausencia de *E. coli* O157 en una muestra, se calculó con base en la **Ecuación 1 (Sección 3.2.5.1)**. Para los cálculos, se consideró los valores de las pendientes obtenidas de las curvas estándar para cada gen *stx*₁, *stx*₂ y *rfbE* (véase **Figura 17, izquierda**). En la **Tabla 14**, se resumen los resultados del % de eficiencia y valores R², para cada par de oligonucleótidos evaluados en las pruebas de qPCR, empleando el ADN de *E. coli* O157:H7, con el modelo ajustado a una regresión lineal simple (n = 1).

Tabla 14. Resultados de Eficiencia y R² para cada par de oligonucleótidos evaluados

Primers evaluado	R ²	E (%)
rfbE	0,99	77
O157	0,96	97
stx ₁	0,99	81
stx ₂	0,99	95

La eficiencia (% E) evidenció una mayor especificidad del par de oligonucleótidos O157 con respecto a los de rfbE, para reconocimiento del serogrupo O157. Pero en general, todos los resultados de la eficiencia, comprendidos entre 81 % y 97 %, estuvieron dentro del rango 80 % y 120 %, considerado como aceptable para este tipo de reacciones de amplificación (Broeders et al., 2014). Con base en estos resultados, se pudo asegurar que no hubo interferencias de posibles inhibidores del proceso de amplificación, ni errores de pipeteo que pudieran afectar la veracidad de los resultados de detección de STEC O157 en una matriz específica. Por tanto y de acuerdo a Broeders *et al.*, la amplificación del ADN target, procedió a duplicarse en cada ciclo, dando lugar a una curva de crecimiento de forma exponencial (Broeders et al., 2014).

La evaluación de los porcentajes de eficiencia por medio del coeficiente de correlación (R²), indicaron un buen ajuste del modelo lineal a los resultados de Ct, con 0,99 para las secuencias rfbE, stx₁ y stx₂ y 0,96 para O157, es decir, entre un 96 % y 99 % de la variación en los valores de Ct se pudieron explicar mediante una relación lineal con el logaritmo de la concentración de ADN. Estos valores de R² (cercaos a 1,00) validaron la confiabilidad de las lecturas con las que se identificó la presencia del patógeno.

Considerando los % de eficiencia (mayores al 80 %) y los valores de los límites de detección sumamente bajos (del orden de pg), para las tres secuencias de primers (O157, stx₁ y stx₂), y comparándolos con los reportados por Kagkli *et al.* (2011), que realizaron una investigación muy similar a la presentada en este trabajo (véase **Tabla 15**), podría decirse que los procedimientos de qPCR aplicados para detectar cepas de

STEC O157, “cumplen con los estrictos criterios establecidos para los métodos de PCR en otros campos” (Kagkli et al., 2011). Por lo tanto, los protocolos desarrollados fueron apropiados y confiables, y pueden recomendarse para su aplicación en el área de alimentos.

Tabla 15. Comparación de resultados con investigación de Kagkli *et al.*, para detectar STEC O157

Genes blanco	Tamaño	% E	qPCR
Kagkli <i>et al.</i> <i>stx1a</i> , <i>stx2a</i> , <i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2d</i> , <i>var eae</i> y <i>rfbE</i>	88 pb a 146 pb	80 % y 95 %	Sondas Taqman
En esta investigación <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>rfbE</i>	88 pb a 199 pb	81 % y 97 %	SYBR Green

Es importante anotar que en esta investigación se utilizó qPCR-SYBR Green como método de detección, el cual es menos específico que qPCR con sondas Taqman empleadas por Kagkli *et al.* y sin embargo, hubo afinidad en los resultados.

Análisis de los modelos aplicados a las gráficas de curvas estándar. En la **Figura 17** se presentaron las gráficas correspondientes a los modelos de regresión lineal (izquierda) y polinómica (derecha) de cada una de las secuencias de oligonucleótidos consideradas en este trabajo, *stx1*, *stx2*, *rfbE* y O157. Hay dos maneras de analizar la bondad del ajuste de los datos, una es en función de R^2 y la otra es con el gráfico de residuales; este último se refiere a la relación de los errores entre cada uno de los puntos analizados, no debe existir una tendencia de los datos, porque implicaría que el factor de perturbación relacionado con una observación cualquiera está influenciado por el factor de perturbación de otra (Rodríguez et al., 2011).

Con el modelo lineal se logró un buen ajuste de los datos representado en valores de R^2 entre 0,96 y 0,99. Sin embargo, la poca aleatoriedad de los valores medidos de Ct en el gráfico residual en relación con la línea recta ajustada (véase **Figura 18**); llevó a buscar otros modelos de ajuste, para mejorar la tendencia de los residuales. El modelo que mejor se ajustó a las relaciones Ct vs Log [ng μL^{-1}] fue el polinómico: para *rfbE*, O157 y *stx2*; un polinomio de grado 4 y para *stx1* un polinomio de grado 3; así los valores de R^2 estuvieron cerca a 0,99, con un nivel de confianza del 95 % dando indicios que no hubo correlación en los residuos.

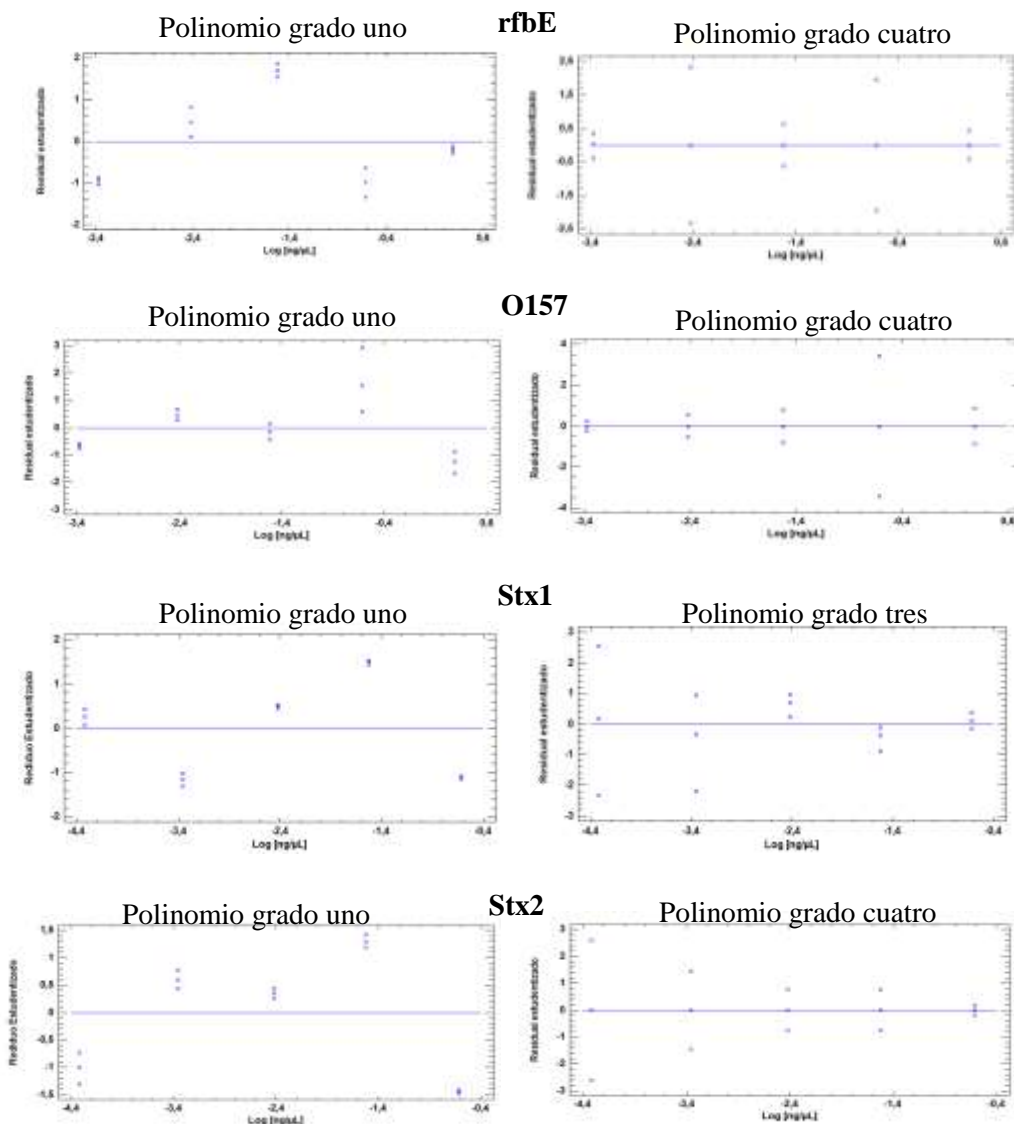


Figura 18. Gráfico de residuales obtenido en el análisis para las curvas estándar en qPCR de cada uno de los cuatro pares de primers rfbE, O157, Stx1 y Stx2, usando ADN de *E. coli* O157

Aunque la regresión polinómica presentó mejores ajustes para describir las tendencias de las observaciones, debe considerarse que este es un modelo más flexible, que se acomoda con facilidad a los datos al aumentar el grado del polinomio (Walpole et al., 1999). El interés de esta investigación fue determinar la eficiencia de la reacción, para lo cual se requirió una pendiente, pero bajo una regresión polinómica se tendrían valores diferentes a través de cada punto de la gráfica, es decir, los cambios no son constantes ya que este modelo da los detalles punto a punto, dificultando el análisis.

La regresión lineal de los datos, aunque mostró cierta dispersión, tuvo valores de R^2 dentro de los límites aceptables y dando un único valor de pendiente; si se superponen las gráficas lineal y polinómica, no hay mucha variación respecto a la tendencia lineal, es decir, se pierden pocos datos, razón por la cual también fue válido el uso de este modelo. La regresión lineal permitió estimar los parámetros que determinaron la linealidad de los valores de Ct vs el logaritmo de la concentración, dentro del intervalo de trabajo definido (Aguilera et al., 2014).

4.3.2 Selectividad de la qPCR

Para determinar las secuencias de ADN específicas, responsables de las expresiones de los genes de interés (*stx₁*, *stx₂* y *rfbE*) de *E. coli* O157:H7, se realizó un análisis *in silico* a través de las bases de datos del NCBI. Los primers elegidos se compararon mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), obteniéndose porcentajes altos de alineamiento e identidad. De esta manera, se confirmó por medio del análisis bioinformático recomendado por Broeders *et al.* (2014), la afinidad y especificidad de los cebadores o primers elegidos a un único target (Broeders et al., 2014).

La prueba de la efectividad del reconocimiento de los target específicos, por parte de los oligonucleótidos diseñados, fue la detección correcta de cada uno de los genes evaluados (*rfbE*, *stx₁* y *stx₂*) en los experimentos de qPCR, utilizando los ADNs de nueve cepas STEC O157 y no O157, mediante los ensayos de inclusividad. Los resultados de los análisis de los pares de primers fueron en todos los casos, del 100 % de inclusividad, con un 95 % de confianza (véase **Figura 19**). La exclusividad también fue del 100 % para cada par de oligonucleótidos ensayados en los ADNs de las cepas no STEC (*i.e.* no portadoras de los genes target), en ninguno hubo amplificación (véase **Figura 20**). En todas las pruebas, las muestras de ADN se ajustaron a una concentración aproximada de 30 ng μL^{-1} .

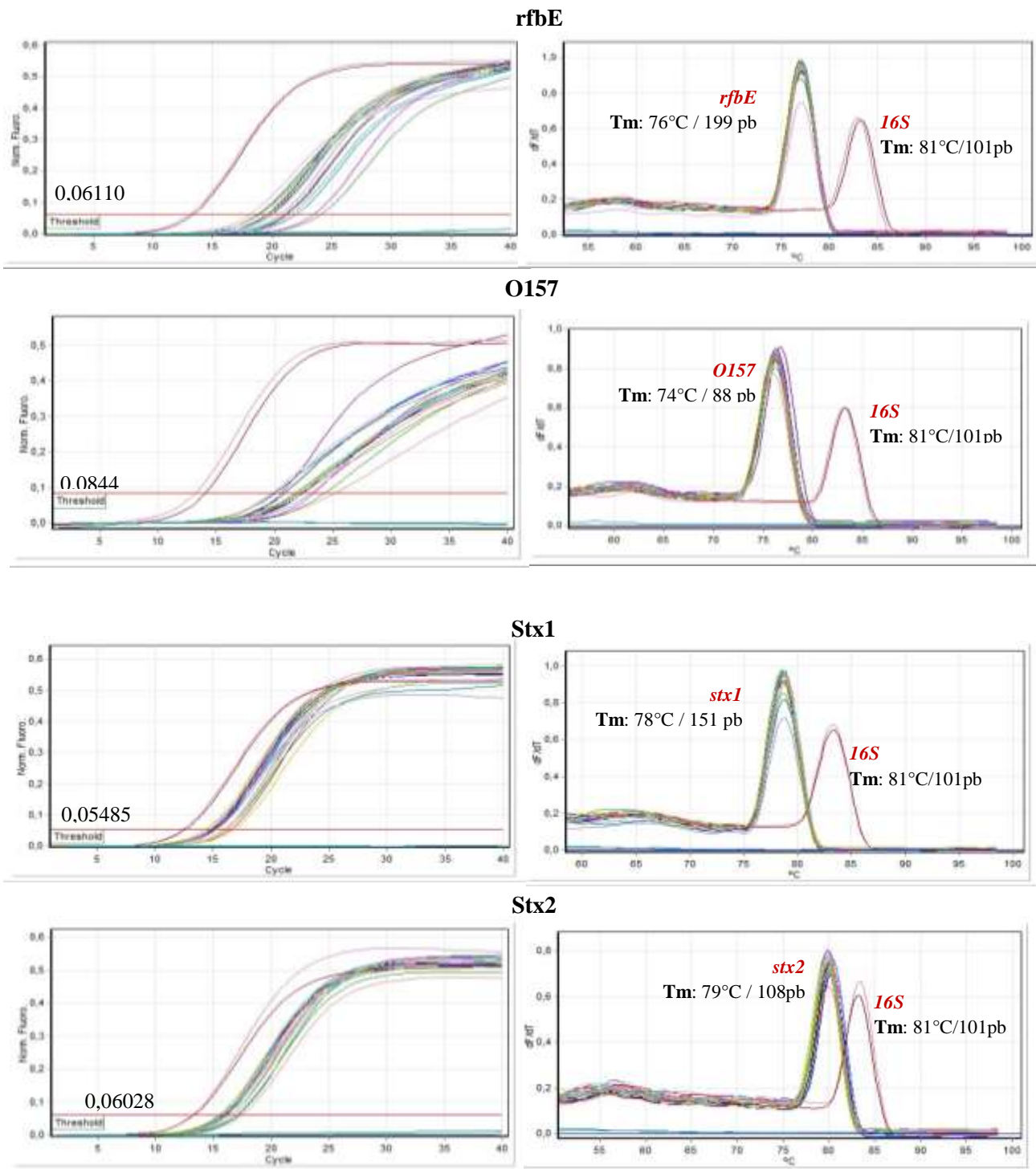


Figura 19. Análisis de inclusividad para la técnica de qPCR evaluando los cuatros pares de primers *rfbE*, O157, Stx1 y Stx2. Se muestran en el gráfico de amplificación (izquierda) y en la gráfica de melting (derecha).

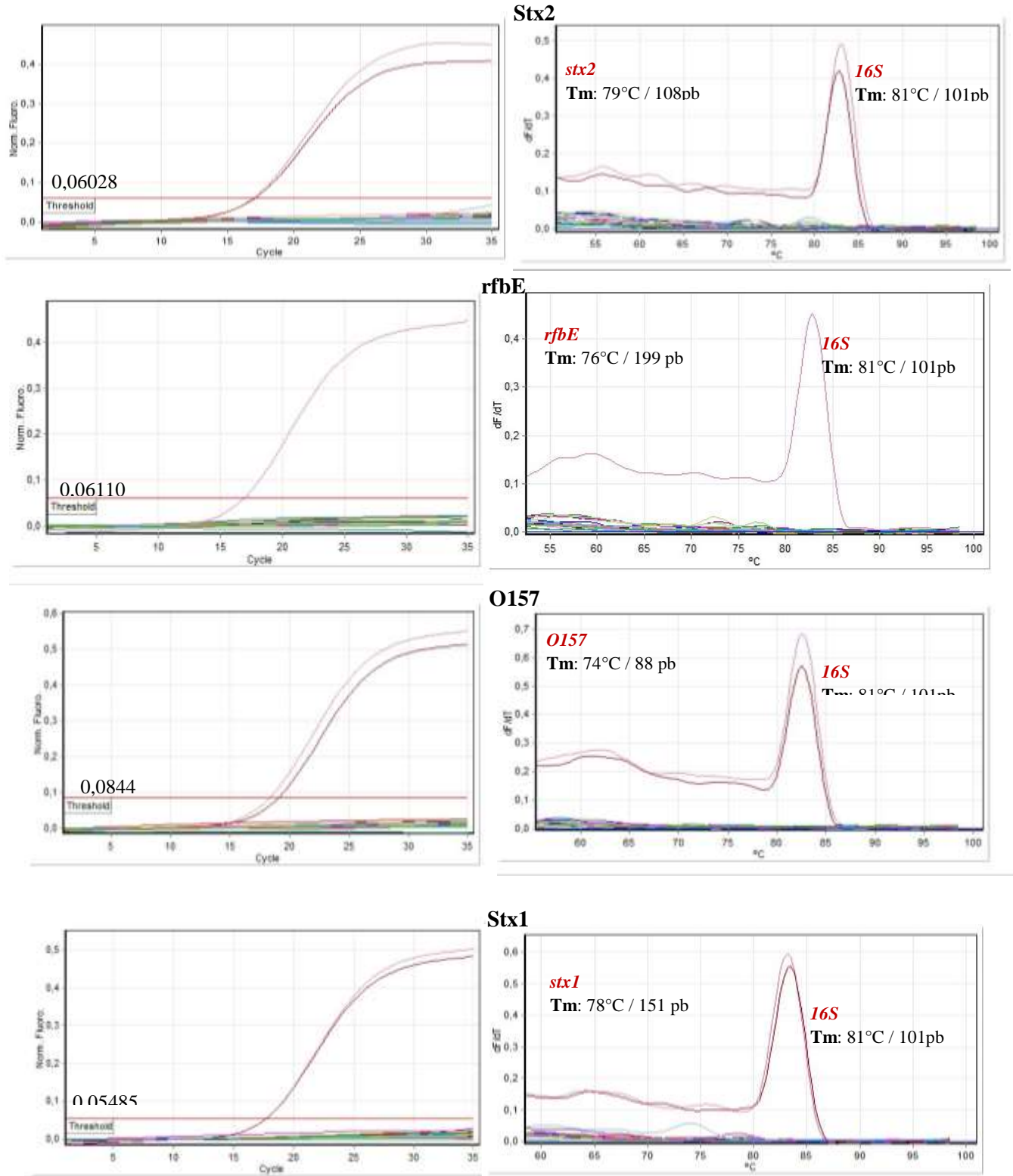


Figura 20. Análisis de exclusividad para la técnica de qPCR evaluando los cuatro pares de primers rfbE, O157, Stx1 y Stx2. Se muestran el gráfico de amplificación (izquierda) y gráfica de melting (derecha).

La inclusividad y exclusividad son señalados dentro de la terminología y definiciones publicadas por Kralik y Ricchi (2017), respecto a las qPCRs aplicadas en diagnósticos microbiológicos, como sensibilidad diagnóstica y especificidad diagnóstica, respectivamente y según estos investigadores, deben ser $\approx 100\%$ para garantizar la capacidad de las pruebas de qPCR (Kralik & Ricchi, 2017). Considerando que en este trabajo estos dos factores alcanzaron el 100 % en las cuatro secuencias evaluadas, se puede tener certeza que las pruebas de qPCR desarrolladas, pueden implementarse para detectar STEC O157 en las muestras positivas y discriminar las negativas.

Siguiendo con el esquema planteado en el cuadro de contingencia (véase **Tabla 9**), se obtuvo una precisión analítica del 100 % para cada uno de los primers evaluados (*stx*₁, *stx*₂, O157 y *rfbE*), probando a través de alto grado de coincidencia en las mediciones, la alta especificidad y la selectividad de los procedimientos de qPCR desarrollados para detectar *E. coli* asociadas al serogrupo O157. Además, como no se detectaron falsos positivos y negativos, puede concluirse que se identificaron correctamente los ADN bacterianos evaluados por medio de los protocolos desarrollados (Kralik & Ricchi, 2017).

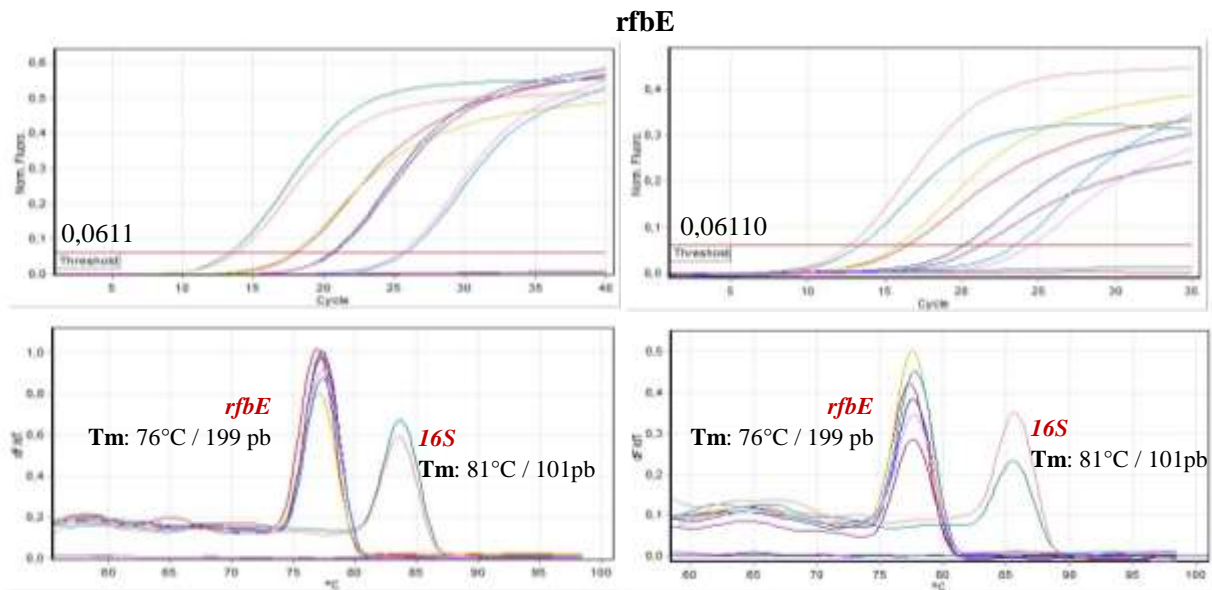
Los valores predictivos positivos y negativos fueron del 100 % para los cuatro pares de primers (*stx*₁, *stx*₂, O157 y *rfbE*); indicando con un alto grado de probabilidad, que las señales registradas como positivas (detectadas) fueron verdaderamente positivas y aquellas muestras verdaderamente negativas, no arrojaron señal alguna (Ct), asegurando de esta forma, la inexistencia de secuencias target. Con estos dos parámetros se reafirmó la eficacia real de las qPCRs desarrolladas como pruebas diagnósticas, sin interferentes en la detección o en la presencia de reacciones cruzadas y con la confianza de la especificidad de los amplicones correspondientes a los genes target evaluados en *E. coli* O157 (*stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*).

Trabajos de investigación como los desarrollados por Brusa *et al.* (2015) en carne vacuna y Kagkli *et al.* (2011) sobre carne picada, ensaladas y leche pasteurizada, también validaron qPCR-SYBR Green para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂, en un número mucho mayor de cepas bacterianas STEC y no STEC, reportando valores de inclusividad y exclusividad del 100 % (Brusa *et al.*, 2015; Kagkli *et al.*, 2011). Como conclusión, ambos grupos de investigadores recomiendan las qPCR validadas en sus trabajos como métodos de diagnóstico muy prometedores. Igualmente Taminiou *et al.* (2014), validaron una qPCR pero empleando sondas Taqman para detectar seis de los patógenos más comunes y nocivos en alimentos marinos, analizando un amplio rango de cepas bacterianas (alrededor de 420) donde se incluía *E. coli* enterohemorrágica, reportando valores de especificidad del 100 % (Taminiou *et al.*, 2014). La comparación de los resultados de los trabajos mencionados con los obtenidos en esta investigación, permiten verificar la capacidad de qPCR-SYBR Green para detectar con certeza cepas STEC, incluyendo *E. coli* O157, la más patogénicas para humanos.

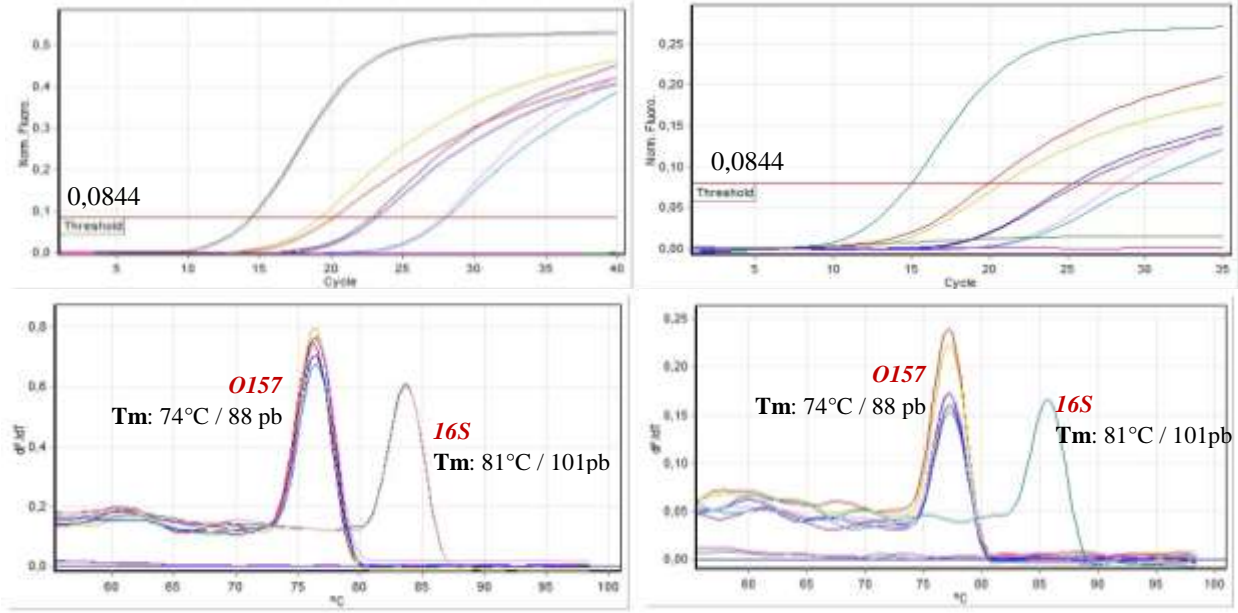
4.3.3 Análisis de robustez

Los análisis de la robustez de cada uno de los cuatro protocolos de qPCR desarrollados para los tres targets de *E. coli* O157, se hizo estimando los efectos de las tres variantes mencionadas en la **Sección 3.2.5.3** (los operarios, los días y kits de qPCR). Se evaluaron las muestras de ADN de *E. coli* O157:H7 por duplicado, en tres concentraciones distintas que estuvieron incluidas en el rango de trabajo establecido para cada par de oligonucleótidos: 24,1 ng μL^{-1} ; 2,68 ng μL^{-1} y 0,29 ng μL^{-1} . Como criterio de aceptabilidad *intra*-ensayo se estableció un CV menor al 5 %.

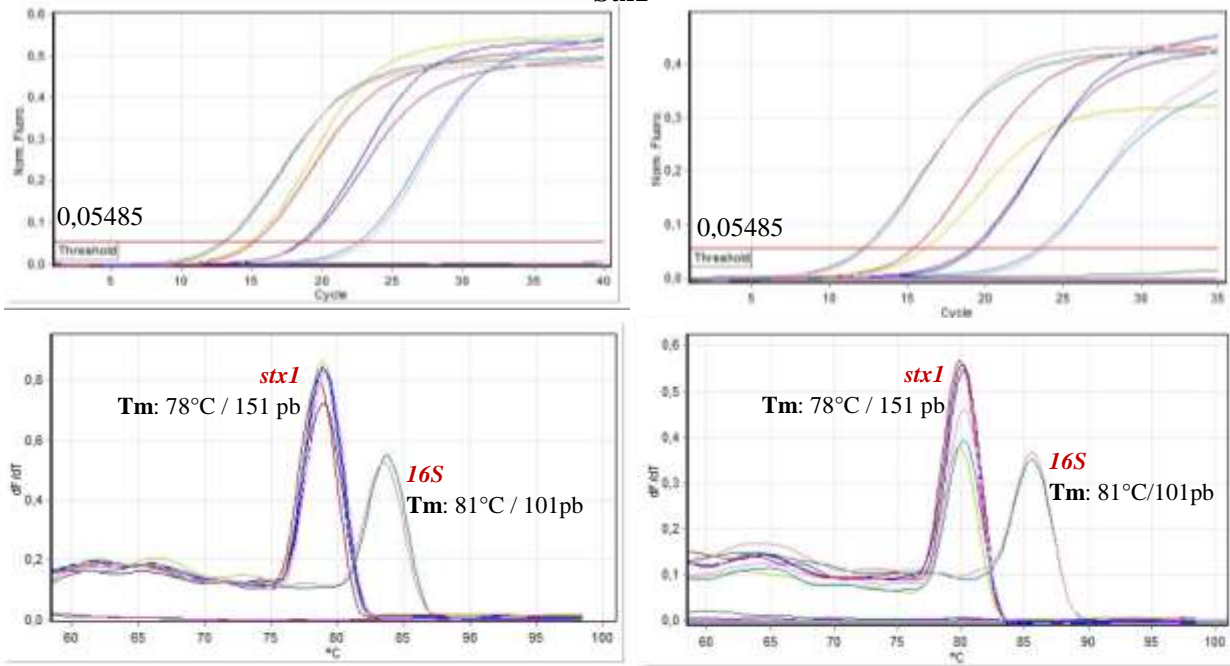
Los amplicones de los genes se detectaron correctamente en todos los procedimientos, sin influencia de las variaciones introducidas (véase **Figura 21**). El control positivo (gen *16S*) dio la señal esperada (Ct), mientras que los controles negativos no amplificaron. Por tanto, las metodologías de qPCR mostraron que los cambios operacionales no afectaron los resultados, evidenciando la robustez de los protocolos, donde la señal de respuesta fue resistente al cambio frente a las variaciones introducidas a cada protocolo (Kralik & Ricchi, 2017; Leotta et al., 2005).



O157



Stx1



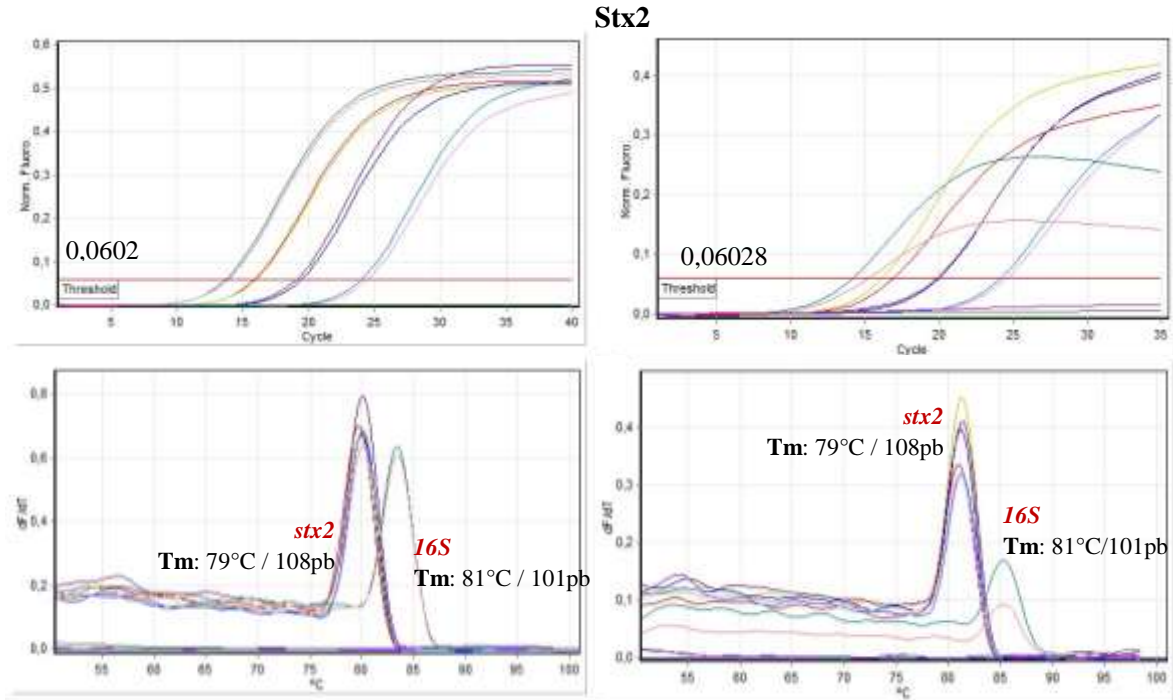


Figura 21. Análisis de robustez para la técnica de qPCR evaluando los cuatros pares de primers rfbE, O157, Stx1 y Stx2. Se muestran en los gráficos, a la izquierda: el gráfico de amplificación y melting de operario 1, kit 1; a la derecha el gráfico de amplificación y melting de operario 2 y kit 1.

Para demostrar la validez estadística respecto a la reproducibilidad de los *inter*-ensayos, se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas de poblaciones normales, analizadas con el estadístico F (véase **Tabla 16**), con un 95 % de confianza. El resultado confirmó que la diferencia de varianzas para cada una de los ensayos realizados por los dos operarios, no fue estadísticamente significativa. En función de este análisis, existe evidencia muestral para probar que las varianzas de cada grupo tuvieron una tendencia homogénea, y por tanto, no hubo mayor variabilidad *inter*-ensayo, apoyando la reproducibilidad de los protocolos bajo las condiciones especificadas en este trabajo.

Tabla 16. Análisis estadístico de la reproducibilidad *inter*-ensayos de qPCR para la detección de genes específicos de STEC O157

rfbE				
Concentración inicial (ng μL^{-1})	Op1 Ct \pm ds	CV (%)	Op2 Ct \pm ds	CV (%)
24,1	17,95 \pm 0,22	1,22	16,23 \pm 0,43	2,66
2,68	20,67 \pm 0,11	0,51	20,70 \pm 0,82	3,96
0,29	25,68 \pm 0,22	0,85	24,01 \pm 0,72	3,00
Fc = 12,846				
O157				
Concentración inicial (ng μL^{-1})	Op1 Ct \pm ds	CV (%)	Op2 Ct \pm ds	CV (%)
24,1	19,71 \pm 0,64	3,27	20,41 \pm 0,65	3,19
2,68	22,99 \pm 0,26	1,14	25,61 \pm 0,38	1,49
0,29	27,91 \pm 0,16	0,58	29,00 \pm 1,15	3,95
Fc = 3,6962				
Stx1				
Concentración inicial (ng μL^{-1})	Op1 Ct \pm ds	CV (%)	Op2 Ct \pm ds	CV (%)
24,1	15,17 \pm 0,17	1,12	15,82 \pm 0,52	3,26
2,68	18,70 \pm 0,13	0,72	19,17 \pm 0,21	1,07
0,29	22,92 \pm 0,38	1,67	23,62 \pm 0,23	0,99
Fc = 1,8839				

Stx2				
Concentración inicial (ng μL^{-1})	Op1 Ct \pm ds	CV (%)	Op2 Ct \pm ds	CV (%)
24,1	16,01 \pm 0,08	0,49	16,59 \pm 0,56	3,37
2,68	19,31 \pm 0,24	1,25	19,96 \pm 0,08	0,39
0,29	24,29 \pm 0,31	1,28	24,40 \pm 0,30	1,25
Fc = 2,5555				

En relación a otro trabajo de validación de qPCR, como el de Brusa (2015), los cuatro protocolos de esta investigación, se sometieron a una variación adicional, la de dos kits, con resultados igualmente satisfactorios (Brusa, 2015). Por tanto, la inclusión de más variantes a los protocolos que podían afectar la precisión de los resultados y que finalmente presentaron poca significancia estadística, fueron la confirmación de la capacidad de la qPCR en lo referente a detección correcta del serogrupo O157.

En síntesis, el método de detección molecular cumplió con los requisitos de robustez (Kralik & Ricchi, 2017), de confiabilidad y precisión. Las mediciones (Ct) reportadas en este trabajo, demostraron que con los protocolos de qPCR-SYBR Green se hizo una identificación acertada de los genes de virulencia relacionados con las STEC O157, en términos de presencia del target; como menciona Kralik *et al.* (2017) en su investigación, esto es una condición importante para considerar un método de detección molecular robusto (Kralik & Ricchi, 2017). Además, al considerar el mayor número de réplicas posibles permitió inferir con más confianza que las lecturas obtenidas eran veraces, y que se ajustaban al resultado esperado (presencia o ausencia de *E. coli* O157).

4.4 Aplicación de los protocolos qPCR en una matriz cárnica

Para valorar la idoneidad, validez y confiabilidad de los protocolos de las qPCR desarrolladas en esta investigación, sobre una matriz real, se utilizó una carne molida bovina proveniente de un expendio de carnes de la ciudad de Medellín, que cumplía con los parámetros de inocuidad microbiológica exigida por la norma colombiana NTC 1325-2008, para cárnicos crudos. Con los protocolos de qPCR se pudo discriminar entre el target y la prevalencia de una diversidad de especies propias del alimento (Brusa *et al.*, 2012; Price *et al.*, 2004).

Siguiendo la metodología descrita en la **Sección 3.2.6**, la contaminación de las muestras de carne se hizo con tres inóculos diferentes, es decir, una por cada bloque, con tres concentraciones dentro de cada uno de los bloques (10^0 , 10^1 y 10^2). Se empleó la lectura de absorbancia (625 nm) de cada uno de los inóculos para estimar la cantidad de bacterias presentes en cada suspensión, medidas en UFC (Unidades Formadoras de Colonia). Se observaron valores de absorbancia altos en aquellas muestras inoculadas con un número de UFC mayor (véase **Tabla 17**), esto es congruente con la ley de Beer – Lambert, en donde se expresa la linealidad entre la concentración del analito absorbente y la longitud de la radiación con el medio que está absorbiendo. Sin embargo, no se pudo establecer un factor que permitiera hacer una relación entre el número de UFC y la lectura de la absorbancia, en parte porque los valores son muy pequeños y pueden tener interferencias con las señales de ruido propias de los equipos de medición.

Tabla 17. Medición de UFC empleadas para contaminar muestras de carne molida bovina.

INÓCULO	Lectura de absorbancia a $\lambda = 625 \text{ nm}$		
	BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III
10^0 (4 UFC) ^a	0,023	0,008	0,012
10^1 (15 UFC) ^a	0,072	0,023	0,037
10^2 (145 UFC) ^a	0,335	0,248	0,198
ns 10^8 ^b	0,097	0,093	0,102

^a UFC tomadas para hacer la inoculación, según cada concentración evaluada. ^b Para la muestra ns se tomó una cantidad de UFC correspondiente a un patrón de McFarland de 10^8 .

Luego de contaminar las tres muestras de carne y hacer las extracciones del ADN, para desarrollar el diseño experimental propuesto, se ajustaron las concentraciones de los ADN bacterianos a $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ aproximadamente. Se eligió esta concentración, porque se encontraba dentro del rango de trabajo determinado para cada par de oligonucleótidos cebadores.

Los tratamientos positivos (con el ADN bacteriano) amplificaron como se esperaba, confirmando la presencia del patógeno, mientras las muestras de los controles negativos (*i.e.* cepa no-STECS) no dieron señal alguna (Ct) en los ensayos (véase **Figura 22**). Por tanto, los protocolos de qPCR para los genes *stx1*, *stx2* y *rfbE*, respondieron adecuadamente a la detección de *E. coli* enterohemorrágica O157 en una matriz tan compleja como la carne.

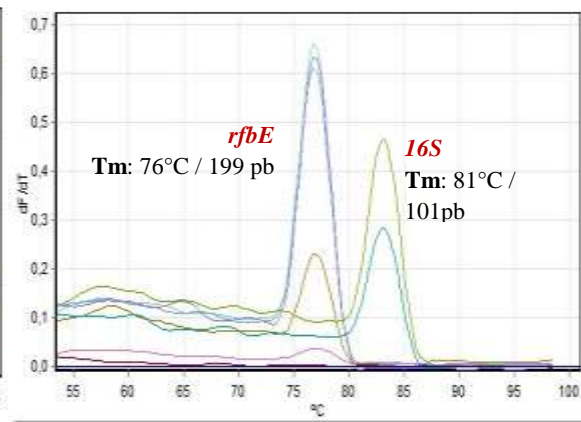
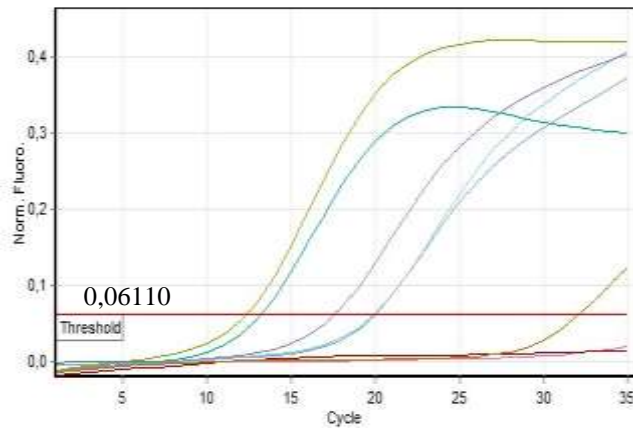
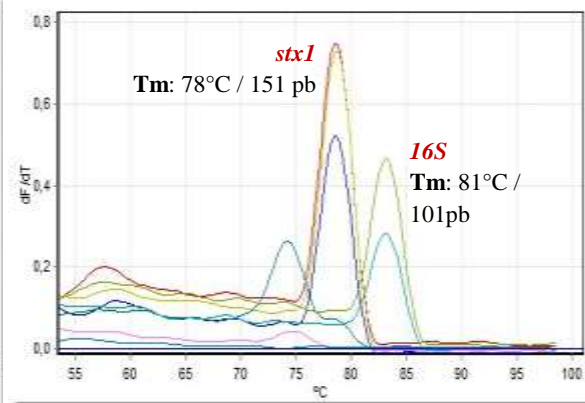
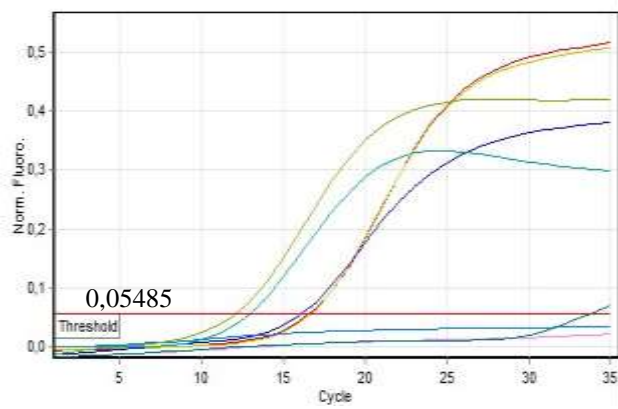
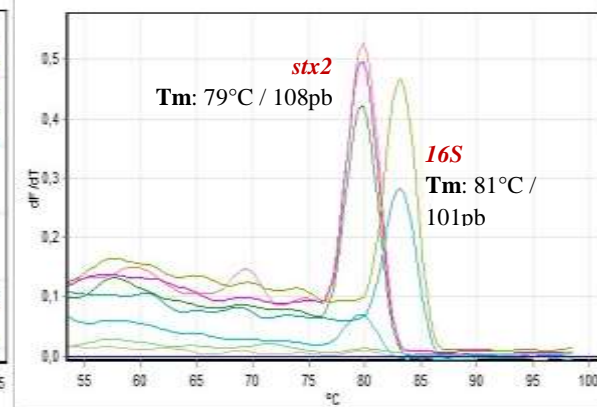
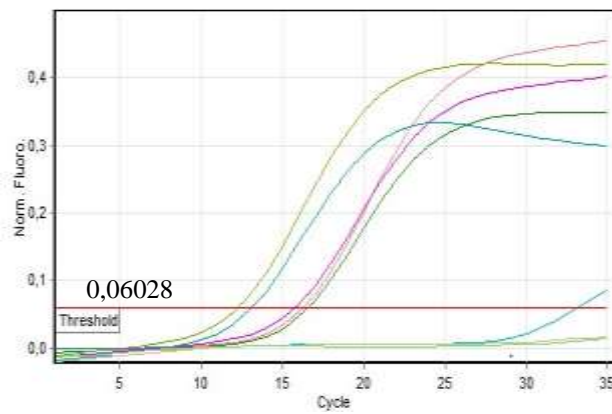
Es importante anotar que la inocuidad inicial de la carne molida se evaluó en los ensayos, incluyendo siempre una muestra de ella, sin tratamiento alguno, en cada uno de los tres bloques del diseño experimental. Sin embargo, la muestra del bloque I amplificó para los genes *stx1* y *rfbE*, con Ct $\approx 33,59$ y $32,08$

respectivamente; estos valores de Ct fueron bastante altos, y se asociaron a una cantidad sumamente baja de los amplicones detectados. Este resultado permitió inferir una posible presencia de STEC O157 en las muestras, sin embargo, no es muy alta y está dentro de la norma INVIMA mencionada. A pesar de esto, en lo referente a la detección de este patógeno por los protocolos implementados, todos los analitos analizados fueron ajustados a una concentración de ADN específica, por tanto, las qPCRs desarrolladas cumplen con el objetivo de la detección del serogrupo O157.

También amplificó el gen *stx₂* en el control negativo del bloque III correspondiente al blanco (*i.e.* agua peptonada), con un Ct \approx 33, aunque en la muestra de carne molida cruda sin tratamiento, ninguno de los tres genes target amplificó, por tanto, se descarta la presencia de la STEC O157 en esta muestra. Esta señal, al igual que las emitidas en la muestra sin inóculo del bloque I, y debido a la inconsistencia con respecto a las demás, posiblemente correspondieron a amplificaciones confusas, limitando la capacidad de detección de los genes target a Cts menores a 33 (Concentraciones mayores de ADN bacteriano), en los protocolos aplicados sobre la matriz real. Como se obtuvieron lecturas confiables hasta Cts de 32, esta podría tomarse como límite de lectura, para los protocolos aquí desarrollados.

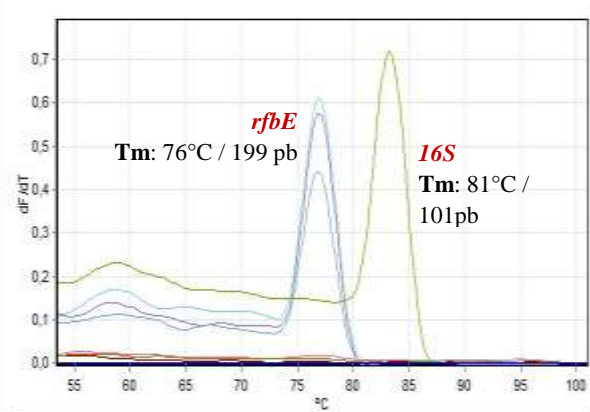
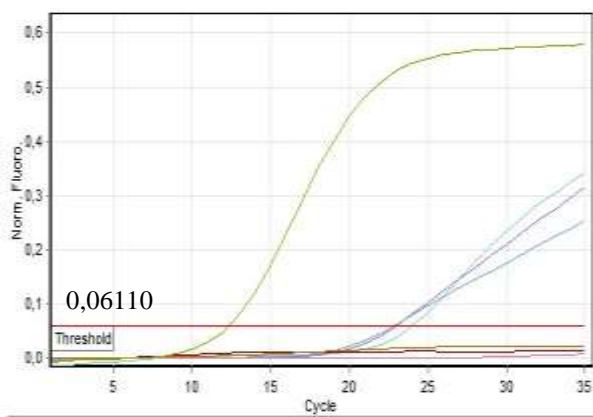
Buscando una explicación a las amplificaciones en las muestras no contaminadas artificialmente, se aplicó el método microbiológico NMP (Número Más Probable), a las muestras de carne empleadas en los bloques, para cuantificar coliformes, coliformes fecales y *E. coli*, para poder establecer si en las muestras de partida, la población microbiana había sobrepasado el límite mínimo permitido para *E. coli* (120) especificado en la *AOAC official methods 966.24, Ed. 18*. Los resultados de los bloques I y II fueron NMP < 3, y para el bloque III fue 11, valores que se consideran bajos y que están dentro de los niveles de inocuidad respecto a la presencia de cualquier *E. coli*. Por tanto, es posible que las señales en las muestras sean consecuencia de lecturas ambiguas del equipo, por llegarse al límite de detección de los protocolos desarrollados en una matriz tan compleja como la carne.

BLOQUE I

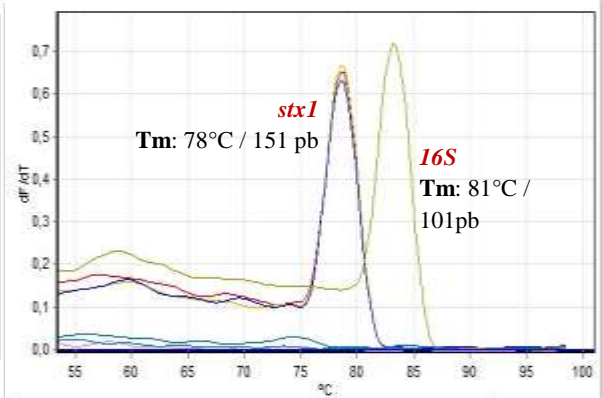
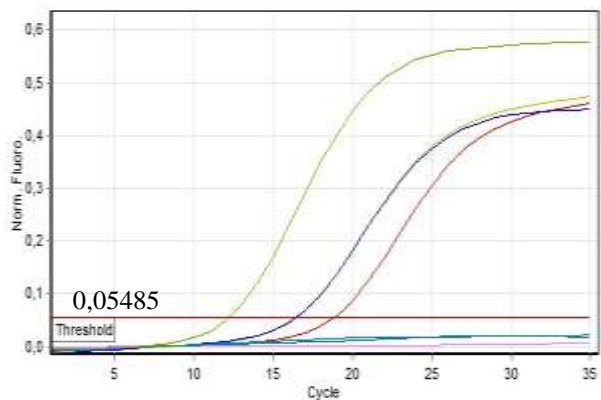
rfbE**Stx1****Stx2**

BLOQUE II

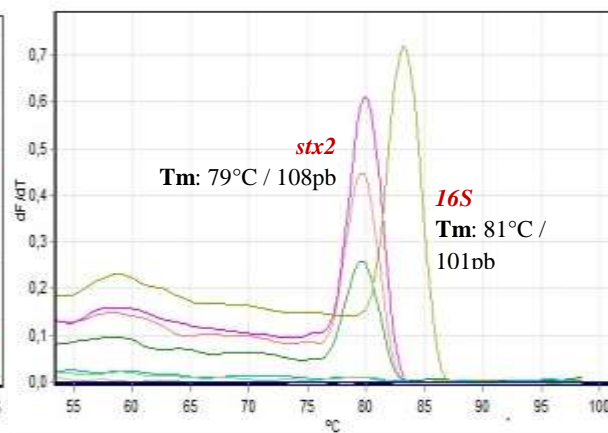
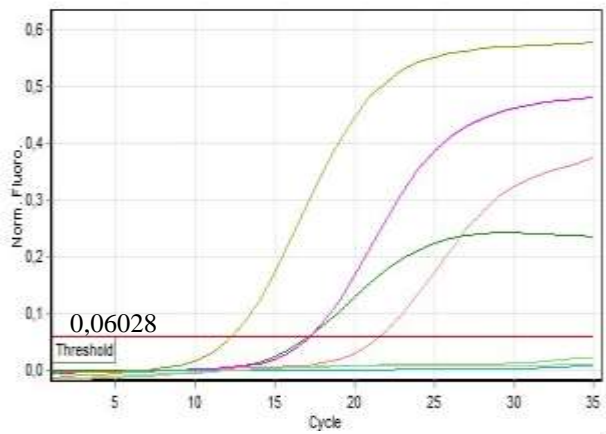
rfbE



Stx1



Stx2



BLOQUE III

rfbE

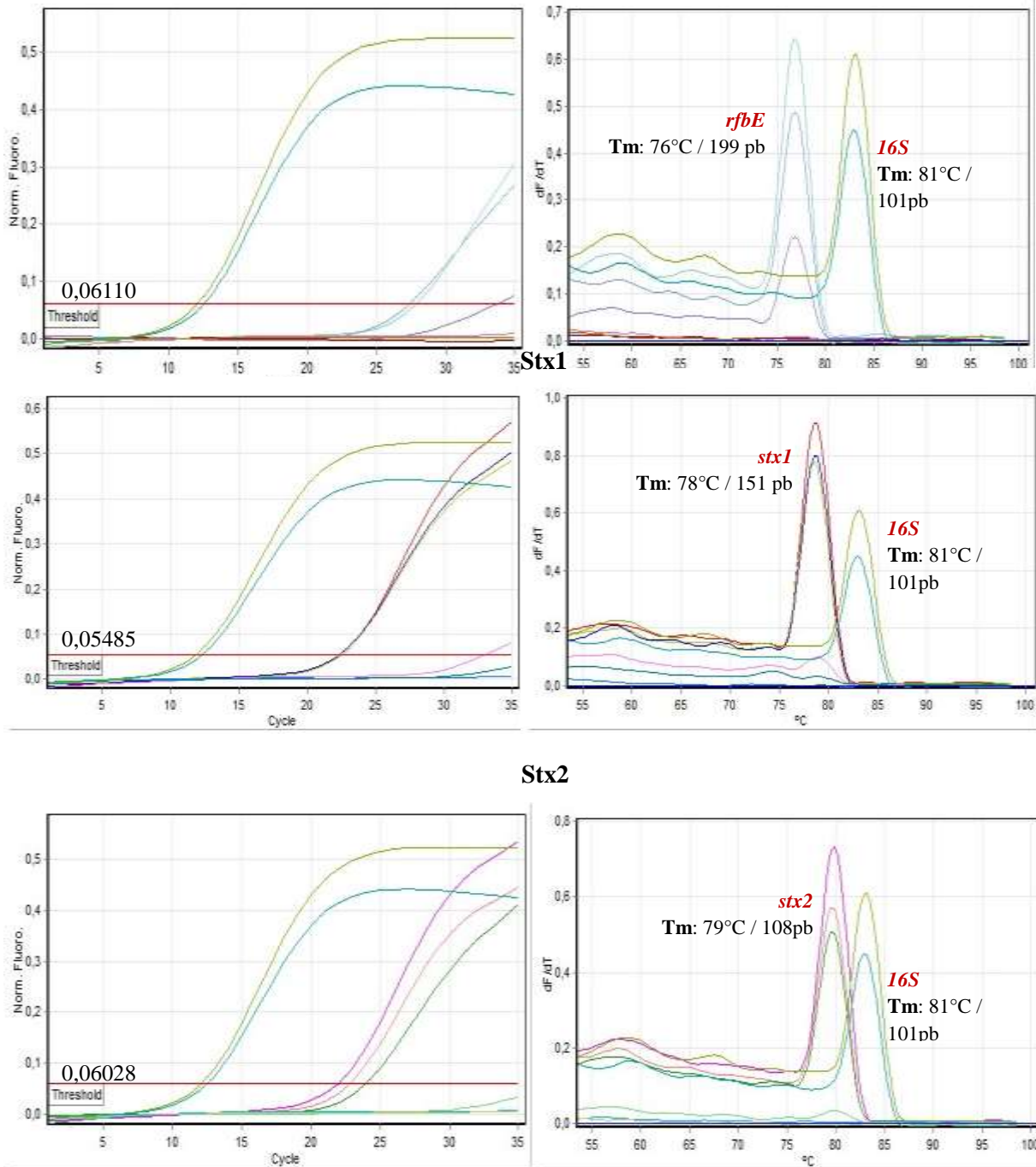


Figura 22. qPCRs para los genes *rfbE*, *stx1* y *stx2*, en una matriz real (carne molida cruda). Gráficos de amplificación (izquierda) y melting (derecha).

El modelo de bloques completamente al azar permitió analizar la poca variabilidad en la respuesta de la pruebas de qPCR para la detección de STEC O157, asociada a tres muestras de carne adquiridas de lotes diferentes e inoculadas en días distintos: se obtuvo un valor residual de 3,66 que indica poca propagación del error experimental, es decir, hubo buena repetibilidad *inter-ensayo*. Se puede afirmar con un 95 % de confianza, que el conjunto de tratamientos en los tres bloques, siguieron una distribución normal; de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk cuyo valor $p = 0,05417$ indicó que se debe aceptar la hipótesis nula (H_0 : los datos siguen una distribución normal), ya que el valor de $p > 0,05$ muestra que los datos tuvieron una tendencia simétrica alrededor de la media.

Aunque se notó una leve variación de las señales de Ct entre los bloques (*inter-ensayo*), al aplicar la prueba de Levene, se obtuvo un valor $p = 0,0409$, por lo cual se aceptó la hipótesis nula (H_0 : varianzas homogéneas) y por tanto, se puede afirmar con un 99 % de confianza, que no hubo heterogeneidad de varianzas entre bloques. En consecuencia, existió poca variación entre los tratamientos de cada bloque y las qPCRs se desarrollaron correctamente a pesar de la complejidad propia de la matriz cárnica, es decir, no hubo interferencia ni afectación en la detección de la STEC O157.

En la **Figura 23**, se presenta la gráfica de franjas (Strip plot) que muestra la tendencia de los datos alrededor de la media. La centralidad de las mediciones de cada tratamiento, al menos dos repeticiones, tendieron a la simetría y el punto que se dispersó, no tuvo una variación muy alta respecto a la media, excepto en el tratamiento donde se evaluó la concentración 10^2 con el gen *rfbE* (C2G3), donde la distribución de los datos tuvo mayor variación respecto al valor central.

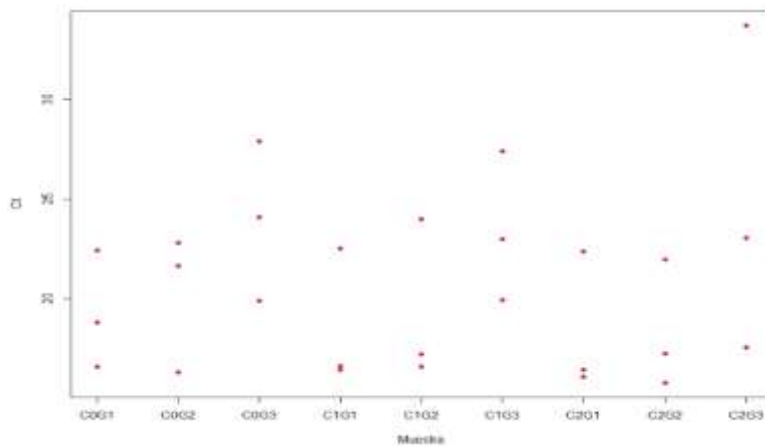


Figura 23. Gráfico de franjas (Strip plot) describe la distribución de las repeticiones *inter-ensayo* para cada tratamiento en el modelo de bloques completamente al azar, evaluados con carne molida contaminada con STEC O157.

Como sugieren Broeders *et al.* (2014), los resultados de qPCR están influenciados por la naturaleza (microbiológica y bioquímica) y la heterogeneidad de las matrices (concentración de ADN del inóculo), que pueden convertirse en posibles inhibidores de la reacción (Broeders *et al.*, 2014). Fue por estas razones que los resultados de esta investigación, se analizaron estadísticamente y se verificó que bajo las condiciones en las cuales se realizaron las pruebas, se puede hacer una detección correcta de *E. coli* del serogrupo O157 mediante el análisis de sus tres genes de mayor virulencia *rfbE*, *stx1* y *stx2*, sin efecto estadísticamente significativo de la matriz cárnica. Así mismo, la metodología de qPCR debe discriminar entre el target y la prevalencia de una diversidad de especies propias del alimento (Brusa *et al.*, 2012; Price *et al.*, 2004; Tuttle *et al.*, 1999).

En relación al inóculo, con los protocolos desarrollados en esta investigación, se logró una detección mínima experimental de 4 UFC mL⁻¹ en las tres muestras de carne; estos resultados son comparables con los de Brusa (2015), que utilizando la técnica de qPCR-SYBR Green en carne contaminada artificialmente, para el análisis de las dos toxinas Stx, detectó 1 UFC mL⁻¹ (Brusa, 2015). Esto sugiere, un correcto reconocimiento con alto porcentaje de confiabilidad de *E. coli* productoras de toxinas Shiga y pertenecientes al serogrupo O157; así mismo, es importante resaltar el valor del límite de detección y el hecho de que la cantidad mínima para desarrollar un cuadro clínico severo es de 0,3 UFC mL⁻¹ a 15 UFC mL⁻¹, lo cual hace que los protocolos desarrollados en nuestra investigación puedan considerarse como un análisis de diagnóstico (Hu *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2013).

En 2011, Kagkli *et al.*, en su estudio de validación de métodos de qPCR para la detección de STEC, realizaron la importancia de contar con método adecuado de extracción para eliminar interferencias en la reacción; además sus muestras contaminadas con la cepa O157, al igual que en esta investigación, no se vieron afectados por la presencia de la biota nativa del alimento. Su límite de detección fue de 2 UFC mL⁻¹ y recomiendan el método de qPCR como estrategia de detección rápida en matrices alimentarias (Kagkli *et al.*, 2011).

Balakrishnan *et al.* (2016), reportaron un método de inmunofluorescencia para detectar *E. coli* O157:H7 en carnes, con límite de detección óptimo de $1,2 \pm 0,06 \times 10^3$ UFC mL⁻¹; estos investigadores demostraron la incidencia del enriquecimiento del medio de cultivo en el mejoramiento de la sensibilidad del análisis en las muestras de alimentos, porque la incubación de la muestra simula el proceso de contaminación natural y al aumentar su población bacteriana, se pueden detectar con mayor facilidad (Balakrishnan *et al.*, 2016).

Taminiau *et al.* (2014), identificaron el gen *rfbE* a través de protocolos de qPCR, para identificar *E. coli* O157:H7 en mariscos, estimando 1 UFC mL⁻¹ como límite de detección. Los investigadores consideraron

que su metodología podría ser una opción válida y alternativa para la vigilancia de los productos pesqueros, porque alcanzaron un buen nivel de sensibilidad y especificidad (Taminiau et al., 2014). Comparado este trabajo con el nuestro, la detección de STEC O157 en carne molida, fue mucho más amplia, porque incluyó además del serogrupo, las dos toxinas más agresivas para el hombre.

4.5 Caracterización microbiológica y bioquímica de *E. coli* O157:H7

4.5.1 Pruebas microbiológicas

Para verificar y confirmar los resultados de las metodologías de qPCR validadas para detectar *E. coli* O157, se hicieron los siguientes seguimientos microbiológicos a cultivos puros de *E. coli* O157 y *E. coli* genérica:

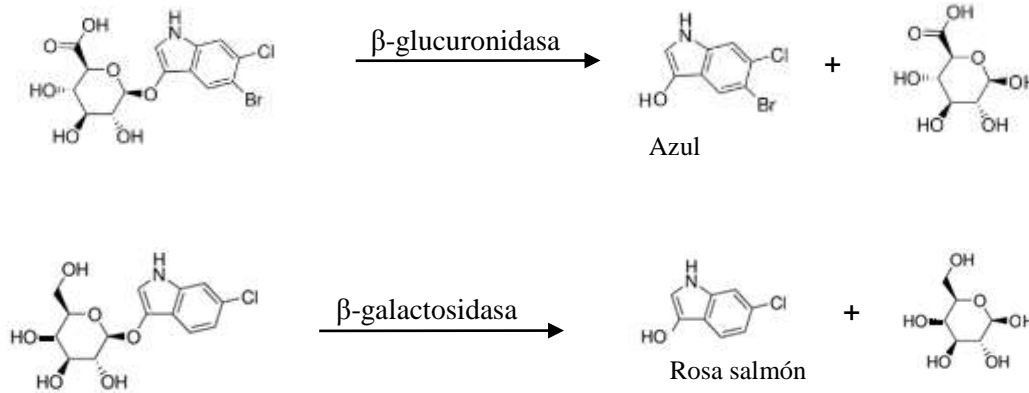
❖ **Medio de cultivo selectivo Agar Cromogénico Colistant.** Con base en las acciones enzimáticas microbianas sobre los compuestos de este medio, 6-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido, se confirmó lo esperado: colonias de *E. coli* O157 de color rosa salmón y las de *E. coli* no O157 de color azul con borde rojo, como se evidencia en la fotografía de la **Figura 24.**



Figura 24. Cultivo en agar Cromogénico Colistant de *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 (izquierda) y *E. coli* genérica ATCC 25922 (derecha)

Las cepas de *E. coli* O157, se caracterizan por ser β -galactosidasa positivas y β -glucuronidasa negativas, por lo cual no pueden degradar el cromóforo glucurónido que le proporciona el color azul. Las demás *E. coli*, como la comensal que se utilizó en esta investigación, al ser β -galactosidasa y β -glucuronidasa positivas, degradan los dos cromóforos del medio, dominando el color azul con borde rojo, proveniente de

la degradación del galactopiranosido (Rivas et al., 2008). En las siguientes reacciones se ilustra la acción de las enzimas bacterianas que dan lugar a la coloración de las colonias.



Fuente de imágenes: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/24904?lang=en®ion=CO>

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/b4532?lang=en®ion=CO>

- ❖ **Caldo BRILA.** Se contrastó los cambios del medio de cultivo con muestras de carne antes y después de inocularse con *E. coli* O157 (véase **Figura 25A**), evidenciándose su capacidad para fermentar la lactosa del caldo, por la formación de las burbujas de gas (CO_2), que es una de las características de *E. coli*.
- ❖ **Medio de cultivo Agar SIM.** Como en el medio caldo BRILA, también se hizo un seguimiento con muestras de carne antes y después de inocularse con *E. coli* O157 (véase **Figura 25B**). Los resultados fueron los esperados para *E. coli* en este medio diferencial: no se produjo sulfuro de hidrógeno (H_2S) que se evidenciaría por la formación de un precipitado negro correspondiente al sulfuro ferroso (FeS) producto de la reacción del H_2S con el hierro del medio; en cambio las pruebas de formación de indol y la motilidad fueron positivas (Camacho et al., 2009).

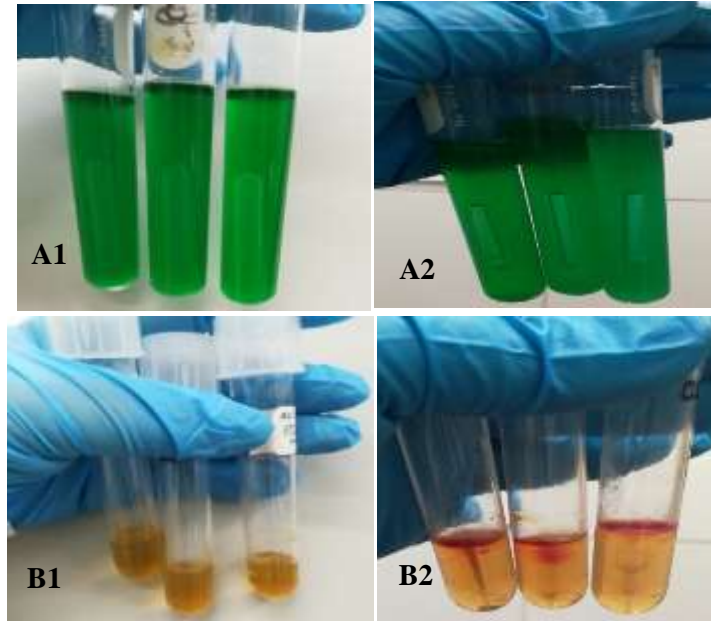
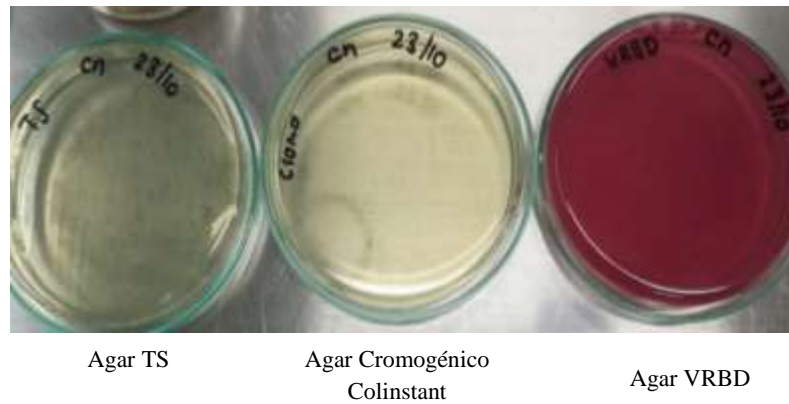


Figura 25. Crecimiento de *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) en Caldo BRILA (A) y medio SIM (B), en muestras de carne antes (A1 y B1) y después de contaminación artificial (A2 y B2).

❖ **Medio VRBD.** Con este medio se hizo seguimiento a todas las muestras de los 11 tratamientos del bloque II; a la par se hizo también el seguimiento de muestras de este bloque, en agar cromogénico colistant. Como se aprecia en la **Figura 26**, los tratamientos que fueron inoculados con STEC O157, dieron el color rojo propio del grupo coliforme en VRBD, debido a su capacidad de fermentar la lactosa, disminuyendo el pH del medio que causa a su vez, el cambio de color del indicador. En el agar Colistant, estos tratamientos dieron el color rosa-salmón (prueba positiva). En los controles negativos de ambas pruebas, no hubo crecimiento, confirmando las pruebas positivas.

A. Controles negativos

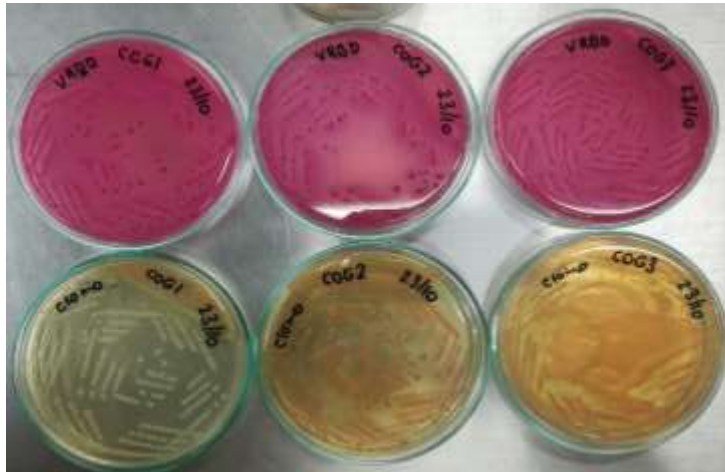


Agar TS

Agar Cromogénico
Colinstant

Agar VRBD

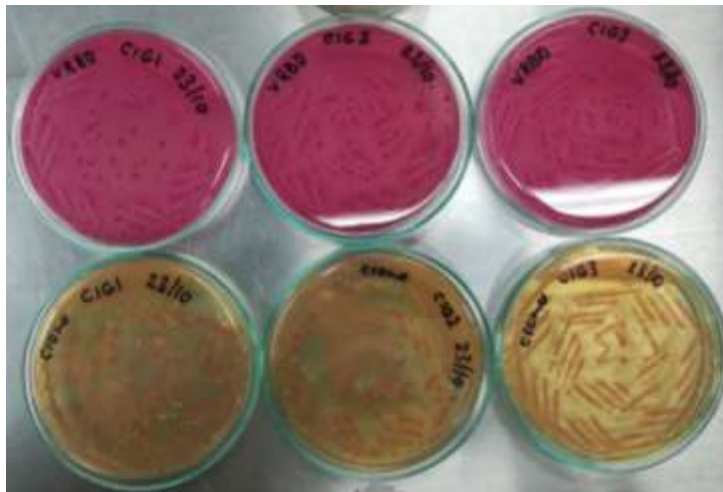
**B. Tratamiento
inóculo 10^0**



Agar VRBD

Agar Cromogénico
Colinstant

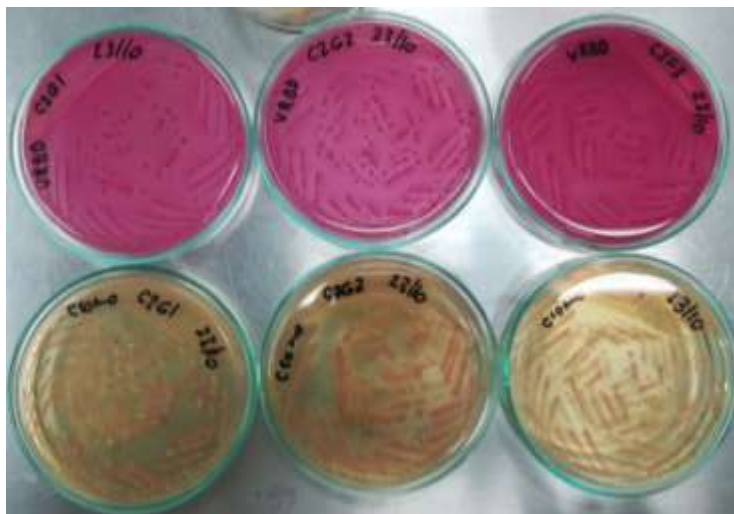
**C. Tratamiento
inóculo 10^1**



Agar VRBD

Agar Cromogénico
Colinstant

**D. Tratamiento
inóculo 10^2**



Agar VRBD

Agar Cromogénico
Colinstant

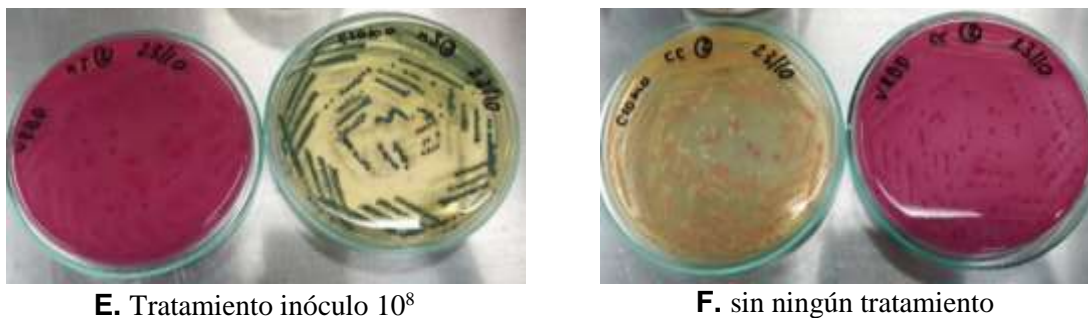


Figura 26. Análisis microbiológicos de los tratamientos desarrollados en carne molida cruda del bloque II, para evaluar crecimiento de *E. coli* O157: **A.** Controles negativos (APB). **B.** Tratamientos inóculo 10⁰ en agar VRBD y agar Cromogénico Colinstant. **C.** Tratamiento inóculo 10¹ en agar VRBD y Cromogénico Colinstant. **D.** Tratamiento inóculo 10² en agar VRBD y agar Cromogénico Colinstant. **E.** Tratamiento inóculo 10⁸ en agar VRBD y agar Cromogénico Colinstant. **F.** Carne sin ningún tratamiento, utilizada como control negativo e inocuidad, en agar Cromogénico Colinstant y agar VRBD.

4.5.2 Pruebas bioquímicas

Todos los tratamientos de cada bloque se evaluaron con las pruebas bioquímicas realizadas en el equipo Vitek[®] 2, algunas de estas descritas en la **Tabla 10**. Se caracterizaron correctamente las muestras contaminadas artificialmente con la cepa *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895), con un nivel de confianza del 98 %. Los resultados de estas pruebas se encuentran en el **Anexo B**.

Los análisis bioquímicos (carga enzimática) y microbiológicos se realizaron en paralelo, a las muestras que se usaron en las qPCR. De esta forma, se tuvo la certeza que la cepa *E. coli* O157 tenía las características reconocidas para ella, desde el punto de vista microbiológico y por lo tanto, los resultados de las pruebas moleculares se pudieron atribuir con certeza a este patógeno. Con toda esta evidencia, se pudo constatar la contaminación artificial de las muestras de carne empleadas en el diseño de bloques, y darles validez a los protocolos de qPCR aplicados para detectar los genes típicos de *E. coli* O157.

El acompañamiento de las pruebas de cultivo con las moleculares, permitió superar las desventajas de unas y otras, brindando la confianza y precisión en la identificación del serogrupo, ante el riesgo que representaba la microbiota nativa de la matriz cárnica, porque podía enmascarar la presencia de *E. coli* O157. Además, la contribución de las pruebas bioquímicas estuvo centrada principalmente como una estrategia rápida de confirmación de los resultados moleculares, frente a los de cultivo que demandaban entre 24 h a 48 h (Newell & La Ragione, 2018; Brusa, 2015).

Un hecho importante a resaltar, fue la concordancia de los resultados de la detección microbiológica, bioquímica y molecular con respecto a la presencia del microorganismo, con lo cual aquellas muestras usadas como controles negativos, donde no hubo crecimiento de la bacteria, pero que presentaron una leve señal de amplificación, valida la importancia de un estudio muy minucioso de la sensibilidad de los métodos moleculares, como estrategias de diagnóstico inicial o tamizaje.

Taminiau *et al.* (2014), hacen un análisis interesante sobre la sensibilidad de la qPCR comparada con los métodos microbiológicos comunes de detección, descritos en la norma ISO 16654, y validados específicamente para el diagnóstico de *E. coli* enterohemorrágica: los investigadores en mención, desarrollaron sus pruebas en una matriz de alimentos pesqueros (mariscos) y obtuvieron límites de detección microbiológica entre 1 UFC a 47 UFC/25 g de muestra para la norma ISO, correspondiente al análisis microbiológico y, 1 UFC a 315 UFC/25 g de muestra con los protocolos de qPCR (Taminiau *et al.*, 2014). Estos resultados prueban la importancia y contribución de un análisis de detección molecular en el diagnóstico en los alimentos de estos microorganismos tan patogénicos para la salud humana.

4.6 Resultados adicionales de la investigación

En la actualidad, las técnicas moleculares e inmunológicas son una contribución importante en lo referente a seguridad alimentaria, dada su utilidad en la detección rápida y confiable de diferentes microorganismos patogénicos al humano. El uso de estas metodologías y sus variaciones como mecanismo de diagnóstico, apoya la identificación oportuna de cepas altamente nocivas en las matrices de alimentos complejas, sin embargo, sus costos limitan su implementación y desarrollo.

La PCR convencional es una de las técnicas moleculares más sencilla y relativamente económica, pero que ha perdido su popularidad frente a las demás, debido a que se aplica como una herramienta de detección meramente cualitativa con fines diagnósticos. En esta investigación se quiso demostrar el gran potencial que suministra la información de protocolos PCR, validando algunos parámetros estadísticos como los límites de detección y de corte, la selectividad y la robustez, para presentarlos como una alternativa semicuantitativa para detectar STEC O157, a través de los mismos genes evaluados por qPCR. La validación de los procesos que se desarrollaron para PCR y que se presentan a continuación, se realizaron simultáneamente con los de qPCR que eran los comprometidos en los objetivos de este trabajo de investigación.

4.6.1 Validación intra-laboratorio de la metodología de PCR punto final

Rango de trabajo. Se analizaron diferentes concentraciones de ADN bacteriano, y se eligió las disoluciones con factor de dilución 1:3 porque permitían observar mejor la variabilidad entre cada punto. El seguimiento de los amplicones se hizo en función de las bandas obtenidas en geles de agarosa preparadas al 1,5 % (w/v). Se empleó la concentración de ADN de $24,1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ como el límite superior de todas las curvas estándar desarrolladas para cada uno de los pares de oligonucleótidos, rfbE, O157, stx₁ y stx₂ (véase **Figura 27**).

- ❖ Los límites de detección de las PCRs fueron: $0,011 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; $0,011 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $0,0033 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y $0,0037 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, para stx₁, stx₂, O157 y rfbE, respectivamente.
- ❖ Los límites de corte encontrados: $0,033 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$; $0,099 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, $0,099 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y $0,033 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, para stx₁, stx₂, O157 y rfbE, respectivamente.
- ❖ Con respecto a los dos pares de oligonucleótidos específicos para el gen *rfbE*, se observó mayor sensibilidad con los cebadores nombrados rfbE, cuyos límites de detección y corte fueron menores frente a los primers O157.
- ❖ Los tamaños de los amplicones coincidieron con los esperados teóricamente, para cada uno de las secuencias de oligonucleótidos: rfbE $\approx 199 \text{ pb}$, O157 $\approx 88 \text{ pb}$, stx₁ $\approx 151 \text{ pb}$ y stx₂ $\approx 108 \text{ bp}$.
- ❖ El control positivo siempre amplificó (gen *16S*), su banda se ubicó muy cerca de la línea del marcador de peso de 100 bp ($\approx 101 \text{ bp}$). De esta forma, se comprobó el buen funcionamiento de los protocolos de PCR.
- ❖ Los controles negativos no dieron banda de amplificación, evidenciando la inocuidad de los procedimientos, es decir, no se presentaron contaminaciones por manipulación de las muestras.
- ❖ Hubo correspondencia entre la concentración de ADN y las intensidades de las bandas de los amplicones, pudiéndose relacionar directamente las mayores concentraciones con las bandas de mayor intensidad.
- ❖ La mayor sensibilidad se alcanzó con los amplicones de stx₁.
- ❖ En general, aunque los procedimientos se consideraron semicuantitativos, se obtuvieron niveles de detección con concentraciones de ADN muy bajos, del orden de $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$, para las cuatro secuencias de oligonucleótidos.

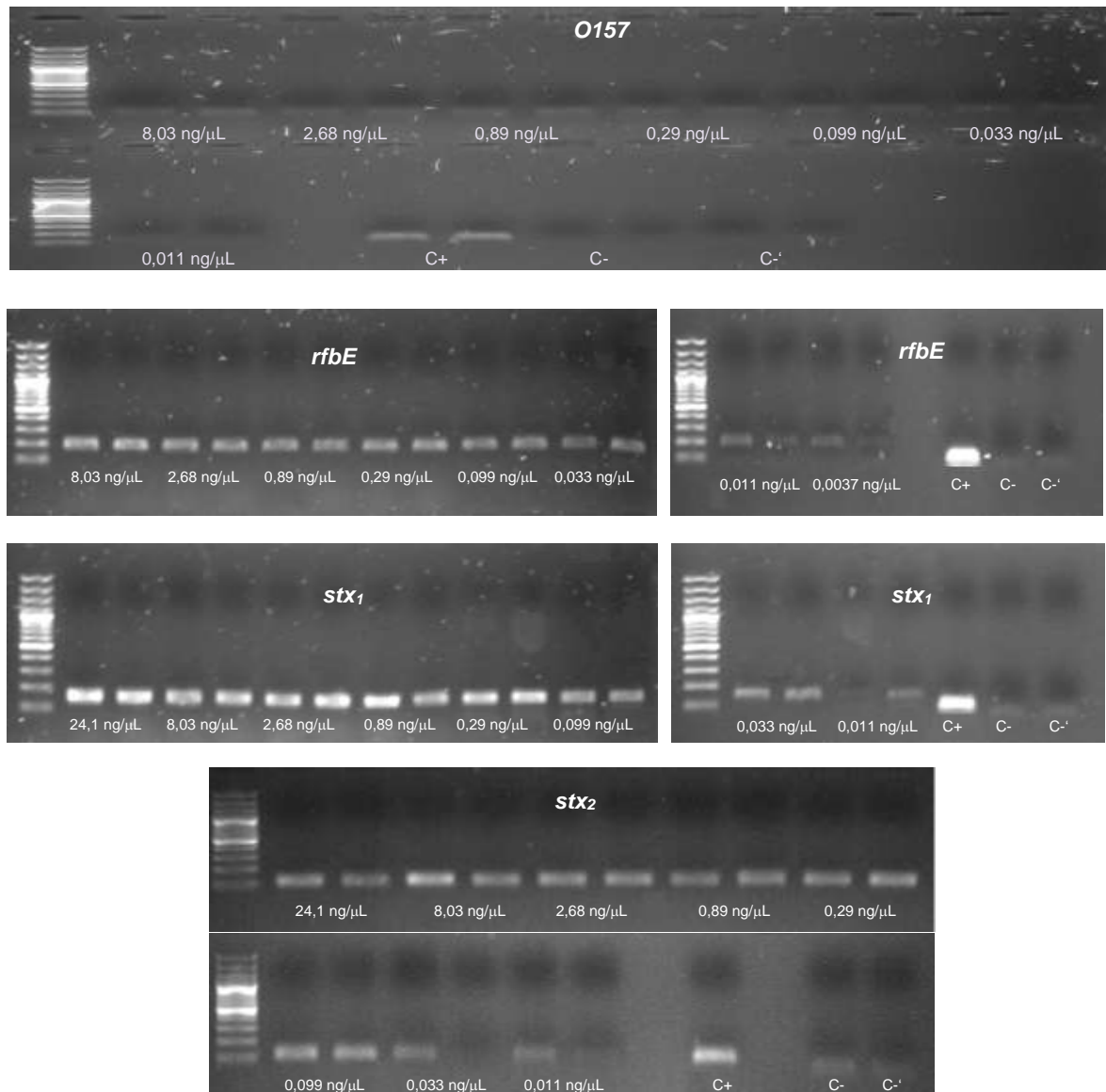


Figura 27. Electroforesis (geles de agarosa) de las curvas estándar de amplicones obtenidos de PCRs correspondientes a *stx1* (151 pb), *stx2* (108 pb), *O157* (88 pb) y *rfbE* (199 pb). C+ es control positivo de la prueba (gen *16S*, 101 pb); C- y C-´ corresponden a controles negativos, con agua y ADN de *E. coli* comensal. Se usó un ladder de 100 pb.

Selectividad. Se detectaron correctamente las muestras contaminadas con cepas STEC (parámetro de inclusividad), observándose bandas intensas y bien definidas y con los tamaños de amplicón esperados teóricamente para cada una de las secuencias (véase **Figura 28**).

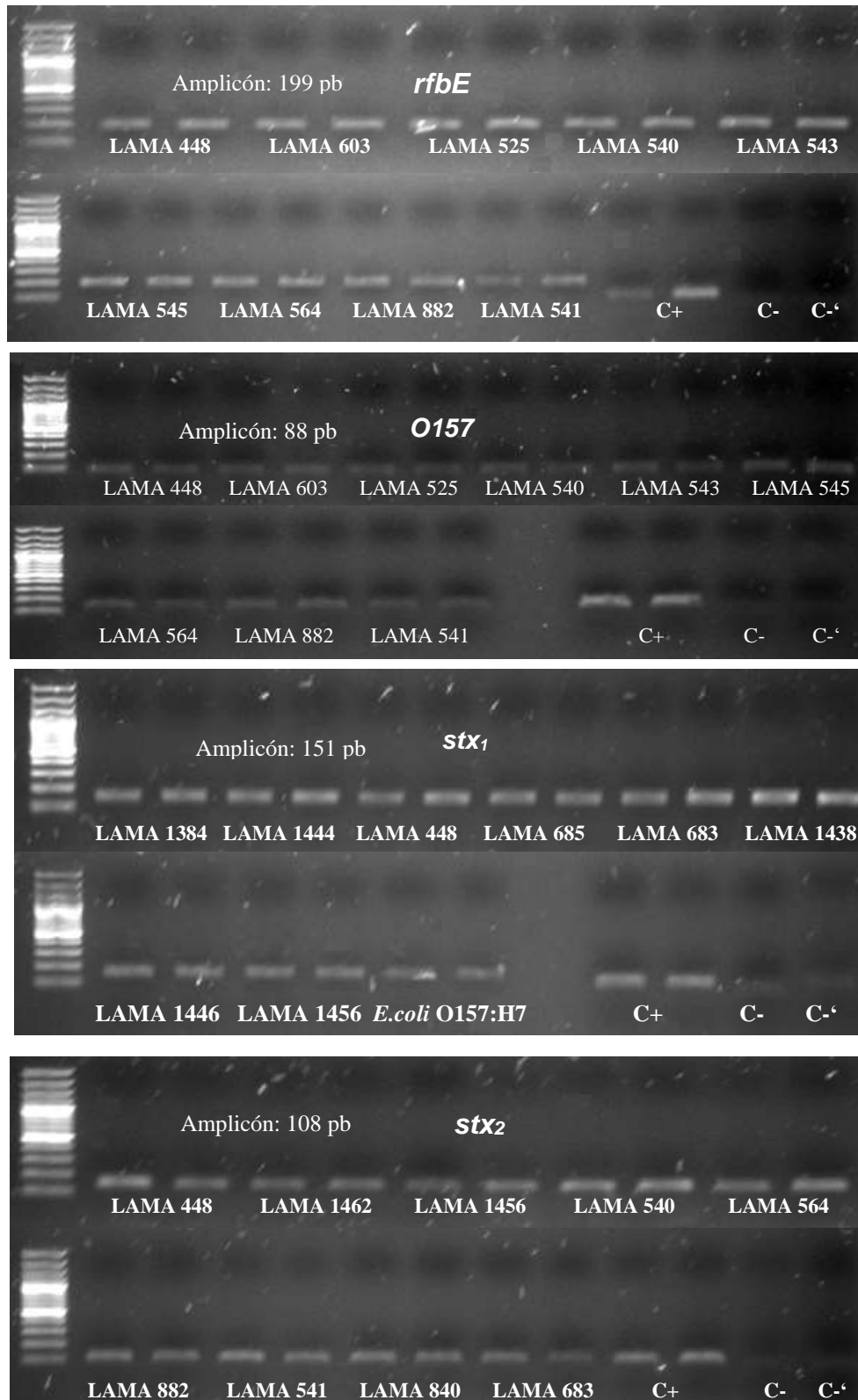
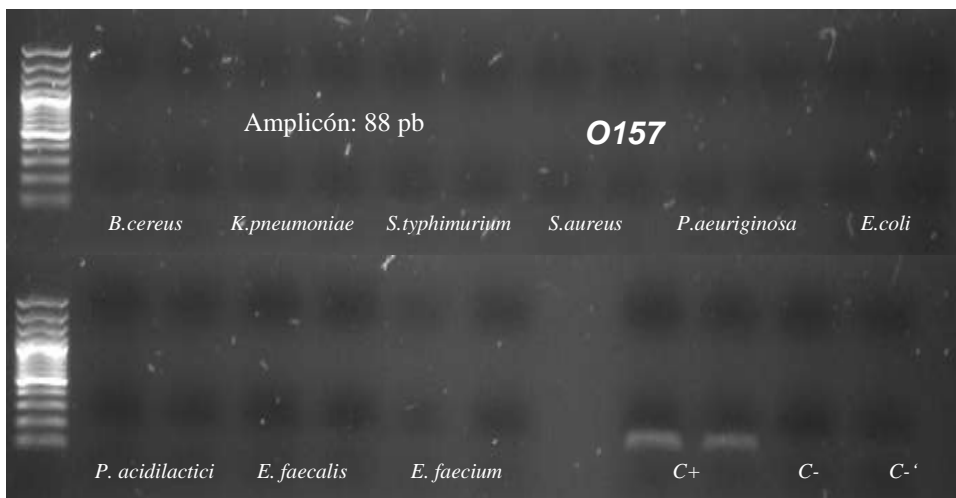
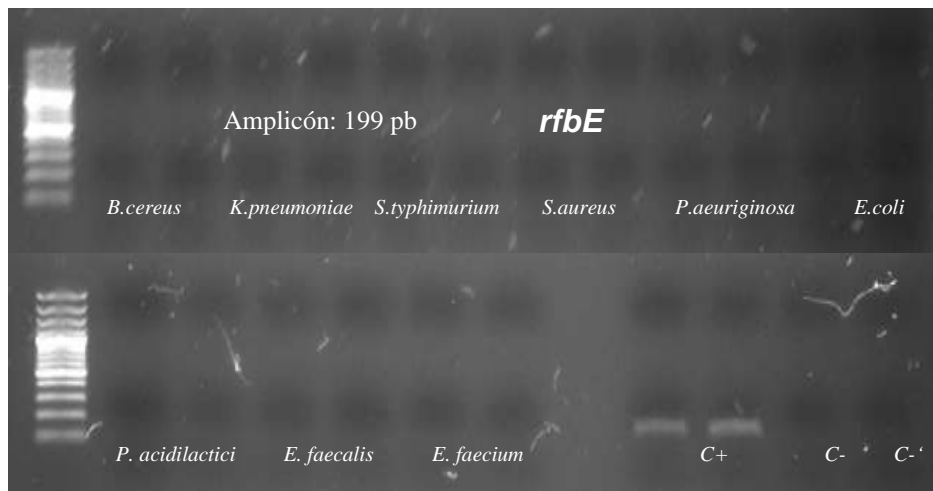


Figura 28. Resultados del análisis de inclusividad a través de PCR convencional, con los pares de primers *rfbE*, O157, *stx1* y *stx2*.

En la evaluación de la exclusividad, no se detectó señal de amplificación en los ADNs extraídos de muestras inoculadas con microorganismos no portadores de los genes target (véase **Figura 29**). Por tanto, los protocolos usados permitieron discriminar *E. coli* O157 de otros microorganismos que son contaminantes comunes en los alimentos, pero que no tienen relación con esta STEC.

En consideración con el cuadro de contingencia descrito en la **Tabla 9**, se obtuvieron valores del 100 % de inclusividad y exclusividad para cada uno de los genes evaluados, con 100 % de precisión analítica. No se observó la presencia de falsos positivos ni negativos



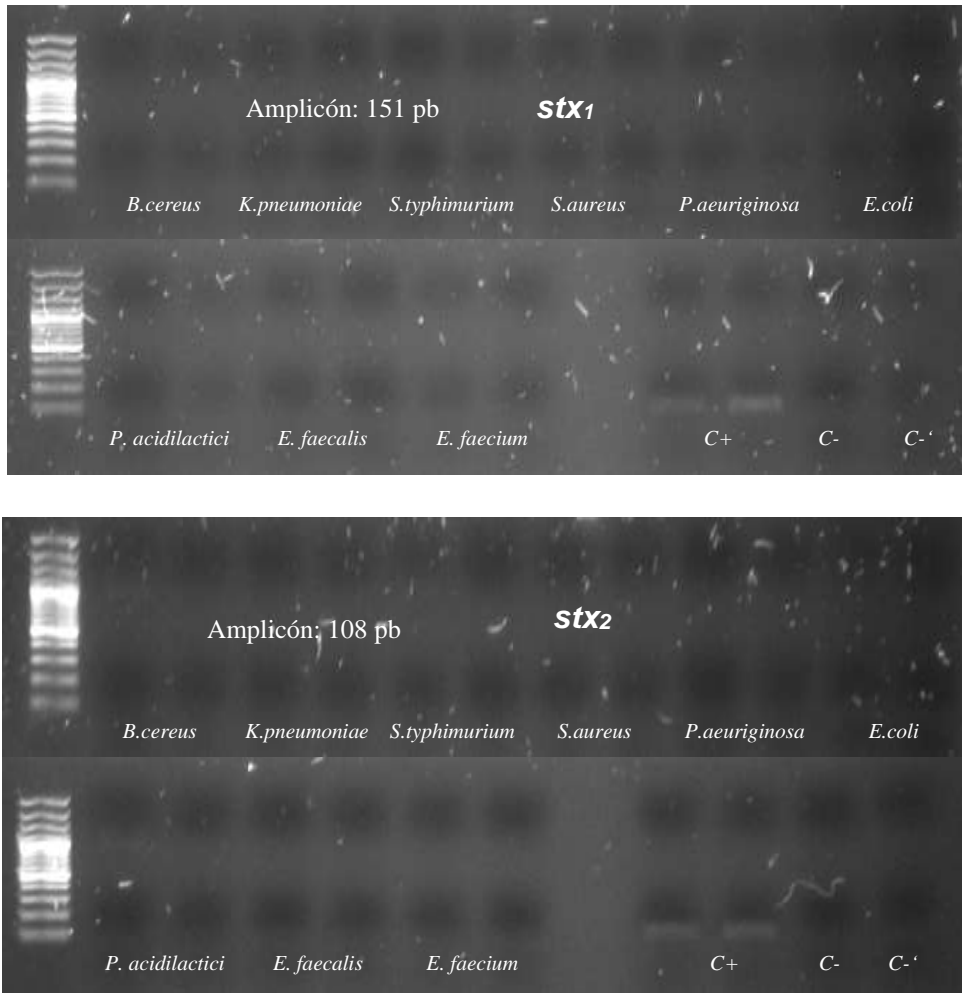


Figura 29. Análisis de exclusividad con PCR convencional, usando los pares de primers rfbE, O157, stx1 y stx2.

En comparación con los resultados validados en este trabajo y presentados anteriormente para qPCR, coinciden, en que ambas técnicas son capaces de identificar correctamente los serotipos que tengan cercanía genotípica con *E. coli* O157, así mismo ambas metodologías discriminan entre aquellos microorganismos que puedan ser contaminantes alimentarias comunes, pero que no tienen relación con esta STEC.

Robustez. Para la evaluación de la reproducibilidad se analizaron tres concentraciones de ADN, evaluados por duplicado, utilizando dos termocicladores, días diferentes, dos personas distintas y dos kits de reacción distintos. La **Figura 30** ilustra los resultados de las electroforesis, con un 100 % de concordancia, bajo las condiciones operacionales descritas en la metodología, sin amplificación de los controles negativos.

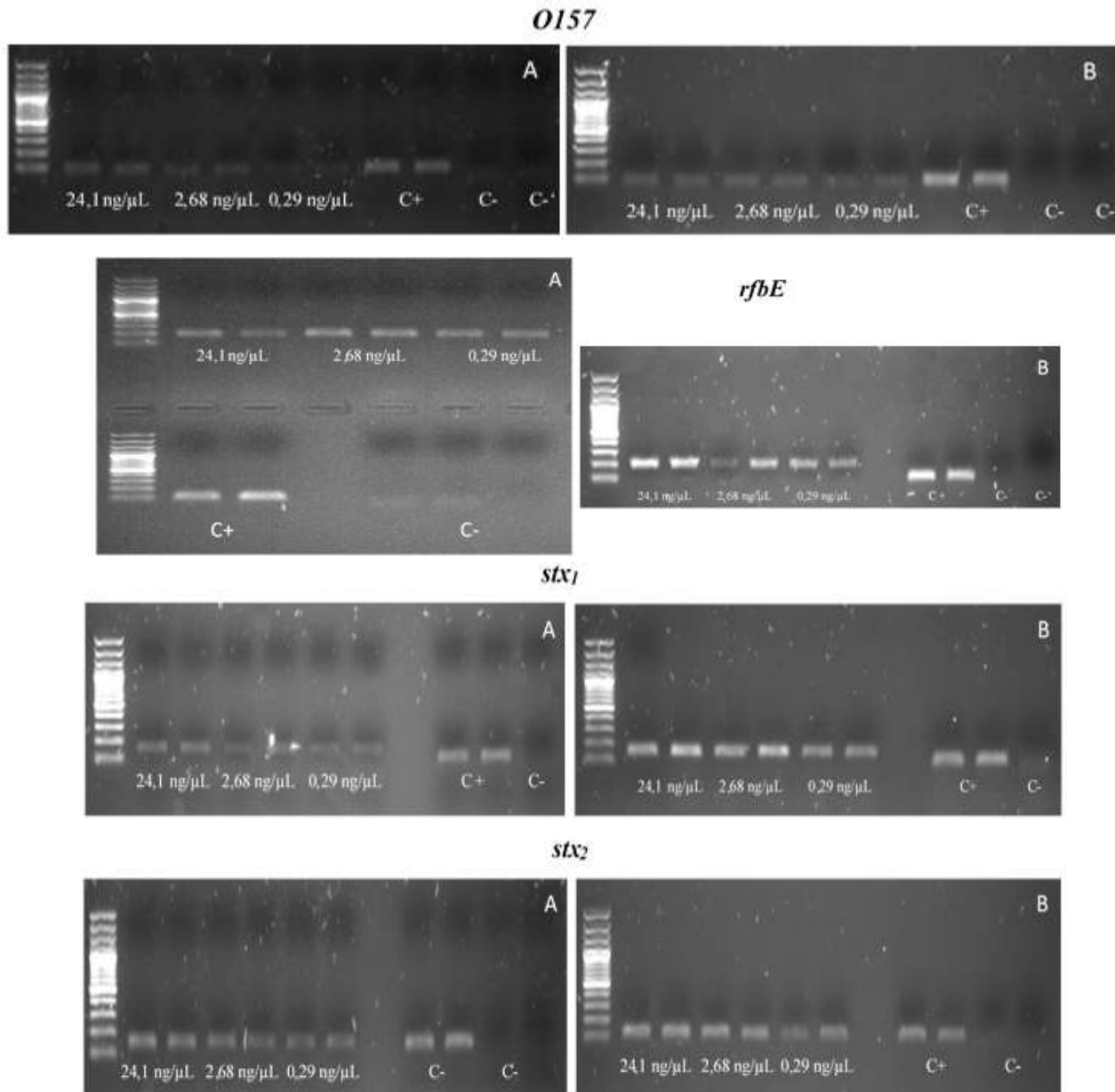
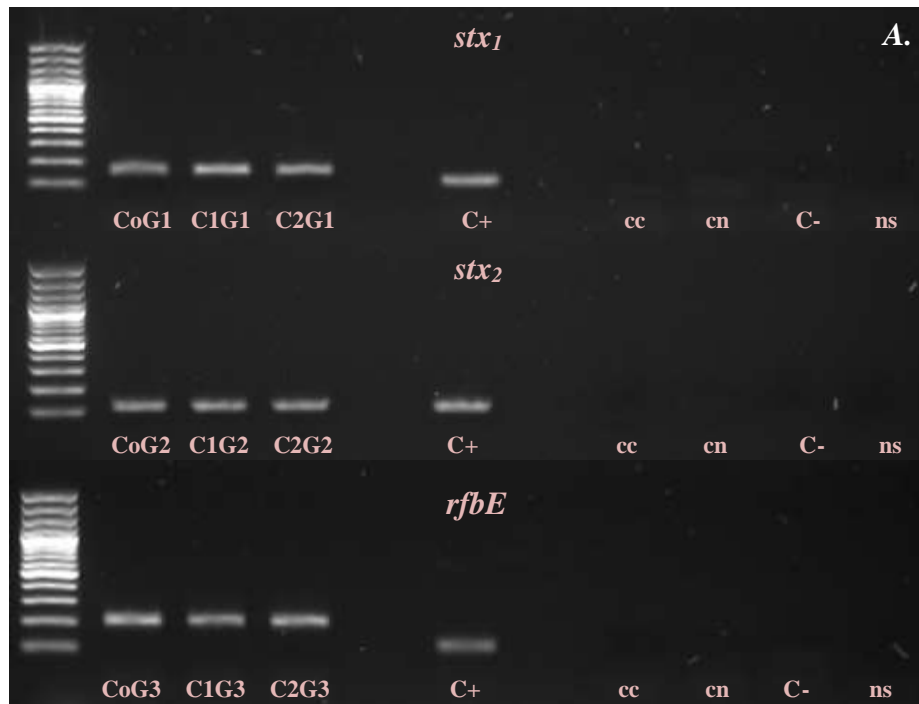


Figura 30. Electroforesis (geles de agarosa), de amplicones para análisis de robustez correspondientes a *stx1* (151 pb), *stx2* (108 pb), *O157* (88 pb) y *rfbE* (199 pb). C+ es control positivo (gen *16S*, 101 pb); C- es control negativo (agua milliQ). **A.** Técnica realizada por operaria 1, kit PCR Supermix (Invitrogen, USA), termociclador BioRad S1000 – Thermal Cycler, día 1. **B.** Técnica realizada por operaria 2, kit Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA), termociclador Multigene, día 2. Geles revelados en fotodocumentador Gel Doc XR Image System. Se usó un ladder de 100 pb.

Aplicación en la matriz contaminada artificialmente. Los ADNs bacterianos se obtuvieron de las mismas muestras de carne empleadas para desarrollar los protocolos de qPCR de la **Sección 4.4** y se desarrolló el mismo diseño de los tres bloques con 11 tratamientos/cada uno, descritos en la **Sección 3.2.6**.

Los resultados pueden apreciarse en la **Figura 31** y se resumen a continuación:

- ❖ El límite de detección fue 4 UFC mL⁻¹
- ❖ No se observaron bandas de amplificación en los controles negativos de STEC (*i.e.* cepa no-STEC).
- ❖ En el bloque III la muestra de carne sin tratamiento alguno, para el gen *stx*₁ se desarrolló una banda pero que no coincidió con el tamaño del gen target, siendo de menor longitud; posiblemente esta señal sea el resultado de dímeros de primers. A esta muestra se le hizo un análisis de NMP y dio menor a 3, valor se encuentra dentro del rango permitido por la norma colombiana (AOAC official methods 966.24, Ed. 18).
- ❖ En los controles negativos correspondientes al blanco (*i.e.* agua peptonada), de los bloques II y III, se observaron unas bandas de poca intensidad, que no coincidieron con el tamaño del amplicón correspondiente al gen evaluado, en ambos casos *stx*₁. También como se mencionó anteriormente, podrían ser el producto de dímeros de primers.



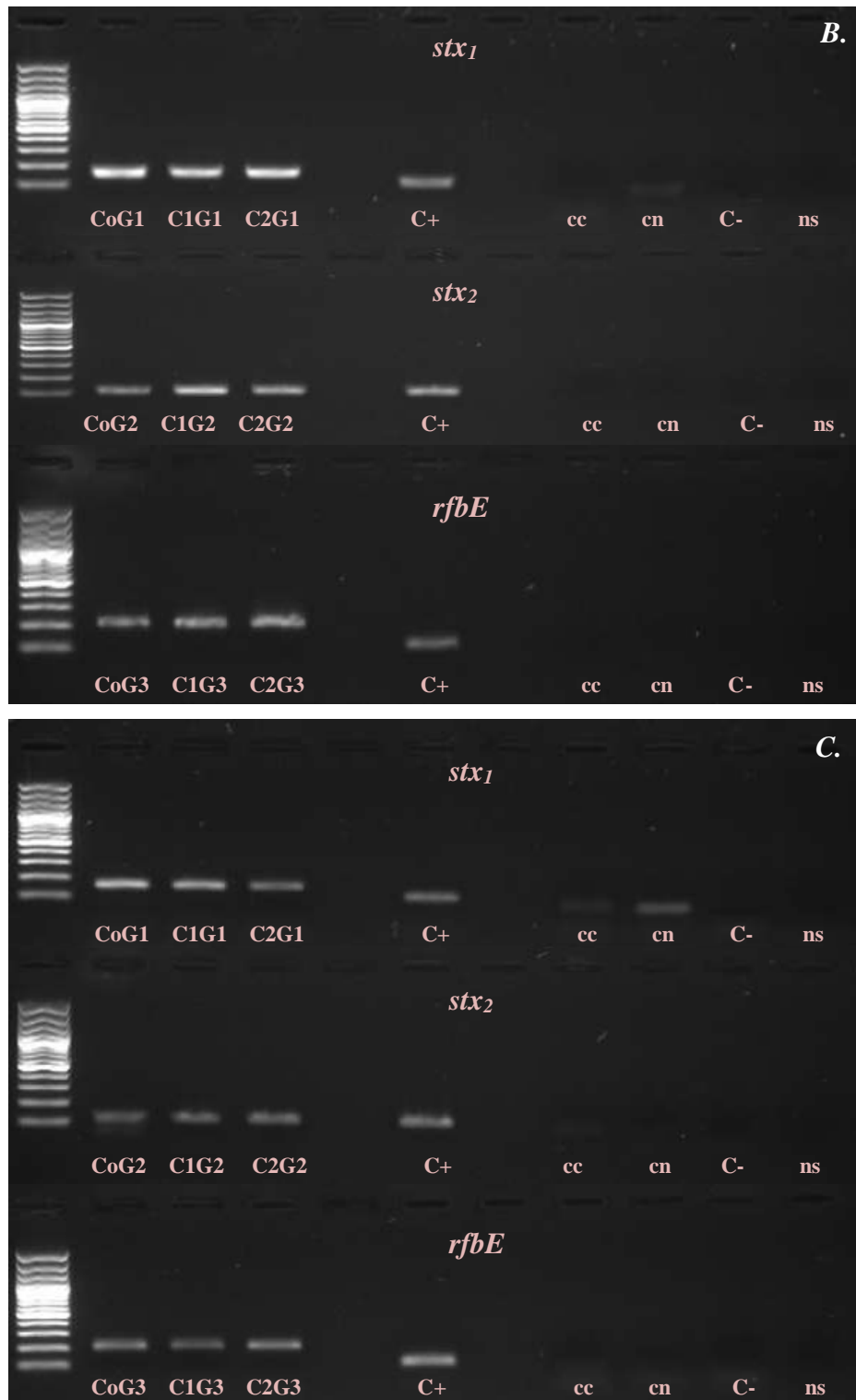


Figura 31. Análisis en una matriz real (carne molida cruda) con PCR convencional, de los genes *rfbE* (199 pb), *stx1* (151 pb) y *stx2* (108 pb), aplicado al diseño experimental de bloques. **A:** Bloque I. **B:** Bloque II. **C:** Bloque III

Son pocas las publicaciones relacionadas con una validación semicuantitativa de la PCR convencional, no obstante, los trabajos que han realizado varios investigadores alrededor de esta técnica en relación a las STEC, fortalecen su aplicación semicuantitativa que propone la presente investigación, con base en los resultados de los parámetros estadísticos ya descritos.

- ❖ El grupo de Acuña *et al.* (2019), recomiendan sus protocolos de PCR múltiple para estudios epidemiológicos y vigilancia en casos de brotes de STEC. Su investigación de tipo cualitativa se centró en la detección de algunos serogrupos de STEC (O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 y O157) en carne, mediante la identificación del gen *wzx*, codificante de flipasa (Acuña *et al.*, 2019).
- ❖ Abdulmawjood *et al.* (2003), validaron una PCR en la que participaron 12 laboratorios de 11 países europeos, que podría emplearse para la identificación temprana de *E. coli* O157, con base en el gen *rfbE*. Los parámetros estadísticos medidos fueron: inclusividad del 92,2 %, especificidad del 100 %, conformidad del 90 % y concordancia del 85 % (Abdulmawjood *et al.*, 2003). Resaltan la importancia de su trabajo respecto a la repetibilidad y reproducibilidad, pero aclaran que es una prueba cualitativa.
- ❖ Leotta *et al.* (2005), reportaron la validación de una PCR multiplex para la detección de STEC, determinando los genes *stx1*, *stx2* y *rfbE*, con valores de inclusividad y exclusividad del 100 % y una concordancia del 100 %. Los investigadores concluyen que una vez validada y optimizada una metodología de PCR puede ser considerada una técnica rápida, precisa, específica y confiable en la detección de *E. coli* O157 (Leotta *et al.*, 2005).
- ❖ Osek y Dacko (2001), desarrollaron una PCR multiplex para STEC O157, evaluando los genes *stx1*, *stx2*, *rfbE*, *ehly* y *eaeA*, en muestras de ganado y de niños, obteniendo 100 % de concordancia. Concluyen que este método cualitativo puede usarse como una prueba rápida, específica y económica para analizar muestras clínicas (OSEK & DACKO, 2001).
- ❖ Van Giau *et al.* (2016), desarrollaron una PCR multiplex para detectar los genes de *stx1* y *stx2* en mariscos, en vegetales y carne. Confrontaron sus resultados con los métodos microbiológicos tradicionales descritos en la norma ISO 16654-2001, y la confirmación fue con la PCR multiplex. Obtuvieron una especificidad del 93.75 % y una concordancia del 96,66 %, logrando detectar un mínimo de 3 UFC mL⁻¹ (Van Giau *et al.*, 2016).

Las PCRs individuales validadas en la presente investigación para detectar *E. coli* O157, a través de los genes que expresan sus toxinas Shiga y el serogrupo O157, pueden representar un aporte importante en lo referente a un diagnóstico rápido, con una certeza muy alta de identificación confiable. Los procedimientos

aplicados en la determinación de los parámetros estadísticos en el desarrollo de la validación que se hizo, respaldan ampliamente la inclusión de esta técnica molecular, en los análisis de muestras alimentarias.

5. Conclusiones

Los resultados satisfactorios de la validación de los protocolos de qPCR desarrollados para detectar de *E. coli* O157a través de los genes de mayor virulencia *stx*₁, *stx*₂ y *rfbE*, garantizan que pueden aplicarse no solo a nivel investigativo, sino también con fines diagnósticos de prevención y seguimiento encaminados a la salud pública, a través del aseguramiento de la calidad alimentaria.

Si bien es cierto que no se desarrolló una qPCR múltiple, con cada gen evaluado en las qPCR individuales, se disminuyen las interferencias entre los amplicones. Las condiciones que se validaron para cada protocolo, permiten el desarrollo rápido y simultáneo de los procedimientos, garantizando así la detección e identificación, de la STEC O157, en periodos cortos de tiempo; con alta especificidad y sensibilidad.

Por los límites de corte hallados para las cuatro secuencias de oligonucleótidos, cercanos a 0,0012 ng μL^{-1} , permiten considerar la qPCR como estrategia de seguimiento y prevención para identificar la STEC O157 en muestras con concentraciones de inóculo muy bajas. La adaptación de estos procedimientos por parte de la industria alimentaria y de entidades de control, les permitiría rastrear este patógeno, en posibles focos de contaminación.

La evaluación del gen *rfbE* junto a las toxinas shiga (Stx₁ y Stx₂), son criterios importantes de aceptación de la técnica de qPCR, dado que contribuyen a una identificación definitiva y confiable de la presencia de *E. coli* del serogrupo O157 en matrices alimentarias, donde la presencia de otros organismos nativos puede opacar la respuesta de esta STEC. La correcta detección de este microorganismo en la matriz de carne molida, valida la eficiencia y la necesidad del uso de esta técnica como apoyo en el diagnóstico.

Al desarrollar un análisis con cultivos puros y una matriz alimentaria real (carne molida cruda) se verificó la utilidad de la qPCR en la identificación presuntiva de STEC O157; esta puede considerarse entonces apropiada para cualquier laboratorio de diagnóstico, dado que una vez sea validada no se requiere mayor capacitación del personal. Además, los análisis de los resultados son sencillos y confiables.

Considerando los % de eficiencia (mayores al 80 %) y los bajos límites de detección (del orden de pg), para las tres secuencias de primers (O157, stx₁ y stx₂), puede entenderse que la metodología aquí presentada para la detección de STEC O157, es apropiada y confiable, por tanto puede recomendarse su aplicación en el área de alimentos porque además, permite discriminar entre el target y la prevalencia de una diversidad de especies propias del mismo.

6. Perspectivas futuras

Los resultados obtenidos en esta investigación, son un punto de partida para seguir trabajando en las características de los protocolos de qPCR para ampliar la detección de *E. coli* O157 en diversas matrices alimentarias, con base en el perfil de virulencia propio de esta cepa. En consecuencia, las investigaciones próximas podrían enfocarse en los siguientes aspectos:

- Estudiar el efecto de las concentraciones de los primers (menores a cinco μM), en la eficiencia de las reacciones de amplificación, debido a que puede influir en este factor que determina el desarrollo apropiado de la polimerización.
- Aplicar pruebas microbiológicas más selectivas y específicas de STEC O157, para confirmar su presencia con mayor certeza.
- Ampliar la evaluación de los genes de virulencia a otros genes que también se han reconocidos como críticos en los procesos de infección causados por STEC O157, tales como los que expresan enterohemolisina, adhesinas e intimina.
- Desarrollar ensayos con un mayor número de repeticiones, para contar con perfiles estadísticos más amplios.

Desarrollar otras técnicas además de las metodologías de cultivo y bioquímicas, como son las pruebas serológicas, que confirmen la presencia de *E. coli* O157 y a la vez soporten los resultados que se obtienen con qPCR.

A. Inclusividad para la técnica de qPCR evaluando los pares de oligonucleótidos rfbE, O157, Stx1 y Stx2

rfbE				
Muestra	Ct	Ds	Media	CV (%)
LAMA 448	19,88	0,26	19,69	1,33
	19,51			
LAMA 603	19,57	0,21	19,72	1,04
	19,86			
LAMA 525	18,15	0,47	18,48	2,56
	18,82			
LAMA 540	22,04	0,51	21,68	2,35
	21,32			
LAMA 543	24,09	0,41	23,80	1,72
	23,51			
LAMA 545	21,16	0,29	21,37	1,39
	21,58			
LAMA 564	20,00	0,04	19,96	0,25
	19,93			
LAMA 882	19,70	0,28	19,89	1,39
	20,09			
LAMA 541	20,70	0,23	20,86	1,08
	21,02			
C+ 16S	13,09	0,19	13,23	1,49
	13,37			
C+ rfbE	18,95	0,13	18,86	0,71
	18,76			
C-	---	---	---	---

O157				
Muestra	Ct	Ds	Media	CV (%)
LAMA 448	$\frac{22,30}{21,74}$	0,40	22,02	1,80
LAMA 603	$\frac{20,90}{20,62}$	0,20	20,76	0,95
LAMA 525	$\frac{19,79}{20,05}$	0,18	19,92	0,92
LAMA 540	$\frac{22,49}{25,20}$	1,92	23,84	8,03
LAMA 543	$\frac{24,34}{23,39}$	0,67	23,86	2,81
LAMA 545	$\frac{22,35}{22,31}$	0,03	22,33	0,13
LAMA 564	$\frac{22,05}{21,96}$	0,064	22,01	0,29
LAMA 882	$\frac{20,66}{21,88}$	0,86	21,27	4,06
LAMA 541	$\frac{22,52}{23,12}$	0,42	22,82	1,86
C+ 16S	$\frac{13,22}{14,09}$	0,62	13,66	4,51
C+ O157	$\frac{22,16}{20,09}$	1,46	21,12	6,93
C-	$\frac{---}{---}$	---	---	---

Stx1				
Muestra	Ct	Ds	Media	CV (%)
LAMA 1384	16,53	0,25	16,71	1,52
	16,89			
LAMA 1444	15,10	0,08	15,04	0,56
	14,98			
LAMA 448	16,22	0,06	16,18	0,35
	16,14			
LAMA 685	16,15	0,13	16,06	0,79
	15,97			
LAMA 683	15,32	0,05	15,29	0,32
	15,25			
LAMA 1438	15,20	0,13	15,29	0,83
	15,38			
LAMA 1446	16,13	0,06	16,17	0,35
	16,21			
LAMA 1456	15,35	0,04	15,38	0,28
	15,41			
<i>E. coli</i> O157:H7	15,09	0,10	15,02	0,66
	14,95			
C+ 16S	12,51	0,13	12,61	1,07
	12,70			
C+ <i>stx1</i>	14,79	0,23	14,63	1,55
	14,47			
C-	---	---	---	---

Muestra	Stx2			
	Ct	Ds	Media	CV (%)
LAMA 448	16,54 16,56	0,01	16,55	0,08
LAMA 1462	15,71 15,77	0,04	15,74	0,27
LAMA 1456	16,03 16,06	0,02	16,04	0,13
LAMA 540	17,16 17,49	0,23	17,32	1,35
LAMA 564	17,02 16,57	0,32	16,80	1,90
LAMA 882	16,04 15,95	0,06	15,99	0,40
LAMA 541	16,51 16,62	0,08	16,56	0,47
LAMA 840	15,84 15,59	0,18	15,72	1,12
LAMA 683	16,20 16,08	0,08	16,14	0,53
C+ 16S	13,23 13,34	0,08	13,28	0,58
C+ stx2	15,73 15,49	0,17	15,61	1,09
C-	--- ---	---	---	---

B. Pruebas bioquímicas desarrolladas para cada uno de los tratamientos del diseño experimental por bloques en carne molida bovina cruda

Bloque I

Tratamiento C0G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Ciente de bioMérieux: Editado 01-oct-2019 15:50 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g1, LACMA investigacion N° paciente: 11309
 Aislamiento: 11309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356251 Prueba de instrumento: 00001B144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050026200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 17:08 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4.90 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad	Escherichia coli O157	
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050026200	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83),			

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IAPL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 06.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de Interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C0G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:51 COT
 Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g2, LACMA investigacion Nº paciente: 21309
 Aislamiento: 21309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356257 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150026200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
--------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 17:06 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,90 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150026200		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(B3).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHiSa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C0G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:51 COT
Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g3, LACMA investigacion Nº paciente: 31309
Aislamiento: 31309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356256 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 18:04 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		
	Bionúmero: 0405610050006200	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:	Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno		
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)	Escherichia coli O157 PHOS(83)		

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:51 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g1, LACMA investigacion N° paciente: 41309
 Aislamiento: 41309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356250 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150006200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 18:04 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150006200		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83),			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CiT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:52 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g2, LACMA investigacion N° paciente: 51309
 Aislamiento: 51309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356603 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050026200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 17:05 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,88 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050026200		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(B3).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHSa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:52 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g3, LACMA investigacion N° paciente: 61309
 Aislamiento: 61309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356261 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (CÓLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405611150027210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 18:02 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,85 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405611150027210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHDS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	(-)	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Cliente de bioMérieux: Editado 01-oct-2019 15:52 COT
 Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g1, LACMA investigacion Nº paciente: 71309
 Aislamiento: 71309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356608 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 2407710151446211 Organismo seleccionado: Hafnia alvei
 Cantidad de organismo:

Comentarios:	
--------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	Nº de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 18:17 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 6,10 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	88% Probabilidad Hafnia alvei		Nivel de confianza: Identificación aceptable
Bionúmero: 2407710151446211			
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Hafnia alvei ADO(1).CMT(22).SAC(1).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01 Guía de interpretación terapéutica:
 Guía de interpretación de CMI: Última modificación de parámetros de AES:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: Informe de examen Editado 01-oct-2019 15:52 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g2, LACMA investigacion N° paciente: 81309
 Aislamiento: 81309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356607 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610470026210 Organismo seleccionado: Escherichia coli

Cantidad de organismo:

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 17:03 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	95% Probabilidad	Escherichia coli	
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610470026210	Nivel de confianza:	Identificación muy buena
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Escherichia coli dTAG(22),PHOS(81),BGUR(83).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	WRL	-	7	dCEL	-	9	8GAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	LURE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	PHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	(-)	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01 Guía de Interpretación terapéutica:
 Guía de interpretación de CMI: Última modificación de parámetros de AES:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Cliente de bioMérieux: Editado 01-oct-2019 15:53 COT
 Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g3, LACMA investigacion Nº paciente: 91309
 Alastamiento: 91309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356606 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	Nº de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 18:02 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,85 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050006210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(B3).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHiSa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento no-STEC

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Ciente de bioMérieux: Informe de examen Editado 01-oct-2019 15:53 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: ns1, LACMA Investigación N° paciente: 101309
 Aislamiento: 101309-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410707403356255 Prueba de Instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610460066600
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410707403	Fecha caduc.: 03-nov-2019 12:00 COT
	Finalizado: 13-sep-2019 17:31 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,35 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad	Escherichia coli	
	Bionúmero: 0405610460066600	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Escherichia coli dTAG(22).			

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	(+)
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Bloque II**Tratamiento C0G1**

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:45 COT
Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g1, LACMA investigacion N° paciente: 12409
Aislamiento: 12409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614261 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150406200
Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:47 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,88 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150406200		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C0G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:47 COT
 Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g2, LACMA investigacion Nº paciente: 22409
 Aislamiento: 22409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103513452 Prueba de instrumento: 000015144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,83)

Información de identificación	Tarjeta: GN	Nº de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:47 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,88 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Bionúmero: 0405610050006200			
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Escherichia coli O157 PHOS(83)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CML:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C0G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:47 COT
 Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g3, LACMA investigacion Nº paciente: 32409
 Aislamiento: 32409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103513447 - Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:47 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,88 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad	Escherichia coli O157	
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050006200	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83),			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLtp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	+	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	CDC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 06.01
 Guía de interpretación de CMi:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux:
Equipo N°:

Informe de examen

Editado 01-oct-2019 15:48 COT
Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g1, LACMA investigacion
Aislamiento: 42409-1 (Para revisar)

N° paciente: 42409

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103513639 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150406210

Cantidad de organismo:

Organismo seleccionado: **Escherichia coli O157**

Comentarios:	

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:45 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad	Escherichia coli O157	
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150406210	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83).			

Detalles bioquímicos

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL (-)	45	PHOS	-	
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 06.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Tratamiento C1G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:48 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g2, LACMA investigacion N° paciente: 52409
 Aislamiento: 52409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103513638 Prueba de Instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:45 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050006200		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83),			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:48 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g3, LACMA investigacion N° paciente: 62409
 Aislamiento: 62409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614252 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:45 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050006200		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	DOC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:49 COT
Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g1, LACMA Investigación N° paciente: 72409
Aislamiento: 72409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614255 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0.50 - 0.63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:45 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,87 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		
	Bionúmero: 0405610050006200	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas. Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	=
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Cliente de bioMérieux: Editado 01-oct-2019 15:49 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g2, LACMA investigacion N° paciente: 82409
 Aislamiento: 82409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614256 Prueba de instrumento: 0000181448D4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050006200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 16:44 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,85 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Escherichia coli O157		
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050006200	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83),			

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 01-oct-2019 15:49 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g3, LACMA investigacion N° paciente: 92409
 Aislamiento: 92409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614257 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050026200
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0.50 - 0.63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 15:45 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,88 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		
	Bionúmero: 0405610050026200	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:	Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno		
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)	Escherichia coli O157 PHOS(83).		

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLtp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento no-STEC

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Cliente de bioMérieux: Editado 01-oct-2019 15:49 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: ns1, LACMA Investigacion N° paciente: 102409
 Aislamiento: 102409-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614258 Prueba de instrumento: 00001B144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610440026601
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli**

Comentarios:

Patrón McFarland: (0.50 - 0.63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 24-sep-2019 14:46 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 3,90 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Escherichia coli		Nivel de confianza: Identificación excelente
Bionúmero: 0405610440026601			
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISe	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Bloque III**Tratamiento C0G1**

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Ciente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:39 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g1, LACMA investigacion N° paciente: 10110
 Aislamiento: 10110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614355 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405611151527211
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 02-oct-2019 01:34 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 9,95 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	93% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación muy buena
Organismo SRF	Bionúmero: 0405611151527211		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 IMLTa(B3),CIT(1),PHOS(B3).			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	(-)
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	ILDC	+	53	IHI Sa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C0G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:39 COT
 Equipo Nº: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g2, LACMA Investigacion Nº paciente: 20110
 Aislamiento: 20110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614246 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150026210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 20:25 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,82 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150026210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83),			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	6	dCEL	-	7	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C0G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Cliente de bioMérieux: Editado 02-oct-2019 15:39 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c0g3, LACMA investigación N° paciente: 30110
 Aislamiento: 30110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614247 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405611150526210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 21:39 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 6,03 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405611150526210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(B3),			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	(-)	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:40 COT
 Equipo N°: _____ Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g1, LACMA investigacion N° paciente: 40110
 Aislamiento: 40110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614248 Pruebas de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150426210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 21:38 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 6,02 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad	Escherichia coli O157	
	Bionúmero: 0405610150426210	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:	Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno		
Perfil(es) típico(s) conraindicante(s)	Escherichia coli O157 PHOS(83),		

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	+	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	(-)	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Ciente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:40 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g2, LACMA investigación N° paciente: 50110
 Aislamiento: 50110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614249 Prueba de instrumento: 00001B144BD4 (COLMAYDF)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150426210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 21:22 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,77 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150426210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(B3),			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	LIRE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	(+)	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHIa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C1G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Informe de examen

Cliente de bioMérieux: Editado 02-oct-2019 15:40 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c1g3, LACMA investigacion N° paciente: 60110
 Aislamiento: 60110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614250 Prueba de instrumento: 0000181448D4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610050026210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 20:24 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,80 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610050026210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Escherichia coli O157 PHOS(83),			

Detalles bioquímicos

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOH	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	iHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G1

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Ciente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:40 COT
Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g1, LACMA investigación N° paciente: 70110
Aislamiento: 70110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410676103614251 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150026210
Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
--------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410676103	Fecha caduc.: 03-oct-2019 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 20:23 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,78 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150026210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento C2G2

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA																	
Cliente de bioMérieux: Equipo N°:	Informe de examen	Editado 02-oct-2019 15:40 COT Editado por: LABORATORIO															
Nombre del paciente: c2g2, LACMA investigacion Aislamiento: 80110-1 (Para revisar)		Nº paciente: 80110															
Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410900403240417 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR) Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)																	
Bionúmero: 0405610150526211 Cantidad de organismo: Organismo seleccionado: Escherichia coli O157																	
Comentarios:																	
Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)																	
Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410900403	Fecha caduc.: 14-may-2020 12:00 COT														
	Finalizado: 01-oct-2019 21:35 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,96 horas														
Origen del organismo	VITEK 2																
Organismo seleccionado	98% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente														
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150526211																
Organismos de análisis y pruebas a separar:																	
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno																	
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83).																	
Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	38	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	+	64	ILATa	-			
Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01 Guía de interpretación de CMI: Nombre de juego de parámetros de AES:				Guía de interpretación terapéutica: Última modificación de parámetros de AES:													
				Página 1 de 1													

Tratamiento C2G3

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Ciente de bioMérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:41 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: c2g3, LACMA investigación N° paciente: 90110
 Aislamiento: 90110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410900403240402 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610150527210
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli O157**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410900403	Fecha caduc.: 14-may-2020 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 21:35 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,98 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	96% Probabilidad Escherichia coli O157		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610150527210		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: Confirmar mediante pruebas serológicas Organismo altamente patógeno			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Escherichia coli O157 PHOS(83)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAIap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	(-)	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Tratamiento no-STEC

COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA

Cliente de biomérieux: **Informe de examen** Editado 02-oct-2019 15:41 COT
 Equipo N°: Editado por: LABORATORIO

Nombre del paciente: ns1_LACMA Investigación N° paciente: 100110
 Aislamiento: 100110-1 (Para revisar)

Tipo de tarjeta: GN Código de barras: 2410900403240401 Prueba de instrumento: 000018144BD4 (COLMAYOR)
 Técnico de preparación: COLEGIO MAYOR DE ANTIOQUIA(LABORATORIO)

Bionúmero: 0405610450026600
 Cantidad de organismo: **Organismo seleccionado: Escherichia coli**

Comentarios:	
---------------------	--

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 2410900403	Fecha caduc.: 14-may-2020 12:00 COT
	Finalizado: 01-oct-2019 19:37 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,03 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Escherichia coli		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610450026600		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	SKG	-
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 08.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Página 1 de 1

Bibliografía

- Abdulmawjood, A., Bülte, M., Cook, N., Roth, S., Schönenbrücher, H., & Hoorfar, J. (2003). Toward an international standard for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157: Part 1. Assay development and multi-center validation. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 775–786. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.012>
- Acuña, P., Florentín, M., Rojas, N., Rodríguez, F., & Guillén, R. (2019). Estandarización de una técnica de PCR múltiple para la detección de los serogrupos O157, O104 y “big six” de *Escherichia coli* productora de la toxina Shiga (STEC). *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 17 (2), 71–76.
- Aguilera, P., Ruiz-Tachiquín, M.-E., Rocha, M., Pineda, B., & Chanez-Cardenas, M. (2014). *PCR en tiempo real*. Recopilado en: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teórico prácticos. 175-201. México.
- Allison, H. E., Sergeant, M. J., James, C. E., Saunders, J. R., Smith, D. L., Sharp, R. J., ... McCarthy, A. J. (2003). Immunity Profiles of Wild-Type and Recombinant Shiga-Like Toxin-Encoding Bacteriophages and Characterization of Novel Double Lysogens. *Infection and Immunity*, 71(6), 3409–3418. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3409-3418.2003>
- Amani, J., Ahmadpour, A., Imani Fooladi, A. A., & Nazarian, S. (2015). Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR-ELISA. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 19(3), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.02.008>
- AOAC. Coliform group and *Escherichia coli* in tree nut meats microbiological method, official Method 966.24. 18 ed. Official methods of analysis of AOAC International.
- AU - Jiang, M., AU - Zhang, H., & AU - Pfeifer, B. A. (2013). The Logic, Experimental Steps, and Potential of Heterologous Natural Product Biosynthesis Featuring the Complex Antibiotic

- Erythromycin A Produced Through *E. coli*. *JoVE*, (71), e4346.
<https://doi.org/doi:10.3791/4346>
- Baker, C. A., Rubinelli, P. M., Park, S. H., Carbonero, F., & Ricke, S. C. (2016). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. *Food Control*, 59, 407–419. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.011>
- Balakrishnan, B., Barizuddin, S., Wuliji, T., & El-Dweik, M. (2016). A rapid and highly specific immunofluorescence method to detect *Escherichia coli* O157: H7 in infected meat samples. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 54–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.017>
- Bergan, J., Dyve Lingelem, A. B., Simm, R., Skotland, T., & Sandvig, K. (2012). Shiga toxins. *Toxicon*, 60(6), 1085–1107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.07.016>
- Bolívar Zapata, F., Arias Ortiz, C. F., Ascacio Martínez, J. A., Barrera Saldaña, H. A., Bolívar Zapata, F. G., Bosch Guha, P., ... Viniegra González, G. (2004). *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna*.
- Brandal, L. T., Wester, A. L., Lange, H., Lobersli, I., Lindstedt, B. A., Vold, L., & Kapperud, G. (2015). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992–2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 324–326. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1017-6>
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., ... Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 37. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.008>
- Brusa, V. (2015). Desarrollo y validación intralaboratorio de una metodología para la detección y aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en carne bovina molida. desarrollo de estrategias de control. Universidad de la Plata. Argentina.
- Brusa, V., Aliverti, V., Aliverti, F., Ortega, E. E., de la Torre, J. H., Linares, L. H., ... Leotta, G. A. (2012). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00171>
- Brusa, V., Galli, L., Linares, L. H., Ortega, E. E., Lirón, J. P., & Leotta, G. A. (2015).

- Development and validation of two SYBR green PCR assays and a multiplex real-time PCR for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat. *Journal of Microbiological Methods*, *119*, 10–17.
<https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.09.013>
- Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(2), 247–272.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.004>
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*, *14*, 19–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). *Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y Escherichia coli por la técnica de diluciones en tubo múltiple (Número más Probable o NMP)*. México: Facultad de Química, UNAM.
- Chan, Y. S., & Ng, T. B. (2016). Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 100. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7236-3>
- Chart, H. (2000). VTEC enteropathogenicity. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(S1), 12S--23S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2000.tb05328.x>
- Cherla, R. P., Lee, S.-Y., & Tesh, V. L. (2003). Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiology Letters*, *228*(2), 159–166. Retrieved from [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00761-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00761-4)
- Dean-Nystrom, E. A., Bosworth, B. T., Cray, W. C., & Moon, H. W. (1997). Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and Immunity*, *65*(5), 1842–1848. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC175228/>
- Deisingh, A. K., & Thompson, M. (2004). Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Journal of Applied Microbiology*, *96*(3), 419–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2003.02170.x>
- Elízaquivel Bárcenas, P. (2009). *Detección y cuantificación de Escherichia coli O157:H7 Listeria monocytogenes, Salmonella spp y Staphylococcus aureus en alimentos vegetales mediante*

- PCR a tiempo real*. Universidad de Valencia. España. Retrieved from <http://roderic.uv.es/handle/10550/38154>
- Elizaquível, P., Sánchez, G., & Aznar, R. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25(2), 704–708. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.003>
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 438–450. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., ... Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162(2), 190–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008>
- Ferreira, M. R. A., Filho, E. G. F., Pinto, J. F. N., Dias, M., & Moreira, C. N. (2014). Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0541-5>
- Flórez, Mourenza, Á. (2013). *Utilización de microorganismos para la producción de energías renovables*. Universidad de la Coruña. Facultad de ciencias. España
- Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, 12(Supplement C), 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>
- Franco Anaya, P. A., Ramírez Medina, L. M., Orozco Ugarriza, M. E., & López Gutiérrez, L. A. (2013). Determination of *Escherichia Coli* and identification of the o157:h7 serotype in pork's meat commercialized in the most important supermarkets in Cartagena, Colombia. *Revista Lasallista de Investigación*, 10(1), 91–100. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492013000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es

- Frankel, G., Phillips, A. D., Trabulsi, L. R., Knutton, S., Dougan, G., & Matthews, S. (2001). Intimin and the host cell - Is it bound to end in Tir(s)? *Trends in Microbiology*, 9(5), 214–218. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02016-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02016-9)
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., & González-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00129>
- Ge, B. L., Zhao, S. H., Hall, R., & Meng, J. H. (2002). A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Microbes and Infection*, 4(3), 285–290. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01540-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01540-x)
- Gohar, A., Abdeltawab, N. F., Fahmy, A., & Amin, M. A. (2016). Development of safe, effective and immunogenic vaccine candidate for diarrheagenic Escherichia coli main pathotypes in a mouse model. *BMC Research Notes*, 9(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1891-z>
- Goji, N., Mathews, A., Huszczyński, G., Laing, C. R., Gannon, V. P. J., Graham, M. R., & Amoako, K. K. (2015). A new pyrosequencing assay for rapid detection and genotyping of Shiga toxin, intimin and O157-specific rfbE genes of Escherichia coli. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.12.003>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., ... Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic Escherichia coli. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(Suppl 1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gracias, K. S., & McKillip, J. L. (2004). A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(11), 883–890. <https://doi.org/10.1139/w04-080>
- Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing Escherichia coli: An overview. *Journal of Animal Science*, 85, E45–E62. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>
- Hannaoui Rodríguez, E. J., Villalobos, L. B., & Martínez Nazaret, R. E. (2009). Escherichia coli

- shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 13–20. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *PCR Methods & Applications*. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hoffman, M. A., Menge, C., Casey, T. A., Laegreid, W., Bosworth, B. T., & Dean-Nystrom, E. A. (2006). Bovine Immune Response to Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(12), 1322–1327. <https://doi.org/10.1128/CVI.00205-06>
- Hu, J., Wang, B., Fang, X., Means, W. J., McCormick, R. J., Gomelsky, M., & Zhu, M. J. (2013). C-di-GMP signaling regulates *E. coli* O157:H7 adhesion to colonic epithelium. *Veterinary Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.023>
- Hunt, J. M. (2010). Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 21–45. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.11.001>
- Hussein, H. S., & Bollinger, L. M. (2005). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Science*, 71(4), 676–689. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.05.012>
- Iguchi, A., Thomson, N. R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I. R., ... Frankel, G. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *Journal of Bacteriology*, 91(1), 347–354. <https://doi.org/10.1128/JB.01238-08>
- ISO 16140-2. *Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.* , (2016).
- Jensen, B. H., Olsen, K. E. P., Struve, C., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-13>
- Johannes, L., & Romer, W. (2010). Shiga toxins from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Micro*, 8(2), 105–116. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2279>

- Jothikumar, N., & Griffiths, M. W. (2002). Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. *Appl Environ Microbiol*, 68(6), 3169–3171. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.3169>
- Jure, M. A., Condorí, M. S., Terrazzino, G. P., Catalán, M. G., Campo, A. L., Zolezzi, G., ... Castillo, M. (2015). Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(2), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.006>
- Kagkli, D.-M., Weber, T. P., Van den Bulcke, M., Folloni, S., Tozzoli, R., Morabito, S., ... Van den Eede, G. (2011). Application of the Modular Approach to an In-House Validation Study of Real-Time PCR Methods for the Detection and Serogroup Determination of Verocytotoxigenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6954–6963. <https://doi.org/10.1128/AEM.05357-11>
- Kargar, M., & Homayoon, M. (2015). Prevalence of shiga toxins (stx1, stx2), eaeA and hly genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains among children with acute gastroenteritis in southern of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(1), 24–28. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60182-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60182-6)
- Karmali, M. A., Gannon, V., & Sargeant, J. M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 360–370. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011>
- Kavaliauskiene, S., Dyve Lingelem, A. B., Skotland, T., & Sandvig, K. (2017). Protection against Shiga Toxins. *Toxins*, 9(2), 44. <https://doi.org/10.3390/toxins9020044>
- Kobayashi, N., Lee, K., Yamazaki, A., Saito, S., Furukawa, I., Kono, T., ... Hara-Kudo, Y. (2013). Virulence Gene Profiles and Population Genetic Analysis for Exploration of Pathogenic Serogroups of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), 4022–4028. <https://doi.org/10.1128/JCM.01598-13>
- Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>

- Krüger, A., & Lucchesi, P. M. A. (2015). Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. *Microbiology*, *161*(3), 451–462. Retrieved from <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000003>
- Law, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(5), 729–745. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01031.x>
- Leotta, G. A., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I. C., Motter, M., ... Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista Argentina de Microbiología*, *37*(1), 1–10.
- Lim, J. Y., Yoon, J., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.4014/jmb.0908.08007>
- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Silva Lopes, T. da. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e Investigación Agraria*, *35*, 77–86. Retrieved from https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202008000100008&nrm=iso
- López Antuñano, F. J., & Mota, J. (2000). Desarrollo de agentes inmunizantes contra el dengue TT - Development of immunizing agents against dengue. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *7*(5), 285–292. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892000000500001>
- Low, J. C., McKendrick, I. J., McKechnie, C., Fenlon, D., Naylor, S. W., Currie, C., ... Gally, D. L. (2005). Rectal Carriage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in Slaughtered Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(1), 93–97. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.93-97.2005>
- Mainil, J. (1999). Shiga/Verocytotoxins and Shiga/ verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. In *Veterinary research* (Vol. 30).
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *152*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>

- Martínez Manrique, C. E. (2006). Modulación de la respuesta inmune: tendencias actuales. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002006000400009&lng=es&tlng=es
- Mead, P. S., & Griffin, P. M. (1998). Escherichia coli O157 : H7. *The Lancet*, 352, 1207–1212. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)01267-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)01267-7)
- Melton-Celsa, A., Mohawk, K., Teel, L., & O'Brien, A. (2012). Pathogenesis of Shiga-toxin producing Escherichia coli. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. https://doi.org/10.1007/82_2011_176
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural, & Ministerio de Salud y Protección Social. (2015). *Resolución número 00002690 de 2015*. (0), 4.
- Moxley, R. A. (2004). Escherichia coli O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Animal Health Research Reviews*, 5(1), 15–33. <https://doi.org/DOI:10.1079/AHRR200463>
- Newell, D. G., & La Ragione, R. M. (2018). Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases*, 65. <https://doi.org/10.1111/tbed.12789>
- Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>
- NTC-ISO/IEC 17025. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. , (2017).
- Nyambe, S., Burgess, C., Whyte, P., & Bolton, D. (2017). An investigation of vtx2 bacteriophage transduction to different Escherichia coli patho-groups in food matrices and nutrient broth. *Food Microbiology*, 68, 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.004>
- O'Brien, A. D., Tesh, V. L., Donohue-Rolfe, A., Jackson, M. P., Olsnes, S., Sandvig, K., ... Keusch, G. . (1992). Shiga Toxin: Biochemistry, Genetics, Mode of Action, and Role in Pathogenesis. *Sansonetti P.J. (Eds) Pathogenesis of Shigellosis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 180, 65–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3->

642-77238-2_4

- Ochoa, T. J., Mercado, E. H., Durand, D., Rivera, F. P., Mosquito, S., Contreras, C., ... Ruiz, J. (2011). Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*.
<https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000100003>
- Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. (2018). *Escherichia Coli* Verocitotoxigénica. Recopilado en *Manual de la pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres*, (pp. 1–12), 27ª ed. <https://www.oie.int/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
- Omisakin, F., MacRae, M., Ogden, I. D., & Strachan, N. J. C. (2003). Concentration and Prevalence of *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces at Slaughter. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(5), 2444–2447. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2444-2447.2003>
- OSEK, J., & DACKO, J. (2001). Development of a PCR-Based Method for Specific Identification of Genotypic Markers of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(Pulawy, Poland), 771–778.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2001.00508.x>
- Page, A. V., & Liles, W. C. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Medical Clinics of North America*, 97(4), 681–695.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.04.001>
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2002). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31(3), 535–546. Retrieved from http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000300020&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Panigatti, M. C., Griffa, C., Boglione, R., Gentinetta, F., & Cassina, D. (2012). USO DE *ESCHERICHIA COLI* PARA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES CONTAMINADOS POR CROMO (VI). *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 11–24. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323627686002>
- Patiño, P. J., & López, M. T. (2006). Replicación del ADN. In F. E. Biogénesis (Ed.), *Biología de la célula* (pp. 119–132).

- Paton, J. C., & Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 450–479. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88891/>
- Pennington, H. (2010). *Escherichia coli* O157. *The Lancet*, 376(9750), 1428–1435. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60963-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60963-4)
- Piedrahita, D., Márquez, T., & Máttar, S. (2001). *DETECCIÓN DE Escherichia coli 0157: H7 EN POBLACIONES PORCINAS, CANAL BOVINA Y PRODUCTOS CÁRNICOS EN EL DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA*. *Revista MVZ Córdoba*, 6, (2), 2001, 119-126.
- Polito, M. G., & Kirsztajn, G. M. (2010). Microangiopatias trombóticas: púrpura trombocitopênica trombótica e síndrome hemolítico-urémica. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 32(3), 303–315. <https://doi.org/10.1590/S0101-28002010000300013>
- Poolman, J. T. (2017). *Escherichia coli*. In *International Encyclopedia of Public Health* (pp. 585–593). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00504-X>
- Prado J, V., & Cavagnaro S.M, F. (2008). Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. *Revista Chilena de Infectología*, 25(6), 435–444. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000600003>
- Price, S. B., Wright, J. C., DeGraves, F. J., Castanie-Cornet, M.-P., & Foster, J. W. (2004). Acid Resistance Systems Required for Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the Bovine Gastrointestinal Tract and in Apple Cider Are Different. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4792–4799. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4792-4799.2004>
- QUIAGEN. (2016). QIAamp DNA Mini Blood Mini Handbook - EN. Retrieved from <https://www.qiagen.com/ie/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>
- Riemann, H. P., & Cliver, D. O. (1998). *Escherichia Coli* O157:H7. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 14(1), 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30278-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30278-4)
- Rivas, L., Mellor, G. E., Gobius, K., & Fegan, N. (2015). *Detection and Typing Strategies for*

- Pathogenic Escherichia coli* (R. W. Hartel, Ed.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2346-5>
- Rivas, M., Leotta, G., & Chinen, I. (2008). Manual de Procedimientos “Detección de STEC 0157 en alimentos.” *Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas*, 1–10.
- Rodríguez, L., Torres, V., Martínez, Jay, O., Noda, A. C., & Herrera, M. (2011). Modelos para estimar la dinámica de crecimiento de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-169. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 45(4), 349–354. Retrieved from <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-cubana-de-ciencia-agricola/articulo/modelos-para-estimar-la-dinamica-de-crecimiento-de-pennisetum-purpureum-vc-cuba-ct-169>
- Rodríguez, M. & Rodríguez, W. (2006). *Métodos físico-químicos en Biotecnología (2006-II)*. Instituto de Biotecnología. Universidad Autónoma de México.
- Roldán, M. L., Chinen, I., Otero, J. L., Miliwebsky, E. S., Alfaro, N., Burns, P., & Rivas, M. (2007). Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(2), 113–119.
- Sandvig, K., Lingelem, A. B. D., Skotland, T., & Bergan, J. (2015). *10 - Shiga toxins: properties and action on cells* (J. Alouf, D. Ladant, & M. R. B. T.-T. C. S. of B. P. T. (Fourth E. Popoff, Eds.). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800188-2.00010-0>
- Shaikh, N., & Tarr, P. I. (2003). *Escherichia coli* O157:H7 Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages: Integrations, Excisions, Truncations, and Evolutionary Implications. *Journal of Bacteriology*, 185(21), 6495–6495. <https://doi.org/10.1128/JB.185.21.6495.2003>
- Sidari, R., & Caridi, A. (2011). Methods for Detecting Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* in Food. *Food Reviews International*, 27(2), 134–153. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.535232>
- Singh, P., & Mustapha, A. (2015). Multiplex real-time PCR assays for detection of eight Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food samples by melting curve analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 101–108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.022>
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, 86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2>

- Solano-Flórez, G., Márquez-Cardona, M. del P., & Schuler, I. (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares. *Universitas Scientiarum*, *14*(1), 16–22.
<https://doi.org/https://doi.org/10.11144/javeriana.SC14-1.odle>
- Spano, G., Beneduce, L., Terzi, V., Stanca, A. M., & Massa, S. (2005). Real-time PCR for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and cattle wastewater. *Letters in Applied Microbiology*, *40*(3), 164–171. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01634.x>
- Spitz, M. (2000). VACUNAS DE ADN DESNUDO. *Medicina (Buenos Aires)*, *60*, 639–644.
- Staley, T. E., Jones, E. W., & Corley, L. D. (1969). Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *The American Journal of Pathology*, *56*(3), 371–392. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2013587/>
- Sun, J., Ji, J., Sun, Y., Abdalhai, M. H., Zhang, Y., & Sun, X. (2015). DNA biosensor-based on fluorescence detection of *E. coli* O157:H7 by Au@Ag nanorods. *Biosensors and Bioelectronics*, *70*, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.009>
- Szalo, I. M., Goffaux, F., Pirson, V., Piérard, D., Ball, H., & Mainil, J. (2002). Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains. *Research in Microbiology*, *153*(10), 653–658. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01379-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01379-7)
- Taminiau, B., Korsak, N., Lemaire, C., Delcenserie, V., & Daube, G. (2014). Validation of real-time PCR for detection of six major pathogens in seafood products. *Food Control*, *44*, 130–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.031>
- Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M. P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R. V., & Griffin, P. M. (1999). Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection*, *122*(2), 185–192. <https://doi.org/10.1017/s0950268898001976>
- Valat, C., Auvray, F., Forest, K., Métayer, V., Gay, E., Peytavin de Garam, C., ... Haenni, M. (2012). Phylogenetic Grouping and Virulence Potential of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia*

coli Strains in Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), 4677 LP – 4682. <https://doi.org/10.1128/AEM.00351-12>

Van Giau, V., Nguyen, T. T., Nguyen, T. K. O., Le, T. T. H., & Nguyen, T. D. (2016). A novel multiplex PCR method for the detection of virulence-associated genes of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *3 Biotech*, 6(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0319-0>

Walk, S. T., Alm, E. W., Gordon, D. M., Ram, J. L., Toranzos, G. A., Tiedje, J. M., & Whittam, T. S. (2009). Cryptic lineages of the genus *Escherichia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(20), 6534–6544. <https://doi.org/10.1128/AEM.01262-09>

Walpole, R., Myers, R., & Myers, S. (1999). *Probabilidad y estadística para ingenieros, 6a ed.* (6a ed.). México.