



**Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas**

**Universidad Nacional de Rosario**

**Tesis de Doctorado**

*“Desarrollo de un enzimoimmunoensayo para la identificación de aislamientos de Escherichia coli O157:H7 y Escherichia coli no O157 productores de Shigatoxina de origen clínico y alimentario”*

**Bioq. Cecilia Casabonne**

**Rosario, Argentina**

**2016**

***“Desarrollo de un enzimoimmunoensayo para la identificación  
de aislamientos de Escherichia coli O157:H7 y Escherichia coli  
no O157 productores de Shigatoxina de origen clínico y  
alimentario”***

**Cecilia Casabonne**

**Bioquímica**

**Título otorgado por la Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura**

**Universidad Nacional del Nordeste**

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Área Bacteriología, Departamento de Microbiología, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 30/08/2012 y el 06/12/2016, bajo la dirección de la Dra. Claudia Balagué.

*A Manuel y Claudio*

## ***Agradecimientos***

*A la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, por haberme brindado el espacio físico donde llevar adelante este trabajo.*

*A la Dra. Claudia Balagué, por su inmensa generosidad, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por permitirme volar...*

*Al Dr. Luis Lorenzo, por su invaluable aporte en el desarrollo de esta tesis.*

*A la Dra. Luisa Fernández, quien me abrió la puerta al mundo de la Bacteriología, por acompañarme incansablemente, por su presencia y apoyo constante.*

*A mis compañeros y amigos de esta ruta llena de bacterias, Virginia, Agustina y Tomás. Simplemente mil gracias. Por demostrarme que todo es más fácil si se hace en grupo. Por tantos buenos y malos momentos, por las peleas y por las risas, por toda la ayuda, comprensión y apoyo recibido.*

*A mis compañeros de Bacteriología, por el apoyo brindado durante estos años. Con ellos también quiero compartir este logro.*

*A mis hermanos, Alberto y Sara y a mis adorados sobrinos, Agustín, Pilar y Catalina.*

*A mis padres, por el ejemplo de constancia, por su hogar lleno de amor y su apoyo incondicional.*

*Finalmente, el agradecimiento más profundo y eterno es para las personas a las que dedico esta Tesis, Manuel y Claudio. A Manuel, mi mayor tesoro en la vida, y a Claudio, por todos estos años compartidos, por su amor y por ser mi gran apoyo en la vida.*

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado,  
un esfuerzo total es una victoria completa”.*

*Mahatma Gandhi*

## ***Fuente de Financiamiento***

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco del Proyecto de Investigación “*Desarrollo de un Test de Enzimoimmunoensayo Múltiple para la Detección de Patógenos Bacterianos en Diarreas*” presentado en la Convocatoria FITS Salud- Diarreas Bacterianas N° 0001/2011 y financiado por la Agencia Nacional Científica y Tecnológica a través del Fondo Argentino Sectorial (FONARSEC). Resolución 415/11. Mayo de 2012. Directora: Dra. Claudia Balagué.

---

**Índice**

|   |          |
|---|----------|
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>1</b> |
| <b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....</b>   | <b>3</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>5</b> |
| 1. <i>Escherichia coli</i> Shigatoxigénica.....   | 5        |
| 1.1. Historia .....   | 5        |
| 1.2. Nomenclatura .....   | 6        |
| 1.3. Microbiología de STEC.....   | 7        |
| 1.3.1. Fisiología bacteriana.....   | 7        |
| 1.3.2. Genética de STEC .....   | 9        |
| 1.4. Factores de patogenicidad.....   | 10       |
| 1.4.1. Citotoxina o toxina Shiga.....   | 11       |
| 1.4.2. Plásmido pO157 .....   | 12       |
| 1.4.3. Enterohemolisina.....  | 13       |
| 1.4.4. Factores de adherencia intestinal.....   | 13       |
| 1.4.4.1. Codificados en la región LEE.....  | 13       |
| 1.4.4.2. Codificados fuera de la región LEE.....  | 14       |
| 1.5. Mecanismo de patogenicidad.....  | 14       |
| 1.6. Reservorios y vías de transmisión.....   | 16       |
| 1.7. Manifestaciones clínicas de la infección por STEC.....                                     | 18       |
| 1.8. Tratamiento.....   | 19       |
| 1.9. Epidemiología.....   | 21       |
| 1.9.1. Situación actual del SUH en Argentina .....  | 22       |
| 1.9.2. Vigilancia del SUH en Argentina y Latinoamérica.....                                     | 23       |
| 1.10. Diagnóstico microbiológico de STEC.....   | 23       |
| 1.10.1. Utilidad y estrategias del cultivo .....  | 24       |
| 1.10.1.1. Agar MacConkey sorbitol .....   | 25       |
| 1.10.1.2. Medios para la detección específica de <i>E. coli</i> productora de Shigatoxina ..... | 26       |
| 1.10.2. Serotipificación .....  | 27       |

---

|   |    |
|---|----|
| 1.10.3. Enzimoimmunoensayos para la detección de STEC .....   | 28 |
| 1.10.4. Ensayos moleculares para detección de STEC .....  | 29 |
| 1.10.5. Separación inmunomagnética .....  | 30 |
| 1.10.6. Ensayo de citotoxicidad sobre células Vero .....  | 30 |
| 1.10.7. Métodos alternativos de subtipificación de STEC .....   | 31 |
| 1.11. Legislación alimentaria sobre STEC .....  | 32 |
| 1.11.1. Marco regulatorio y estado de situación en la República Argentina.....                                  | 33 |
| 1.11.2. Protocolos internacionales estandarizados para la detección y aislamiento<br>de STEC en alimentos ..... | 34 |
| 2. Enzimoimmunoensayos.....   | 36 |
| 2.1. Historia .....   | 36 |
| 2.2. Clasificación de los enzimoimmunoensayos .....   | 37 |
| 2.2.1. Enzimoimmunoensayos homogéneos.....  | 37 |
| 2.2.2. Enzimoimmunoensayos heterogéneos.....  | 37 |
| 2.2.2.1. Clasificación del ELISA .....  | 38 |
| 3. Estandarización de los enzimoimmunoensayos.....  | 40 |
| 3.1. Preparación de estándares y controles.....   | 40 |
| 3.2. Evaluación de la sensibilización de la fase sólida.....  | 41 |
| 3.2.1. Selección del soporte sólido.....  | 41 |
| 3.2.2. Inmovilización del material biológico.....   | 42 |
| 3.3. Selección de los reactivos de detección.....   | 43 |
| 3.4. Evaluación de las condiciones de reacción.....   | 45 |
| 4. Validación de los métodos analíticos.....  | 45 |
| 4.1. Parámetros involucrados en la validación de métodos inmunológicos cualitativos<br>.....                    | 46 |
| 4.1.1. Límite de detección .....  | 46 |
| 4.1.2. Zona de incertidumbre.....   | 46 |
| 4.1.3. Sensibilidad.....  | 47 |
| 4.1.4. Especificidad.....   | 47 |
| 4.1.5. Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.....   | 48 |
| 4.1.6. Precisión.....   | 49 |
| 4.1.7. Eficacia o coincidencia .....  | 50 |
| 4.1.8. Robustez.....  | 51 |

---

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.8.1. Estimación de la estabilidad térmica de reactivos empleados en el ELISA  | 51        |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>54</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>55</b> |
| 1. Confección de la colección de cepas  | 55        |
| 2. Confirmación de género y especie en los aislamientos incorporados a la colección de cultivo  | 56        |
| 2.1. Desarrollo en medios selectivos  | 56        |
| 2.2. Identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas metabólicas   | 57        |
| 2.3. Identificación bacteriana mediante aglutinación  | 57        |
| 2.4. Determinación de la presencia de Shigatoxinas mediante el ELISA comercial Ridascreen® <i>Verotoxin</i>   | 57        |
| 2.5. Caracterización genotípica de los aislamientos bacterianos de <i>E. coli</i> diarreogénicos y <i>Shigella</i> spp.                                 | 58        |
| 2.5.1. Extracción de ADN bacteriano   | 58        |
| 2.5.2. Amplificación por PCR de genes codificantes de factores de patogenicidad   | 58        |
| 3. Recolección de muestras de materia fecal   | 61        |
| 4. Sensibilización y desarrollo del ELISA-O157 y ELISA-Stx2   | 62        |
| 4.1. Preparación de soluciones  | 62        |
| 4.1.1. Buffer <i>coating</i>  | 62        |
| 4.1.2. Solución de bloqueo  | 62        |
| 4.1.3. Solución de lavado   | 62        |
| 4.1.4. Solución de sustrato   | 62        |
| 4.1.5. Solución de parada   | 62        |
| 4.2. Sensibilización de las policubetas   | 62        |
| 4.3. Desarrollo de la técnica del ELISA-O157 y del ELISA-Stx2   | 63        |
| 5. Estandarización del ELISA-O157 y del ELISA-Stx2  | 64        |
| 5.1. Definición de la concentración de anticuerpo utilizado para la sensibilización de las policubetas del ELISA-O157                                   | 64        |
| 5.2. Definición de la concentración de los anticuerpos utilizados para sensibilización de las policubetas y como anticuerpos secundarios del ELISA-Stx2 | 65        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 5.3. Definición de la concentración del conjugado marcado con HRP.....   | 65        |
| 5.4. Definición de la fase sólida.....   | 66        |
| 5.5. Preparación de los controles positivo y negativo.....   | 66        |
| 6. Validación del ELISA-O157 y del ELISA Stx-2 .....   | 67        |
| 6.1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo .....                                | 67        |
| 6.2. Cálculo del punto de corte, sensibilidad y especificidad diagnóstica .....  | 67        |
| 6.3. Límite de detección .....   | 68        |
| 6.4. Rango de incertidumbre o región de error.....   | 68        |
| 6.5. Reactividad del ELISA-O157 y Elisa-Stx2 .....   | 69        |
| 6.6. Determinación de reacciones cruzadas.....   | 69        |
| 6.7. Precisión .....   | 70        |
| 6.8. Ensayos de estabilidad térmica acelerada.....   | 70        |
| 6.8.1. Ensayos de estabilidad térmica de las policubetas sensibilizadas.....   | 71        |
| 6.8.2. Ensayos de estabilidad térmica del CPH .....  | 71        |
| 6.8.3. Ensayos de estabilidad térmica del conjugado anti <i>E. coli</i> O157-HRP.....  | 71        |
| 6.8.4. Ensayos de estabilidad térmica del anticuerpo secundario de conejo anti Stx2 .....                                    | 71        |
| 6.8.5. Ensayos de estabilidad térmica del anticuerpo de cabra anti IgG de conejo, conjugado con HRP.....                     | 71        |
| 6.8.6. Ensayos de estabilidad térmica del sustrato.....  | 72        |
| 7. Análisis estadístico.....   | 72        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>PARTE I. Colección de cultivo y de muestras de materia fecal</b>  |           |
| 1. Confección de la colección de cepas.....  | 73        |
| 2. Confirmación de género y especie de los aislamientos incorporados a la colección de cultivo.....                          | 77        |
| 2.1. Caracterización bioquímica y serológica de los aislamientos .....   | 77        |
| 2.2. Caracterización genotípica de los aislamientos bacterianos de <i>E. coli</i> diarreogénicos y <i>Shigella</i> spp. .... | 78        |
| 2.3. Detección molecular de los genes <i>ipaH</i> y <i>virA</i> en aislamientos de <i>Shigella</i> spp. ....                 | 79        |
| 3. Recolección de muestras de materia fecal.....   | 80        |

**PARTE II. ELISA-O157**

|   |    |
|---|----|
| 4. Estandarización de la técnica de ELISA-O157 .....  | 81 |
| 4.1. Definición de la concentración de anticuerpo utilizado para la sensibilización de las policubetas..... | 81 |
| 4.2. Definición de la concentración del anticuerpo marcado con HRP .....                                    | 82 |
| 4.3. Definición de la fase sólida.....  | 83 |
| 4.4. Preparación de los controles positivo y negativo.....  | 84 |
| 5. Validación del ELISA-O157 .....  | 85 |
| 5.1. Determinación de la sensibilidad, especificidad y de los valores predictivos positivo y negativo.....  | 85 |
| 5.2. Cálculo del valor de corte.....  | 86 |
| 5.3. Límite de detección .....  | 87 |
| 5.4. Rango de incertidumbre o región de error.....  | 88 |
| 5.5. Reactividad del ELISA-O157 .....   | 88 |
| 5.6. Determinación de reacciones cruzadas.....  | 89 |
| 5.7. Precisión del ELISA-O157 .....   | 92 |
| 5.8. Ensayos de estabilidad térmica acelerada.....  | 93 |
| 5.8.1. Ensayos de estabilidad térmica de las policubetas sensibilizadas.....                                | 93 |
| 5.8.2. Ensayos de estabilidad térmica del CPH .....   | 95 |
| 5.8.3. Ensayos de estabilidad térmica del conjugado anti <i>E. coli</i> O157-HRP.....                       | 96 |
| 5.8.4. Ensayos de estabilidad térmica del sustrato.....   | 97 |

**PARTE III. ELISA-Stx2**

|   |     |
|---|-----|
| 6. Estandarización del ELISA-Stx2 .....   | 99  |
| 6.1. Definición de la concentración de anticuerpo utilizado para la sensibilización de las policubetas y como anticuerpo secundario del ELISA-Stx2..... | 99  |
| 6.2. Definición de la concentración del anticuerpo conjugado con HRP.....   | 101 |
| 6.3. Definición de la fase sólida.....  | 101 |
| 6.4. Preparación de los controles positivo y negativo.....  | 102 |
| 7. Validación del método de ELISA-Stx2.....   | 103 |
| 7.1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo .....   | 103 |
| 7.2. Cálculo del punto de corte, sensibilidad y especificidad diagnóstica .....   | 104 |

|  |            |
|--|------------|
| 7.3. Límite de detección .....   | 106        |
| 7.4. Rango de incertidumbre.....   | 106        |
| 7.5. Reactividad del ELISA-Stx2 .....  | 107        |
| 7.6. Determinación de reacciones cruzadas.....                               | 108        |
| 7.7. Precisión del ELISA-Stx2.....   | 111        |
| 7.8. Ensayos de estabilidad térmica acelerada.....                           | 112        |
| 7.8.1. Ensayos de estabilidad térmica de las policubetas sensibilizadas..... | 112        |
| 7.8.2. Ensayos de estabilidad térmica del anticuerpo secundario .....        | 113        |
| 7.8.3. Ensayos de estabilidad térmica del CPH .....                          | 114        |
| 7.8.4. Ensayos de estabilidad térmica del conjugado.....                     | 115        |
| 7.8.5. Ensayos de estabilidad térmica del sustrato.....                      | 116        |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>  | <b>118</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>139</b> |
| <b>DESARROLLO A FUTURO - PERSPECTIVAS.....</b>                               | <b>141</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                       | <b>142</b> |

## Resumen

*Escherichia coli* shigatoxigénica (STEC) es un patógeno emergente responsable de casos esporádicos de diarreas y de brotes asociados a la ingesta de alimentos contaminados. La enfermedad causada por STEC se caracteriza por dolor abdominal y diarrea acuosa que puede progresar a diarrea con sangre y colitis hemorrágica. Las complicaciones tales como el Síndrome Urémico Hemolítico se desarrollarán en el 5% al 15% de estos casos. STEC produce una o más toxinas Shiga (Stx1, Stx2 y sus variantes), las cuales representan su principal factor de patogenicidad, responsables de las complicaciones intestinales y sistémicas. Numerosos métodos diagnósticos han sido desarrollados para la detección de STEC, entre ellos, los culturales, los inmunológicos y los genéticos. La metodología clásica para el diagnóstico de STEC O157:H7 implica el aislamiento del microorganismo mediante el cultivo, seguido de la confirmación bioquímica e inmunológica. Sin embargo, estos métodos de cultivo tradicionales, incluyendo el agar MacConkey sorbitol, no revelan la presencia de STEC no O157, y las técnicas necesarias para la detección de estos microorganismos están más allá del alcance de la mayoría de los laboratorios de rutina. La detección de la Stx por medio de enzimoimmunoensayos (ELISA) o por métodos moleculares que detectan los genes codificantes de las toxinas Shiga se presentan como métodos alternativos para la detección de las STEC no O157. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar dos sistemas de enzimoimmunoensayos para la detección de *Escherichia coli* O157 y *Escherichia coli* no O157 productoras de Shigatoxinas asociadas a diarreas mucosanguinolentas o a brotes alimentarios con el propósito de contribuir al diagnóstico de estos patógenos prevalentes en nuestra región, de difícil caracterización y cuya identificación permite un abordaje diferencial a nivel terapéutico y de vigilancia. Para cumplir con los objetivos planteados se seleccionaron aislamientos bacterianos, de origen clínico y alimentario, y muestras de materia fecal de pacientes con diarrea. Los aislamientos y las muestras clínicas fueron empleados en los ensayos de estandarización y validación de los prototipos desarrollados. La estandarización de los ELISA implicó el análisis de los anticuerpos de captura, secundarios y conjugados, el sustrato y las concentraciones de trabajo óptimas de cada uno de ellos que se utilizaron en la producción de estos equipos. La validación consistió en la determinación de parámetros tales como sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, límite

de detección, valor de corte, presencia de reacciones cruzadas, precisión intermedia y repetibilidad y estabilidad térmica de los componentes del ELISA. En el caso del ELISA-O157, desarrollado para detección de STEC O157, presentó una sensibilidad y una especificidad del 100%, con un grado de concordancia muy bueno con la técnica de cultivo y la PCR. Se determinó el valor de corte de la técnica y, en ese punto, la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 98%. El límite de detección de este equipo fue de  $10^6$  UFC/mL de *Escherichia coli* O157. No se observaron reacciones cruzadas con los diferentes microorganismos bacterianos y fúngicos ensayados, tanto de origen clínico como alimentario. La precisión intermedia y repetibilidad fue aceptable, con un coeficiente de variación menor al 20%. La estabilidad térmica ensayada demostró que la vida útil del equipo completo fue de 9 meses. Por otra parte, el ELISA-Stx2, desarrollado para la detección de STEC productora de Stx2, presentó una sensibilidad del 80% y una especificidad del 100%, con un grado de concordancia muy bueno con la técnica de PCR y con el ELISA comercial Ridascreen® *Verotoxin*. Se determinó el valor de corte del método y se calculó la sensibilidad y la especificidad en ese punto que resultaron del 100% y del 98%, respectivamente. El límite de detección de este equipo fue de  $10^6$  UFC/mL de STEC productoras de Stx2. No se observaron reacciones cruzadas con los diferentes microorganismos bacterianos y fúngicos ensayados, tanto de origen clínico como alimentario. Este equipo presentó una precisión intermedia y repetibilidad aceptable, con un coeficiente de variación menor al 20%. La vida útil del equipo completo fue de 7 meses. Finalmente, el análisis de costos de ambos equipos demostró que estos ELISA representaron una metodología económica en comparación con las técnicas de cultivo y moleculares evaluadas en este trabajo. Los ensayos desarrollados en esta tesis podrían reproducirse en un formato comercial, ya que los estudios de validación demostraron una estabilidad y un desempeño comparable con los equipos comerciales. Además, estos ensayos podrían ser utilizados en conjunto como métodos alternativos o complementarios a los establecidos para el diagnóstico y vigilancia de STEC.

## ***Abreviaturas y símbolos***

|                |   |
|----------------|---|
| ADN            | Ácido desoxirribonucleico   |
| A/E            | Lesión de adherencia y esfacelación   |
| ARN            | Ácido ribonucleico  |
| ATCC           | Colección americana de cultivo (del inglés, <i>American Type Culture Collection</i> ) |
| AUC            | Área bajo la curva  |
| CDC            | Centro para el Control y Prevención de Enfermedades                                   |
| CH             | Colitis hemorrágica   |
| CLSI           | del inglés, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>                        |
| CN             | Control negativo  |
| CPH            | Control positivo  |
| CTS            | Caldo tripteína soya  |
| CV             | Coefficiente de variación   |
| DAEC           | <i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa  |
| DE             | Desviación estándar   |
| dNTP           | Desoxirribonucleótidos trifosfato   |
| E              | Especificidad   |
| EE             | Error estándar  |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>   |
| EAEC           | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa  |
| EHEC           | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica   |
| EIA            | enzoinmunoanálisis o enzoinmunoensayo   |
| EIEC           | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva  |
| ELISA          | Ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas   |
| EPEC           | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena  |
| ETA            | Enfermedad transmitida por alimentos  |
| ETEC           | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica  |
| Gb3            | Globotriaosilceramida   |
| H              | Antígeno flagelar   |
| HRP            | Peroxidasa de rábano picante  |
| ISO            | Organización Internacional de Estandarización   |

|      |  |
|------|--|
| K    | Índice de concordancia Kappa                         |
| Kb   | Kilobases  |
| Kda  | KiloDaltons  |
| LD   | Límite de detección                                  |
| LEE  | del inglés, <i>locus of enterocyte effacement</i>    |
| LPS  | Lipopolisacárido                                     |
| MB   | Megabases  |
| MUG  | Metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido             |
| NM   | No móvil   |
| O    | Antígeno somático                                    |
| OD   | Densidad óptica                                      |
| p    | Probabilidad   |
| pb   | Pares de bases                                       |
| PBS  | Buffer fosfato salino                                |
| PCR  | Reacción en cadena de la polimerasa                  |
| PTT  | Púrpura Trombocitopénica Trombótica                  |
| r    | Coefficiente de correlación                          |
| RIA  | Radioinmunoanálisis                                  |
| ROC  | del inglés, <i>Receiver Operating Characteristic</i> |
| S    | Sensibilidad   |
| STEC | <i>Escherichia coli</i> Shigatoxigénica              |
| Stx  | Shigatoxina  |
| SMAC | MacConkey sorbitol                                   |
| SUH  | Síndrome Urémico Hemolítico                          |
| T    | Temperatura  |
| UC   | Unidades Centinela                                   |
| UFC  | Unidades formadores de colonias                      |
| VPP  | Valor predictivo positivo                            |
| VPN  | Valor predictivo negativo                            |
| X    | Valor promedio                                       |

## **Introducción**

### **1. *Escherichia coli* Shigatoxigénica**

#### **1.1. Historia**

*Escherichia coli* Shigatoxigénica (STEC) fue descrita por primera vez en el año 1977 por Knowalchuk, quien informó que cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) de los serogrupos O18, O26, O111 y O128 aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico sobre células Vero (Konowalchuk y col., 1977). La toxina descrita en estos primeros estudios era similar a la producida por cepas conocidas, en ese momento, como bacterias Shiga y, que en la actualidad, son conocidas como *Shigella dysenteriae* tipo 1.

Dos años más tarde, se describió la presencia de STEC en asociación con la enfermedad humana en Reino Unido (Wade y col., 1979) y, poco después, en Nueva Zelanda (Wilson y col., 1980). La literatura más antigua sugiere que las infecciones producidas por STEC podrían haber ocurrido con anterioridad dado que se describió una epidemia en la década de 1950 causada por *E. coli* O111, aunque su importancia no fue reconocida a pesar de haber jugado un papel importante en brotes posteriores, tanto en Australia como en otros países (Belnap y col., 1955).

Aunque los taxonomistas, durante muchos años, se dieron cuenta que los géneros *Shigella* y *Escherichia* estaban estrechamente relacionados y, algunos de ellos han sugerido que deberían combinarse en un único género, se tardó más de 20 años para vincular la *E. coli* con la producción de esta toxina (Konowalchuk y col., 1977). El reconocimiento de STEC como una clase patogénica distinta de *E. coli* resultó, en primer lugar, de la observación epidemiológica realizada por Riley y col. en 1983, quienes investigaron dos brotes caracterizados por un fuerte dolor abdominal y diarrea acuosa seguido de diarrea sanguinolenta. Esta enfermedad, denominada como Colitis Hemorrágica (CH), se asoció con la ingesta de hamburguesas poco cocidas en una cadena de restaurantes de comida rápida. En los cultivos de heces de estos pacientes se logró la recuperación de *E. coli* O157:H7. Una segunda observación esencial, también en 1983, realizada por Karmali y col., informó la asociación de casos esporádicos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) con una citotoxina fecal y una *E. coli* productora de citotoxina en las heces. Por lo tanto, las dos observaciones clínicas y

microbiológicas, una basada en un raro serotipo de *E. coli* y la otra en la producción de una citotoxina específica, dieron lugar al reconocimiento de un nuevo patógeno entérico cada vez más importante asociado a enfermedades intestinales y renales (Riley y col., 1983).

Algunos años más tarde, estudios retrospectivos, demostraron que el serotipo O157:H7 surgió probablemente de ganado proveniente de América del Sur (Orskov y col., 1987).

## **1.2. Nomenclatura**

El descubrimiento de este patógeno por los diversos caminos de la investigación dio como resultado una nomenclatura paralela. El término *E. coli* verotoxigénica o *Vero cytotoxin producing E. coli* (VTEC) se debe a que estas cepas producen una toxina que es citotoxigénica para las células Vero (Konowalchuk y col., 1977). El término VTEC es todavía ampliamente utilizado en el Reino Unido y en muchas publicaciones científicas europeas. Por otro lado, el término *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) fue acuñado originalmente para referirse a las cepas que causan CH y SUH (Nataro y Kaper, 1998). De acuerdo con la nomenclatura más reciente, estas cepas se denominan STEC, un término que refleja la citotoxina producida por estas cepas (Calderwood y col., 1997). El término STEC se utiliza sobre todo en trabajos científicos americanos.

STEC y VTEC son términos equivalentes y, ambos, se refieren a las cepas de *E. coli* que producen uno o más citotoxinas. Sin embargo, como veremos más adelante, no está claro que la mera posesión de los genes codificantes de la toxina confiere patogenicidad a la bacteria en ausencia de otros factores de virulencia.

El término EHEC, del cual está ampliamente estudiado el serotipo O157:H7, fue asignado a las cepas que ocasionan CH y SUH y que, a su vez, sintetizan la toxina Shiga (Stx) causando lesiones de adherencia y esfacelación (A/E) (del inglés, *attaching and effacing*) sobre las células epiteliales y poseen un plásmido de 90 Kb que codifica para una enterohemolisina (O'Brien y col., 1977; Levine y col., 1987). Por lo tanto, EHEC pertenece a un subgrupo de las STEC e incluye una connotación clínica importante, ya que no todas las STEC son patógenas, mientras que todas las EHEC sí lo son (Kaper y col., 2004).

### 1.3. Microbiología de STEC

#### 1.3.1. Fisiología bacteriana

La *E. coli*, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria anaeróbica facultativa, Gram-negativa, móvil, no formadora de spora. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas o no patogénicas, lo que significa que no causan enfermedad alguna y que viven en los intestinos de los seres humanos y otros mamíferos. La presencia de esta bacteria en el intestino es necesaria para un desarrollo normal y para preservar la salud de la persona ya que *E. coli* y otras bacterias entéricas sintetizan la vitamina K y vitaminas del complejo B que el cuerpo absorbe (Welch, 2006).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son comensales, sin embargo, algunas pueden causar diarrea por lo que han sido clasificadas en seis categorías o grupos de acuerdo a los mecanismos de virulencia que poseen: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Tornieporth y col., 1995).

El estudio de los serotipos característicos de este virotipo EHEC involucra el análisis del antígeno somático (O), que deriva de la composición de la pared celular y antígeno flagelar (H), que caracteriza al flagelo, encontrándose este último sólo en especies móviles. Se conocen distintos serotipos de STEC, divididos en dos grandes grupos los O157 y no O157.

Dentro del primer grupo se encuentran las *E. coli* O157:H7, siendo el serotipo más patogénico y el que desarrolla la enfermedad más grave. Su nombre se origina del antígeno somático O157 y del séptimo antígeno flagelar H. La *E. coli* O157:H7 es parte de la flora intestinal bovina. El ganado, no así los humanos, poseen el receptor globotriaosilceramida (Gb3) de las Stx en las células epiteliales intestinales (Hoey y col., 2002). Algunos estudios sugieren que la toxina se une al epitelio bovino y se internaliza, pero luego es transportada al lisosoma y no al retículo endoplásmico. Esto resulta en una destrucción de la toxina impidiendo la citotoxicidad como así también la diseminación sistémica (Hoey y col., 2003). Este serotipo presenta diferencias marcadas con otras *E. coli* patogénicas. Particularmente, *E. coli* O157:H7 es negativa para la invasividad (prueba de Sereny), se adhiere a través de un pilus común de *E. coli* (PCE), no produce toxinas termoestables y termolábiles y es hemolítica. Además, no fermenta el sorbitol en comparación con el resto de las *E. coli* que lo fermentan en un 93%. Más aún, no fermenta la ramnosa, carece de la capacidad de hidrolizar el 4-metilumbeliferil-

$\beta$ -D-glucurónido (MUG) y no crece a 45 °C en presencia de sales biliares al 0,15%. Debido a esta última característica, este serotipo no puede ser aislado utilizando los métodos estándares para coliformes fecales, que incluyen una incubación a 45 °C (Law, 2000).

En el grupo de las STEC no O157 se encuentran las O26:H11; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145:NM, entre otros serotipos. Generalmente, estos serotipos están asociados a infecciones en el hombre y, aunque son menos patogénicas, pueden llegar a causar enfermedad menos severa (Rodríguez- Ángeles, 2002).

Existen otros serotipos de *E. coli* no O157 productores de Stx altamente virulentos como: O91:H21/H-, O26:H-, O113:H21, O117:H7, O118:H16, O128:H2/H-, O145:H28 y O146:H2, que se han asociado con enfermedad en humanos (Blanco y col., 2004). Se debe tener presente que las cepas STEC no O157 tienen una frecuencia de aislamiento 4 veces mayor, pueden ser sorbitol positivas y, actualmente, hay más de 200 serotipos descritos (Nataro y Kaper, 1998; Blanco y col., 2004).

En países de Europa continental las infecciones por cepas STEC no O157 son más frecuentes que las producidas por cepas STEC O157:H7 (Pradel y col., 2000). Los serogrupos O26, O103 y O111 son responsables de la mayoría de las infecciones que ocurren en San Pablo, Brasil (Vaz y col., 2004). En cambio, en EE.UU., Canadá, Inglaterra y Escocia el serotipo O157:H7 es el más frecuentemente asociado a infecciones en seres humanos (Tarr y col., 2005). El serotipo O157:H7 también se ubica en el primer lugar de frecuencia en los casos esporádicos de diarrea y SUH que ocurren en Argentina, seguido por los serogrupos O145 y O26 (Rivas y col., 2006).

En el caso particular de *E. coli* O157 se ha estimado una dosis infectiva muy baja, descrita en 10 UFC/g. En otros serotipos de STEC se estima que puede ser un valor superior, pero siempre menor que 100 UFC/g. Es un grupo de bacterias relativamente resistente a condiciones adversas del ambiente y es importante tener en cuenta que como la dosis infectiva es tan baja, el riesgo de infectarse puede presentarse aún sin multiplicación de la bacteria en el alimento (Mead y Griffin, 1998).

Las cepas de STEC toleran el pH bajo del estómago del huésped y son eliminadas en su materia fecal. Pueden sobrevivir por algunos meses en las heces, en la tierra y en el agua, sobretodo en presencia de materia orgánica y pueden estar presentes en cañerías de provisión de agua no potable y en bebederos de animales.

La temperatura óptima de crecimiento de las STEC se encuentra entre 30-42 °C, presenta una baja capacidad de desarrollar a temperaturas de 44-45 °C e imposibilidad de desarrollar a temperaturas superiores a 45 °C. Es incapaz de desarrollar a temperaturas de -10 °C pero puede sobrevivir en productos congelados (-18 °C) sin cambio en el número total de microorganismos por períodos prolongados. La pasteurización y la adecuada cocción a 71 °C inactivan las STEC (Farrokh y col., 2013).

Otras características particulares de *E. coli* O157 es la resistencia a los cambios de pH, por ejemplo, durante la fermentación de embutidos (Leyer y col., 1995).

### 1.3.2. Genética de STEC

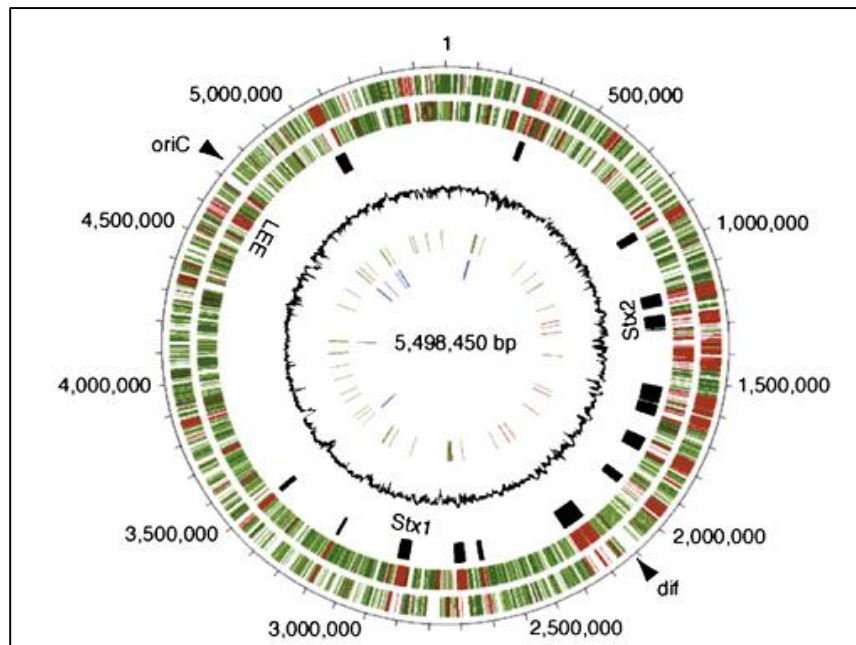
El origen de STEC es aún incierto. Genéticamente, *E. coli* O157:H7 es similar al serotipo enteropatogénico de *E. coli* O55:H7, comúnmente asociado con brotes de diarrea infantil en todo el mundo. La *E. coli* O55:H7 patógena tiene muchos de los factores de virulencia de adhesión de la *E. coli* O157:H7 pero carece de la expresión de las Shigatoxinas. Se cree que un linaje de *E. coli* O55:H7 perdió el cluster O55 *rfb-gnd*, donde *rfb* codifica para la biosíntesis del antígeno O y *gnd* codifica para la gluconato-6-fosfato deshidrogenasa. Posteriormente, mediante transferencia horizontal y recombinación, adquirió el clúster O157 *rfb-gnd*, la capacidad de producir Stx y otros factores de virulencia y se convirtió en una EHEC O157:H7 (Whittman, 1998).

El cromosoma de STEC O157 es una molécula cerrada circular, de doble cadena de ADN, de un tamaño aproximado de 5,5 MB (Hayashi y col., 2001).

La Figura 1 proporciona una representación gráfica del cromosoma de *E. coli* O157 responsable del brote en Sakai (Japón) en 1996, derivada de la secuenciación del genoma. El círculo externo indica las localizaciones en el genoma de 5,5 MB. El segundo y tercer círculos muestran, en rojo, los genes de *E. coli* O157 que difieren de las de una cepa de laboratorio no patógena de *E. coli*. El cuarto círculo de la Figura indica, en negro, las ubicaciones de los genomas de bacteriófagos templados integrados en el cromosoma de *E. coli* que albergan los genes que codifican para las toxinas Stx1 y Stx2. Estos bacteriófagos representan algunas de las diferencias evidentes entre el genoma de la cepa STEC O157 Sakai y el genoma de una cepa de laboratorio no patógena de *E. coli* (Hayashi y col., 2001).

Los genomas de bacteriófagos templados integrados que llevan los genes de la toxina Shiga pueden ser inducidas a replicarse líticamente y generar una progenie de bacteriófago por la exposición de las STEC a los agentes químicos o a la luz

ultravioleta. Estos bacteriófagos presentan una morfología lamboidea, con cabezas hexagonales y colas largas. Estos fagos podrían ser responsables de la transmisión de los genes que codifican la Stx entre diferentes cepas de *E. coli* en el tracto gastrointestinal y, más aún, la transferencia de estos genes a otros géneros y especies de bacterias, tales como *Citrobacter* spp., *Aeromonas* spp. y *Enterobacter* spp., en los cuales se han informado portación de los genes de la toxina Shiga (Sandvig, 2006).



**Figura 1.** Representación circular del cromosoma de *E. coli* O157. El círculo externo indica las localizaciones en el genoma de 5,5 MB. El segundo y tercer círculos muestran, en rojo, los genes de *E. coli* O157 que difieren de las de una cepa de laboratorio no patógena de *E. coli*. El cuarto círculo indica, en negro, las ubicaciones de los genomas de bacteriófagos templadas integrados que codifican Stx1 y Stx2 en el cromosoma de la O157. (De: Hayashi y col., 2001).

#### 1.4. Factores de patogenicidad

Los aislamientos de STEC y EHEC no sólo expresan la Stx sino que, usualmente, poseen otros factores significativos de patogenicidad como la Intimina, una proteína de superficie esencial para la formación de las lesiones de A/E en las células del epitelio

gastrointestinal y la enterohemolisina que está comúnmente asociada a las cepas EHEC, entre otros (Frankel y col., 1998; Welinder- Olsson y col., 2002).

A continuación se detallarán los principales factores de virulencia involucrados en la patogenia de este microorganismo.

#### **1.4.1. Citotoxina o toxina Shiga**

La Stx es el principal determinante de patogenicidad de las STEC y su síntesis está relacionada con la presencia de un bacteriófago inserto en el genoma bacteriano (Frankel y col., 1998; Galli y col., 2008).

En forma general, la Stx está integrada por dos subunidades: A y B. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa y puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa y otro A2 de 4 kDa unidos a través de un puente disulfuro. El péptido A1 es el que posee la actividad enzimática, en tanto que el A2, es responsable de la unión de la subunidad A al pentámero que conforma la subunidad B.

La subunidad B (7,5 KDa), está constituida por cinco unidades idénticas que se fijan al receptor de la célula blanco y es la que se une al receptor celular específico Gb3 presente en las células eucarióticas humanas. La Stx daña las células intestinales, vasculares y renales y es codificada por genes *stx* que son transportados por bacteriófagos lisogénicos y pueden ser adquiridos por genes transferidos horizontalmente. Estos genes que codifican las Stx pueden ser inducidos por agentes como la mitomicina C (Muhldorfer y col., 1996).

La familia de estas toxinas contiene dos grupos principales denominados Stx1 y Stx2, inmunológicamente diferentes. Las cepas STEC de origen humano, animal o alimentario pueden producir Stx1, Stx2 o variantes, solas o en combinación de dos o más toxinas.

La Stx1 es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, excepto en algunos casos en los que se aprecia un residuo de diferencia. Se han descrito los siguientes subtipos o variantes de esta toxina: Stx1a, Stx1c y Stx1d (Paton y col., 1995; Zhang y col., 2002; Friedrich y col., 2002).

Por otra parte, estudios epidemiológicos han demostrado que Stx2 es el factor de patogenicidad más importante asociado con enfermedad humana severa. Se han descrito diversas variantes de Stx2 que son altamente homólogas a Stx2 y que pueden neutralizarse con el anticuerpo anti-Stx2. Sin embargo, difieren en la actividad

biológica, receptor celular específico, citotoxicidad relativa sobre células Vero y HeLa, rango del hospedador, capacidad para ser activadas por la elastasa del ratón y en las secuencias aminoacídicas o nucleotídicas. En este grupo heterogéneo de toxinas se reconocieron alrededor de 22 variantes las que incluyen, Stx2 (toxina producida por el prototipo *E. coli* O157:H7 y EDL933), Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g, entre otras. Como ejemplos podemos mencionar que las Stx2c y Stx2d son producidas por cepas de STEC aisladas de humanos y animales, mientras que Stx2e es producida principalmente por cepas de STEC responsables de la enfermedad del edema en los cerdos, aunque son aisladas con baja frecuencia en seres humanos con enfermedad gastrointestinal (Teel y col., 2002).

La Stx2f es producida por cepas de STEC aisladas de palomas silvestres y también se ha asociado a diarrea en niños (Teel y col., 2002).

La Stx2g fue descrita en una cepa de STEC aislada de las heces de ganado sano (Pierard y col., 1998; Schmidt y col., 1991; Leung y col., 2003; García Aljaro y col., 2005). Esta variante presenta una baja prevalencia (0,7%) en bovinos, lo que sugiere que puede ser una variante emergente que aún no se ha extendido ampliamente en el ganado. La Stx2g presenta homología de ácidos nucleicos con secuencias de Stx asociados con enfermedades humanas y, por otra parte, la citotoxicidad sobre células HeLa y Vero es comparable a la de Stx-EDL933 (ATCC 43889) (Leung y col., 2003).

Analizando las diferentes variantes de Stx2, se encontró que las cepas STEC Stx2c son menos virulentas y causan diarrea sanguinolenta menos frecuentemente que cepas Stx2 o Stx2c.

Es importante destacar que una misma cepa puede sintetizar Stx1, Stx2 o ambas, e inclusive múltiples variantes de Stx2 (Scheutz y col., 2012).

Las Stx presentan una diferencia en su toxicidad sobre tejidos celulares y animales, demostrándose que Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1, con un riesgo mayor de desarrollar SUH (Nishikawa y col., 2000).

#### **1.4.2. Plásmido pO157**

El plásmido pO157 de 60 MDa se encuentra en la mayoría las cepas de STEC O157:H7 y contiene diversos genes que codifican para diversos factores de virulencia. Entre ellos se encuentran los genes *espP* (serina proteasa extracelular), *katP* (catalasa-peroxidasa), *ehxA* (enterohemolisina), *etp* (sistema de secreción tipo II) y para una

fimbria que podría estar involucrada en la colonización inicial de los enterocitos (Schmidt y col., 1995).

### **1.4.3. Enterohemolisina**

Como lo mencionamos anteriormente, el plásmido pO157 de 60 MDa encontrado en las cepas de *E. coli* O157:H7 y en otras STEC de origen humano, contiene los genes que codifican para la enterohemolisina (Beutin y col., 1994; Schmidt y col., 1995). La enterohemolisina se expresa en muchas de las cepas STEC y es una proteína perteneciente a la familia de las citolisinas formadoras de poros (RTX), siendo el gen que codifica su síntesis, el *ehxA*. Esta citolisina desempeña un papel, aún no bien explicado, en la lisis de los eritrocitos a fin de que estos liberen los grupos hemo, moléculas necesarias para mejorar el crecimiento de este patógeno (Hannaoui Rodríguez y col., 2009).

### **1.4.4. Factores de adherencia intestinal**

#### **1.4.4.1. Codificados en la región LEE**

Algunos genes que codifican para factores de virulencia están localizados en la región LEE (del inglés, *locus of enterocyte effacement*) del cromosoma bacteriano. Entre ellos se encuentra el gen *eae* que codifica una proteína denominada Intimina, responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E. La formación de esta lesión está asociada con un drástico reordenamiento del citoesqueleto de la célula huésped, dando como resultado la formación de una estructura con forma de pedestal rica en actina polimerizada (Frankel y col., 2001).

Además, la región LEE codifica reguladores transcripcionales, chaperonas, el sistema de secreción de tipo III, empleado en el transporte de las proteínas efectoras hacia la célula huésped, translocadores y proteínas efectoras incluyendo al receptor translocado de la Intimina denominado Tir (del inglés, *translocated intimin receptor*) (Garmendia y col., 2005).

Está demostrado que ciertos serotipos de STEC-LEE positivos, O157:H7, O26:H11, O111:NM y O145:NM, son altamente virulentos y están asociados a brotes y casos esporádicos de enfermedad severa en humanos. No obstante, la presencia de la región LEE no sería esencial para la patogénesis dado que un gran número de cepas STEC-LEE negativas son capaces de causar enfermedad severa y ocasionalmente brotes

(Jenkis y col., 2003; Paton y col., 1999). Por lo tanto, en la patogénesis de estas cepas estarían involucrados otros factores de adherencia adicionales codificados fuera de la región LEE.

#### 1.4.4.2. Codificados fuera de la región LEE

Se ha descrito un grupo de adhesinas relacionadas con la adherencia de las cepas STEC al enterocito codificadas fuera de a región LEE. Entre estas adhesinas podemos mencionar: Iha (del inglés, *iron regulated gene A homologue adhesin*) (Tarr y col., 2001); Efa1 (del inglés, *EHEC factor for adherence*) (Nicholls y col., 2000); LPFO157/OI- 141; LPFO157/OI-154 y LPFO113/OI-154 (del inglés, *long polar fimbria*) (Torres y col., 2002). Estas adhesinas están codificadas en islas genómicas únicas de *E. coli* EDL933. Otras tres adhesinas, ToxB (proteína identificada en pO157) (Tatsuno y col., 2001), Saa (del inglés, *STEC autoagglutinating adhesin*) identificada en cepas LEE negativas (Paton y col., 2001) y Sfp (del inglés, *sorbitol fermenting plasmid*) están codificadas en el megaplásmido de las cepas STEC (Toma y col., 2003; Jenkis y col., 2003).

### 1.5. Mecanismo de patogenicidad

Al igual de lo que ocurre con otras infecciones entéricas asociadas a *E. coli*, se considera que el proceso de enfermedad involucra la colonización del intestino y el daño debido a las toxinas. La colonización es el proceso por el cual STEC supera los mecanismos de defensa del huésped y se establece en el intestino. La acidez gástrica es un importante mecanismo de defensa del huésped en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, la resistencia a los ácidos es una característica importante de las *E. coli* O157 y de otros serotipos de STEC.

La adherencia a las células epiteliales intestinales, mediada por fimbrias, es un evento temprano en la infección por STEC lo que provoca el alargamiento de las microvellosidades intestinales. A continuación, se produce la translocación del receptor Tir, el cual se integra a la membrana plasmática adoptando una forma de pelo enrollado (Hartland y col., 1999). El dominio central extracelular de Tir actúa como receptor de la adhesina Intimina de la bacteria (Frankel y col., 2001). Simultáneamente, Tir interactúa mediante sus dominios intracelulares N- y C-terminal con diversas proteínas del citoesqueleto uniendo íntimamente la bacteria al enterocito. Además, se produce la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E y la

acumulación de filamentos de actina en el citoplasma. Esta reducción de la superficie absortiva causa una diarrea sin sangre.

Como vimos anteriormente, la Stx tiene una estructura AB<sub>5</sub> que consiste en una subunidad A unida a un pentámero de cinco monómeros de subunidad B responsable de la unión de la toxina a las células hospedadoras. Hasta el presente, el principal receptor identificado para Stx1 y Stx2 en humanos es el receptor Gb3, y la expresión en la superficie de las células blanco está ligada a la citotoxicidad (Jacewicz y col., 1995). Una vez que la toxina se une al receptor, se internaliza y sigue un transporte retrógrado vía el complejo de Golgi hacia el retículo endoplásmico y la membrana nuclear (Sandvig y Van Deurs, 1996). La subunidad A de la Stx se trasloca al citoplasma donde actúa como una glicosidasa removiendo una adenina de la posición 4324 del extremo 5' del ARNr 28S de la subunidad ribosomal 60S, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas (Endo y col., 1988). Algunos estudios demuestran que la actividad ribotóxica también puede inducir apoptosis o muerte celular programada (Smith y col., 2003).

Si bien la citotoxicidad de Stx está ligada a la expresión del receptor Gb3 en la superficie celular, la sensibilidad de una célula a la toxina no sólo se correlaciona con la cantidad de Gb3 expresado en su superficie sino también con la estructura del receptor. Las modificaciones de la longitud de la cadena de ácidos grasos del Gb3 o la disociación del Gb3 de los arreglos lipídicos de la membrana pueden conducir a una terminación prematura del transporte retrógrado al complejo de Golgi (Sandvig y col., 1992; Sandvig y col., 1994) o a un transporte hacia el compartimento lisosomal (Falguieres y col., 2001). Ambas alteraciones resultan en una sensibilidad reducida o, más aún, en una resistencia a la inhibición de la síntesis de proteínas. La exitosa inhibición de la síntesis de proteínas depende del clivado de su subunidad A en un fragmento A1 de 27,5 kDa enzimáticamente activo y otro A2 de 4,5 kDa (Garred y col., 1995a; Lea y col., 1999). Este corte está mediado por furina, una serina proteasa dependiente de calcio localizada en el aparato de Golgi. El clivado y activación de la subunidad A ocurre a una menor velocidad en células que no poseen furina y se le atribuye a la presencia de calpaína en el citoplasma o catepsina en los lisosomas (Garred y col., 1995b).

Es probable que el daño de la mucosa intestinal por la Stx, el lipopolisacárido (LPS) y otros mediadores de inflamación, promuevan la translocación de la toxina a la circulación. En la circulación sanguínea la Stx va hacia la célula blanco que posee el

receptor específico, concretamente, hacia el intestino, el SNC y el riñón. En el humano se encuentran altos niveles de Gb3 en el riñón, específicamente en la región cortical. La Stx citotóxica para las células endoteliales del riñón humano, causa una típica histopatología renal que incluye edema en las células del endotelio glomerular y deposición de plaquetas dentro del glomérulo, estas lesiones endoteliales conducen al estrechamiento de la luz de los capilares y a la oclusión de los vasos glomerulares, a través de la acumulación de plaquetas y fibrina (Paton y Paton, 1998a). Diversas investigaciones permiten establecer que la Stx induce la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como TNF $\alpha$  e IL-6, que pueden potenciar el efecto citotóxico de la Stx sobre las células endoteliales vasculares humanas. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas (Tesh y O'Brien, 1991).

#### **1.6. Reservorios y vías de transmisión**

STEC se puede encontrar en la flora fecal de una variedad de animales, incluyendo vacas, ovejas, cabras, cerdos, gatos, aves, perros y caballos (Beutin, 1999).

En términos de infección humana, el ganado vacuno es el principal reservorio de STEC. Las cepas STEC aisladas de animales sanos pueden estar asociadas a un episodio inicial de diarrea en animales jóvenes seguido por una colonización asintomática. Las tasas de aislamiento de STEC O157:H7 en los animales son mucho más bajas que la de los serotipos no O157 y la prevalencia de STEC O157:H7 en el ganado varía significativamente de un país a otro. Los estudios realizados en el ganado bovino han encontrado STEC O157:H7 en el 1,3% de los animales en Finlandia (Lahti y col., 2001), en el 10,8% en Alemania (Montenegro y col., 1990) y en el 15,7% en los EE.UU. (Chapman y Siddons, 1997). En Argentina, en un importante muestreo realizado en nueve frigoríficos exportadores, se encontró una prevalencia de STEC O157 del 4,1% en materia fecal y del 2,6% en carcasas bovinas. En tanto, la prevalencia para STEC no O157 en nuestro país fue del 22,3% en materia fecal y del 9,0% en carcasas (Masana y col., 2010; Masana y col., 2011).

Otro estudio realizado en Argentina, detectó la presencia de STEC en un 4,0% en perros y en un 4,2% en gatos (Gallego y col., 2006). Similar porcentaje (4,3%) se detectó en otro trabajo en caninos y felinos (Bentancor, 2006).

La principal vía de transmisión de STEC es la contaminación de la carne por contenido intestinal y las heces en el matadero (Butler, 1996). Por lo general, STEC se

transmite a los humanos por los alimentos, el agua y de persona a persona. La mayoría de los casos son causados por la ingestión de alimentos contaminados, particularmente alimentos de origen animal. En EE.UU., el consumo de hamburguesas poco cocidas, preparadas en un restaurante o caseras, ha sido la causa particularmente significativa de brotes (Griffin, 1995). En Escocia, se infectaron más de 400 personas y 18 pacientes de edad avanzada murieron debido a la ingesta de productos cárnicos contaminados (Christie, 1996).

Sin embargo, el espectro de los vehículos implicados en la enfermedad debido a STEC se está expandiendo más allá de los brotes iniciales asociados a hamburguesas. Se han relacionado brotes de STEC con el consumo de diferentes alimentos tales como mayonesa (Griffin, 1995), zumo de manzana sin pasteurizar (McCarthy, 1996), brotes de soja y alfalfa, embutidos fermentados, leche no pasteurizada, yogur, quesos, papas y lechuga (Gyles, 2007). Estos vehículos nos ilustran la capacidad notable de STEC para crecer en diferentes tipos de alimentos en condiciones en que otros patógenos no sobrevivirían.

El porcentaje de aislamiento en alimentos y la distribución de los serogrupos es variable entre las diferentes zonas. En EE.UU., la tasa de recuperación de STEC O157:H7 a partir de carne picada se ubica entre 0-3%; en Malasia, en cambio, se ha informado una tasa superior al 30% (Griffin, 1995; Radu y col., 1998). En un estudio realizado en Uruguay se recuperó STEC en el 1,8% de las muestras de carne picada analizadas, donde los aislamientos correspondieron al serotipo O157:H7 (Varela y col., 2008). En regiones de Europa, los porcentaje obtenidos resultaron entre un 1-2% (Blanco y col., 2003).

Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral y la contaminación fecal de aguas de recreación o aguas de pozo.

Diversos trabajos han descrito que la excreción de STEC O157 en humanos es prolongada e intermitente. En niños pequeños, a diferencia de lo que ocurre en niños mayores y adultos, el tiempo de excreción de O157 supera ampliamente el tiempo de resolución de los síntomas (Swerdlow y Griffin, 1997).

### 1.7. Manifestaciones clínicas de la infección por STEC

El espectro de manifestaciones clínicas de la infección por *E. coli* O157:H7 es amplio, lo que dificulta generalmente el diagnóstico. Este microorganismo puede causar infecciones asintomáticas, diarreas con o sin sangre, SUH y Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT).

La enfermedad típica comienza, días después de la ingestión de las bacterias, con calambres abdominales y diarrea acuosa, generalmente sin o con febrículas. Alrededor del 50% de los pacientes pueden presentar náuseas y vómitos. Luego de 1 a 2 días, en el 35 a 90% de los casos, la enfermedad progresa a una CH (Tarr y col., 2005) donde el aspecto de la materia fecal de los pacientes infectados por STEC O157:H7 es similar a la de una hemorragia gastrointestinal. Sin embargo, si bien las heces con sangre son características de esta infección, el diagnóstico también debe ser considerado en pacientes con diarreas acuosas. En la mayoría de los casos, la CH se resuelve en una semana sin dejar secuelas. Sin embargo, el SUH desarrolla en el 6% de los pacientes y es diagnosticado usualmente entre los días 2 a 14 luego de la aparición de la diarrea.

El SUH es un síndrome clínico que se caracteriza por la tríada diagnóstica, anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda. Fue descrito por primera vez por Gasser (Gasser y col., 1955) y, en Argentina, por Gianantonio quien publicó la primera casuística de 66 casos en el año 1962. Es probablemente la causa más común de falla renal aguda en niños (Gianantonio y col., 1964).

Este síndrome ocurre por un aumento simultáneo de las Stx circulantes y citoquinas proinflamatorias que causan daño a las células endoteliales del riñón dando lugar a depósitos de plaquetas y de fibrina, lesiones a los eritrocitos y obstrucción de la microvascularización (Mead y Griffin, 1998). Las manifestaciones comunes son palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema e hipertensión arterial. Los pacientes también pueden presentar complicaciones neurológicas, tales como dolores de cabeza severos, letargo, convulsiones y/o encefalopatías (Paton y Paton, 1998a).

El SUH es más probable que ocurra en niños menores de diez años de edad o en ancianos. En niños, causa falla renal aguda y oliguria en tanto que en adultos, el desarrollo de la oliguria es precedido a menudo por complicaciones neurológicas y/o cardiovasculares. Las razones que justifican la mayor incidencia de la *E. coli* O157:H7 provocando la progresión de CH a SUH en estos grupos etarios son confusas, pero podría deberse a la disminución de la función inmunológica o a las diferencias en la sensibilidad de las células blanco a las Stx. Además de las edades extremas, existen

otros factores que predisponen al desarrollo del SUH, como las diarreas sanguinolentas, la fiebre, la leucocitosis, el tratamiento con agentes reductores de la motilidad intestinal o antidiarreicos y un período prodrómico corto.

Aunque tanto la Stx1 como la Stx2 son capaces de causar SUH, el genotipo de la toxina también influye en la evolución a SUH. En una revisión reciente realizada en Europa sobre 272 pacientes, Stx1 estaba presente en el 39%, Stx2 en el 51% y ambos genes en un 9,6%. De los pacientes con STEC productora de Stx1, el 8,4% desarrolló SUH; de los estaban infectados con Stx2, el 74% desarrolló SUH y, los pacientes con STEC que portaban ambos genes, el 53% desarrolló SUH. Estas cifras ilustran el hecho de que Stx2 está asociada con mayor frecuencia con la enfermedad severa (Bielaszewska y col., 2013).

La gravedad del SUH radica en que aproximadamente la mitad de los pacientes requiere diálisis y el 75%, transfusión sanguínea. Sumado a esto, la tasa de letalidad es del 3% al 5% y, el 5% de los pacientes que sobreviven presentan secuelas severas como insuficiencia renal crónica o daños neurológicos irreversibles (Ibarra y Goldstein, 2008).

La PTT consiste en el hallazgo de cinco parámetros importantes: trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, falla renal y síntomas neurológicos. Sin embargo, la lesión renal es menos severa y las implicancias neurológicas más prominentes que en el SUH. Es usualmente diagnosticada en adultos (Wang y col., 1996).

## **1.8. Tratamiento**

El tratamiento de la infección por STEC consiste en una terapia de apoyo y seguimiento de la evolución del paciente para evitar el desarrollo de las complicaciones microangiopáticas. Es importante recordar que los pacientes pueden parecer engañosamente normohidratados mientras cursan las fases iniciales del proceso protrombótico grave (Rahal y col., 2012).

El manejo del SUH también consiste en la instauración de terapias de soporte que incluyen un meticuloso seguimiento del balance hidro-electrolítico, transfusiones de sedimento globular, diálisis peritoneal y un adecuado aporte calórico-proteico.

Otros tratamientos incluyen transfusiones de plasma fresco congelado para eliminar las Stx circulantes y las citoquinas proinflamatorias (Nakatani y col., 2002). Sin embargo, informes retrospectivos recientes han puesto en duda la utilidad del intercambio de plasma (Hauswaldt y col., 2013).

Los agentes antimicrobianos activos contra STEC deben evitarse durante la fase aguda de la enfermedad. Si bien el tratamiento con antibióticos reduce la carga bacteriana fecal de STEC, se ha demostrado que no modifican la duración de la enfermedad diarreica aguda y, lo que resulta más importante, están asociados a un mayor riesgo en el desarrollo de SUH. Este efecto perjudicial podría deberse a que la lisis bacteriana llevaría a la posterior liberación de toxinas o a la posibilidad de la inducción directa de los bacteriófagos por los antimicrobianos (Smith y col., 2012).

Estudios retrospectivos demostraron que el SUH desarrolla mayormente en pacientes tratados con agentes antimicrobianos como la trimetoprima- sulfametoxazol, demostrándose que concentraciones subinhibitorias de este agente estimula la liberación de Stx *in vitro* (Wong y col., 2000).

Un estudio prospectivo reciente (Wong y col., 2012) realizado en 259 niños menores de 10 años infectados con *E. coli* O157:H7, demostró que el SUH ocurrió con mayor frecuencia en los niños que recibieron antibióticos (36%) en comparación con aquellos que no lo recibieron (12%). Sin embargo, algunos autores han cuestionado el dogma de que los antibióticos están contraindicados por completo en pacientes con infección por STEC, debido a que se demostró que la azitromicina no aumenta la expresión de Stx *in vitro* (Bielaszewska y col., 2012). La experiencia reciente durante el brote alemán de STEC O104:H4 mostró que el tratamiento con azitromicina en la infección por STEC resultó beneficioso para la descolonización de los pacientes que se habían recuperado de la enfermedad aguda y que eran portadores a largo plazo de STEC (Hauswaldt y col., 2013).

Por otra parte, los agentes antidiarreicos también están contraindicados en pacientes con diarreas sanguinolentas en general. En un estudio retrospectivo se demostró que el SUH era más probable que se desarrolle en pacientes infectados con *E. coli* O157:H7 que recibieron estas drogas que en pacientes que no las recibieron (Boyce y col., 1995).

Otras alternativas terapéuticas han sido evaluadas debido a las dificultades que presenta el tratamiento de este patógeno. El eculizumab es un anticuerpo monoclonal que se une con una alta afinidad a la proteína C5 del complemento, inhibiendo así su escisión en C5a y C5b e impidiendo la generación del complejo terminal del complemento de C5b-9. El eculizumab inhibe la hemólisis intravascular mediada por el complemento de la microangiopatía trombótica en pacientes con SUH. Puntualmente, el anti-C5 del complemento se utilizó en casos refractarios durante el brote alemán antes

mencionado. A pesar de un prometedor informe inicial donde se evidenció una rápida mejoría clínica en 3 casos pediátricos tratados con eculizumab, los hallazgos en una cohorte más grande de pacientes no mostraron efectos beneficiosos (Menne y col., 2012).

Otros tratamientos experimentales, incluyendo anticuerpos anti- Stx y manganeso, han demostrado ser prometedores en modelos animales, pero aún no se han evaluado en ensayos clínicos humanos (Mukhopadhyay y Linstedt, 2012).

### **1.9. Epidemiología**

La notificación obligatoria de las infecciones por STEC ha evolucionado con el creciente reconocimiento de la gravedad de las mismas, por un aumento real en el número de infecciones, como así también por una mejora en los sistemas de vigilancia de las enfermedades asociadas y de los métodos de detección.

En Europa continental, las infecciones por cepas STEC no O157 son más frecuentes, mientras que en Gran Bretaña STEC O157 aparece asociada a casos esporádicos y brotes, fundamentalmente por productos cárnicos.

En Asia, los reportes de infecciones por STEC O157 son escasos, salvo en Japón a partir del brote masivo con más de 10000 afectados en 1996, posiblemente por falta de sistemas de vigilancia.

En Australia, las infecciones por STEC no O157, fundamentalmente O111:NM, son más frecuentes que por STEC O157.

En Canadá, la incidencia de las infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 5,3 casos/100000 habitantes, donde la exposición a carne molida mal cocida, el contacto directo con el ganado, el agua de consumo contaminada y el medio ambiente rural contaminado son los factores de riesgo más importantes.

En EE.UU., las infecciones por *E. coli* O157:H7 continúan siendo un problema importante de salud a pesar de la implementación de sistemas de vigilancia de los patógenos asociados a las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y de un estricto control en la producción de alimentos. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (del inglés, *Center for Disease Control and Prevention*) estimó que STEC O157:H7 causa 73000 casos de enfermedad anual, mientras que STEC no O157 causa al menos 37000 enfermos por año, ocasionando más de 2000 hospitalizaciones y 60 muertes por año (Mead y Griffin, 1998). La incidencia de las

infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 2,1 casos/100000 habitantes y representa, después de *Listeria*, la segunda causa (29%) de las hospitalizaciones por ETA.

Respecto a Latinoamérica, en Colombia, se comunicó en forma preliminar que *E. coli* O157:H7 fue el agente causal del 7,2% de los casos de diarrea y que el 6,5% del ganado era portador de este patógeno. En Chile y Argentina, STEC O157 y no O157 están asociadas a casos de diarrea y SUH. En Uruguay, durante el año 2002, se informó el primer caso que vincula a *E. coli* O157:H7 con episodios de diarrea sanguinolenta o SUH. En Paraguay, a partir del año 2001, se comenzaron a notificar casos de diarrea asociados a *E. coli* O157:H7 luego de la implementación de un programa regional de control de las enfermedades emergentes y reemergentes (Rivas, 2011).

La incidencia de SUH en todo el mundo varía ampliamente. En los EE.UU., aproximadamente el 90% de los casos de SUH son causados por STEC O157:H7 (Tarr y col., 2005). En América del Sur, el problema se concentra en países del Cono Sur, principalmente Argentina, Chile y Uruguay. En Argentina, la incidencia es de 12 por cada 100000 niños menores de 5 años de edad, pero puede ser 10 veces menor en el resto del mundo. Esto podría responder a diferencias en la distribución geográfica como consecuencia directa de la magnitud de los reservorios del agente causal y a la influencia de mecanismos de transmisión específicos presentes en el área (Tarr y col., 2005).

### **1.9.1. Situación actual del SUH en Argentina**

El SUH es endémico en Argentina y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica. Además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Cada año se producen alrededor de 300 a 400 casos nuevos.

Los niños afectados son menores de 5 años, fundamentalmente entre 6 y 36 meses, de ambos sexos. La tasa de hospitalización para el año 2006 fue de 13,9 casos por cada 100000 niños menores de 5 años (Rivas, 2011).

La enfermedad está distribuida en todo el país, pero la frecuencia es mayor en las provincias del centro y sur durante los meses cálidos, aunque se registran casos durante todo el año.

En los últimos años, la incidencia de esta enfermedad aumentó lo que puede estar relacionado con el desconocimiento etiológico que imperó hasta hace pocos años. Sin embargo, la letalidad asociada al SUH disminuyó debido al diagnóstico precoz de la

enfermedad, la instauración temprana de la diálisis en los casos con oliguria severa o anuria y al manejo de la anemia hemolítica.

En estudios realizados para establecer la etiología del SUH en niños argentinos, se encontraron evidencias acumulativas de infección por STEC en el 60% de los casos, siendo O157:H7 el serotipo más frecuente. *Shigella dysenteriae* tipo 1 está asociada a casos de SUH en otros países, sin embargo, no fue aislada en nuestro país vinculada a esta enfermedad.

### **1.9.2. Vigilancia del SUH en Argentina y Latinoamérica**

Teniendo en cuenta el número de casos que se producen anualmente y la severidad de la enfermedad, en abril del 2000 el Ministerio de Salud estableció, mediante la Resolución N° 346/00, la notificación obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud individualizada e inmediata.

Complementariamente, a fin de reforzar el Sistema de Vigilancia vigente, se implementó una estrategia de vigilancia adicional basada en Unidades Centinela (UC). La vigilancia epidemiológica a través de las UC permite determinar tendencias, focalizar actividades de vigilancia y sugerir intervenciones preventivas. Las UC en lugar de seleccionar un área geográfica con una población definida, seleccionan una unidad de atención de salud sin población definida, por ello esta estrategia tiene como limitación la imposibilidad de comparación de la magnitud del problema estudiado con otras subpoblaciones o áreas donde la información no se recolecta mediante esta estrategia. Este sistema de vigilancia está integrado por tres componentes: epidemiológico, clínico y de laboratorio, que cumplen funciones específicas en relación a la recolección, el análisis y a la difusión de la información (Rivas, 2011).

### **1.10. Diagnóstico microbiológico de STEC**

La metodología diagnóstica de STEC se basa en el aislamiento de las STEC, en la detección de la presencia de cualquiera de las Stx o de los genes *stx* en extractos fecales o cultivos fecales. Estos procedimientos difieren en complejidad, velocidad, sensibilidad, especificidad y costos, por lo tanto, las estrategias de diagnóstico deben adaptarse a la clínica y a los recursos disponibles.

Los méritos sobre la utilización de distintos tipos de ensayos han sido ampliamente discutidos y debatidos, sin embargo, el consenso general es que la estrategia en la selección de las pruebas en el laboratorio debe incluir la detección de

todas las STEC, incluso en zonas donde el serotipo prevalente es STEC O157 (Gould y col., 2009; Hermos y col., 2011).

En el laboratorio de microbiología clínica, la recuperación de STEC O157 a partir de muestras de heces ha sido facilitada por la incapacidad de la mayoría de las cepas de este serotipo de fermentar el sorbitol (Tarr y col., 2005). Por ello, si bien los laboratorios resultan muy competentes a la hora de la detección de *E. coli* O157:H7, a menudo no investigan la presencia de otros serotipos de STEC. Esto crea un vacío en el diagnóstico ya que el 50% o más de las infecciones por STEC pueden ser causadas por STEC no O157 y, además, la vigilancia y el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad resulta incompleta (Gould y col., 2013)

Existen varios métodos disponibles para la detección de STEC en el laboratorio clínico. Estos incluyen el cultivo, los inmunoensayos para detección de antígenos específicos de STEC y pruebas moleculares, tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El cultivo bacteriológico sigue siendo la prueba de referencia dada la importancia de la identificación de las cepas bacterianas viables para su posterior tipificación. Por esta razón, se ha incrementado el esfuerzo en el desarrollo de medios sólidos que permitan seleccionar STEC no O157 (Kase y col., 2015).

Otro punto a tener en cuenta es la sensibilidad limitada de los métodos de cultivo en la detección de STEC, por lo que se recomienda que los laboratorios complementen esta metodología tradicional con otros ensayos diagnósticos (Gould y col., 2009).

Si bien los avances en la sensibilidad y velocidad de detección de STEC tienen implicancia directa en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades diarreicas, la caracterización de los aislamientos de STEC, basada en la determinación del serotipo o de los factores de virulencia individuales, es necesaria para la prevención, el control y la predicción de infecciones por STEC a nivel de salud pública.

#### **1.10.1. Utilidad y estrategias del cultivo**

El aislamiento en cultivo puro de la cepa patógena puede permitir una caracterización fenotípica completa de STEC de gran importancia a los fines epidemiológicos. Otras ventajas del cultivo son la posibilidad de realizar un enriquecimiento de la muestras lo que lleva a un aumento en la sensibilidad del proceso y pueden desarrollarse en laboratorios de baja complejidad comparados con los métodos moleculares.

Cuando *E. coli* O157:H7 fue identificado por primera vez como agente etiológico de CH se encontró que, a diferencia de la mayoría de las cepas de *E. coli*, no fermentaba el sorbitol (Pai y col., 1984). A partir de este momento, se desarrollaron diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales basados en esta característica distintiva de la *E. coli* O157:H7, lo que permite la diferenciación de este microorganismo del resto de los organismos presentes en la muestra (Gill y col., 2014).

Las guías del CDC del año 2009 recomiendan que las muestras de heces de pacientes con diarrea aguda adquirida en la comunidad, es decir, aquellas en las que se buscan patógenos entéricos como *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*, deben investigarse para STEC O157 utilizando un medio selectivo y diferencial. Sin embargo, un resultado negativo para STEC O157 no descarta la presencia de STEC no O157. Por ello, las guías del CDC recomiendan, en estos casos, la búsqueda de STEC no O157 en la muestra utilizando una prueba que detecte las Stx o los genes que codifican para las mismas (Gould y col., 2009).

#### **1.10.1.1. Agar MacConkey sorbitol**

El uso del agar MacConkey sorbitol (SMAC) para la siembra de heces de pacientes con diarrea sanguinolenta, se basa en la peculiaridad bioquímica de *E. coli* O157:H7 de no fermentar el sorbitol. Este medio difiere del típico agar MacConkey mediante la sustitución de la lactosa por sorbitol. Además, el agar SMAC contiene cefixima y telurito de potasio, útiles para suprimir el crecimiento de bacterias Gram negativas que pudieran interferir en el aislamiento de STEC O157 (Nataro y col., 2007).

Las primeras investigaciones encontraron que el agar SMAC muestra una sensibilidad, una especificidad y un valor predictivo negativo (VPN) para *E. coli* O157:H7 aceptable, pero un valor predictivo positivo (VPP) del 28% (March y Ratnam, 1986). Además de su bajo VPP, otras limitaciones del SMAC incluyen su incapacidad para detectar las STEC no O157, como así también a aquellos aislamientos de STEC O157 fermentadores lentos del sorbitol (Ammon y col., 1999).

La base genética para la fermentación lenta del sorbitol por STEC O157 se basa en que el gen *uidA*, que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa, controla la velocidad del metabolismo del sorbitol en *E. coli*. El clon epidémico original O157:H7 no presenta actividad  $\beta$ -glucuronidasa; sin embargo, transporta el gen *uidA* que presenta 18 nucleótidos adicionales, de los cuales solamente 6 alteraron la secuencia aminoacídica de la proteína UidA. Además, presenta dos mutaciones de desplazamiento de marco,

con 18 bases de diferencia, que alteraron la secuencia de 6 aminoácidos consecutivos, reduciendo la eficacia de la enzima. Debido a que la enzima no se inactiva completamente, es de vital importancia realizar la lectura de las placas dentro de 24 a 48 horas de la inoculación del medio para evitar falsos negativos (Feng y Lampel, 1994).

En conclusión, debido a la ocurrencia de este patógeno en todo el mundo y su capacidad bien documentada de causar enfermedades graves, los medios seleccionados para la siembra de las heces de pacientes con diarrea o SUH deben incluir el agar SMAC para la recuperación y el aislamiento de STEC O157.

#### **1.10.1.2. Medios para la detección específica de *E. coli* productora de Shigatoxina**

Los medios cromogénicos son medios diferenciales y selectivos para la identificación visual de patógenos específicos basados en sus características bioquímicas fenotípicas. El medio cromogénico, CHROMagar™ O157 permite la diferenciación de las colonias de STEC O157, visualizadas de color malva, del resto de las de *E. coli* que presentan color azul. Desafortunadamente, como ocurre con el agar SMAC, CHROMagar™ O157 no es capaz de detectar las STEC no O157 (CHROMagar™ O157 CHROMagar Microbiología, Francia, 2013).

Un estudio realizado por Church y col., demostró que el CHROMagar™ O157 tenía una tasa de falsos positivos del 20% en comparación con el agar SMAC que resultó del 65%. En el mismo estudio, CHROMagar™ O157 tuvo una mayor sensibilidad (96,3%) que el agar SMAC (85,2%) para la detección de STEC O157 (Church y col., 2007).

Otros medios cromogénicos, tales como Colorex™ O157 (Alere Inc., Canadá), están disponibles en el mercado para la detección de STEC O157, aunque no han sido evaluados clínicamente.

Los laboratorios de microbiología clínica utilizan ya sea el agar SMAC o el CHROMagar™ O157 para detectar exclusivamente STEC a pesar de la limitación de ambos medios en la detección de las STEC no O157.

El aumento de la prevalencia y la conciencia sobre la importancia de las STEC no O157, junto con las directrices publicadas el CDC, ha llevado al desarrollo de medios con indicadores cromogénicos para la detección de STEC no O157.

Los medios cromogénicos desarrollados para detectar un amplio número de serotipos de STEC incluyen el CHROMagar™ STEC y el agar Rainbow® O157 (CHROMagar Microbiología, Francia, 2014; Biolog, EE.UU., 2008).

El medio CHROMagar<sup>TM</sup> STEC está destinado a detectar todos los serotipos de STEC basado en la utilización de sustratos cromogénicos por el microorganismo.

Por otro lado, el agar Rainbow® O157 detecta los serotipos O157:H7, O26:H11, O48:H21, O111:H- y O111:H8. Este medio contiene sustratos cromogénicos que son específicos para las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y la  $\beta$ -glucuronidasa. Las colonias de *E. coli* O157:H7, típicamente  $\beta$ -glucuronidasa negativas, se visualizan de color negro o gris, en tanto las cepas toxigénicas no O157 que sobreproducen la  $\beta$ -galactosidasa en relación con la  $\beta$ -glucuronidasa, aparecen en este medio de color púrpura, violeta o azul. El resto de las cepas de *E. coli* no patógenas,  $\beta$ -glucuronidasa positivas, aparecen como colonias rosas a púrpuras y, finalmente, las restantes especies bacterianas son inhibidas en este medio o crecen como colonias blancas (Biolog, EE.UU., 2008).

Durante el brote de *E. coli* O104:H4 productora de una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido ocurrido en Europa en el 2011, se desarrolló específicamente el medio CHROMagar<sup>TM</sup> STEC O104 para detectar la cepa asociada al brote. Este medio es incapaz de detectar otros serotipos no O157 y de las O104:H4 que han perdido el plásmido que codifica para la  $\beta$ -lactamasa (Gouali y col., 2013).

### 1.10.2. Serotipificación

Las STEC pueden ser caracterizadas por una amplia variedad de métodos, incluyendo la serotipificación (Blanco y col., 2004).

Como lo mencionamos anteriormente, el serotipo de un aislamiento de *E. coli* se basa en el antígeno O (Ohne) presente en el LPS bacteriano y el antígeno H (Hauch) de la proteína flagelar. El esquema de serotipificación internacional ha descrito 174 antígenos O (numerados de 1 a 181, con los números 31, 47, 67, 72, 93, 94, y 122 suprimidos) y 53 antígenos H, con aislamientos de *E. coli* que presentan varias combinaciones de antígenos O y H (Scheutz y col., 2004).

Un alto porcentaje de los serotipos de STEC son cepas mutantes no móviles (NM) que portan el antígeno H. Investigaciones adicionales pueden, en algunos casos, determinar el serotipo al que pertenecen estas cepas NM o identificar las diferencias entre lo que parecen ser serotipos idénticos NM. Las STEC O157:H7 se caracterizan por no fermentar el sorbitol y de amplia distribución mundial, mientras que las STEC O157:NM son fermentadoras de sorbitol y se encuentran generalmente sólo en ciertas regiones de Europa.

Dentro de las desventajas que presenta esta metodología se encuentra la imposibilidad en la tipificación de aquellos aislamientos de STEC que tienen antígenos O o H, o ambos, no descritos en el sistema internacional y, por lo tanto, resulta imposible su serotipificación. Por otra parte, existe un acceso limitado a un pequeño número de laboratorios certificados para realizar la serotipificación de las *E. coli*. No obstante, este método, es una base importante para la diferenciación de las STEC y es, a menudo, el punto de partida en la caracterización de las mismas.

Como lo hemos mencionado, la serotipificación es eficaz para revelar la diversidad entre las STEC, sin embargo, existen otros sistemas desarrollados para la subtipificación de las mismas (Gyles, 2007).

### **1.10.3. Enzimoimmunoensayos para la detección de STEC**

Los primeros enzimoimmunoensayos (EIA) desarrollados para la detección de Stx identificaron colonias STEC basados en la unión a anticuerpos monoclonales anti Stx1 y anti Stx2 inmovilizados sobre membranas. Posteriormente, se desarrollaron un gran número de EIA para la detección de STEC directamente en heces o en cultivos selectivos de heces. La mayoría de estas pruebas detectan Stx1 y Stx2 y el antígeno O157 (Bryan y col., 2015).

Múltiples estudios demuestran que uno de los EIA más evaluados y utilizados es el EIA en microplaca Premier EHEC (Meridian Bioscience Inc., EE.UU.). Otro EIA que se ha sometido a evaluación clínica es el ProSpect Shigatoxin *E. coli* (Remel, Europe Ltd., Reino Unido), el cual demostró una sensibilidad inferior en comparación con el Premier EHEC.

Otros inmunoensayos de pocillos desarrollados y comercializados son el ensayo Shiga toxin Chek (TechLab Inc., EE.UU.) y el Ridascreen® *Verotoxin* (R-Biopharm AG, Alemania).

Además, podemos mencionar el inmunoensayo óptico BioStar OIA SHIGATOX (Inverness Medical-BioStar, Inc., EE.UU) que detecta Stx por su interacción con los anticuerpos anti-Stx en la superficie de una oblea de silicio; esta interacción provoca un aumento en el espesor óptico de la película delgada y se traduce en un cambio de color visible en la oblea.

Por otro lado, se encuentran disponibles ensayos de inmunocromatografía como el ImmunoCard STAT! EHEC (Meridian Bioscience Inc., EE.UU.), Duopath® *Verotoxin* (Merck, Alemania), Quik Chek™ Shiga toxin (TechLab Inc., EE.UU.) y el

ImmunoCard STAT! *E coli* O157 Plus (Meridian Bioscience, Inc., EE.UU.). Los ensayos inmunocromatográficos proporcionan un resultado cualitativo en 10 a 15 minutos y los ensayos en microplaca, en aproximadamente 2 horas.

La sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos no deben ser asumidas como 100%, por lo que los resultados deben ser interpretados con cautela hasta la identificación certera de las colonias sospechosas de STEC. Frente a la posibilidad de obtener resultados falsos positivos con estos métodos, se destaca la importancia de utilizar más de una metodología para el diagnóstico de las enfermedades relacionadas con STEC (Hunt, 2010).

#### **1.10.4. Ensayos moleculares para detección de STEC**

Pollard y col. desarrollaron una PCR convencional para la detección de los genes *stx1* y *stx2* en una única reacción (Pollard y col., 1990). A partir de entonces se han desarrollado una multitud de ensayos de PCR y, un gran número de ellos, utilizan plataformas en tiempo real.

Las ventajas del uso de los ensayos de PCR en tiempo real incluyen una excelente sensibilidad, especificidad y la posibilidad de desarrollo de ensayos múltiples para detección y diferenciación de los genes *stx1*, *stx2*, *eae* y *ehxA*, entre otros (Zhang y col., 2012).

Los ensayos comerciales de PCR en tiempo real comerciales tales como GeneDisc® (GeneDisc® Technologies Pall Corporation, EE.UU.) y BAX® System (DuPont Nutrition and Health, EE.UU.) incluyen la detección rápida de los genes *stx1*, *stx2* y *eae* u otros y, finalmente, la detección de los genes específicos del serotipo de STEC O157 y de los seis serotipos principales de STEC no O157.

Numerosos ensayos moleculares para la detección simultánea de múltiples patógenos gastrointestinales están disponibles en el mercado. El panel xTag® *Gastrointestinal Pathogen* (GPP) (Luminex Corporation, EE.UU.) permite la detección de múltiples agentes etiológicos de gastroenteritis entre los cuales se detectan, por separado, *E. coli* O157 y STEC no O157.

El EntericBio real time Gastro Panel I® (Serosep, Irlanda), el panel GI FilmArray® (BioFire, Inc., EE.UU.) y el Seeplex® Diarrhea ACE Detection (Seegene, Corea del Sur) muestran sensibilidades y especificidades similares para STEC como el GPP.

Un método de considerable interés para la detección de STEC en heces humanas que aún no se ha evaluado clínicamente es la Amplificación Isotérmica Mediada por Lazo (LAMP) (del inglés, *Loop-Mediated Isothermal Amplification Method*). Esta variante de la técnica de PCR utiliza múltiples iniciadores, condiciones isotérmicas (60-65 °C) y la *Bst*-DNA polimerasa para la amplificación de la secuencia blanco. Las ventajas de esta técnica es su elevada sensibilidad y especificidad, tiempos de proceso relativamente cortos (30 minutos a 1 hora), condiciones isotérmicas y un sistema de detección sencilla (Mori y Notomi, 2009).

#### **1.10.5. Separación inmunomagnética**

La separación inmunomagnética se utiliza en la industria alimentaria para mejorar la recuperación de diversos serotipos de STEC. Esta metodología consiste en la detección de *E. coli* O157:H7/NM mediante la utilización de anticuerpos anti-*E. coli* O157 purificados, adsorbidos y unidos covalentemente a la superficie de partículas esféricas paramagnéticas de poliestireno, uniformes y microscópicas. Estas partículas marcadas son incubadas en el caldo de enriquecimiento lo que permite la unión de los anticuerpos al antígeno somático de *E. coli* O157:H7/NM. Posteriormente, se realiza la concentración mediante la utilización de un imán y el concentrado es sembrado en un medio diferencial y selectivo para *E. coli* O157:H7/NM (Rivas, 2011).

De la misma manera que para el serotipo O157, se encuentran disponibles en el mercado, diferentes reactivos para la concentración inmunomagnética de los serotipos de STEC más comúnmente asociados con enfermedad humana. Así, se puede realizar una concentración selectiva de los serogrupos O26, O103, O111 y O145 de una muestra pre-enriquecida. Podemos mencionar marcas comerciales como Neogen (Neogen Corp., EE.UU.) y Dynabeads (Dyna, Noruega).

#### **1.10.6. Ensayo de citotoxicidad sobre células Vero**

La citotoxicidad sobre células Vero (riñón de mono verde africano) sigue siendo la técnica de referencia para la demostración de la presencia de toxinas Stx en muestras de materia fecal.

Las células Vero tienen una alta concentración de receptores de Gb3 en sus membranas plasmáticas así como también de Gb4 (receptor específico para Stx2e) y, por lo tanto, son sensibles a todas las variantes de Stx conocidas. En un ensayo típico, la monocapa de células Vero se trata con extractos fecales esterilizados por filtración o

con filtrados de cultivos fecales y se examina el efecto citopático luego de 48 a 72 horas de incubación.

Históricamente, este ensayo ha jugado un papel muy importante en el establecimiento del diagnóstico de la infección por STEC, especialmente, cuando el aislamiento del microorganismo resulta dificultoso.

La sensibilidad de la técnica está influenciada por el recuento de STEC en la muestra fecal, así como la cantidad y potencia de la Stx producida por el propio microorganismo y el grado en que la Stx se libera de las células bacterianas. Karmali y col. encontraron que el tratamiento de los cultivos fecales con polimixina B, empleada para liberar la toxina asociada a las células, mejoró la sensibilidad del ensayo de citotoxicidad (Karmali y col., 1985).

A pesar de que se trata de un método diagnóstico valioso, estas técnicas son laboriosas, lentas y de alto costo, por lo que su uso está restringido a laboratorios de mayor complejidad, fundamentalmente a los laboratorios de referencia.

#### **1.10.7. Métodos alternativos de subtipificación de STEC**

Existe una enorme diversidad genética dentro de los aislamientos de STEC. En *E. coli* O157:H7, la diversidad es en gran parte debida a inserciones y deleciones en las islas O y en los bacteriófagos (Gyles, 2007).

Los estudios epidemiológicos, la investigación de brotes y la detección temprana de brotes asociados a ETA dependen de los métodos de tipificación que discriminan más allá del nivel de serotipo, los cuales están ampliamente desarrollados para STEC O157:H7. Se han desarrollado métodos de subtipificación molecular para discriminar las diversas cepas de *E. coli* O157: H7. Estos métodos se han aplicado principalmente en brotes, para distinguir entre infecciones asociadas a brotes y esporádicas o no relacionadas (Bender y col., 1997).

Uno de los métodos de subtipificación más comúnmente utilizados es la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) (del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), técnica en la que los fragmentos de cromosoma bacteriano generados por la digestión con una enzima de restricción seleccionada para cortar el ADN en 20 a 25 piezas, se separan por electroforesis (Terajima y col., 2006). La comparación de los patrones obtenidos permite determinar las relaciones de los aislamientos entre sí.

Otro método de subtipificación para STEC O157:H7 es el Análisis de Múltiples Locus Número Variable de Repeticiones en Tándem (MLVA) (del inglés: *Multiple*

*Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis*) (Hyytiä-Trees y col., 2006). Este método se basa en la ocurrencia de un número variable de repeticiones en tándem de tramos cortos de ADN en loci específicos en el cromosoma. El MLVA es una técnica relativamente simple, robusta, rápida, con una sensibilidad similar al PFGE y muy eficaz en la determinación de las relaciones entre las STEC O157:H7 (Noller y col., 2003).

Un tercer método molecular de subtipificación es el *Multilocus Sequences typing* (MLST) basado en las variaciones de secuencias de nucleótidos de fragmentos internos de genes de referencia. Este método no demostró ser efectivo para subtipificar aislamientos de STEC O157:H7 (Noller y col., 2003).

Ahmed y col. (1987) desarrollaron un esquema de tipificación de fagos para STEC O157:H7 que, posteriormente, fue ampliado de 62 a 88 tipos de fagos. Este método ha sido un complemento útil de la serotipificación y el PFGE. La tipificación de fagos también se ha informado para subtipificación de determinadas STEC no O157 (Ahmed y col., 1987; Rivas y col., 2006).

El análisis de los genes de virulencia es un método muy útil en la tipificación de STEC (Beutin y col., 1994). Los genes *stx*, *eae* y *ehxA* son los investigados con frecuencia para esta finalidad (Rivas y col., 2006).

### **1.11. Legislación alimentaria sobre STEC**

A partir de junio de 2012, EE.UU. implementó medidas relacionadas a mitigar los riesgos sanitarios de las carnes bovinas por cepas de STEC patógenas para el hombre. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (del inglés, *United States Department of Agriculture*), representado por el Servicio de Inspección de Alimentos (FSIS) (del inglés, *Food Safety and Inspection Service*), adoptó regulaciones aplicables a las carnes frescas destinadas a la producción de carnes molidas. La FSIS considera que una mercadería será rechazada al confirmarse la presencia de STEC por aislamiento, la presencia de los genes *stx* y *eae* o de al menos uno de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, denominados *big six*.

En la Unión Europea, también a partir de esa fecha, se comenzaron a aplicar controles en la frontera a cortes de carne fresca implementando el criterio de “tolerancia cero” para rechazar los lotes, inclusive ante la detección del gen *stx*.

En ese mismo año, entró en vigencia la Norma ISO 13136 para la detección, aislamiento y caracterización de STEC (O157, O111, O26, O103 y O145). Cabe aclarar que esta norma no es una herramienta legal (ISO 13136, 2012).

En los países del Mercosur, específicamente en Uruguay, el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca a través de la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG), a la luz de la normativa mencionada, resolvió aplicar controles oficiales en todas las producciones de carne bovina cruda, recortes y/o carne que pueda destinarse a la preparación de carne picada. La normativa vigente en este país establece que las empresas productoras de dichos productos deben establecer procedimientos de autocontrol para exportar a EE.UU. Estas medidas adoptadas por el gobierno y la industria uruguaya podrían servir como experiencia para el resto de los países del Mercosur en la certificación de sus productos.

#### **1.11.1. Marco regulatorio y estado de situación en la República Argentina**

En la República Argentina, en mayo de 2004, se modificó el Artículo 255 del Código Alimentario Argentino (CAA) y, en el 2012, se modificaron o incluyeron los artículos 156tris, 286bis, 302 y 925quater. Estos refieren a las especificaciones microbiológicas que deben cumplir la carne picada fresca, la comida preparada lista para el consumo, las salazones cocidas, los chacinados frescos, y las frutas y hortalizas, respectivamente. Todas estas categorías de alimentos deben cumplir con un criterio microbiológico que, entre otros parámetros, incluye la ausencia de *E. coli* O157:H7 en 5 muestras de 65 g cada una, o ausencia en 5 muestras de 25 g cada una (Artículo 925quater). Las metodologías recomendadas por el CAA para el análisis de estos alimentos son la USDA/FSIS, ISO y BAM-FDA (del inglés, *Bacteriological Analytical Manual*), que refieren específicamente a la búsqueda de *E. coli* O157:H7 (CAA, 2016).

La vigilancia de las STEC no O157 en alimentos no se realiza en forma generalizada debido a que no existe una reglamentación, quedando limitada la detección de STEC no O157 a determinados lugares con capacidad analítica. En este contexto, las autoridades sanitarias aplicaron el criterio de “tolerancia cero” para STEC en hamburguesas congeladas, de acuerdo a lo que estipula el artículo 6 inciso 6a del CAA, como consecuencia de la ausencia de un marco regulatorio específico.

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) dispone de dos circulares, una refiere al monitoreo de STEC O157:H7 (3834) y la otra al monitoreo de STEC no O157 (4032) (SENASA, 2008).

En el 2015, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) aprobó la inclusión en los criterios microbiológicos de los Artículos 156tris, 255, 302 y 925quater los serogrupos O145, O121, O26, O111 y O103 por ser los serogrupos más prevalentes en salud pública.

### **1.11.2. Protocolos internacionales estandarizados para la detección y aislamiento de STEC en alimentos**

La elevada prevalencia de brotes y casos asociados a los serotipos O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 en carnes y otros alimentos, motivó a que las agencias de control de la seguridad alimentaria, tales como la USDA o la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (del inglés, *Food and Drug Administration*) o la Organización de Normalización Internacional (ISO) (del inglés, *International Standardization Organization*) focalicen sus esfuerzos de control en la detección de estos serotipos mediante técnicas oficiales para alimentos seleccionados como productos cárnicos. Las metodologías oficiales para la búsqueda de STEC en alimentos se basan, en líneas generales, en los siguientes pasos: 1) enriquecimiento en caldo de cultivo selectivo, 2) tamizaje, 3) concentración inmunomagnética, 4) aislamiento en medios selectivos y diferenciales, 5) confirmación por pruebas bioquímicas y serológicas y 6) determinación de factores de virulencia.

Para ello, se establecieron normas para la detección y el aislamiento del serogrupo O157. La norma ISO 16654:2001 describe un método para el aislamiento de *E. coli* O157, basado en características específicas de este serogrupo. Sin embargo, los esfuerzos para identificar rasgos que caractericen el crecimiento de STEC no O157 no han sido suficientes para lograr el desarrollo de una metodología para la detección y el aislamiento de todos los serogrupos no O157.

La base de las metodologías de tamizaje para muestras de alimentos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (del inglés, *European Food Safety Authority*) radica en que la mayoría de los serogrupos de STEC poseen los genes *stx* y *eae*. Sin embargo, para determinar que una muestra está contaminada con STEC es necesario el aislamiento de la bacteria y la confirmación del perfil virulento, descartando la presencia de ADN libre o fagos *stx* libres en el caldo de enriquecimiento. Este paso puede retrasar la confirmación de la presencia o no de STEC en el alimento sospechoso debido a la carencia de medios de cultivo específicos y diferenciales orientados a la identificación de STEC (EFSA, 2013; Kase y col., 2015).

La USDA dispone de las normas MLG (del inglés, *Microbiology Laboratory Guidebook*) para el análisis de STEC O157:H7 y de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 en productos cárnicos. Estas normas describen un paso de enriquecimiento en caldo Trypticase Soya modificado (CTSm) seguido por una PCR en Tiempo Real empleando un equipo comercial para la detección de O157:H7 (MLG 5.09) y de los genes *stx* y *eae* (MLG 5B.05). Aquellas muestras con señal *stx/eae* son sometidas a otro tamizaje por PCR en tiempo real para la detección del serogrupo. Si la muestra resulta positiva para O157:H7 (MLG 5.09) o para *stx/eae* y para alguno de los 6 serogrupos no O157 (MLG 5B.05), se procede al aislamiento por separación inmunomagnética y, posteriormente, a la siembra en agar Rainbow modificado.

La FDA propone un protocolo para aislar *E. coli* diarreogénicas, incluyendo las STEC O157:H7 y no O157 implicadas en ETA (Feng y col., 2011a). Sin embargo este protocolo está validado para el análisis de productos que contengan carne pero no para muestras de carne exclusivamente.

La especificación técnica CEN ISO/TS 13136 incluía la detección de genes *stx* seguida, en las muestras positivas, de la detección del gen *eae*. Todas las muestras positivas para los genes *stx* y *eae* debían ser luego sometidas a la detección del serogrupo específico y al aislamiento mediante separación inmunomagnética.

A partir del brote de Alemania de 2011, la ISO/TS 13136 fue modificada para adaptarla a la nueva realidad europea. Según la nueva versión (ISO/TS 13136:2012), cualquier STEC es considerada patógena para el hombre y podría causar enfermedad severa dependiendo del perfil de riesgo del alimento (alimentos listos para consumo, alimentos que sufren cocción o pasteurización) y del estado del individuo que lo consume. Además, dada la gran plasticidad genómica de esta especie bacteriana, es posible que modificaciones en los factores de virulencia puedan generar nuevas cepas patógenas pertenecientes a otros serogrupos. Esta nueva versión también sugiere que serogrupos patógenos pueden surgir a partir de la adquisición del gen *stx* por cepas no STEC. Esta norma propone la utilización de CTSm con 16 mg/L de novobiocina y casaminoácidos, agua peptonada bufferada o agua peptonada bufferada modificada con piruvato, acriflavina, cefsulodina y vancomicina como caldos de enriquecimiento, según el tipo de matriz a analizar. Posteriormente, se procede al tamizaje por PCR en tiempo real para la detección de los genes *stx* y *eae*, y el aislamiento en agar Tryptona Bilis Glucurónico aplicando la técnica de separación inmunomagnética en caso que exista para el serogrupo identificado.

## **2. Enzimoinmunoensayos**

### **2.1. Historia**

A lo largo de los años se han utilizado diferentes metodologías que permitieron evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo basadas en la inmunoprecipitación y la aglutinación. La baja sensibilidad y nivel de detección de estos métodos llevó al desarrollo de técnicas que empleaban marcadores para detectar dicha reacción. Se han utilizado isótopos radioactivos, compuestos fluorescentes y quimioluminiscentes, marcadores electroactivos, lantánidos, radicales libres estables, partículas de látex, liposomas, colorantes, coloides, bacteriófagos y enzimas, entre otros.

Los EIA o ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) constituyen el desarrollo ulterior del radioinmunoanálisis (RIA); en lugar de los peligrosos radioisótopos de corta vida media, se emplean enzimas como sustancias marcadoras. Los EIA combinan la reacción inmunológica con un indicador altamente sensible por lo que el débil efecto inmunológico se ve reforzado por la amplificación enzimática. De esta manera, estas técnicas se caracterizan por una elevada sensibilidad y detectabilidad sumada a la especificidad de la reacción inmunológica. Estos ensayos se apoyan en tres características biológicas fundamentales: la extraordinaria especificidad de los anticuerpos, el elevado poder catalítico y la alta especificidad de las enzimas, lo que explica su elevada aplicabilidad en el diagnóstico clínico a través de la identificación de la presencia y concentración de moléculas en los distintos fluidos biológicos (Aydin, 2015; Tijssen, 1993; Voller y col., 1978).

Aunque el principio básico de las técnicas de ELISA y del RIA datan de 1941, el método ELISA fue diseñado en 1971 por los científicos suizos Engvall y Perlmann quienes desarrollaron el ELISA mediante la modificación del método de RIA, empleándolo en la determinación de los niveles de IgG en el suero de conejo (Engvall y Perlmann, 1971). En el mismo año, otro equipo de investigación, cuantificó gonadotropina coriónica humana en orina mediante el método de EIA utilizando la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (Van Weemen y Schuurs, 1971).

A partir de la invención del ELISA, los investigadores utilizaron esta metodología en el diagnóstico microbiológico. En 1980, Siegle y col., modificaron esta prueba mediante la incorporación de placas de microtitulación para identificar las concentraciones de diversas hormonas, péptidos y proteínas (Siegle y col., 1980).

Los EIA continúan siendo el pilar de los métodos en los que se explota la especificidad inherente de los anticuerpos. Esta técnica está aún en expansión en todos

los campos de la biología pura y aplicada y se ha convertido en un método utilizado de forma rutinaria en los laboratorios de investigación y diagnóstico en todo el mundo. Si bien hay un uso creciente de sistemas automatizados de EIA con aplicaciones comerciales; las técnicas manuales siguen utilizándose en investigaciones y en laboratorios de baja complejidad (Crowther, 2000).

## **2.2. Clasificación de los enzimoimmunoensayos**

Existen diferentes criterios de clasificación para los EIA, según la naturaleza del sistema pueden ser competitivos o no; y conforme a la naturaleza del conjugado se han identificado los ensayos con antígenos o anticuerpos marcados. Sin embargo, la clasificación más utilizada es la de inmunoensayos heterogéneos u homogéneos de acuerdo al requerimiento o no de estos procedimientos para separar las fases del ensayo (O'Kennedy y col., 1990; Aydin, 2015).

### **2.2.1. Enzimoimmunoensayos homogéneos**

Estos EIA se ejecutan sin una fase sólida y no requieren la separación entre los reactantes enlazados y libres. Su principio se basa en una inhibición o activación de la reacción enzimática por el complejo antígeno-anticuerpo. En la reacción enzimática de comprobación, esta actividad catalítica se mide en comparación con el conjugado libre, lo que hace superflua la separación de fases (O'Kennedy y col., 1990).

En los ensayos homogéneos, si bien queda eliminada la fase de separación, se introduce el riesgo de que los componentes de la muestra puedan interferir en la actividad enzimática. Sin embargo, la mayor limitante es su baja sensibilidad lo que no los convierte en una alternativa real para la detección de anticuerpos. Estos ensayos se utilizan principalmente para sustancias de bajo peso molecular (haptenos) y de concentración relativamente alta, como la farmacovigilancia de drogas. La única ventaja que poseen es su sencillez operativa (O'Kennedy y col., 1990).

### **2.2.2. Enzimoimmunoensayos heterogéneos**

Los inmunoensayos enzimáticos heterogéneos, conocidos con el nombre de ELISA, se basan en el mismo principio que el RIA. En este método, es esencial contar con una etapa de lavado posterior a la unión del antígeno y el anticuerpo, para eliminar la presencia de moléculas interferentes en el medio.

La técnica de ELISA se fundamenta en la premisa de que, luego de acoplar antígenos solubles o anticuerpos a una matriz sólida insoluble, éstos retienen la actividad inmunológica. Estas biomoléculas también pueden unirse a una enzima, por lo tanto el conjugado resultante, retiene tanto la actividad enzimática como la inmunológica (Ochoa Azze, 2012).

Brevemente, luego de la incubación de antígeno-anticuerpo, se realiza una separación entre el inmunocomplejo formado sobre la fase sólida y las biomoléculas no fijadas a este soporte. Esta separación puede hacerse por simple aspiración y lavado, lo que permite eliminar todos los componentes de la muestra que podrían interferir en el ensayo. La separación entre los inmunorreactantes libres y fijados puede hacerse también por sedimentación, captura de los inmunocomplejos de interés, filtración, difusión radial y otros principios inmunocromatográficos. No obstante, el lavado es el procedimiento de elección (Ochoa Azze, 2012).

Además de haptenos, en el ELISA también es posible determinar moléculas de alto peso molecular. Sin embargo, su principal ventaja está dada por su alta sensibilidad, detectabilidad, precisión y exactitud, lo que hace que el ELISA pueda equipararse al RIA pero sin las desventajas propias de este último método (O'Kennedy y col., 1990).

#### **2.2.2.1. Clasificación del ELISA**

Existen diferentes clasificaciones para los sistemas de ELISA basadas fundamentalmente en los principios de reacción. Los ELISA pueden ser competitivos o no competitivos (Tijssen, 1993).

En los ensayos competitivos, los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno-enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia del analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestras y conjugados pueden ser simultáneas o secuenciales. Esta última variante no es estrictamente competitiva, presenta una mayor detectabilidad y es la recomendada para detectar anticuerpos de baja afinidad.

Estos ensayos, en especial el de inhibición de antígeno, son útiles para la evaluación de la respuesta inmune humoral, al favorecer la interacción antígeno-anticuerpo que se realiza en la fase líquida. Se caracterizan por tener una buena correlación con los ensayos *in vivo* aunque son más laboriosos sobre todo cuando se requiere procesar un gran número de muestras (Harlow y Lane, 1998).

Los ensayos heterogéneos no competitivos pueden subdividirse, de acuerdo al inmunorreactante inmovilizado, en ensayos de captura de anticuerpos o de antígenos.

En los ensayos de captura de anticuerpos se destaca el principio del ensayo indirecto, en el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado antiinmunoglobulina-enzima, o proteína A-enzima. La cantidad de enzima enlazada indica la concentración de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. No obstante, debe tenerse en cuenta que su correlación con los ensayos *in vivo* se afecta cuando la concentración de anticuerpos es baja, ya que el ELISA indirecto tiende a sobrestimar los sueros de títulos bajos, probablemente esto se deba a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o de anticuerpos de baja afinidad. Este método es el de elección para detectar anticuerpos de clase IgG o IgA. Los anticuerpos de clase IgM puede estudiarse previa absorción de los anticuerpos IgG, aunque este isotipo debe evaluarse preferentemente con ensayos de captura IgM.

El ELISA tipo sándwich doble anticuerpo es el ejemplo clásico de métodos para la detección de antígenos, el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sándwich doble anticuerpo modificado) u otros procedimientos (Ochoa Azze, 2012).

Los ensayos sándwich doble antígeno, se emplean para la detección de anticuerpos y, al igual que en los indirectos, los antígenos capturan los anticuerpos, pero en esta ocasión en lugar de un conjugado anti-inmunoglobulina-enzima, usamos antígeno-enzima, de esta forma se alcanza la máxima sensibilidad y detectabilidad (Tijssen, 1993).

En general, los ensayos sándwich son más apropiados para la automatización de los sistemas ELISA, ya que puede suprimirse un paso de reacción añadiendo simultáneamente muestras y conjugado, aunque hay que prever las posibles interferencias del conjugado a elevadas concentraciones de antígenos o anticuerpos en la muestra.

La selección de uno u otro principio depende principalmente de los propósitos del ensayo, la disponibilidad y calidad de los reactivos y su utilización en la práctica. La modalidad más frecuente del ELISA para la determinación de antígenos es el modelo sándwich directo descrito anteriormente (Ochoa Azze, 2012).

### **3. Estandarización de los enzimoimmunoensayos**

La selección del EIA y sus procedimientos relacionados deben ser adecuados para las aplicaciones, es decir, para los fines diagnósticos requeridos a fin de que los resultados de estos ensayos sean pertinentes.

Los requisitos que debe cumplir un EIA no sólo incluyen la adecuación diagnóstica de la prueba, sino también su aceptación por las comunidades científica y reguladora, su aceptabilidad por parte del cliente y su aplicabilidad de acuerdo a los recursos disponibles en cada laboratorio. Entre tales requisitos, se pueden incluir los costos de realización, la disponibilidad de equipos, el nivel de sofisticación de la técnica y las destrezas de interpretación de la misma, la disponibilidad de reactivos, la caducidad de los productos, las condiciones para el transporte, la bioseguridad, el rendimiento de la muestra, el tiempo para la obtención de los resultados, los aspectos relacionados con el control de calidad y la garantía de calidad (OIE, 2008).

Las etapas para la optimización de un EIA involucran: la preparación de estándares y controles, la evaluación del recubrimiento o sensibilización de la fase sólida, la selección de los amortiguadores y de los reactivos de detección y la evaluación de las condiciones de reacción.

#### **3.1. Preparación de estándares y controles**

Es necesario garantizar la obtención de estándares y/o controles homogéneos para la optimización del ensayo de ELISA.

Las muestras de control pueden crearse mediante la adición de una concentración conocida del analito en la matriz y se pueden utilizar para determinar el rendimiento del ensayo basado en el cálculo del porcentaje de la recuperación.

Otras muestras de control que pueden emplearse en los ensayos de ELISA son las creadas a partir de muestras reales donde el nivel de analito ha sido determinado por otro método validado. Estas muestras son fraccionadas, congeladas y utilizadas como muestras de control para evaluar el rendimiento del ensayo (Cox y col., 2014).

La congelación y descongelación reiterada provoca la desnaturalización de las proteínas. Por ello, se emplean distintos procedimientos estabilizadores entre los que se destacan la liofilización con y sin aditivos, el uso de azúcares, polialcoholes y aminoácidos o proteínas de diferentes especies para la conservación en medio líquido. Diversos estudios sugieren el empleo de albúmina sérica humana al 6%. Además, deben

incluirse agentes antibacterianos como la azida sódica o el timerosal (Ochoa Azze, 2012).

### **3.2. Evaluación de la sensibilización de la fase sólida**

En los ELISA es extremadamente importante la etapa de sensibilización de la fase sólida. En estos ensayos hay una proporcionalidad entre el número de moléculas inmovilizadas en la primera capa sobre la matriz sólida y las que reaccionan en la segunda capa. Esta proporcionalidad continúa en capas ulteriores y es responsable de la sensibilidad del ensayo. Además, es vital que la orientación de las moléculas inmovilizadas sea la correcta.

La adsorción de las biomoléculas depende, principalmente, de las débiles fuerzas de atracción intermoleculares basadas en polaridades eléctricas intramoleculares alternativas y estacionarias, mediadas principalmente en el primer caso por grupos hidrofóbicos y en el segundo, por grupos hidrofílicos (Ochoa Azze, 2012).

#### **3.2.1. Selección del soporte sólido**

Se describen un gran número de materiales utilizados como fase sólida, entre ellos, el cloruro de polivinilo, el polipropileno, el acrílico y la nitrocelulosa, entre otros. El poliestireno es el más usado por su excelente cualidad óptica, por facilitar enlaces estables y por su dureza mecánica. Las microplacas de poliestireno pueden ser estándares o de alta captación. Estas últimas, además de los grupos hidrofóbicos característicos de este material, tienen una fina red de grupos hidrofílicos capaces de establecer puentes de hidrógeno (Ochoa Azze, 2012).

En el caso de los antígenos de pobre adsorción deben emplearse soportes que faciliten la unión covalente, aunque también pueden usarse plásticos convencionales. La inmovilización se logra a través de moléculas puentes, como la albúmina sérica bovina o humana metilada y otras sustancias policatiónicas como la poli-L-lisina. En el caso de los péptidos sintéticos puede también alcanzarse mediante extensión del extremo N-terminal con grupos que faciliten su adsorción (Ochoa Azze, 2012).

Entonces, la fase sólida más ampliamente explotada es la placa de microtitulación de 96 pocillos fabricada a partir de cloruro de polivinilo (placas flexibles) o de poliestireno (placas rígidas e inflexibles).

En forma general, se recomienda el uso de pocillos de fondo plano en los que se emplea la lectura espectrofotométrica para evaluar el desarrollo de color. Sin embargo,

los pocillos de fondo redondo pueden ser utilizados cuando se realiza la evaluación visual de la prueba (Crowther, 2000).

Existen otros formatos sólidos como perlas o micropartículas, membranas, tubos, tiras o placas tipo estrella, los cuales brindan una mayor sensibilidad y detectabilidad al aumentar la superficie de contacto y disminuir los tiempos de reacción (Ochoa Azze, 2012).

El rendimiento de las placas debe ser examinado en forma rutinaria ya que no se puede asumir que las placas no varían en su rendimiento. Esto es particularmente importante cuando se trabaja con lotes de placas diferentes (Crowther, 2000).

### **3.2.2. Inmovilización del material biológico**

Una característica clave de la fase sólida del ELISA es que los antígenos o los anticuerpos se pueden unir a las superficies fácilmente por adsorción pasiva. Este proceso es comúnmente llamado revestimiento. La mayoría de las proteínas se adsorben a las superficies de plástico, probablemente, como resultado de interacciones hidrófobas entre las subestructuras de la proteína no polar y la matriz de plástico. Las interacciones son independientes de la carga neta de la proteína y, por lo tanto, cada proteína tiene una constante de unión diferente (Crowther, 2000).

La inmovilización del material biológico depende principalmente de las características del soporte sólido, de las propiedades de la biomolécula donde la velocidad de difusión disminuye proporcionalmente al aumento del volumen hidrodinámico, de la hidrofobicidad y del tipo de soporte sólido.

Otro factor importante es la concentración de la biomolécula ya que a mayor concentración se incrementa la adsorción. Generalmente, concentraciones entre 1-10  $\mu\text{g/mL}$  son suficientes, aunque estas deben estimarse en cada caso. Las concentraciones elevadas pueden provocar una disminución de la sensibilidad y la detectabilidad del ensayo (efecto gancho) debido a la formación de sobrecapas de biomoléculas débilmente adsorbidas que se liberan fácilmente en los pasos subsiguientes, inhibiendo los inmunorreactantes en la fase líquida.

Más aún, en esta etapa se requiere establecer las condiciones de temperatura y tiempo de incubación ya que son directamente proporcionales a la adsorción. La temperatura aumenta la velocidad de difusión mediante el incremento de la interacción entre la biomolécula y la fase sólida. Por otra parte, un tiempo apropiado es necesario para lograr una inmovilización efectiva. Sin embargo, cuando se prolonga demasiado el

tiempo o se aumenta excesivamente la temperatura, puede disminuir la adsorción por desnaturalización de las biomoléculas. Existe una relación inversa entre tiempo y temperatura que debe ser controlada estrechamente. Las incubaciones de 2 a 4 horas a 37 °C son equivalentes a incubaciones de 16 a 20 horas a 2-8 °C, generalmente, esta última combinación es la satisfactoria.

Finalmente, los amortiguadores que se emplean en el recubrimiento, en la dilución de los inmunorreagentes y en los lavados se determinan experimentalmente. Generalmente tienen un pH neutro y los usados como diluyentes contienen moléculas con función estabilizante y bloqueadora (Cox y col., 2014).

El amortiguador más común y que aporta mejores resultados es el amortiguador carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Otros amortiguadores utilizados son el Tris 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 8,5; Tris 0,05 M, pH 8,0; el fosfato de sodio 0,01 M, NaCl 0,1 M, pH 7,2; el citrato 0,1 M, pH 6,0; el clásico amortiguador fosfato salino (PBS) 0,15 M, pH 7,2- 7,4 e, incluso, el agua desionizada. No deben emplearse amortiguadores con elevada fuerza iónica, detergentes u otras moléculas que puedan competir con los sitios de unión a la fase sólida o aumentar la viscosidad de la solución. Sin embargo, el Tween-20 al 0,05% (v/v) es el de elección cuando se usa material de alta captación (Cox y col., 2014).

### **3.3. Selección de los reactivos de detección**

La reacción antígeno-anticuerpo se detecta generalmente mediante un cambio de color o la emisión de luz producidos por la interacción de una enzima y su sustrato. Ambos efectos son cuantificables y proporcionales a la intensidad de la interacción.

El uso de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos que pueden usarse y la gran estabilidad de los conjugados. Los criterios de selección para una enzima marcadora son bajo costo y alto grado de pureza en su obtención, presencia de grupos reactivos para la unión covalente, estable en forma libre y conjugada, elevada actividad catalítica, soluble, sensible y mensurable, no debe hallarse en el medio a examinar y la actividad debe conservarse en las condiciones de la prueba. Por otra parte, se debe tener en cuenta la disponibilidad de sustratos estables, baratos y no tóxicos que permitan la formación de productos estables (Hornbeck, 2001).

Numerosas enzimas son utilizadas en los ensayos heterogéneos, pero la HRP y fosfatasa alcalina son las de uso más frecuente. En los ensayos homogéneos se utilizan

la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, la lisozima, la malato deshidrogenasa y la hexoquinasa, entre otras (Harlow y Lane, 1998).

La HRP es una hemoproteína que transfiere el hidrógeno de moléculas donadoras al peróxido de hidrógeno, se conjuga fácilmente, tiene una elevada actividad catalítica y un gran número de cromógenos que permiten la lectura fotométrica, como la 3,3',5, 5'-tetrametil-bencidina, la orto-fenilendiamina y el 2,2'-azino-bis (Harlow y Lane, 1998).

La fosfatasa alcalina es una enzima de difícil conjugación, sin embargo, sus conjugados son muy estables. Aunque la sensibilidad con los sustratos cromogénicos es inferior a la que puede alcanzarse con la peroxidasa, la fosfatasa alcalina reúne otras ventajas, es menos dependiente de factores interferentes como la hemoglobina en la muestra y la lectura, en la mayoría de los ensayos, puede hacerse sin que se requiera detener la reacción (Tijssen, 1993).

La elección del sustrato es de gran importancia para la estandarización del método ELISA y hay que tener en cuenta varios factores como la sensibilidad, la especificidad, la repetibilidad, la facilidad de lectura y complejidad de preparación, así como la estabilidad después de la reacción.

En los últimos años se ha incrementado el uso de sistemas cíclicos enzimáticos de amplificación y sustratos fluorescentes y quimioluminiscentes, todos en aras de aumentar la sensibilidad de los ensayos (Ochoa Azze, 2012).

Por lo tanto, la actividad enzimática puede estimarse mediante fluorimetría, luminometría o colorimetría, como medida de los productos solubles formados, o mediante sustratos de depósito. Los productos fluorescentes y luminiscentes brindan una sensibilidad y una detectabilidad superior y permiten una mayor dilución de los inmunoreactantes, así como una reducción del tiempo de ejecución de los ensayos y del volumen de reacción. Sin embargo, la colorimetría sigue siendo el método más empleado debido a la posibilidad de evaluación visual, equipamiento sencillo y mayor estabilidad de los productos formados (Tijssen, 1993).

La reacción enzimática en el ELISA se puede detener mediante el agregado de reactivos de parada como NaOH, HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Este paso se realiza generalmente en el momento en que la relación entre la enzima-sustrato-producto se encuentra en la fase lineal.

Los resultados se miden espectrofotométricamente y las longitudes de onda para la lectura de los sustratos, antes o después de la adición de agentes de parada, depende de las características del conjugado utilizado (Hornbeck, 2001).

### **3.4. Evaluación de las condiciones de reacción**

En la interacción antígeno-anticuerpo participan los mismos factores que intervienen en el revestimiento, es decir, el pH, la fuerza iónica, la temperatura y los solventes orgánicos influyen en la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo.

La formación de complejos se incrementa con la temperatura, siendo las más utilizadas, temperaturas entre 20-25 °C y 37°C.

El tiempo de reacción óptimo para las muestras y el conjugado se determina por la mayor discriminación entre el estándar o el control positivo y el control negativo. Debe tenerse en cuenta que un excesivo tiempo de reacción puede incrementar las uniones inespecíficas, sobre todo en los ensayos indirectos.

La estandarización de un EIA es un proceso dinámico en el que las fronteras entre este procedimiento y el de validación no están claramente definidas. Una buena estandarización es necesaria para obtener resultados confiables en el proceso de validación, siendo necesario, en algunas oportunidades, realizar una re-estandarización del método.

### **4. Validación de los métodos analíticos**

La validación es la confirmación mediante el examen y la provisión de una evidencia objetiva de que se han satisfecho los requisitos particulares para un uso pretendido y específico (Ruisánchez y col., 2005). El proceso de validación permite emitir resultados confiables para una adecuada toma de decisiones (Padilla, 2007).

La necesidad de validar los métodos de análisis involucra tanto a los ensayos cualitativos como a los cuantitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos que utilizan curvas de calibración para calcular la concentración o actividad de las muestras estudiadas y los resultados se dan en una distribución continua. Algunas técnicas que usan una escala discontinua, se denominan semi-cuantitativas (Ochoa y col., 2000). Por otra parte, los métodos cualitativos son aquellos que no ofrecen un resultado numérico sino binario, es decir, positivo o negativo (Ochoa Azze, 2012; Trullos y col., 2004; Ochoa y col., 2000).

En este trabajo abordaremos los parámetros de calidad que caracterizan a los métodos cualitativos. Esta razón se basa netamente en que, como mencionaremos más adelante, el objetivo principal de este trabajo de tesis es la validación de un EIA para la

detección de patógenos asociados a diarreas mucosanguinolentas. Por ello, a continuación, definiremos exclusivamente los parámetros de calidad involucrados en la validación de este tipo de ensayos.

#### **4.1. Parámetros involucrados en la validación de métodos inmunológicos cualitativos**

Según diversos autores, los parámetros fundamentales a evaluar para la validación de los métodos inmunológicos cualitativos son la especificidad, la selectividad, la sensibilidad, la robustez, el valor predictivo positivo y negativo, el límite de detección, el límite de corte, el rango de incertidumbre y los estudios de concordancia (Ochoa y col., 2000; Ruisánchez y col., 2005; Magnusson y Ornemark, 2014).

##### **4.1.1. Límite de detección**

El límite de detección (LD) se conoce como la menor cantidad de analito que puede ser detectada en una muestra, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones experimentales establecidas.

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (del inglés: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), en un documento preliminar, proporcionaba una definición similar y adoptaba el término valor (verdadero) mínimo detectable, como equivalente al límite de detección (Currie, 1995).

Por otra parte, la ISO introdujo el término general de concentración neta mínima detectable, como la concentración (o cantidad) neta verdadera de analito en el material sujeto a análisis que conducirá, con una probabilidad  $(1-\beta)$ , a la conclusión de que la concentración (o cantidad) de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco (ISO, 1997).

##### **4.1.2. Zona de incertidumbre**

La zona de incertidumbre o zona gris es aquella en la que los resultados no pueden clasificarse con certeza como positivos o negativos, o son claros pero no reproducibles. Esta zona o región de error corresponde al intervalo de concentraciones donde se obtienen resultados falsos positivos y negativos, por lo que está definida por un valor superior e inferior de concentración del analito en la muestra. La extensión de esta zona es importante y define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que esta zona sea más estrecha (Ruisánchez y col., 2005).

#### 4.1.3. Sensibilidad

La sensibilidad (S) se define como la probabilidad de que la respuesta analítica, y por ende la prueba, resulte positiva cuando en la muestra estudiada está realmente presente el sustrato de interés diagnóstico en los límites de detección o por arriba de ellos (Sánchez Ruiz y col., 2010).

Es importante la diferenciación de los términos sensibilidad diagnóstica, empleado en los ensayos cualitativos, y sensibilidad analítica. La sensibilidad analítica se define como la sensibilidad del ensayo a cambios en la concentración del analito y depende de la pendiente de la curva dosis-respuesta y de la imprecisión en la determinación de la concentración del analito (Ochoa y col., 1999). En los ensayos cualitativos, la sensibilidad diagnóstica es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada (Ochoa y col., 2000).

$$S = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

Donde:

S: sensibilidad

VP: verdaderos positivos

FN: falsos negativos

Los valores óptimos de S dependen de los propósitos de la técnica, idealmente el 100%, aunque por lo general una elevada sensibilidad se alcanza a expensas de la especificidad y viceversa. Para que la S de un método analítico sea estadísticamente válida se debe cumplir la siguiente regla de decisión: si la S es menor al 95% el método analítico no tiene buena S, por lo contrario, si la S es mayor o igual al 95% el método analítico tiene buena S (Sánchez Ruiz y col., 2010).

#### 4.1.4. Especificidad

La especificidad (E) es la probabilidad de que la respuesta analítica, y por ende la prueba, resulte negativa debido a que en la muestra estudiada está ausente el sustrato de

interés o se encuentra por debajo de los límites de detección (Sánchez Ruiz y col., 2010).

$$E = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

Donde:

E: especificidad

VN: verdaderos negativos

FN: falsos negativos

De la misma manera que para la S, los valores óptimos de E dependen de los propósitos de la técnica, idealmente el 100%. Para que la E de un método analítico sea estadísticamente válida se debe cumplir la siguiente regla de decisión: si la E es menor al 95% el método analítico no tiene buena E, por lo contrario, si la E es mayor o igual al 95% el método analítico tiene buena E (Sánchez Ruiz y col., 2010):

#### 4.1.5. Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de que el sustrato de interés diagnóstico esté presente o en la cantidad mínima detectable cuando la prueba resultó positiva (Ochoa y col., 2000).

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

Donde:

VPP: valor predictivo positivo

VP: verdaderos positivos

FP: falsos positivos

Para que el VPP de un método analítico sea estadísticamente válido se debe cumplir la siguiente regla de decisión: si VPP es menor al 95%, el método analítico no tiene buen VPP, mientras que si VPP es mayor o igual al 95%, el método analítico tiene buen VPP.

Por otra parte, el valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad que el sustrato de interés diagnóstico esté ausente o en una cantidad inferior a la mínima detectable cuando la prueba resultó negativa (Ochoa y col., 2000).

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

Donde:

VPN: valor predictivo negativo

VN: verdaderos negativos

FN: falsos negativos

Para que el VPN de un método analítico sea estadísticamente válido se debe cumplir la siguiente regla de decisión: si VPN es menor al 95%, el método analítico no tiene buen VPN, por el contrario, si VPN es mayor o igual al 95% el método analítico tiene buen VPN.

Los valores predictivos, manteniendo la S y la E invariables, se modifican drásticamente de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad y los marcadores inmunológicos, genéticos, bioquímicos o de otra índole estudiados en la población. A medida que la prevalencia disminuye, el VPN aumenta y el VPP disminuye (Ochoa y col., 2000).

#### **4.1.6. Precisión**

La precisión de un ensayo es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos en las mediciones repetidas de un mismo objeto o de objetos similares bajo

condiciones especificadas. Este parámetro se expresa numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas (Ochoa Azze, 2012).

La precisión del ensayo puede ser evaluada mediante la determinación de dos niveles, la precisión intraensayo e interensayo.

La precisión intraensayo es la que se obtiene cuando se procesan varias réplicas de diferentes muestras en un mismo ensayo; es decir, la precisión entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (repetibilidad). Deben analizarse muestras que hayan sido procesadas independientemente, desde la preparación hasta los resultados finales y usarse al menos dos concentraciones diferentes del analito. El número de repeticiones recomendado varía desde cinco a diez.

La precisión interensayo es la que se obtiene entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones. Se evalúan muestras de diferentes concentraciones y se hacen entre tres a diez replicados en un ensayo dado, repitiendo este procedimiento al menos dos veces en días diferentes para un total de tres ensayos. La precisión interensayo permite también explorar la reproducibilidad del trabajo de un laboratorio durante un período de tiempo determinado, evaluar la ejecución entre los técnicos y la variación entre laboratorios o lotes de reactivos.

Los EIA, por su propio carácter, son menos precisos que las técnicas químicas, físicas o bioquímicas, por lo que el criterio de validación es menos riguroso. El coeficiente de variación (CV) no debe superar el 10% en la prueba de precisión intraensayo y el 20% en la interensayo. Sin embargo, algunas normas admiten hasta el 20% en la prueba intraensayo (Ochoa Azze, 2012).

#### **4.1.7. Eficacia o coincidencia**

La eficacia o coincidencia es la capacidad general de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos, es decir, una eficacia óptima se alcanzará en aquella técnica que no tenga resultados falsos positivos ni falsos negativos.

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de muestras se utilizan estudios de concordancia (o eficiencia), como son la prueba de McNemar y, el más usado, el índice de concordancia Kappa (K).

El K puede clasificarse en cinco grupos de acuerdo a los valores obtenidos: deficiente ( $K < 0,20$ ), regular ( $K = 0,21 - 0,40$ ), moderada ( $K = 0,41 - 0,60$ ), buena ( $K =$

0,61 – 0,80) y muy buena ( $K= 0,81 – 1,00$ ). En la práctica, cualquier valor de  $K$  menor a 0,5 denota una baja correlación.

Un problema del uso de este índice es que los valores dependen de la proporción o prevalencia de las muestras de cada categoría, haciendo que no sea posible la comparación entre los diferentes índices procedentes de varios estudios.

La prueba de McNemar es empleada cuando se comparan dos métodos con las mismas muestras y las sensibilidades y especificidades pueden aparearse (Ochoa Azze, 2012).

#### **4.1.8. Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por pequeñas variaciones deliberadas en los parámetros del método. Si las mediciones son susceptibles a estas variaciones durante el análisis, entonces las condiciones analíticas deben ser controladas de forma adecuada o debe ser incluirse una declaración de precaución en el procedimiento (Ochoa Azze, 2012; Magnusson y Ornemark, 2014).

Entonces, el análisis de la robustez de un método consiste en introducir modificaciones en las condiciones experimentales y observar sus influencias en el desarrollo del mismo. Un ejemplo de variaciones típicas es el estudio de la estabilidad de las soluciones analíticas frente a pequeños cambios en la temperatura, pH y concentración de reactivo, entre otras (Magnusson y Ornemark, 2014).

##### **4.1.8.1. Estimación de la estabilidad térmica de reactivos empleados en el ELISA**

La vida útil es una medida del tiempo en el que las características de rendimiento de una prueba se mantienen estables bajo las condiciones de manipulación especificadas. El cambio en la calidad depende de factores tales como la temperatura de almacenamiento, la humedad, la protección del paquete y la formulación.

Las tasas de degradación de los reactivos se definen por las leyes de la química y la física. El factor dominante a un dado pH, fuerza iónica y composición es la temperatura. Por lo tanto, la degradación de cualquier producto puede ser monitoreado a altas temperaturas y, posteriormente, determinar la vida útil utilizando dicha información y extrapolando a la temperatura de almacenamiento prevista.

Los ensayos de los productos en tiempo real son considerados el estándar de oro para la determinación de las fechas de caducidad pero su determinación no es práctica

en la mayoría de los casos. Debido a esto, los ensayos de Estabilidad Térmica Acelerada se utilizan a menudo en el desarrollo de reactivos clínicos para proporcionar un indicador temprano de la vida útil de los mismos.

Los ensayos de Estabilidad Térmica Acelerada son estudios diseñados para incrementar la velocidad de degradación química y/o biológica o el cambio físico de un medicamento o insumo por medio del empleo de temperaturas de almacenamiento exageradas.

El poder predictivo de los datos de estabilidad procedentes de este estudio acelerado se fundamenta en la ecuación de Arrhenius que se utiliza para predecir la estabilidad de un producto a temperaturas ordinarias a partir de los datos obtenidos a altas temperaturas.

La ecuación de Arrhenius, que se muestra a continuación, expresa la relación entre la constante de velocidad de una reacción y la temperatura a la cual transcurre la misma (Levine, 2004).

$$K(T) = A \cdot e^{-E_a/RT}$$

Donde:

K (T): constante de velocidad de la reacción dependiente de la temperatura

A: factor pre-exponencial o factor de frecuencia

Ea: energía de activación de la reacción

R: constante de los gases ideales

T: temperatura absoluta (K) de conservación del equipo

Para calcular el plazo de validez (n) de los distintos componentes involucrados en el desarrollo del prototipo de ELISA diseñado (policubetas sensibilizadas con anticuerpos, conjugados, sustrato, solución de frenado y controles positivos) se aplica la siguiente modificación de la ecuación de Arrhenius:

$$T = \frac{-E_a / R}{\left[ \frac{\ln \Sigma e^{-E_a / RT_n}}{n} \right]}$$

Dónde:

K (T): constante de velocidad de la reacción dependiente de la temperatura

A: factor de frecuencia o factor pre-exponencial, relacionado con la frecuencia de las colisiones entre las moléculas de reactivos y sus unidades dependerán de las de K.

E<sub>a</sub>: energía de activación de la reacción (E<sub>a</sub> = 83 KJ/mol)

R: constante de los gases ideales. Si la E<sub>a</sub> está dada en J/mol, su valor es 8,31 J/mol

T: temperatura absoluta (K) de conservación del equipo

T<sub>n</sub>: temperatura usada en el período n

n: plazo de validez

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral fue desarrollar dos sistemas de enzimoimmunoensayos para la detección de *Escherichia coli* O157 y *Escherichia coli* no O157 productoras de Shigatoxinas asociadas a diarreas mucosanguinolentas o a brotes alimentarios con el propósito de contribuir al diagnóstico de estos patógenos prevalentes en nuestra región, de difícil caracterización y cuya identificación permite un abordaje diferencial a nivel terapéutico y de vigilancia.

### **Objetivos específicos**

1. Reconocer todas las variables involucradas en el desarrollo de un prototipo de enzimoimmunoanálisis en fase sólida para la detección de los patógenos bacterianos mencionados.
2. Estandarizar la metodología de enzimoimmunoanálisis.
3. Validar el ensayo desarrollado mediante la determinación de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos.
4. Comparar la capacidad de detección de esta metodología desarrollada con las técnicas de cultivo e identificación clásica, la PCR y los enzimoimmunoanálisis comerciales.
5. Realizar el análisis comparativo con estudios de costos y accesibilidad.

## ***Materiales y métodos***

### **1. Confección de la colección de cepas**

La construcción de la colección de cepas involucró el trabajo conjunto de nuestro grupo de investigación con los siguientes hospitales de la zona del Gran Rosario que son Nivel 2 en la Red de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria: Hospital de Niños Zona Norte, Hospital Provincial de Rosario, Hospital de Niños Víctor J. Vilela, Hospital Escuela Eva Perón y Hospital Provincial del Centenario.

Los aislamientos recuperados e identificados taxonómicamente fueron incorporados a la colección de cepas para su posterior utilización en los ensayos de estandarización y validación de los ELISA desarrollados en el marco de este trabajo.

La denominación de los distintos aislamientos se realizó de acuerdo al código **X999Y**, donde:

X: lugar de origen (**V**: Hospital de Niños Víctor J. Vilela; **Z**: Hospital de Niños Zona Norte; **C**: Hospital Provincial del Centenario; **B**: Hospital Escuela Eva Perón; **P**: Hospital Provincial de Rosario).

999: número de aislamiento

Y: microorganismo (**Ec**: virotipos de *E. coli* diarreogénicas; **Sh**: *Shigella* spp.; **Ca**: *Campylobacter* spp.; **Sa**: *Samonella* spp. y **V**: otros microorganismos).

Sumado a esto, fueron incorporados a la colección de cepas aislamientos clínicos no relacionados a procesos diarreicos provenientes del servicio asistencial del Área Bacteriología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) que trabaja con muestras de pacientes que concurren al Hospital Provincial del Centenario. Los aislamientos incorporados fueron *Achromobacter xiloxidans*, *Alcaligenes faecalis*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, Estafilococo coagulasa negativo grupo *haemolyticus*, Estafilococo coagulasa negativo grupo *saprophyticus*, Estafilococo coagulasa negativo grupo *simulans*, *Proteus penneri*, *Serratia marscescens*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

Además, fueron incluidas cepas pertenecientes a la colección de nuestro grupo de investigación, las que incluyeron fundamentalmente *E. coli* diarreogénicas recuperadas a partir de muestras de animales y alimentos, como así también de origen humano.

La colección de cepas también incluyó las siguientes cepas control de calidad provenientes de la colección americana de cultivo (ATCC) (del inglés, *American Type Culture Collection*): *Acinetobacter baumannii* ATCC 19696, *Acinetobacter iwoffii* ATCC 15309, *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *Campylobacter jejuni* ATCC 700819, *Campylobacter coli* ATCC 33559, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* ATCC 27164, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Escherichia coli* ATCC 700336, *Escherichia coli* ATCC 35401, *Escherichia coli* ATCC 43890, *Escherichia coli* ATCC 43889, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Morganella morganii* ATCC 25829, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Providencia alcalifaciens* ATCC 9886, *Providencia stuartii* ATCC 33672, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Shigella flexneri* ATCC 29903, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 13636, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

Finalmente, se incluyeron las cepas *E. coli* O104 no toxigénica, EE5 (*E. coli* O111:H8 productora de Stx1a y Stx2a), JJ10 (*E. coli* O157:H7 productora de Stx2c) y B2F1 (*E. coli* O91:H21 productora de Stx2d) (Feng y col., 2011b).

Los aislamientos fueron conservados en caldo tripteína soya (CTS) con el agregado de glicerol (20%) a una temperatura de -70 °C.

## **2. Confirmación de género y especie en los aislamientos incorporados a la colección de cultivo**

### **2.1. Desarrollo en medios selectivos**

Los aislamientos bacterianos sospechosos de STEC se realizaron en el medio selectivo SMAC y en el medio cromogénico CHROMagar™ O157 para aumentar la selectividad del método de aislamiento. Las cepas STEC O157 desarrollaron en placas de SMAC como colonias pequeñas e incoloras, en tanto, en el medio cromogénico CHROMagar™ O157 se observaron colonias de color malva.

En el caso particular de otros enteropatógenos como *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. se utilizó el medio selectivo agar Salmonella Shigella (SS), donde las colonias de

*Salmonella* spp. se presentaron como incoloras, transparentes con centro negro e incoloras, transparentes sin centro negro en el caso de *Shigella* spp.

## **2.2. Identificación bacteriana mediante pruebas bioquímicas metabólicas**

Con el fin de corroborar la identidad de las diferentes cepas derivadas por los diferentes centros adheridos al proyecto, se procedió a su caracterización mediante el empleo de pruebas bioquímicas metabólicas.

Los aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente mediante las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa, fermentación de lactosa, fermentación de sacarosa, utilización del citrato, actividad ureasa, producción de ácido sulfhídrico, producción de indol, movilidad, actividad lisina descarboxilasa, actividad ornitina descarboxilasa, actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, fermentación del sorbitol, actividad citocromooxidasa y orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) (Farmer, 1999).

## **2.3. Identificación bacteriana mediante aglutinación**

La detección del serogrupo O157 se realizó mediante aglutinación en lámina con antisuero policlonal anti-O157 (Oxoid Ltd., Reino Unido). En tanto a los aislamientos identificados como *Shigella* spp. se les realizó aglutinación en lámina utilizando antisueros OshA, OshB, OshC y OshD (Bio-Rad Laboratories, EE.UU.) para la identificación de las especies *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*, respectivamente. Finalmente, los aislamientos caracterizados fenotípicamente como *Salmonella* spp. fueron ensayados con los antisueros polivalentes O (Remel Europe Ltd., Reino Unido).

## **2.4. Determinación de la presencia de Shigatoxinas mediante el ELISA comercial Ridascreen® Verotoxin**

El equipo Ridascreen® *Verotoxin* es un enzimoimmunoensayo para la identificación cualitativa de Shigatoxinas 1 y 2 presentes en *E. coli* en muestras de heces y en cultivos enriquecidos.

El procedimiento para la determinación de Shigatoxinas mediante el Ridascreen® *Verotoxin* consistió en añadir 100  $\mu$ L de muestra o control a cada pocillo e incubar 1 h a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Luego de la incubación, se descartó el contenido de cada pocillo y se lavó cinco veces con 300  $\mu$ L de solución de lavado provista por el fabricante. Se añadió 100  $\mu$ L del conjugado enzimático a cada pocillo y se incubó 30

min a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Posteriormente, se procedió nuevamente al lavado y se agregó 100 µL de la solución sustrato/ cromógeno a cada pocillo. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (20 - 25 °C) al abrigo de la luz y se añadió 50 µL de solución de frenado a cada pocillo. Finalmente, se midió la densidad óptica (OD) de cada uno de los pocillos a 450 nm corregida a 600 nm.

## **2.5. Caracterización genotípica de los aislamientos bacterianos de *E. coli* diarreogénicos y *Shigella* spp.**

### **2.5.1. Extracción de ADN bacteriano**

Para la extracción del ADN se tomaron 5 colonias aisladas y se resuspendieron en 100-200 µL de agua destilada estéril y se llevó a una OD de 0,5 medido a 600 nm en espectrofotómetro. Esta suspensión se calentó a 94 °C durante 15 min y se centrifugó 15 s a 10000 rpm. Posteriormente, se utilizaron 5 µL del sobrenadante como templado para las reacciones de PCR que se describen a continuación (Ridley, 1998).

### **2.5.2. Amplificación por PCR de genes codificantes de factores de patogenicidad**

Se estudió la presencia de los genes codificantes para los diferentes factores de patogenicidad que definen los distintos virotipos de *E. coli* diarreogénicos y de *Shigella* spp.

La confirmación del virotipo STEC se realizó mediante una PCR múltiple destinada a la detección de los genes codificantes de las Stx (*stx1* y *stx2*) y del factor correspondiente al LPS O157 (*rfbO157*). Para ello se trabajó con un volumen final de 25 µL de una mezcla de reacción conteniendo solución buffer PCR 1X; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,05 mM de cada dNTP; cebadores *stx1* (2 pmol/µL); cebadores *stx2* (0,4 pmol/µL); cebadores *rfbO157* (0,4 pmol/µL) y 0,02 U/µL de Taq polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización previa a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillado a 58 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Se realizó un último ciclo a 72 °C durante 2 min para completar la elongación de los productos de amplificación. Como controles positivos se utilizaron el ADN proveniente de las cepas *E. coli* ATCC 43895 (*stx1*, *stx2*, *rfbO157*), *E. coli* ATCC 43890 (*stx1*) y *E. coli* ATCC 43889 (*stx2*) y como control negativo, el ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Paton y Paton, 1998b).

Para la detección del gen *eae* se trabajó con un volumen final de 25 µL de una mezcla de reacción conteniendo solución buffer PCR 1X; 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de

cada dNTP; cebadores específicos (0,4 pmol/μL) y 0,02 U/μL de Taq polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización previa a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillado a 54 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 2 min. Un último ciclo a 72 °C durante 2 min fue realizado para completar la elongación de todos los productos de amplificación. Como control positivo se utilizó el ADN proveniente de la cepa *E. coli* ATCC 43895 y como control negativo, ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922 (Karch y col., 1993).

Para la detección de los genes *einv* y *agg* que definen a los virotipos EIEC y EAEC, respectivamente, se trabajó con un volumen final de 25 μL de una mezcla de reacción conteniendo solución buffer PCR 1X; 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; cebadores específicos (0,2 pmol/μL) y 0,03 U/μL de Taq polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización previa a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillado a 63 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 60 s. Finalmente, se incluyó un último ciclo a 72 °C durante 7 min para completar la elongación de todos los productos de amplificación. Como controles positivos se utilizó el ADN proveniente de las cepas *S. flexneri* ATCC 29903 (*einv*) y de *E. coli* O104 provista por el Instituto Dr. Carlos G. Malbrán (*agg*) y, como control negativo, *E. coli* ATCC 25922 (Pass y col., 2000).

La detección de los genes que codifican para las toxinas LT1, ST1 y ST2 (*ltI*, *stI* y *stII*) se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL de una mezcla de reacción conteniendo solución buffer PCR 1X; 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de cada dNTP; cebadores específicos (0,4 pmol/μL) y 0,03 U/μL de Taq polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización previa a 94 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillado a 62 °C durante 60 s y extensión a 72 °C durante 60 s. Un último ciclo a 72 °C durante 7 min para completar la elongación de todos los productos de amplificación. Como control positivo se utilizó el ADN proveniente de la cepa *E. coli* ATCC 35401 y, como control negativo, de *E. coli* ATCC 25922 (Pass y col., 2000).

En el caso de *Shigella* spp., el estudio de los factores de patogenicidad para caracterizar este género involucró la detección de los genes *ipaH* y *virA*

Para la detección del gen *ipaH* se trabajó con un volumen final de una mezcla de reacción conteniendo solución buffer PCR 1X; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; cebadores específicos (0,5 pmol/μL) y 1 U/μL de Taq polimerasa. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización previa a 94 °C durante 2 min,

seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, anillado a 60 °C durante 1 min y extensión a 68 °C durante 3 min. Un último ciclo se realizó a 72 °C durante 5 min para completar la elongación de todos los productos de amplificación. Como control positivo se utilizó el ADN de la cepa *S. flexneri* ATCC 29903 (Hartman y col., 1990) y como control negativo el ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Por otra parte, para la detección del gen *virA* se trabajó con un volumen final de una mezcla de reacción conteniendo solución buffer PCR 1X; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; cebadores específicos (1 pmol/μL) y 1 U/μL de Taq polimerasa. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización previa a 94 °C durante 1 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, anillado a 65 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Un último ciclo a 72 °C durante 5 min para completar la elongación de todos los productos de amplificación. Como control positivo se utilizó el ADN de la cepa *S. flexneri* ATCC 29903 (Villalobo y Torres, 1998) y como control negativo el ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922.

En todos los casos los productos de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio (1 μg/mL) y, posteriormente, fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. Según el tamaño del fragmento amplificado, se utilizó un marcador de peso molecular con un tamaño de bandas entre 100 - 1000 pb (100 pb) o con un tamaño de bandas entre 250 - 10000 pb (1 Kb).

Las secuencias de los cebadores utilizados en las distintas reacciones de PCR, así como el tamaño de los productos de amplificación se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en las reacciones de amplificación

| Genes          | Cebadores (5' - 3')                                  | Tamaño del producto de amplificación (pb) | Referencias          |
|----------------|--|---|----------------------|
| <i>stx1</i>    | F: GAAGAGTCCGTGGGATTACG<br>R: AGCGATGCAGCTATTAATAA   | 130                                       | Paton y Paton, 1998b |
| <i>stx2</i>    | F: TTAACCACACCCACCGGGCAGT<br>R: GCTCTGGATGCATCTCTGGT | 346                                       | Paton y Paton, 1998b |
| <i>rfbO157</i> | F: CGGACATCCATGTGATATGG<br>R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC  | 259                                       | Paton y Paton, 1998b |

| Genes       | Cebadores (5' - 3')   | Tamaño del producto de amplificación (pb) | Referencias              |
|-------------|---|---|--------------------------|
| <i>eae</i>  | F: CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC<br>R: CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG      | 864                                       | Karch y col., 1993       |
| <i>ipaH</i> | F: TGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGG<br>R: TTCTGATGCCTGATGGACCAGGAG       | 140                                       | Pass y col., 2000        |
| <i>agg</i>  | F: AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC<br>R: ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC      | 194                                       | Pass y col., 2000        |
| <i>tlf</i>  | F: TGGATTCATCATGCACCACAAGG<br>R: CCATTTCTCTTTTGCCTGCCATC        | 360                                       | Pass y col., 2000        |
| <i>stI</i>  | F: TTTCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG<br>R: GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG    | 160                                       | Pass y col., 2000        |
| <i>stII</i> | F: CCCCTCTCTTTTGCCTTCTTTCC<br>R: TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACCC     | 423                                       | Pass y col., 2000        |
| <i>ipaH</i> | F: GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGT<br>R: GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC | 619                                       | Hartman y col., 1990     |
| <i>virA</i> | F: CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACATC<br>R: TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC  | 215                                       | Villalobo y Torres, 1998 |

F: directo, R: inverso, pb: pares de bases

### 3. Recolección de muestras de materia fecal

Con el objeto de realizar los ensayos de validación de los equipos de ELISA desarrollados, se recolectaron muestras de heces de pacientes que concurrieron a los hospitales pertenecientes a la red conformada para el desarrollo y validación de estos prototipos.

Las muestras fueron sembradas en agar SMAC y CHROMAgar™ O157 para la búsqueda de *E. coli* O157 mediante la individualización de colonias transparentes no fermentadoras de sorbitol y de colonias color malva, respectivamente. Posteriormente, las colonias sospechosas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas metabólicas, fueron serotipificadas utilizando el antisuero policlonal anti-O157 (Oxoid Ltd.) y, finalmente, fueron confirmadas por PCR múltiple para la detección de los genes *rfbO157*, *stx1* y *stx2*.

En aquellas placas en las que no se observaron colonias con características macroscópicas compatibles con *E. coli* O157, se realizó una suspensión bacteriana

proveniente de la zona de confluencia con la finalidad de efectuar la extracción del ADN y la PCR múltiple para detección de los genes mencionados anteriormente.

Las suspensiones bacterianas fueron alicuotadas y conservadas a -20 °C para su posterior procesamiento en los ensayos de validación de los ELISA desarrollados.

#### **4. Sensibilización y desarrollo del ELISA-O157 y ELISA-Stx2**

##### **4.1. Preparación de soluciones**

###### **4.1.1. Buffer *coating***

El buffer *coating* consistió en una solución de carbonato / bicarbonato de sodio, preparada de acuerdo a la siguiente formulación: 8,40 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 2,00 mg/L de eritrosina, 1,00 g/L de azida de sodio. La solución se llevó a un pH de 9,6 ± 0,1 empleando NaOH 4 N. Posteriormente, se filtró a esterilidad utilizando sucesivamente membranas de 1,2 µm, 0,45 µm y 0,2 µm.

###### **4.1.2. Solución de bloqueo**

La solución de bloqueo consistió en una solución de peptona al 2% en buffer *coating*. Posteriormente, se filtró a esterilidad utilizando sucesivamente membranas de 1,2 µm, 0,45 µm y 0,2 µm.

###### **4.1.3. Solución de lavado**

La solución de lavado se preparó utilizando 100 mM de fosfatos, 40 g/L de ClNa y 5 g/L de Tween 20 (pH=7). Posteriormente, se filtró a esterilidad utilizando sucesivamente membranas de 1,2 µm, 0,45 µm y 0,2 µm.

###### **4.1.4. Solución de sustrato**

La solución de sustrato se preparó empleando 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mM de clorhidrato de tetrametilbencidina y 50 mM de ácido cítrico (pH=5,2).

###### **4.1.5. Solución de parada**

La solución de parada consistió en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

##### **4.2. Sensibilización de las policubetas**

De acuerdo al conocimiento y a la experiencia previa sobre la tecnología ELISA de la empresa GT Lab. involucrada en el Proyecto de Investigación “Desarrollo de un

Test de Enzimoimmunoensayo Múltiple para la Detección de Patógenos Bacterianos en Diarreas” presentado en la convocatoria FITS Salud- Diarreas Bacterianas N° 0001/2011, la fase sólida seleccionada para el desarrollo del ELISA fue una policubeta de microtitulación de poliestireno cristal de alta capacidad de fijación de proteínas. Dentro de los diseños estudiados, se optó por emplear el formato de 12 tiras de 8 pocillos armada sobre marcos para totalizar 96 pocillos por unidad (marca Greiner Bio One, Alemania).

La sensibilización de las policubetas del ELISA para la detección de *E. coli* O157 (en adelante, ELISA-O157) y del ELISA para detección de Stx-2 (en adelante, ELISA-Stx2) involucró la preparación de una solución del anticuerpo de captura o primario en buffer *coating*.

En ambos ELISA, las policubetas fueron sensibilizadas con 100 µL del anticuerpo de captura durante 2 h a una temperatura de 37 °C en una estufa libre de contaminaciones. Posteriormente, se descartó el contenido de las policubetas y se agregó en cada pocillo 200 µL de la solución de peptona estéril al 2%. La tiras se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Luego, se descartó el contenido de las policubetas y se colocaron invertidas sobre papel de filtro a 37 °C durante 1 h para su secado. El almacenamiento de las mismas se realizó en recipientes herméticos a temperaturas entre 2 - 8 °C.

#### **4.3. Desarrollo de la técnica del ELISA-O157 y del ELISA-Stx2**

Las policubetas fueron inoculadas con 100 µL de las suspensiones de cultivos bacterianos utilizados como controles positivos y negativos. Se trabajó con diferentes concentraciones de muestras y controles. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, los pocillos se lavaron 5 veces con 300 µL de solución de lavado. Finalizada esta etapa, se agregó 100 µL del anticuerpo policlonal de cabra anti- *E. coli* O157 marcado con HRP (código ABIN288142, antibodies- online, EE.UU.) a cada pocillo y se incubó 30 min a 37 °C. Posteriormente, las policubetas se lavaron 5 veces con 300 µL de solución de lavado y se agregó 100 µl de la solución de sustrato a cada pocillo. Se incubaron las microplacas a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 min al abrigo de la luz. Se agregó 50 µL de solución parada a cada pocillo de reacción y se procedió a la lectura de la OD a 450/620 nm utilizando espectrofotómetro (UNICO, New Jersey, EE.UU.).

En el caso del desarrollo del ELISA-Stx2, se sembraron los pocillos con 100 µL de muestras y/o controles positivos y negativos y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Luego los pocillos se lavaron 5 veces con 300 µL de solución de lavado. Posteriormente, se agregó 100 µL del anticuerpo secundario y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Luego, los pocillos se lavaron nuevamente y, a continuación, se agregó 100 µL de un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo marcado con HRP (marca Ab Frontier, código LF-SA5002A) y se incubó 30 min a 37 °C. Se lavaron los pocillos nuevamente, se agregó 100 µL de sustrato, se incubó a temperatura ambiente (20 - 25 °C) durante 15 min al abrigo de la luz y, finalmente, se añadió 50 µL de solución de parada. Se procedió a la lectura de la OD a 450/620 nm en el espectrofotómetro (UNICO).

## **5. Estandarización del ELISA-O157 y del ELISA-Stx2**

### **5.1. Definición de la concentración de anticuerpo utilizado para la sensibilización de las policubetas del ELISA-O157**

La sensibilización de las policubetas del ELISA-O157 involucró la evaluación del uso de dos anticuerpos de captura o primarios. En primer lugar se analizó el anticuerpo policlonal comercial de cabra anti *E. coli* O157 (código: ab 30521, Abcam, Reino Unido) y en segundo lugar, el anticuerpo monoclonal anti *E. coli* O157 (código: ab 13625, Abcam, Reino Unido).

Para la selección del anticuerpo de captura y la estandarización de la concentración del mismo, se evaluaron diferentes concentraciones de ambos anticuerpos anti *E. coli* O157 a saber, 3,75 µg/mL; 1,5 µg/mL; 0,75 µg/mL; 0,5 µg/mL; 0,25 µg/mL y 0,175 µg/mL. Las distintas concentraciones del anticuerpo fueron preparadas en buffer *coating* y el proceso de sensibilización se realizó de acuerdo a lo detallado en el apartado 4.2.

Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de ELISA de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.3. Para este ensayo en particular, se trabajó con una concentración de 0,5 µg/mL (1:1000) del anticuerpo policlonal de cabra anti *E. coli* O157-HRP según recomendaciones del fabricante.

Como control positivo de la reacción se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 43889 y, como control negativo, la cepa *E. coli* ATCC 25922.

La concentración óptima de recubrimiento a una temperatura, tiempo y amortiguador definido se define como aquella concentración en la que el control

positivo alcanza la mayor señal, generalmente mantenida a concentraciones superiores (meseta) y se obtiene la menor señal para el control negativo y/o el blanco reactivo (Ochoa y col., 2000).

### **5.2. Definición de la concentración de los anticuerpos utilizados para sensibilización de las policubetas y como anticuerpos secundarios del ELISA-Stx2**

El objetivo de esta etapa fue seleccionar el anticuerpo de captura o primario y el anticuerpo secundario que se emplearon en el ELISA sándwich. Para ello resultó necesario determinar las concentraciones óptimas de ambos anticuerpos. Se utilizaron concentraciones de 2,5 µg/mL; 1,5 µg/mL; 1 µg/mL y 0,5 µg/mL del anticuerpo monoclonal comercial anti Shigatoxina 2 (marca Hycult Biotech) en buffer *coating* y del anticuerpo policlonal de conejo anti Stx2 (facilitado por la Dra. Roxane Piazza del Servicio de Bacteriología- Instituto Butantán) para sensibilizar las policubetas. Además, estos mismos anticuerpos fueron ensayados como anticuerpos secundarios a concentraciones de 2 µg/mL y 4 µg/mL preparados en buffer fosfato salino (PBS) (pH=7,3).

De esta manera, los resultados de este ensayo permitieron determinar el anticuerpo óptimo a emplear tanto como anticuerpo de captura como anticuerpo secundario, y sus respectivas concentraciones de trabajo.

Se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 43889 y *E. coli* ATCC 25922 como controles positivo y negativo, respectivamente. Las determinaciones fueron procesadas por triplicado.

Las condiciones que permitieron seleccionar el anticuerpo de captura y el secundario y la dilución de los mismos, fueron evaluadas mediante los valores de OD a los que se observó una mayor diferencia entre las concentraciones del control positivo y negativo, con una menor variabilidad.

### **5.3. Definición de la concentración del conjugado marcado con HRP**

Para la definición de la concentración del conjugado empleado en el ELISA-O157, se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra anti- *E. coli* O157-HRP (antibodies-online). Se trabajó con diluciones 1:1000 y 1:2000 en solución PBS (pH=7,3) de la solución comercial.

En el caso del ELISA-Stx2, el anticuerpo de cabra anti IgG de conejo marcado con HRP (Ab Frontier) fue ensayado a concentraciones de 0,25 µg/mL y 0,5 µg/mL.

Como control positivo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 43889 y, como control negativo, la cepa *E. coli* ATCC 25922. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **5.4. Definición de la fase sólida**

Una vez definidas la concentraciones óptimas de los anticuerpos de captura y conjugado para el desarrollo del ELISA, se ensayó una marca comercial alternativa de microplaca (Biomat srl, Italia).

Como control positivo se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 43889 y, como control negativo, la cepa *E. coli* ATCC 25922. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **5.5. Preparación de los controles positivo y negativo**

Se preparó el control positivo (CPH) que, posteriormente, fue utilizado en los ensayos de validación del ELISA-O157 y del ELISA-Stx2. Para ello se inoculó CTS con la cepa control *E. coli* ATCC 43889 (*E. coli* O157:H7 productora de Stx-2) y se incubó durante 24 h a 37 °C con agitación a 200 rpm. Posteriormente, se ajustó la concentración de bacterias de la suspensión a  $1 \times 10^8$  UFC/mL mediante la medición de la OD utilizando espectrofotómetro y comparando con la curva de crecimiento correspondiente. A partir de esta suspensión se tomó 1 mL y se centrifugó a 3000 g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se inactivó la suspensión bacteriana por calentamiento en un baño térmico a 60 °C durante 60 min. Luego se agregó solución Kathon hasta alcanzar una concentración final de 0,1%. Finalmente, la suspensión se fraccionó en tubos eppendorf y se conservó a -20 °C hasta el momento de su uso.

De la misma manera, se procedió a la preparación del control negativo (CN). Para ello, se inoculó CTS con *E. coli* ATCC 25922 y se incubó durante 24 h a 37 °C. A continuación, se procedió de la misma manera que lo descrito para la preparación del CPH.

Para confirmar la inactivación del patógeno y la pureza del CPH y CN, se sembró la suspensión bacteriana inactivada en placas con medio diferencial CLDE y con medio selectivo SMAC y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se consideró que la inactivación del microorganismo y la pureza del CPH y del CN fueron óptimas en ausencia de crecimiento bacteriano.

Los CPH y CN, preparados de acuerdo a lo descrito anteriormente, fueron almacenados a 4°C y a -20 °C durante 7 días y, posteriormente, fueron ensayados empleando el ELISA-O157 y el ELISA-Stx2.

## **6. Validación del ELISA-O157 y del ELISA Stx-2**

### **6.1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo**

Se determinó la S, la E y los valores predictivos del ELISA-O157 y del ELISA-Stx2 mediante la evaluación de 100 muestras de materia fecal. Basándonos en la experiencia previa de GT Lab. como empresa productora de ELISA y de acuerdo a lo publicado en los boletines técnicos de los equipos disponibles en el mercado, se adoptó un valor de corte empírico de 0,8 (Ridascreen® *Verotoxin*, 2004; Solus *E. coli* O157 ELISA, 2015).

En el caso del ELISA-O157, se consideró la técnica de cultivo en el medio SMAC y/o CHROMagar™ O157 como el método de referencia (Kase y col., 2015). Además, se compararon los resultados obtenidos mediante ambas metodologías con la detección del gen *rfbO157* mediante la PCR múltiple descrita en el apartado 2.5.2. de esta sección.

Por otra parte, al evaluar el ELISA-Stx2 empleando las suspensiones bacterianas provenientes de colonias sospechosas de STEC o de la zona de confluencia del cultivo de materia fecal, se consideró a la metodología de PCR para la detección del gen *stx2* como método de referencia. Además, se compararon los resultados obtenidos mediante ambas metodologías con el ELISA comercial Ridascreen® *Verotoxin* (R- Biopharm AG, Alemania).

Respecto a la S, E, VPP y VPN, estas fueron calculadas mediante la construcción de tablas de contingencia de 2x2.

Para evaluar la concordancia entre las distintas metodologías diagnósticas empleadas (ELISA desarrollado, cultivo, PCR y ELISA comercial), se calcularon los valores de concordancia K.

### **6.2. Cálculo del punto de corte, sensibilidad y especificidad diagnóstica**

Los valores de S y E dependen de la selección óptima del punto de corte de la prueba diagnóstica. Una herramienta útil para la determinación de los puntos de corte son las curvas ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*). Estas curvas

presentan la sensibilidad de una prueba diagnóstica, en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad), para distintos puntos de corte.

Otro parámetro que se evaluó fue la bondad de la prueba diagnóstica mediante la determinación del área bajo la curva (AUC). Esta área puede interpretarse como la probabilidad de que ante un par de individuos, uno enfermo y el otro sano, la prueba los clasifique correctamente.

Se trabajó con las lecturas de OD de las 100 muestras de materia fecal procesadas con el ELISA-O157 y el ELISA-Stx2. Como lo mencionamos anteriormente, se consideró la técnica de cultivo en el medio SMAC y/o CHROMagar™ O157 y la PCR como métodos de referencia para el diagnóstico de *E. coli* O157 y la detección de Stx-2, respectivamente.

### **6.3. Límite de detección**

Para determinar el LD del prototipo desarrollado se prepararon 10 suspensiones bacterianas de *E. coli* O157:H7 productora de Stx-2 (*E. coli* ATCC 43889) de 5 niveles de concentración cercanos al LD esperado ( $1 \times 10^8$  UFC/mL,  $1 \times 10^7$  UFC/mL,  $1 \times 10^6$  UFC/mL,  $1 \times 10^5$  UFC/mL y  $1 \times 10^4$  UFC/mL) y fueron analizadas con el ELISA-O157 y el ELISA-Stx2. Posteriormente, se calculó la frecuencia relativa de resultados positivos [P(x)] para cada nivel de concentración.

Mediante el empleo del programa CurveExpert 1.4, se graficó la P(x) en función de las UFC/mL, ajustando la curva a una sigmoidea. La bondad del ajuste de la mencionada curva se determinó mediante el análisis del coeficiente de correlación (r) y el error estándar (EE), brindados por el mencionado programa.

De acuerdo a lo establecido por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), el LD se consideró aquella concentración del analito a estudiar donde las respuestas analíticas de al menos el 95% de los ensayos fueron positivas (CLSI, 2008).

### **6.4. Rango de incertidumbre o región de error**

Dado que el rango de incertidumbre o región de error se define como la región de concentración donde existen las probabilidades más elevadas de que la respuesta del ensayo sea errónea, se procedió a la determinación de este parámetro. A partir de la gráfica obtenida para el cálculo del LD, se determinó el rango de incertidumbre como la región comprendida entre el 5% y el 95% de los resultados positivos.

## **6.5. Reactividad del ELISA-O157 y ELISA-Stx2**

Los microorganismos utilizados para evaluar la reactividad de los ELISA desarrollados fueron *E. coli* O157 y no O157 de origen clínico como alimentario. Estas cepas se incubaron durante 24 h en CTS con agitación suave a 35 - 37 °C. Posteriormente, 1 mL de estos caldos fueron centrifugados a 3000 g durante 5 min. Los sobrenadantes fueron empleados para realizar, por triplicado, la reacción de ELISA.

Para evaluar el ELISA-O157 se ensayaron 13 suspensiones bacterianas de *E. coli* O157 de las cuales 9 eran cepas de origen alimentario (L3Ec, L6Ec, L7Ec, L10Ec, L11Ec, L12Ec, L19Ec, L20Ec y L24Ec), 2 de origen clínico (P57Ec y P62Ec) y 2 cepas manipuladas en el laboratorio de *E. coli* O157 no toxigénicas (P39Ec y P40Ec).

Por otra parte, para evaluar el ELISA-Stx2, se utilizaron 10 STEC productoras de Stx-2, de las cuales 6 corresponden a cepas de origen alimentario (L6Ec, L7Ec, L11Ec, L12Ec, L19Ec y L24Ec) y 4 de origen clínico (P37Ec, P41Ec, P57Ec y P62Ec).

Sumado a esto, se evaluó la capacidad del ELISA-Stx2 para detectar las variantes de la toxina Stx-2. Para ello se utilizaron las cepas EE5, JJ10 y B2F1.

## **6.6. Determinación de reacciones cruzadas**

Los microorganismos utilizados para evaluar la posible presencia de reacciones cruzadas fueron incubaron durante 24 h en CTS con agitación suave a 35 - 37 °C (28 °C en el caso de *Candida albicans*). Posteriormente, 1 mL de cada uno de estos caldos de enriquecimiento fueron centrifugados a 3000 g durante 5 min. Los sobrenadantes fueron empleados para realizar, por triplicado, la reacción de ELISA.

Los microorganismos ensayados fueron *Acinetobacter baumannii* ATCC 19696, *Achromobacter xiloxidans* (aislamiento clínico), *Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* ATCC 7966, *Alcaligenes faecalis* (aislamiento clínico), *Aspergillus niger* (aislamiento clínico), *Bacillus subtilis* ((aislamiento ambiental), *Campylobacter jejuni* ATCC 700819, *Campylobacter coli* ATCC 33559, *Candida albicans* ATCC 10231, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Escherichia coli* ATCC 700336, *Escherichia coli* ATCC 35401, *Escherichia coli* ATCC 25922, EPEC (Vt42Ec, aislamiento de origen animal), STEC productora de Stx-1 (L6Ec, aislamiento alimentario), EAEC (L25Ec, aislamiento clínico), EPEC (L4Ec, aislamiento clínico), ETEC (Vt44Ec, aislamiento de origen animal), EIEC (P58Ec, aislamiento clínico), Estafilococos coagulasa negativo

grupo *haemolyticus* (aislamiento clínico), Estafilococos coagulasa negativo grupo *saprophyticus* (aislamiento clínico), Estafilococos coagulasa negativo grupo *simulans* (aislamiento clínico), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Morganella morganii* ATCC 25829, *Proteus mirabilis* ATCC 29906, *Proteus penneri* (aislamiento clínico), *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Providencia stuartii* ATCC 33672, *Pseudomonas aeroduginosa* ATCC 9027, *Samonella enteritidis* ATCC 13076, *Serratia marscescens* (aislamiento clínico), *Shigella flexneri* ATCC 29903, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Xanthomonas (Stenotrophomonas) maltophilia* ATCC 13636, *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, *Streptococcus pyogenes* (aislamiento clínico) y *Streptococcus agalactiae* (aislamiento clínico).

Se utilizó el CPH y el CN como controles positivo y negativo de la reacción.

### **6.7. Precisión**

La precisión de los ELISA desarrollados se determinó utilizando el control positivo a dos concentraciones diferentes, el CPH y este mismo control diluido 10 veces (CPL); y el CN. Para ello, se realizaron 10 repeticiones para cada uno de los controles durante 3 días. Posteriormente, se calculó el valor promedio (X), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variabilidad (CV) entre las réplicas en un ensayo (repetibilidad) y la variabilidad durante los tres días (precisión intermedia).

### **6.8. Ensayos de estabilidad térmica acelerada**

El estudio de estabilidad térmica acelerada se realizó para predecir la estabilidad de los ELISA desarrollados a temperaturas ordinarias a partir de los datos obtenidos a altas temperaturas.

En este contexto, los diferentes componentes del ELISA fueron sometidos a condiciones de almacenamiento que se detallan a continuación: a) 28 °C durante 5, 10 y 15 días; b) 37 °C durante 5, 10 y 15 días y c) 42 °C durante 2, 3 y 4 días.

La estabilidad térmica fue calculada mediante aplicación de la ecuación de Arrhenius a los resultados obtenidos, la cual nos permitió inferir la estabilidad térmica entre 2 - 8°C. Para aplicación de la mencionada ecuación se consideró que la temperatura de conservación (T) fue 278 K (5 °C), valor promedio de temperaturas entre 2 °C y 8 °C. Además, la energía de activación fue de 83 kJ/mol y los períodos de ensayo (n) fueron expresados en días.

#### **6.8.1. Ensayos de estabilidad térmica de las policubetas sensibilizadas**

Las placas fueron sensibilizadas, bloqueadas y envasadas en recipientes herméticos. Posteriormente, fueron sometidas a las diferentes condiciones térmicas mencionadas anteriormente, guardando una contramuestra a 4 °C.

#### **6.8.2. Ensayos de estabilidad térmica del CPH**

Se ensayó la estabilidad térmica del CPH para lo cual se sometió el mencionado control a las condiciones térmicas antes mencionadas. Luego se ensayó el ELISA-O157 y el ELISA-Stx2, procesando en paralelo con el CPH conservado a 4 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6.8.3. Ensayos de estabilidad térmica del conjugado anti *E. coli* O157-HRP**

El conjugado fue diluido a una concentración final de trabajo de 0,001 µg/mL en buffer PBS (pH=7,3) y fue fraccionado en tubos eppendorf. Posteriormente, fue sometido a las condiciones de incubación antes mencionadas. Luego, se ensayó el ELISA-O157 utilizando el conjugado sometido al tratamiento térmico previamente descrito y, en paralelo, el conjugado conservado a 4 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6.8.4. Ensayos de estabilidad térmica del anticuerpo secundario de conejo anti Stx2**

El anticuerpo secundario de conejo anti Stx2, utilizado en el ELISA-Stx2, fue diluido a la concentración de trabajo en buffer PBS (pH=7,3) y fue fraccionado en tubos eppendorf. Luego, fue sometido a las condiciones térmicas de incubación antes mencionadas. Posteriormente, se ensayó el ELISA utilizando el conjugado sometido al tratamiento térmico descrito previamente y el conservado a 4 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6.8.5. Ensayos de estabilidad térmica del anticuerpo de cabra anti IgG de conejo, conjugado con HRP**

El anticuerpo de cabra anti IgG de conejo-HRP, utilizado en el ELISA-Stx2, fue diluido a la concentración de trabajo en buffer PBS (pH=7,3) y fue fraccionado en tubos eppendorf. Luego, fue sometido a las condiciones térmicas de incubación antes mencionadas. Posteriormente, se ensayó el ELISA utilizando el conjugado sometido al tratamiento térmico previamente descrito. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **6.8.6. Ensayos de estabilidad térmica del sustrato**

El sustrato fue alicuotado y sometido posteriormente a las condiciones térmicas anteriormente mencionadas. Posteriormente, se ensayó el ELISA-O157 y ELISA-Stx2 utilizando los reactivos sometidos al tratamiento térmico previamente descrito. Los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **7. Análisis estadístico**

Las OD de los valores obtenidos por los ensayos de ELISA se analizaron por la media y el error estándar de la media utilizando el programa SigmaPlot 10.0. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos cuando el valor de p fuera de 0,05.

Para la construcción de la curva ROC y el tratamiento de datos se utilizó el programa estadístico SigmaPlot 10.0.

El LD y la zona de incertidumbre se determinaron mediante la construcción de la curva correspondiente utilizando el Programa CurveExpert, de acuerdo a lo detallado en el apartado 6.3 de esta sección.

## Resultados

### PARTE I. Colección de cultivo y de muestras de materia fecal

#### 1. Confección de la colección de cepas

El trabajo conjunto de nuestro grupo de investigación junto al Hospital de Niños Zona Norte, al Hospital Provincial de Rosario, al Hospital de Niños Víctor J. Vilela, al Hospital Escuela Eva Perón y al Hospital Provincial del Centenario logró la recolección de 255 aislamientos que incluyeron 177 *Shigella* spp., 35 *Salmonella* spp., 31 *C. jejuni*, 3 *C. coli*, 4 EIEC, 1 EAEC y 4 STEC.

Dos trabajos publicados recientemente por nuestro grupo de investigación describen la caracterización de los aislamientos de *S. sonnei* y *S. flexneri* y de *C. jejuni* utilizados en este trabajo, profundizando en los perfiles de los factores de patogenicidad que presentan estos géneros bacterianos (Casabonne y col., 2016a; Casabonne y col., 2016b).

Los aislamientos de *E. coli* diarreogénicos derivados por los mencionados hospitales fueron incluidos en su totalidad a la colección de cepas. Por otro lado, considerando el resto de los aislamientos mencionados, se seleccionaron al azar representantes de cada especie bacteriana y de cada hospital participante de manera de lograr una mayor diversidad en la selección de los mismos y en la construcción de la colección de cepas.

Los aislamientos seleccionados para continuar con los ensayos de estandarización y validación de los ELISA desarrollados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Aislamientos seleccionados al azar a partir de las cepas derivadas por los distintos hospitales que colaboraron en el trabajo.

| Código | Microorganismo     | Derivante                    |
|--------|--------------------|------------------------------|
| B1Sh   | <i>S. flexneri</i> | H. Escuela Eva Perón         |
| B8Sh   | <i>S. sonnei</i>   | H. Escuela Eva Perón         |
| C11Sh  | <i>S. flexneri</i> | H. Provincial del Centenario |
| C117Sh | <i>S. sonnei</i>   | H. Provincial del Centenario |

| Código | Microorganismo         | Derivante                    |
|--------|------------------------|------------------------------|
| P14Sh  | <i>S. sonnei</i>       | H. Provincial                |
| P24Sh  | <i>S. flexneri</i>     | H. Provincial                |
| V44Sh  | <i>S. sonnei</i>       | H. Victor J. Vilela          |
| V61Sh  | <i>S. flexneri</i>     | H. Victor J. Vilela          |
| Z16Sh  | <i>S. flexneri</i>     | H. de Niños Zona Norte       |
| Z81Sh  | <i>S. sonnei</i>       | H. de Niños Zona Norte       |
| B1Sa   | <i>Salmonella</i> spp. | H. Escuela Eva Perón         |
| C55Sa  | <i>Salmonella</i> spp. | H. Provincial del Centenario |
| P9Sa   | <i>Salmonella</i> spp. | H. Provincial                |
| V3Sa   | <i>Salmonella</i> spp. | H. Victor J. Vilela          |
| Z6Sa   | <i>Salmonella</i> spp. | H. de Niños Zona Norte       |
| P33Ca  | <i>C. jejuni</i>       | H. Provincial                |
| V30Ca  | <i>C. jejuni</i>       | H. Victor J. Vilela          |
| Z27Ca  | <i>C. jejuni</i>       | H. de Niños Zona Norte       |
| P25Ca  | <i>C. coli</i>         | H. Provincial                |
| V5Ca   | <i>C. coli</i>         | H. Victor J. Vilela          |

B: Hospital Escuela Eva Perón, C: Hospital Provincial del Centenario, P: Hospital Provincial de Rosario, V: Hospital de Niños Víctor J. Vilela, Z: Hospital de Niños Zona Norte, H.: hospital; S.: *Shigella*; Sh: *Shigella*; Sa: *Salmonella*; C.: *Campylobacter*; Ca: *Campylobacter*.

A continuación, se muestra la Tabla 3, donde se encuentran detalladas las cepas de *E. coli* diarreogénicas derivadas por los distintos hospitales y las pertenecientes a nuestro de investigación, las cuales fueron confirmadas feno y genotípicamente como se describirá en el apartado 2 de la presente sección.

**Tabla 3.** Características de los aislamientos *E. coli* diarreogénicas confirmados por técnicas fenotípicas, serológicas y genotípicas.

| <b>Código</b> | <b>Microorganismo</b> | <b>Origen</b>   | <b>Presencia de gen</b>   |
|---------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|
| L3Ec          | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L4Ec          | EPEC                  | Alimento        | <i>eae</i>                |
| L6Ec          | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L7Ec          | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L10Ec         | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx1</i> |
| L11Ec         | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L12Ec         | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L19Ec         | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L20Ec         | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx1</i> |
| L24Ec         | STEC O157             | Alimento        | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |
| L25Ec         | EAEC                  | Alimento        | <i>agg</i>                |
| Z26Ec         | EAEC                  | Humano          | <i>agg</i>                |
| L29Ec         | EAEC                  | Alimento        | <i>agg</i>                |
| L31Ec         | EAEC                  | Alimento        | <i>agg</i>                |
| L33Ec         | EPEC                  | Alimento        | <i>eae</i>                |
| P37Ec         | STEC no O157          | Humano          | <i>eae, stx2</i>          |
| P39Ec         | <i>E. coli</i> O157   | Cepa manipulada | <i>rfbO157</i>            |
| C40Ec         | <i>E. coli</i> O157   | Cepa manipulada | <i>rfbO157</i>            |
| P41Ec         | STEC O145             | Humano          | <i>eae, stx2</i>          |
| Vt42Ec        | EPEC                  | Animal          | <i>eae</i>                |
| Vt44Ec        | EPEC                  | Animal          | <i>stI, stII, stIII</i>   |
| P57Ec         | STEC O157             | Humano          | <i>eae, rfbO157, stx1</i> |

| Código | Microorganismo | Origen | Presencia de gen          |
|--------|----------------|--------|---------------------------|
| P58Ec  | EIEC           | Humano | <i>ipaH</i>               |
| P59Ec  | EIEC           | Humano | <i>ipaH</i>               |
| B60Ec  | EIEC           | Humano | <i>ipaH</i>               |
| V61Ec  | EIEC           | Humano | <i>ipaH</i>               |
| P62Ec  | STEC O157      | Humano | <i>eae, rfbO157, stx2</i> |

B: Hospital Escuela Eva Perón, C: Hospital Provincial del Centenario, P: Hospital Provincial de Rosario, V: Hospital de Niños Víctor J. Vilela, Z: Hospital de Niños Zona Norte, L: cepas perteneciente a la colección original del grupo de investigación, STEC: *E. coli* Shigatoxigénica, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, EPEC: *E. coli* enteropatógena, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EAEC: *E. coli* enteroagregativa.

Numerosos trabajos presentados por nuestro grupo de investigación en distintas reuniones científicas nacionales e internacionales, profundizaron sobre las metodologías empleadas para el aislamiento y detección de las *E. coli* diarreogénicas y *Campylobacter* spp. en muestras de origen alimentario (Casabonne y col., 2015; González y col., 2013; Comba y col., 2013; Migliore y col., 2013; Dusso y col., 2013).

De esta manera, de acuerdo a lo presentado en la Tabla 3, podemos observar 2 aislamientos de *E. coli* diarreogénicas (ETEC y EPEC) recuperadas a partir de muestras de animales, concretamente de porcinos, producto de la vinculación con la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario.

Por otra parte, en la Tabla 3 podemos observar que, en su mayoría, los aislamientos recuperados fueron de origen alimentario, describiéndose 14 cepas que incluyeron 2 EPEC, 3 EAEC y 9 STEC O157. Estos virotipos de *E. coli* diarreogénicos se recuperaron a partir de muestras de carne picada, quesos fundidos y derivados cárnicos tales como, salchichas y hamburguesas. Estos hallazgos fueron los resultantes de trabajos en colaboración con el Instituto del Alimento de Rosario “Dr. Benjamín Berisso” y de proyectos de investigación realizados por nuestro grupo de trabajo.

## 2. Confirmación de género y especie de los aislamientos incorporados a la colección de cultivo

### 2.1. Caracterización bioquímica y serológica de los aislamientos

Los aislamientos desarrollados en los medios selectivos fueron identificados mediante pruebas bioquímicas metabólicas y fueron confirmados mediante aglutinación utilizando antiseros comerciales.

Los resultados de las pruebas bioquímicas metabólicas que permitieron la diferenciación de *S. sonnei*, *S. flexneri* y EIEC de las restantes *E. coli*, se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Pruebas bioquímicas diferenciales de las especies *S. sonnei*, *S. flexneri*, *E. coli* y EIEC.

| Pruebas bioquímicas               | <i>E. coli</i>                  | EIEC | <i>S. flexneri</i> | <i>S. sonnei</i> |
|-----------------------------------|---------------------------------|------|--------------------|------------------|
| Actividad citocromooxidasa        | -                               | -    | -                  | -                |
| Fermentación de glucosa           | +                               | +    | +                  | +                |
| Fermentación de lactosa           | +                               | -    | -                  | -                |
| Fermentación de sacarosa          | +                               | -    | -                  | -                |
| Producción de H <sub>2</sub> S    | -                               | -    | -                  | -                |
| Utilización del citrato           | -                               | -    | -                  | -                |
| Actividad ureasa                  | -                               | -    | -                  | -                |
| Producción de indol               | +                               | -    | - ó +              | - ó +            |
| Movilidad                         | +                               | -    | -                  | -                |
| Actividad β-glucuronidasa         | + (excepto <i>E. coli</i> O157) | +    | V                  | V                |
| Actividad lisina descarboxilasa   | +                               | -    | -                  | -                |
| Actividad ornitina descarboxilasa | +                               | +    | -                  | +                |
| ONPG                              | +                               | +    | -                  | +                |

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, *E.*: *Escherichia*, *S.*: *Shigella*, TSI: agar triple azúcar, SH<sub>2</sub>: ácido sulfhídrico, ONPG: orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, +: positivo, -: negativo, V: variable

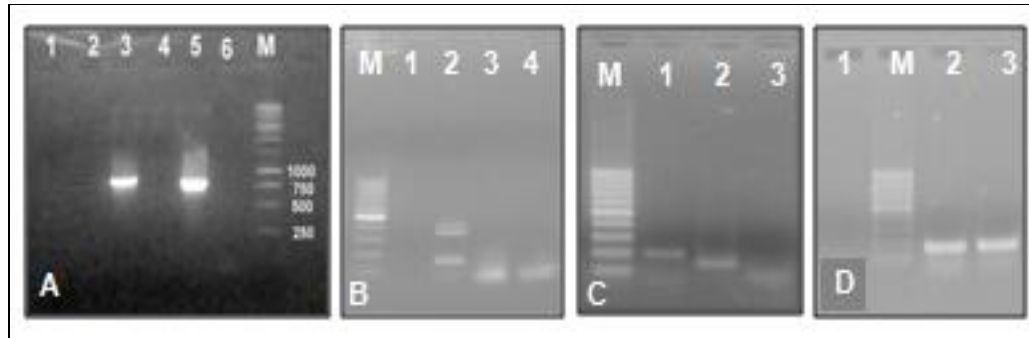
Las cepas de *E. coli* no fermentadoras de sorbitol, fueron aglutinadas con el antisuero policlonal anti-O157 (Oxoid Ltd., Reino Unido), resultando positivas para este ensayo 13 cepas de *E. coli* O157 (Tabla 3).

La identificación de *S. sonnei* y *S. flexneri* mediante pruebas bioquímicas convencionales fue confirmada mediante serotipificación, resultando 40 *S. sonnei* y 137 *S. flexneri*.

## 2.2. Caracterización genotípica de los aislamientos bacterianos de *E. coli* diarreogénicos y *Shigella* spp.

Las *E. coli* diarreogénicas fueron identificadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada uno de los genes que codifican los factores de patogenicidad que definen cada serotipo.

El análisis de los productos de amplificación permitió la identificación genotípica de 4 EAEC, 3 EPEC, 4 EIEC, 1 ETEC, 11 STEC O157, 2 STEC no O157 y 2 *E. coli* O157 no shigatoxigénicas, resultados que se detallan en la Tabla 3. En las Figuras 2 y 3 se muestran los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de PCR.



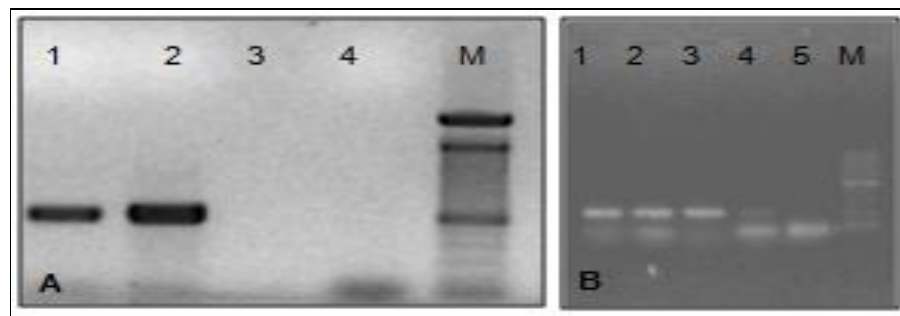
**Figura 2.** A) Amplificación del gen *eae*. Calle 1: cepa P58Ec (EIEC); calle 2: cepa Vt44Ec (ETEC); calle 3: cepa L4Ec (EPEC); calle 4: *E. coli* ATCC 25922; calle 5: *E. coli* ATCC 43895; calle 6: control negativo (sin templado); calle M: marcador de peso molecular 1 Kb. B) Amplificación de los genes *stxI*, *stxII* y *ltI*. Calle M: marcador de peso molecular 100 pb; calle 1: cepa L25Ec (EAEC); calle 2: *E. coli* ATCC 35401; calle 3: *E. coli* ATCC 25922; calle 4: control negativo (sin templado). C) Amplificación del gen *ipaH*. Calle M: marcador de peso molecular 100 pb; calle 1: cepa P58Ec; calle 2: *S. flexneri* ATCC 29903; calle 3: *E. coli* ATCC 25922. D) Amplificación del gen *agg*. Calle 1: *E. coli* ATCC 25922; calle M: marcador de peso molecular 100 pb; calle 2: cepa Z26Ec; calle 3: *E. coli* O104.



**Figura 3.** Amplificación de los genes *rfbO157* (259 pb), *stx1* (130 pb) y *stx2* (346 pb). Calle 1: *E. coli* ATCC 43895; calle 2: cepa L6Ec; calle 3: cepa Z2Ec; calle 4: *E. coli* ATCC 43890; calle 5: *E. coli* ATCC 25922; calle M: marcador de peso molecular 100 pb.

### 2.3. Detección molecular de los genes *ipaH* y *virA* en aislamientos de *Shigella* spp.

Los 177 aislamientos de *Shigella* spp. fueron confirmados como tales mediante la detección por PCR de los genes *ipaH* y *virA*. En la Figura 4 se muestran los productos de amplificación obtenidos correspondientes a los genes mencionados.



**Figura 4.** Detección molecular de los genes *ipaH* y *virA* en los aislamientos de *Shigella* spp. **A)** Productos de amplificación correspondientes al gen *ipaH* (619 pb). Calle 1: cepa Z81Sh; calle 2: *S. flexneri* ATCC 29903; calle 3: *E. coli* ATCC 25922; calle 4: control de reacción (sin templado); calle M: marcador de peso molecular 1 Kb. **B)** Productos de amplificación correspondientes al gen *virA* (215 pb). Calle 1: cepa Z16Sh; calle 2: cepa P24Sh; calle 3: cepa V44Sh; calle 4: *S. flexneri* ATCC 29903; calle 5: control de reacción (sin templado); calle M: marcador de peso molecular 100 pb.

### 3. Recolección de muestras de materia fecal

Se recolectaron 100 muestras de materia fecal de pacientes que concurrieron a los distintos hospitales involucrados en esta etapa del presente trabajo. El uso final de cada una de estas muestras fue la validación de los equipos de ELISA desarrollados.

Las muestras fueron procesadas mediante el cultivo y la identificación fenotípica, serológica y genotípica, resultando 95 muestras de materia fecal negativas para la presencia de STEC O157 y STEC no O157. Continuando el análisis de estas 95 muestras, se encontró que 35 resultaron positivas para *Shigella* spp., 1 para EPEC, 3 para *Campylobacter* spp. y 4 para *Salmonella* spp.

Por otra parte, podemos mencionar que de las 5 muestras en las cuales se detectó presencia de STEC por algunas de las metodologías empleadas, en 3 de ellas se identificó *E. coli* O157 productora de Stx-2 y, en las dos muestras restantes, *E. coli* no O157 productora de Stx-2. Ningún aislamiento estudiado correspondía a STEC productora de Stx-1.

A continuación, en la Tabla 5, se muestran los hallazgos del cultivo, la serología y la PCR obtenidos en las 5 muestras de materia fecal positivas para STEC.

**Tabla 5.** Resultados del cultivo bacteriológico, de la detección de los genes *rfbO157*, *stx1* y *stx2* mediante PCR y de la serología de las 5 muestras de materia fecal positivas para STEC.

| Materia fecal | Presencia de gen*    | Cultivo**                       | Serología*** |
|---------------|----------------------|---------------------------------|--------------|
| 4             | <i>rfbO157, stx2</i> | <i>E. coli</i> O157             | +            |
| 10            | <i>rfbO157, stx2</i> | <i>E. coli</i> O157             | +            |
| 31            | <i>stx2</i>          | Ausencia de <i>E. coli</i> O157 | -            |
| 73            | <i>rfbO157, stx2</i> | <i>E. coli</i> O157             | +            |
| 92            | <i>stx2</i>          | Ausencia de <i>E. coli</i> O157 | -            |

\*: Detección de los genes *rfbO157*, *stx1* y *stx2* mediante PCR múltiple, \*\*: aislamientos en agar SMAC y CHROMAgar™ O157, \*\*\*: aglutinación con antisuero policlonal anti-O157 (Oxoid Ltd. Reino Unido), -: negativo, +: positivo.

## **PARTE II. ELISA-O157**

### **4. Estandarización de la técnica de ELISA-O157**

#### **4.1. Definición de la concentración de anticuerpo utilizado para la sensibilización de las policubetas**

Para la estandarización del ELISA-O157, se evaluaron policubetas sensibilizadas con diferentes concentraciones del anticuerpo policlonal comercial de cabra anti *E. coli* O157 y del anticuerpo monoclonal anti *E. coli* O157 (3,75 µg/mL, 1,5 µg/mL, 0,75 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,175 µg/mL).

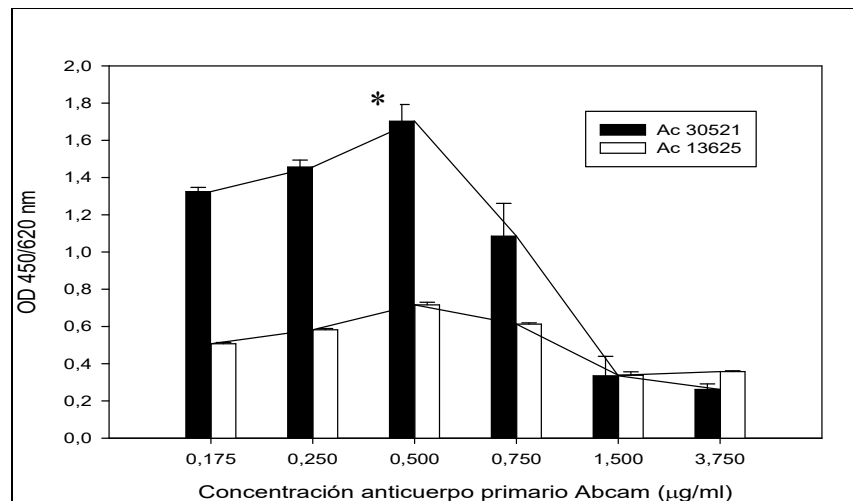
Se prepararon suspensiones bacterianas en el orden de  $1 \times 10^7$  UFC/mL a  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli* productora de Shigatoxina ATCC 43889 y *E. coli* ATCC 25922. Se trabajó con una dilución de 1:1000 del anticuerpo marcado con HRP, según criterio del fabricante (antibodies- online, EE.UU.). Todas las determinaciones fueron procesadas por triplicado.

Los valores de OD registrados al procesar el CN resultaron menores a 0,008.

Al analizar el CPH al utilizar el anticuerpo policlonal comercial de cabra anti *E. coli* O157 (ab 30521) como anticuerpo de captura, se registró la lectura de OD más alta a una concentración de 0,50 µg/mL, observándose diferencias significativas con los valores de OD registrados para el resto de las concentraciones ( $p < 0,05$ ). En base a estos resultados, se decidió seleccionar la concentración de 0,50 µg/mL para la sensibilización de las placas de manera de garantizar un recubrimiento óptimo.

En el caso del anticuerpo monoclonal anti *E. coli* O157 (ab 13625), se observó lecturas de OD por debajo de 0,600 al analizar el CPH a las distintas concentraciones estudiadas, demostrándose además diferencias significativas al comparar con el anticuerpo ab 30521.

En la Figura 5, se muestran las lecturas de OD obtenidas para cada concentración ensayada del anticuerpo policlonal comercial de cabra anti *E. coli* O157 (ab 30521) (barras negras) y del anticuerpo monoclonal anti *E. coli* O157 (ab 13625) (barras blancas)

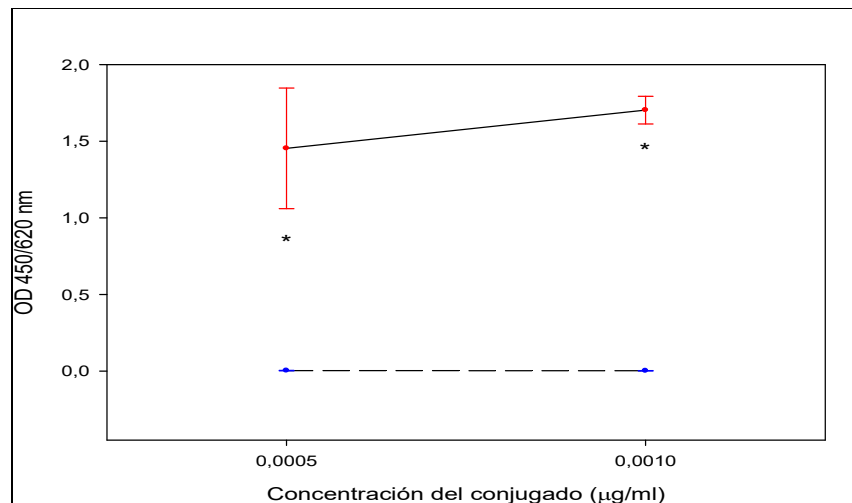


**Figura 5.** Determinación de la concentración óptima del anticuerpo policlonal comercial anti *E. coli* O157 utilizado para sensibilización de las policubetas del ELISA-O157. Las barras negras representan los controles positivos ensayados a distintas concentraciones de este anticuerpo primario. OD: absorbancia medida a 450/620 nm, \*: diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Se muestran las desviaciones estándar de los experimentos independientes realizados por triplicado.

#### 4.2. Definición de la concentración del anticuerpo marcado con HRP

Se analizaron dos concentraciones diferentes del anticuerpo anti- *E. coli* O157-HRP (antibodies- online, EE.UU.) para definir la concentración óptima de trabajo al utilizarlo como conjugado en la reacción del ELISA-O157.

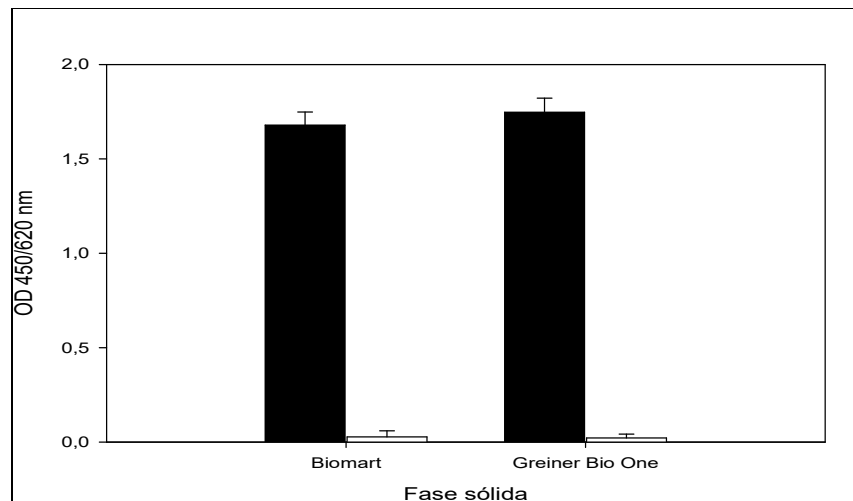
Los resultados se muestran en la Figura 6, donde se observa que, si bien la dilución 1:1000 (0,001 µg/mL) permitió una mayor diferenciación entre los controles negativo y positivo con valores OD más altos, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con la dilución 1:2000 (concentración: 0,0005 µg/mL) del mencionado anticuerpo. Como resultado de este análisis, se seleccionó 1:2000 como la dilución de trabajo para continuar los ensayos de validación.



**Figura 6.** Determinación de la concentración óptima del anticuerpo anti *E. coli*-HRP utilizado en el ELISA-O157. OD: absorbancia medida a 450/620 nm, — : control positivo, - - - : control negativo, \*: diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Se muestran las desviaciones estándar (segmentos rojos) de los experimentos independientes realizados por triplicado.

#### 4.3. Definición de la fase sólida

Se ensayaron dos marcas de microplacas de poliestireno cristal de alta capacidad de fijación de proteínas, Biomart y Greiner Bio One, empleadas como fase sólida del ELISA-O157. Al analizar los valores de OD de los controles positivos y negativos no se observaron diferencias significativas entre las marcas mencionadas ( $p > 0,05$ ) (Figura 7).

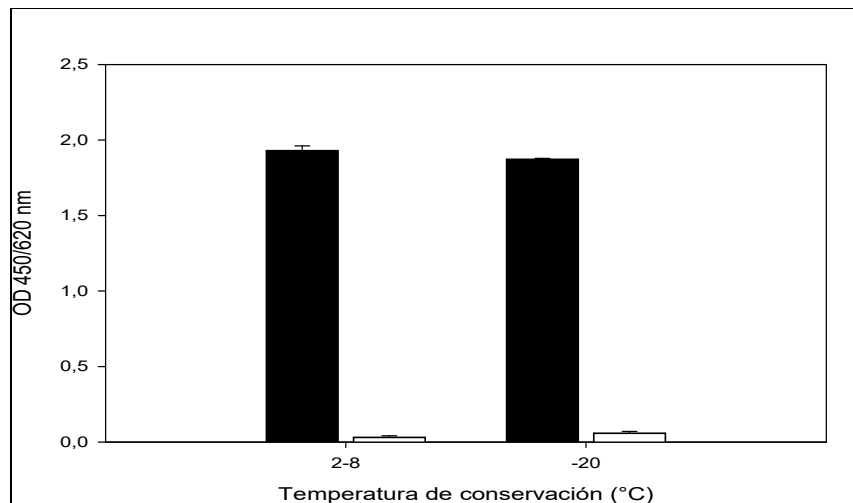


**Figura 7.** Definición del comportamiento de distintas marcas comerciales de la fase sólida utilizada para el ELISA-O157. Se muestra el comportamiento de los controles positivos (barra negra) y negativos (barra blanca) ensayados las microplacas Biomart y Greiner Bio One. Se muestran las desviaciones estándar de experimentos independientes realizados por triplicado. OD: absorbancia medida a 450/620 nm.

#### 4.4. Preparación de los controles positivo y negativo

Resulta de vital importancia para los procesos de validación la estandarización de la preparación y conservación de los controles positivo y negativo que estarán involucrados en los diferentes ensayos. Para ello, fijamos la concentración de las suspensiones bacterianas utilizadas como CPH y CN ( $10^8$  UFC/mL), su inactivación por calor y su estabilización mediante el agregado de solución de Kathon. Finalmente, se ensayó en forma preliminar la viabilidad de estos controles a temperaturas de 2 - 8 °C y de -20 °C.

Con respecto a los ensayos realizados sobre el CPH y el CN, conservados a temperaturas de 2 - 8 °C y de -20 °C, no se observaron diferencias significativas entre las mencionadas temperaturas de conservación ( $p > 0,05$ ) para ambos controles. Este comportamiento se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Resultados obtenidos al ensayar el ELISA con el control positivo (barra negra) y el negativo (barra blanca) conservados a temperaturas de 2 - 8 °C y -20 °C durante 7 días. Se muestran las desviaciones estándar de la media de los experimentos independientes realizados por triplicado.

## 5. Validación del ELISA-O157

### 5.1. Determinación de la sensibilidad, especificidad y de los valores predictivos positivo y negativo

Para el estudio de la S, E, VPP y VPN se utilizaron las 100 muestras de materia fecal derivadas por los distintos hospitales pertenecientes a la Red de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria. Estas muestras fueron analizadas empleando el ELISA-O157 y las técnicas de cultivo y PCR para detección del gen *rfbO157*.

Los resultados del cultivo y de la PCR se detallaron oportunamente en la Tabla 5. Por otro lado, los resultados obtenidos al ensayar las 100 suspensiones de los aislamientos o de las colonias provenientes de la zona de confluencia de las muestras de heces con el ELISA-O157 permitió la determinación de *E. coli* O157 en 3 de ellas (muestras 4, 10 y 73), coincidiendo con el cultivo y la detección del gen *rfbO157*.

Es importante aclarar que para el cálculo de la S, la E, el VPP y el VPN se consideraron como negativas a aquellas muestras en las que solamente se detectó el gen *stx2* mediante PCR, es decir, en aquellas que fueron tipificadas como STEC no O157. Esto responde a que el ELISA-O157 sólo permite la detección de las *E. coli* O157.

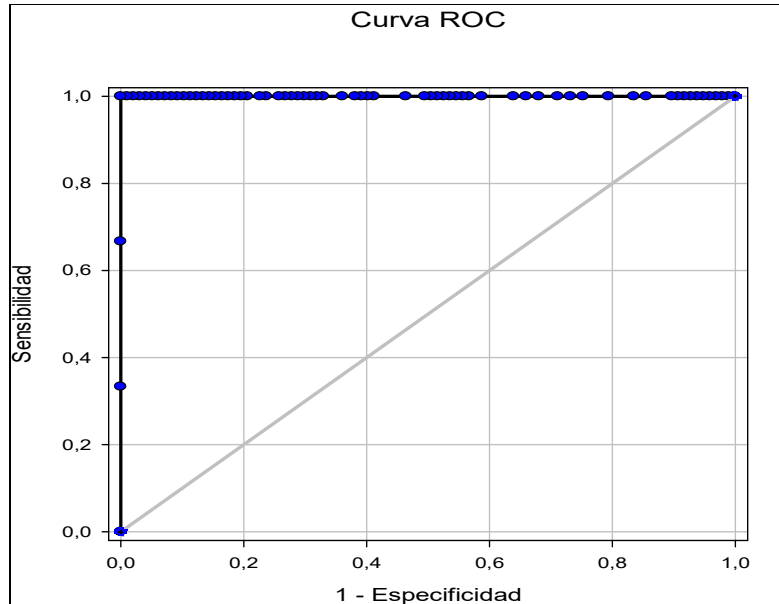
A partir de los resultados obtenidos se determinó una S y una E del 100%. Por otra parte, el VPP y el VPN fueron del 100%.

La concordancia del ELISA-O157 resultante del cálculo del índice K con respecto al cultivo y la PCR fue de 1, lo que significó una muy buena correlación entre los métodos estudiados.

## 5.2. Cálculo del valor de corte

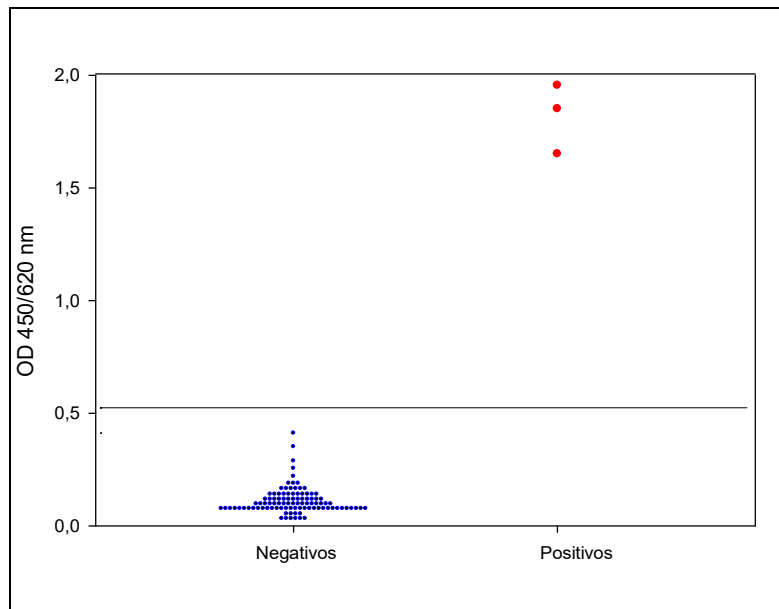
Es necesario establecer un valor de corte a partir del cual una muestra puede ser diagnosticada como positiva o negativa al emplear el ELISA-O157. Además, la designación de este valor permitió determinar la S y la E diagnósticas del ensayo mencionado. Para ello, se recurrió a la construcción de una curva ROC utilizando los valores de OD de las muestras positivas y negativas. Este análisis permitió realizar un emparejamiento de los valores de S y E para cada punto de corte.

En la Figura 9, se observa la curva ROC obtenida a partir del tratamiento estadístico de los datos, los cuales arrojaron un valor del AUC de 1 lo que implicó una excelente capacidad de discriminación del método ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Curva ROC del ELISA-O157. Área bajo la curva ROC=1,0.

Para seleccionar el punto de corte del ELISA-O157 se establecieron las características de S y E de la prueba a diferentes lecturas de OD. La mayor eficiencia de la prueba se obtuvo con un punto el corte de 0,5 donde el ensayo mostró una S del 100% y una E del 99,9% (Figura 10).

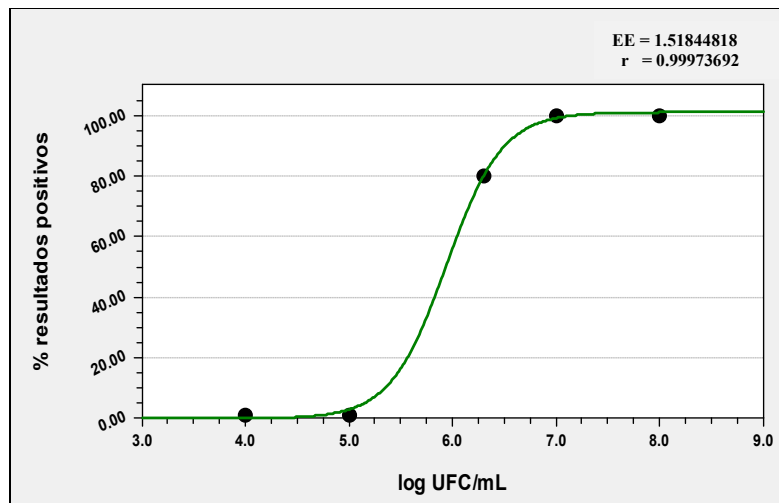


**Figura 10.** Distribución de la OD de las muestras positivas y negativas analizadas.

### 5.3. Límite de detección

Para la determinación del LD del ELISA-O157 se prepararon 10 suspensiones independientes de *E. coli* ATCC 43889 de los siguientes niveles de concentración:  $1 \times 10^8$  UFC/mL,  $1 \times 10^7$  UFC/mL,  $5 \times 10^6$  UFC/mL,  $1 \times 10^5$  UFC/mL y  $1 \times 10^4$  UFC/mL. Posteriormente, estas suspensiones se ensayaron utilizando el ELISA-O157 desarrollado. Teniendo en cuenta el punto de corte obtenido mediante el análisis de la curva ROC, se determinó la frecuencia relativa de resultados positivos  $[P(x)]$  para cada nivel de concentración y se graficaron estos valores ajustando la curva a una sigmoidea, obteniéndose valores del  $r$  de 0,999 y del EE de 1,518, lo que demostró que la bondad en el ajuste de la regresión fue apropiada (Figura 11).

El valor del LD calculado aplicando la ecuación de la curva resultante fue  $4,7 \times 10^6$  UFC/mL.



**Figura 11.** Curva de respuesta de probabilidad de resultados positivos en función a la concentración de *E. coli* O157. UFC: unidades formadoras de colonias; EE: error estándar, r: coeficiente de correlación, %: porcentaje.

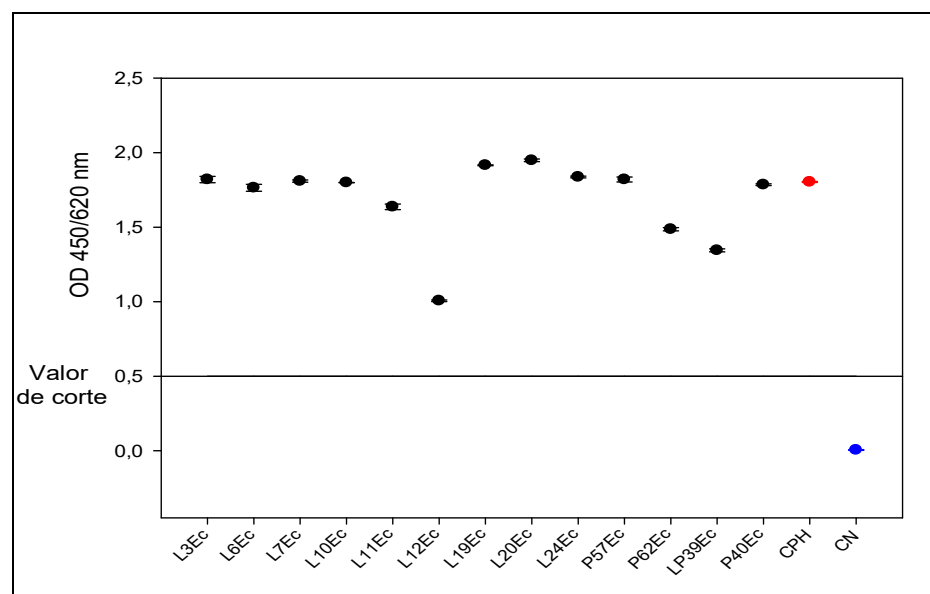
#### 5.4. Rango de incertidumbre o región de error

A partir de la curva obtenida (Figura 11) se estableció que el rango de incertidumbre se encontraba entre los valores de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL y  $4,7 \times 10^6$  UFC/mL. Este hallazgo significó que las muestras cuyos valores se encuentren en esta zona, deberían ser ensayadas nuevamente de modo de obtener un diagnóstico certero.

#### 5.5. Reactividad del ELISA-O157

La evaluación de la reactividad del ELISA-O157 frente a diferentes cepas de *E. coli* O157 de origen clínico y alimentario resultó necesaria y de gran importancia. Para ello, se ensayaron 13 suspensiones bacterianas de *E. coli* O157 pertenecientes a la colección de cepas, las que fueron caracterizadas oportunamente mediante pruebas bioquímicas metabólicas, aglutinación con partículas de látex anti O157 (Oxoid Ltd., Reino Unido) y la detección del gen *rfbO157* por PCR.

Los resultados demostraron la capacidad de este ELISA de detectar el 100% de los aislamientos ensayados, tanto de origen clínico como alimentario. En la Figura 12 se muestra que las lecturas de OD de cada una de las cepas analizadas se encontraron sustancialmente por encima del valor de corte de esta técnica (0,5), con valores que entre 0,992 y 1,948.



**Figura 12.** Reactividad del ELISA-O157 en el total de las cepas analizadas. OD: densidad óptica. (●): lectura de OD para el CPH; (●): lectura de OD para el CN y (●): lecturas de OD de cada una de las cepas analizadas. Un resultado es considerado positivo si el valor de OD es > a 0,5.

### 5.6. Determinación de reacciones cruzadas

La especificidad del ELISA-O157 fue analizada utilizando aislamientos de origen clínico y alimentario y cepas control de calidad, pertenecientes a la colección de cepas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los valores de OD promedio obtenidos demostraron ausencia de reacciones cruzadas con los microorganismos estudiados. En la Tabla 6 se muestran los valores de OD al ensayar el ELISA-O157 para los diferentes microorganismos.

**Tabla 6.** Reactividad cruzada del ELISA-O157 con los diferentes microorganismos.

| Microorganismo   | OD <sub>450/620nm</sub> (promedio) |
|--|------------------------------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19696                      | 0,005                              |
| <i>Achromobacter xilosoxidans</i>                              | 0,013                              |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966 | 0,004                              |

| Microorganismo   | OD <sub>450/620nm</sub><br>(promedio) |
|--|---------------------------------------|
| <i>Alcaligenes faecalis</i>                                  | 0,006                                 |
| <i>Aspergillus niger</i>                                     | 0,006                                 |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                     | 0,005                                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700819                      | 0,005                                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> (P33Ca)                          | 0,010                                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> (V5Ca)                           | 0,025                                 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231                           | 0,008                                 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090                        | 0,006                                 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048                     | 0,007                                 |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155                   | 0,003                                 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047                       | 0,006                                 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212                      | 0,005                                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 35401                           | 0,007                                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922                           | 0,006                                 |
| EAEC (L25Ec)   | 0,007                                 |
| EIEC (P58Ec)   | 0,005                                 |
| EPEC (Vt42Ec)  | 0,009                                 |
| EPEC (L4Ec)  | 0,009                                 |
| ETEC (Vt44Ec)  | 0,008                                 |
| Estafilococos coagulasa negativos grupo <i>haemolyticus</i>  | 0,011                                 |
| Estafilococos coagulasa negativos grupo <i>saprophyticus</i> | 0,016                                 |
| Estafilococos coagulasa negativos grupo <i>simulans</i>      | 0,006                                 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883                      | 0,005                                 |

| Microorganismo                                 | OD <sub>450/620nm</sub><br>(promedio) |
|--|---------------------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603       | 0,007                                 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906            | 0,001                                 |
| <i>Proteus penneri</i>                         | 0,003                                 |
| <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380              | 0,006                                 |
| <i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672         | 0,006                                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027        | 0,006                                 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076       | 0,005                                 |
| <i>Salmonella</i> spp. (B1Sa)                  | 0,007                                 |
| <i>Salmonella</i> spp. (P9Sa)                  | 0,012                                 |
| <i>Serratia marscescens</i>                    | 0,005                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903            | 0,004                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> (V61Sh)               | 0,014                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> (C11Sh)               | 0,002                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930              | 0,004                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> (P14Sh)                 | 0,009                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> (Z81Sh)                 | 0,031                                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538         | 0,007                                 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228   | 0,005                                 |
| STEC (P37Ec)                                   | 0,020                                 |
| STEC (P41Ec)                                   | 0,014                                 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13636 | 0,004                                 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>                  | 0,009                                 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>                | 0,006                                 |

| Microorganismo                           | OD <sub>450/620nm</sub><br>(promedio) |
|--|---------------------------------------|
| <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610 | 0,005                                 |
| CPH                                      | 1,798                                 |
| CN                                       | 0,008                                 |

OD: absorbancia, EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena, ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica, EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva, STEC: *Escherichia coli* shigatoxigénica, CN: control negativo; CPH: control positivo alto, L: cepa perteneciente al cepario del grupo de investigación, Vt: cepa de proveniente de muestra animal, Ec: *Escherichia coli*, P: Hospital Provincial de Rosario, B: Hospital Escuela Eva Perón, C: Hospital del Centenario, Z: Hospital de Niños Zona Norte, V: Hospital de Niños Victor J. Vilela.

### 5.7. Precisión del ELISA-O157

A partir de los resultados obtenidos al analizar el control positivo a dos concentraciones diferentes (CPH y CPL) y el CN mediante el ELISA-O157, se calculó la OD media, la DE y el CV%.

La precisión se evaluó mediante la determinación del CV% en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia. Los resultados del ensayo de repetibilidad se resumen en la Tabla 7 y los del ensayo de precisión intermedia en la Tabla 8.

**Tabla 7.** Repetibilidad del ELISA-O157

| Muestra | X (450/620 nm) | DE     | CV%  |
|---------|----------------|--------|------|
| CPH     | 1,945          | 0,1537 | 7,9  |
| CPL     | 1,573          | 0,1482 | 9,4  |
| CN      | 0,064          | 0,0114 | 17,8 |

X: absorbancia media, DE: desviación estándar, CV%: coeficiente de variación porcentual, CPH: control positivo alto, CPL: control positivo bajo, CN: control negativo.

**Tabla 8.** Precisión intermedia del ELISA-O157

| <b>Muestra</b> | <b>X (450/620 nm)</b> | <b>DE</b> | <b>CV%</b> |
|----------------|-----------------------|-----------|------------|
| <b>CPH</b>     | 1,741                 | 0,2261    | 13,0       |
| <b>CPL</b>     | 1,448                 | 0,1978    | 13,6       |
| <b>CN</b>      | 0,064                 | 0,0155    | 24,2       |

X: absorbancia media, DE: desviación estándar, CV%: coeficiente de variación porcentual, CPH: control positivo alto, CPL: control positivo bajo, CN: control negativo.

Los valores alcanzados en el ensayo de repetibilidad fueron inferiores al 20% al analizar los tres controles. Sin embargo, al analizar la precisión intermedia, el CV% de los CPH y CPL resultaron menores al 15%, en tanto el CV% del CN resultó del 24,2%.

### **5.8. Ensayos de estabilidad térmica acelerada**

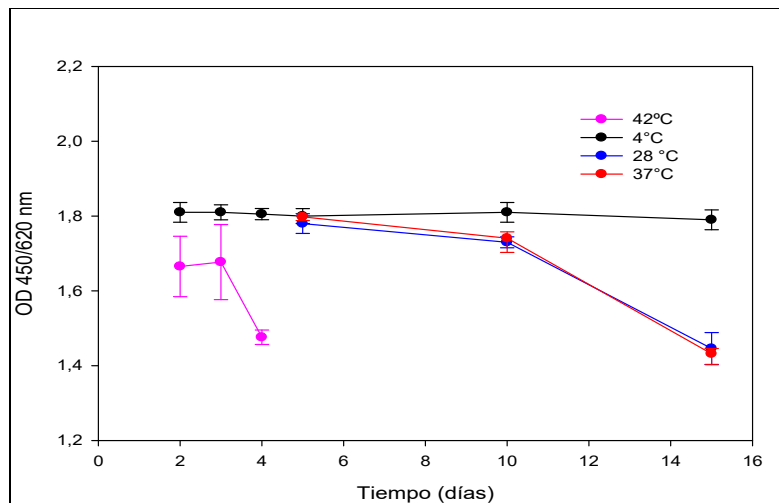
Los diferentes componentes involucrados en el desarrollo del ELISA-O157 (policubeta sensibilizada, CPH, conjugado y sustrato) fueron sometidos a temperaturas de 28 °C y 37 °C durante 5, 10 y 15 días, y a 42 °C durante 2, 3 y 4 días. Los valores de OD obtenidos en cada caso se compararon con la contramuestra conservada el mismo período entre 2 °C y 8 °C.

A continuación se detallan los hallazgos obtenidos en los ensayos de estabilidad térmica acelerada para cada uno de los componentes evaluados.

#### **5.8.1. Ensayos de estabilidad térmica de las policubetas sensibilizadas**

Las policubetas sensibilizadas y sometidas a condiciones extremas de temperatura y tiempo de almacenamiento fueron utilizadas para ensayar el CPH y el CN.

En la Figura 13 se detallan las lecturas de OD obtenidas para el CPH ensayado utilizando las policubetas sin tratar y tratadas a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.



**Figura 13.** Evolución de la OD del CPH utilizando policubetas sensibilizadas sin tratar (negro) e incubadas a temperaturas de 28 °C (azul) y 37 °C (rojo) durante 5, 10 y 15 días; y de 42 °C (rosa) durante 2, 3 y 4 días.

Analizando los valores de OD obtenidos, no se observaron diferencias significativas al incubar las policubetas a 28 °C y 37 °C durante 5 días ( $p > 0,05$ ), sin embargo, las lecturas posteriores a estas mismas temperaturas (10 y 15 días de incubación) presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), con una marcada caída en los valores de OD a los 15 días de tratamiento.

Por otra parte, se observaron diferencias significativas al ensayar el CPH utilizando las policubetas sin tratar y tratadas a 42 °C ( $p < 0,05$ ).

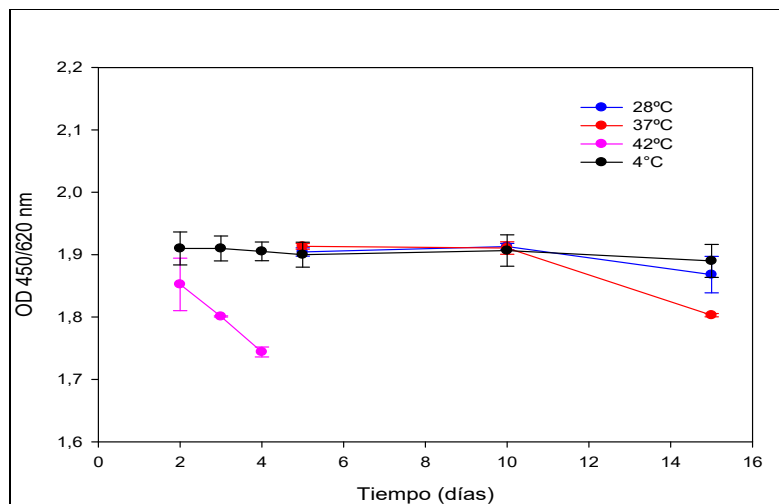
No se observaron diferencias significativas al analizar el CN utilizando las policubetas sometidas a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación con respecto a las conservadas a 4 °C ( $p > 0,05$ ). Las lecturas de este control presentaron valores cercanos a 0 por lo que no fueron incluidas en la Figura 13.

Para determinar la vida útil de las policubetas se seleccionó 28 °C y 37 °C y 5 días como parámetros para ser utilizados en la ecuación de Arrhenius. El tiempo de conservación de las policubetas sensibilizadas a temperaturas entre 2 - 8 °C resultó de 278 días (9 meses aproximadamente).

### 5.8.2. Ensayos de estabilidad térmica del CPH

El CPH fue inactivado y conservado en Kathon al 0,1%. Se confirmó la pureza del mismo y la inactivación del patógeno al no observarse crecimiento bacteriano en las placas con el medio diferencial CLDE y con el medio selectivo SMAC.

Los resultados de OD obtenidos luego de haber sometido al CPH a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación se utilizaron para realizar la gráfica que se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Evolución de la OD del CPH durante los días de tratamiento a las temperaturas de 28 °C (azul), 37 °C (rojo) y 42 °C (rosa) y los valores de OD del CPH sin tratar (negro).

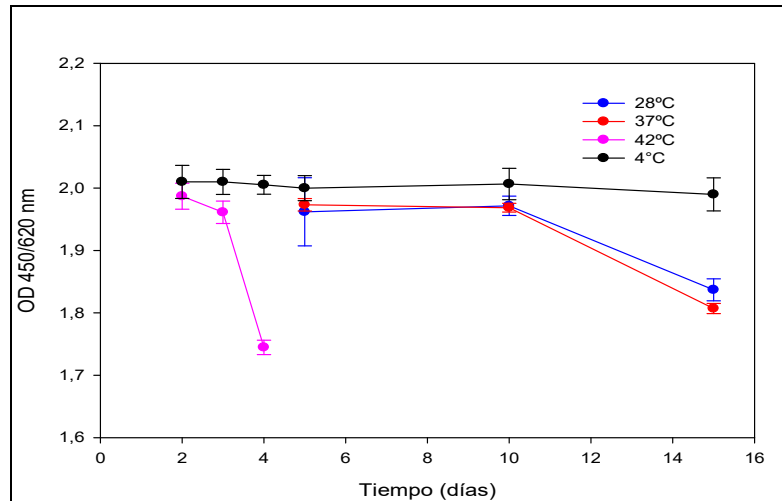
Analizando la curva del tratamiento del CPH a 28 °C comparada con la del CPH sin tratamiento térmico, podemos mencionar que no se observaron diferencias significativas durante el período en estudio ( $p > 0,05$ ).

Con respecto a la curva del tratamiento a 37 °C, se observaron diferencias significativas a los 15 días de incubación, en tanto a 42 °C se observaron diferencias significativas a los 3 y 4 días de tratamiento térmico ( $p < 0,05$ ).

Analizando los valores de OD obtenidos para el CPH, se seleccionaron las siguientes condiciones: 15 días a 28 °C, 10 días a 37 °C y 2 días a 42 °C. Al aplicar la ecuación de Arrhenius, el tiempo de conservación del CPH a temperaturas entre 2 - 8 °C fue de 766 días (25 meses, aproximadamente).

### 5.8.3. Ensayos de estabilidad térmica del conjugado anti *E. coli* O157-HRP

Para verificar la estabilidad térmica del conjugado anti *E. coli* O157-HRP utilizado a la concentración de trabajo en el ELISA-O157, se ensayó el CPH utilizando este anticuerpo conjugado sometido a las distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación, mencionadas anteriormente. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura 15.



**Figura 15.** Evolución de la OD del CPH utilizando el anticuerpo conjugado sin tratar (negro) e incubado a temperaturas de 28 °C (azul) y 37 °C (rojo) durante 5, 10 y 15 días; y de 42 °C (rosa) durante 2, 3 y 4 días.

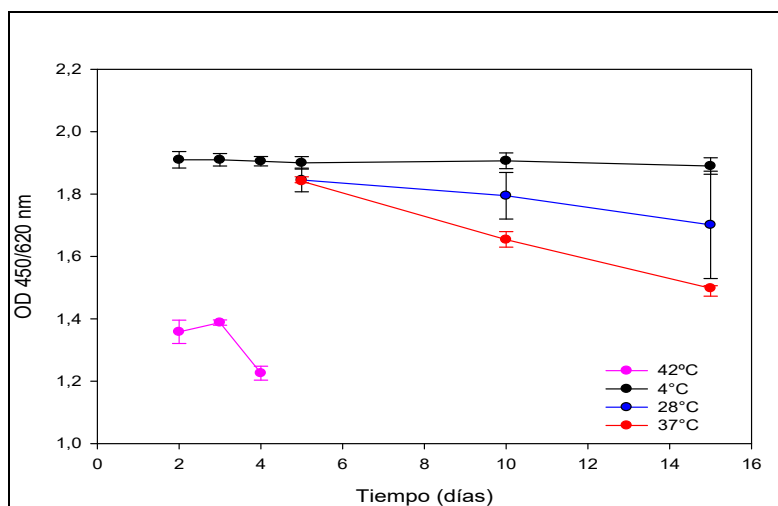
Al analizar los valores de OD del CN utilizando el anticuerpo conjugado con HRP incubado bajo las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación, no se observaron diferencias significativas con respecto al conservado a 4 °C ( $p > 0,05$ ). Las lecturas obtenidas para este control presentaron valores cercanos a 0, por lo que no fueron incluidas en la Figura 15.

Por otra parte, podemos mencionar que no se observaron diferencias significativas entre los valores de OD del CPH utilizando el conjugado sin tratar y tratado a temperaturas de 28 °C y 37 °C durante 5 y 10 días, y a 42 °C durante 2 días ( $p > 0,05$ ), de modo que se seleccionaron estas condiciones para realizar el cálculo de la estabilidad térmica aplicando la ecuación de Arrhenius. Entonces, se determinó que la estabilidad

térmica del anticuerpo conjugado con HRP a temperaturas entre 2 - 8 °C fue de 692 días (23 meses, aproximadamente).

#### 5.8.4. Ensayos de estabilidad térmica del sustrato

El sustrato fue sometido a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Los resultados obtenidos se utilizaron para realizar la gráfica correspondiente (Figura 16).



**Figura 16.** Evolución de la OD del CPH utilizando el sustrato sin tratar (negro) e incubado a temperaturas de 28 °C (azul) y 37 °C (rojo) durante 5, 10 y 15 días; y de 42 °C (rosa) durante 2, 3 y 4 días.

No se observaron diferencias significativas al analizar el CN utilizando el sustrato sometido a las condiciones antes mencionadas con respecto al conservado a 4 °C ( $p > 0,05$ ). Las lecturas de este control presentaron valores cercanos a 0 por lo que no fueron incluidas en la Figura 16.

Analizando los valores de OD obtenidos al ensayar el CPH a 28 °C y 37 °C, no se observaron diferencias significativas al quinto día de incubación, contrariamente a lo ocurrido en los restantes puntos del ensayo a esta misma temperatura. Por otro lado, a 42 °C se observaron diferencias significativas a partir del día 2 de incubación.

Se seleccionó 5 días a 28 °C y a 37 °C para la aplicación de la ecuación de Arrhenius. El tiempo de conservación del sustrato a temperaturas entre 2 - 8 °C fue de 278 días (9 meses aproximadamente).

Evaluando los componentes del equipo en forma conjunta y simultánea, pudimos inferir que la estabilidad térmica a temperaturas de 2 - 8 °C para el ELISA-O157 completo fue de 9 meses.

### **PARTE III. ELISA-Stx2**

#### **6. Estandarización del ELISA-Stx2**

##### **6.1. Definición de la concentración de anticuerpo utilizado para la sensibilización de las policubetas y como anticuerpo secundario del ELISA-Stx2**

La estandarización del ELISA-Stx2 involucró, como primer paso, la definición del anticuerpo de captura y del anticuerpo secundario, así como también sus respectivas concentraciones.

Se ensayó el anticuerpo monoclonal anti Shigatoxina 2 (Hycult Biotech, EE.UU.) y el anticuerpo policlonal de conejo anti Stx2 suministrado por el Instituto Butantán de la ciudad de San Pablo, Brasil. Ambos anticuerpos fueron utilizados para sensibilizar las policubetas a concentraciones de 2,5 µg/mL; 1,5 µg/mL; 1 µg/mL y 0,5 µg/mL. Además, ambos anticuerpos fueron empleados como anticuerpos secundarios a concentraciones de 2 µg/mL y 4 µg/mL.

De acuerdo a los valores obtenidos al emplear ambas combinaciones, se observó que, al utilizar el anticuerpo primario Hycult Biotech y el anticuerpo suministrado por el Instituto Butantán como secundario, las lecturas de OD resultaron francamente mayores a las concentraciones ensayadas (Figura 17.A) en comparación con la combinación que empleaba como anticuerpo primario el suministrado por el Instituto Butantán, y el anticuerpo Hycult Biotech como secundario (Figura 17.B). Por lo tanto, se optó por la combinación en la que se utilizó el anticuerpo monoclonal anti Shigatoxina 2 (Hycult Biotech) como anticuerpo de captura o primario y el anticuerpo policlonal de conejo anti Stx2 (Instituto Butantán) como anticuerpo secundario.

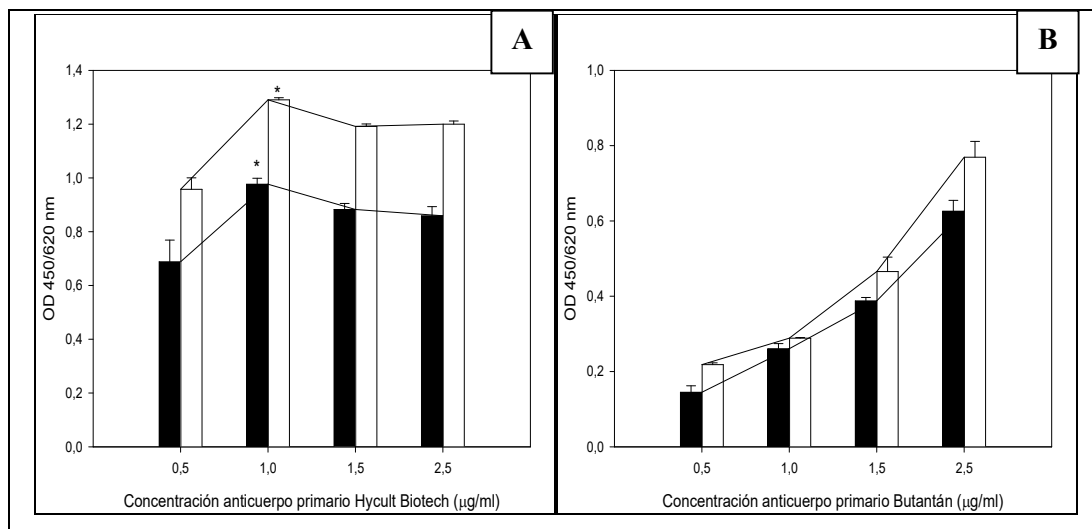
Analizando la Figura 17.A, que representa la combinación de anticuerpos seleccionada, se procedió a la evaluación de la concentración óptima de trabajo del anticuerpo primario (Hycult Biotech) a emplear en el ELISA-Stx2. Se observó que, a la concentración de 1 µg/mL, el CPH presentó el valor de OD más alto con diferencias significativas con las lecturas obtenidas al ensayar las restantes concentraciones de este anticuerpo ( $p < 0,05$ ).

Al evaluar la concentración de trabajo del anticuerpo policlonal de conejo anti Stx2 (Instituto Butantán) utilizado como anticuerpo secundario, se observó que a una concentración de 4 µg/mL se obtuvo una mayor lectura de OD, con diferencias

significativas con la lecturas obtenidas al ensayar la concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ).

Es importante aclarar que las lecturas de OD del CN fueron próximas a 0, datos que no fueron incluidos en la Figura 17.

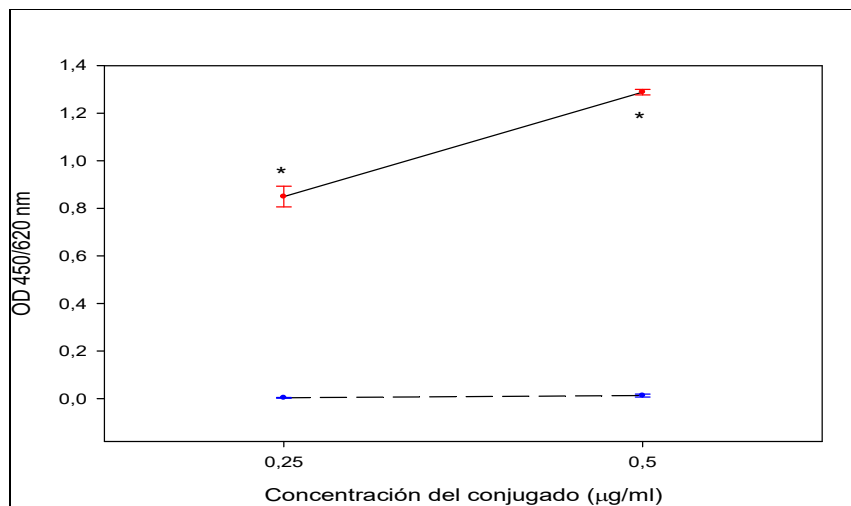
Resumiendo, mediante la combinación de los resultados analizados se seleccionó el anticuerpo monoclonal anti Shigatoxina 2 (Hycult Biotech) como anticuerpo de captura a una concentración de 1  $\mu\text{g/mL}$  y, como anticuerpo secundario, el anticuerpo de conejo anti Stx2 (Butantán) a una concentración de 4  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 17.** Estandarización de la concentración óptima del anticuerpo de captura y del anticuerpo secundario del ELISA-Stx2. **A)** Valores de OD obtenidos al utilizar el anticuerpo de captura Hycult Biotech y el secundario Butantán. **B)** Valores de OD obtenidos al utilizar el anticuerpo de captura Butantán y el secundario Hycult Biotech. Barras negras: controles positivos ensayados a diferentes concentraciones de anticuerpo primario, utilizando 2  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo secundario. Barras blancas: controles positivos ensayados a diferentes concentraciones de anticuerpo primario empleando 4  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo secundario. OD: absorbancia medida a 450/620 nm. Se muestran las desviaciones estándar de experimentos independientes realizados por triplicado. \*: Concentración del anticuerpo primario Hycult Biotech (1  $\mu\text{g/mL}$ ) y del anticuerpo secundario (4  $\mu\text{g/mL}$ ) que presentaron diferencias significativas respecto al empleo de 1  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo primario y 2  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo secundario ( $p < 0,05$ ).

## 6.2. Definición de la concentración del anticuerpo conjugado con HRP

Al realizar la estandarización de la concentración del anticuerpo comercial de cabra anti IgG de conejo marcado con HRP (Ab Frontier, Corea), se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las diluciones 0,25  $\mu\text{g/mL}$  y 0,5  $\mu\text{g/mL}$  del anticuerpo al utilizar la microplaca sensibilizada con concentraciones del anticuerpo de 1  $\mu\text{g/mL}$ . La concentración del conjugado seleccionada para continuar con los ensayos fue 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , ya que fue la dilución a la que se observó una mayor diferenciación entre el CPH y el CN. Estos resultados se muestran en la Figura 18.

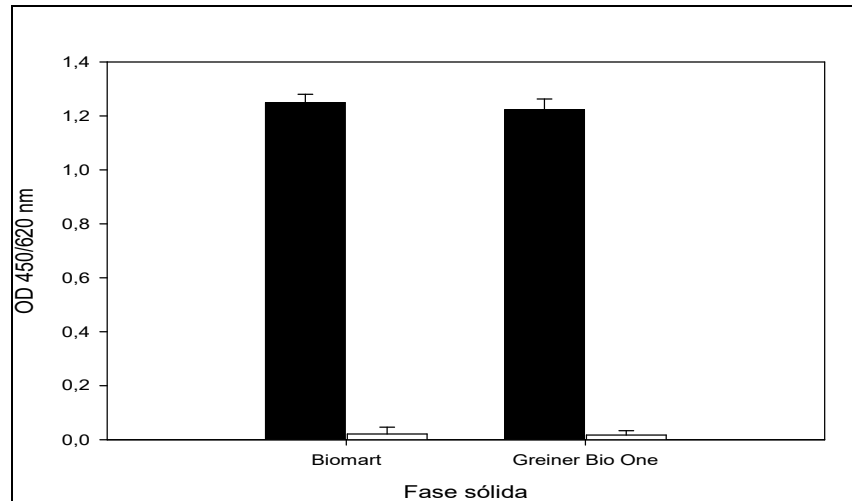


**Figura 18.** Determinación de la concentración óptima de anticuerpo IgG anti conejo-HRP (Ab Frontier, Corea) utilizado en el ELISA-Stx2. OD: absorbancia medida a 450/620 nm, — : control positivo, - - - : control negativo, \*: diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Se muestran las desviaciones estándar de los controles positivos (segmentos rojos) y de controles negativos (segmentos azules) de los ensayos independientes realizados por triplicado.

## 6.3. Definición de la fase sólida

En este trabajo se evaluaron dos marcas comerciales diferentes para ser empleadas como fase sólida del ELISA-Stx2. Las placas de poliestireno ensayadas correspondieron a las marcas Biomart y Greiner Bio One.

Las microplacas mencionadas presentaron la misma respuesta respecto a los valores de OD obtenidos al ensayar el CPH y el CN, no observándose diferencias significativas entre ambas ( $p > 0,05$ ) (Figura 19).

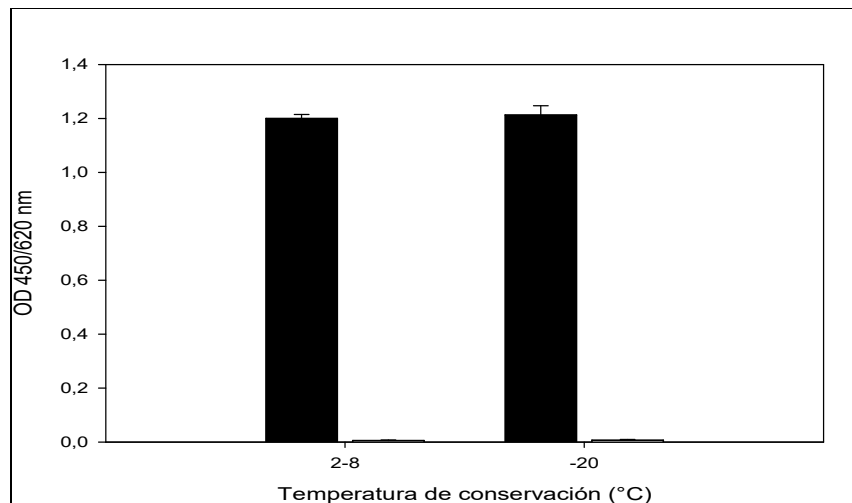


**Figura 19.** Estandarización ELISA-Stx2 variando la fase sólida (placas Biomart y Greiner Bio One). Se presenta el comportamiento del control positivo (barras negras) y negativo (barras blancas) ensayados con ambas microplacas. Se muestran las desviaciones estándar de experimentos independientes realizados por triplicado. OD: absorbancia medida a 450/620 nm.

#### 6.4. Preparación de los controles positivo y negativo

De la misma manera que al estandarizar el ELISA-O157, hemos sometido los controles CPH y CN a temperaturas de 2 - 8 °C y a -20 °C durante 7 días para evaluar la viabilidad o estabilidad de los mismos al ensayarlos con el ELISA-Stx2.

Respecto a los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas entre las mencionadas temperaturas de conservación, 2 - 8 °C y -20°C, al evaluar el CPH y el CN ( $p > 0,05$ ). Estos hallazgos se muestran en la Figura 20.



**Figura 20.** Resultados obtenidos al ensayar el ELISA-Stx2 con el control positivo (barra negra) y el control negativo (barra blanca) conservados a 2 - 8 °C y a -20°C durante 7 días. Se muestran las desviaciones estándar de la media de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

## 7. Validación del método de ELISA-Stx2

### 7.1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

Las colonias aisladas o las colonias provenientes de la zona de confluencia del cultivo fueron ensayadas con el ELISA-Stx2 en un total de 100 muestras de heces sembradas en el medio selectivo SMAC. Como método de referencia se empleó la detección del gen *stx2* mediante PCR y, paralelamente, se comparó el ELISA en estudio con el ELISA comercial Ridascreen® *Verotoxin*.

Los aislamientos recuperados a partir de las 100 muestras de materia fecal fueron ensayados de acuerdo a lo descrito anteriormente, siendo posible la detección del gen *stx2* en 4 muestras (N°4, N°10, N°73 y N°92).

En la Tabla 9 se detallan las muestras de materia fecal cuyos aislamientos resultaron positivos por alguna de las metodologías empleadas.

**Tabla 9.** Comparación de los resultados obtenidos al analizar las muestras con el ELISA-Stx2, la PCR para la detección del gen *stx2* y el ELISA Ridascreen® *Verotoxin*.

| Materia fecal | ELISA-Stx2 | PCR         | ELISA comercial |
|---------------|------------|-------------|-----------------|
| 4             | +          | <i>stx2</i> | +               |
| 10            | +          | <i>stx2</i> | +               |
| 31            | -          | <i>stx2</i> | +               |
| 73            | +          | <i>stx2</i> | +               |
| 92            | +          | <i>stx2</i> | +               |

-: negativo, +: positivo.

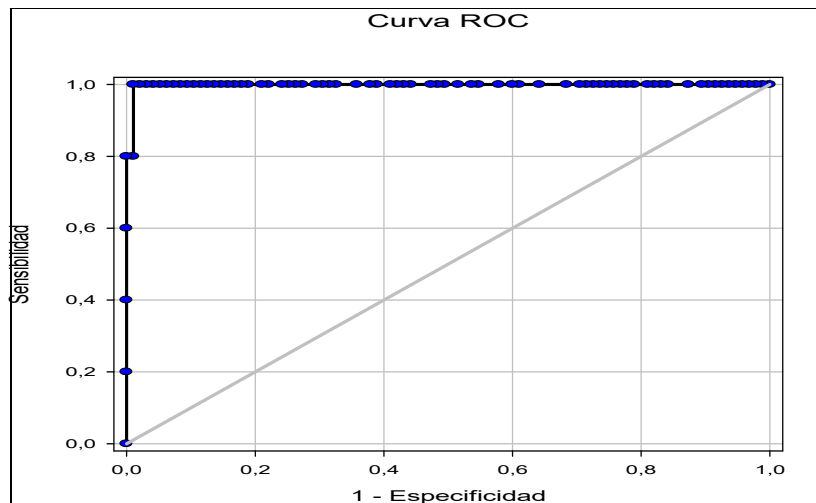
Los resultados indicaron que la S del ELISA-Stx2 desarrollado fue del 80% y la E del 100%. Además, el VPP fue del 100% y el VPN del 98,95%.

El índice K entre el ELISA-Stx2 y la técnica de PCR para detección del gen *stx2* fue de 0,9, valor que representó un muy buen nivel en el grado de concordancia entre estos métodos. El mismo grado de concordancia (0,98) se obtuvo al comparar el ELISA-Stx2 con el ELISA Ridascreen® *Verotoxin*.

## 7.2. Cálculo del punto de corte, sensibilidad y especificidad diagnóstica

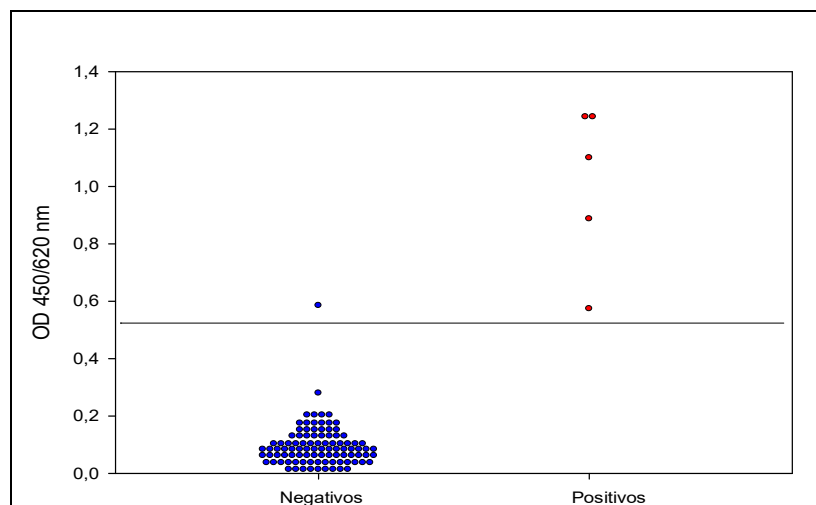
La definición del punto de corte para el ELISA-Stx2 permitió diagnosticar una muestra como positiva o negativa para la presencia de la toxina Stx-2. Para ello, se construyó la curva ROC correspondiente utilizando los valores de OD de las muestras positivas y negativas.

En la Figura 21, se observa la curva ROC obtenida a partir del tratamiento estadístico de los datos, los cuales arrojaron un valor del AUC de 0,9979 lo que implicó una excelente capacidad de discriminación del método ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21.** Curva ROC del ELISA-Stx2. Área bajo la curva ROC: 0,9979.

Para seleccionar el punto de corte del ELISA-Stx2 se establecieron las características de S y E de la prueba a diferentes valores de OD. La mayor eficiencia del método se obtuvo a una lectura de OD de 0,45, donde la prueba mostró una S del 100% y una E del 98%. Por lo tanto, se seleccionó este valor como punto de corte del ELISA. Estos resultados se detallan en la Figura 22.

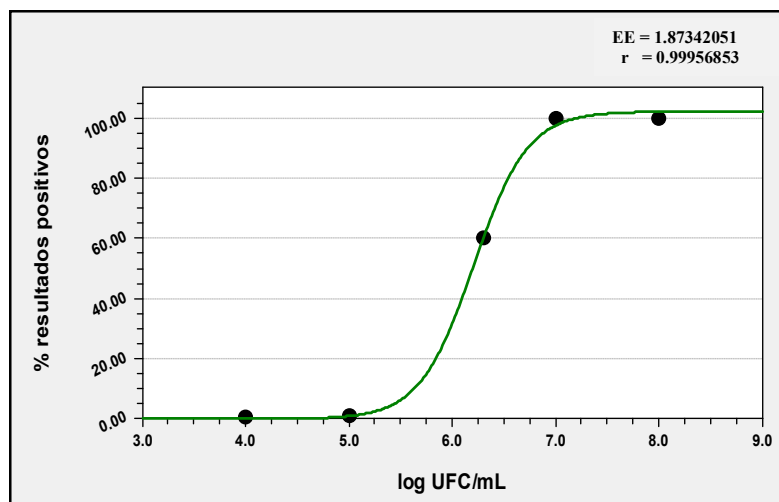


**Figura 22.** Distribución de los valores de absorbancia de las muestras positivas y negativas analizadas. La línea horizontal corresponde al valor de corte seleccionado (0,45) que permitió una adecuada discriminación entre las muestras positivas y negativas.

### 7.3. Límite de detección

A partir de 10 suspensiones bacterianas independientes de cada uno de 5 niveles de concentración de *E. coli* ATCC 43889 se realizó la técnica de ELISA-Stx2, se calculó el porcentaje de resultados positivos [P(x)] y se graficó la curva en función a la concentración de STEC productora de Stx-2 ajustando la curva a una sigmoidea, obteniéndose valores del r de 0,999 y del EE de 1,873, lo que demostró que la bondad en el ajuste de la regresión fue apropiada (Figura 23).

El valor del LD obtenido aplicando la ecuación de la curva resultante fue de  $7,5 \times 10^6$  UFC/mL.



**Figura 23.** Curva de respuesta de probabilidad de resultados positivos en función a la concentración expresada en log de UFC/mL de STEC productora de Stx-2. UFC: unidades formadoras de colonias; EE: error estándar; r: coeficiente de correlación.

### 7.4. Rango de incertidumbre

A partir de los datos obtenidos al determinar el LD en el apartado 7.3. se determinó que el rango de incertidumbre del método estuvo comprendido entre valores de concentración de  $2,9 \times 10^5$  UFC/mL y  $7,5 \times 10^6$  UFC/mL.

### 7.5. Reactividad del ELISA-Stx2

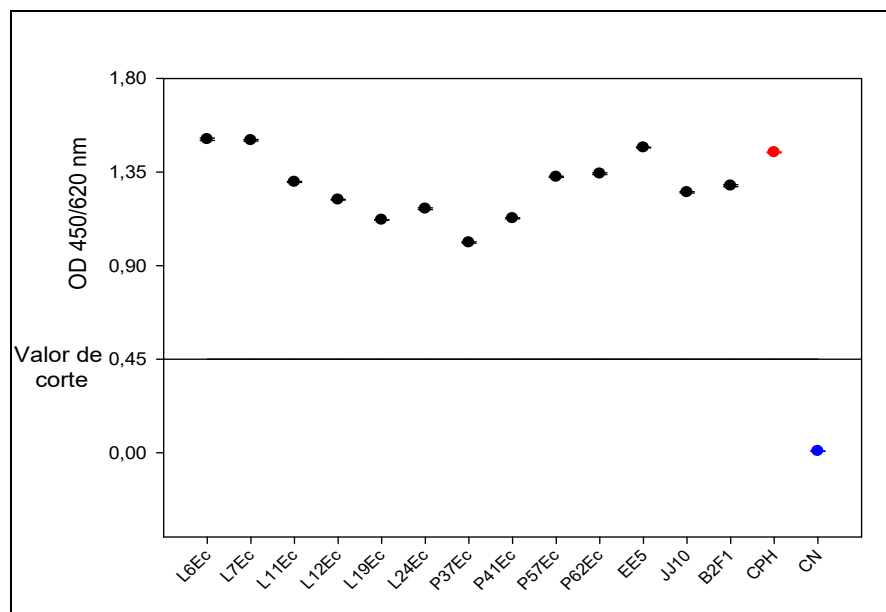
La evaluación de la reactividad del ELISA-Stx2 frente a diferentes cepas de origen clínico como alimentario de STEC productoras de Stx-2, involucró el análisis de 10 suspensiones bacterianas de STEC. Estos aislamientos fueron confirmados como productores de Stx-2 mediante la detección del gen *stx2* por PCR.

El ELISA-stx2 resultó positivo para todos los aislamientos ensayados, tanto los de origen clínico como alimentario.

Por otra parte, se ensayaron las cepas de STEC EE5, JJ10 y B2F1, cuyas variantes de Stx2 fueron caracterizadas como Stx2a, Stx2c y Stx2d, respectivamente. El ELISA-Stx2 presentó reacción positiva al ensayar los aislamientos mencionados anteriormente.

En la Figura 24 se muestra que las lecturas de OD de cada una de las cepas analizadas se encontraron sustancialmente por encima del valor de corte de esta técnica (0,45), con lecturas de OD que se encontraron entre 1,011 y 1,508.

En este estudio no fueron ensayados los subtipos Stx2b, Stx2e, Stx2f y Stx2g ya que no se disponían de las mencionadas cepas.



**Figura 24.** Reactividad del ELISA-Stx2 en el total de las cepas analizadas. OD: densidad óptica. (●): lectura de OD para el CPH; (●): lectura de OD para el CN y (●): lecturas de OD de cada una de las cepas analizadas. Un resultado es considerado positivo si el valor de OD es mayor a 0,45.

### 7.6. Determinación de reacciones cruzadas

La especificidad del ELISA-Stx2 fue analizada utilizando aislamientos de origen clínico y alimentario y cepas control de calidad.

Los valores de OD promedio demostraron ausencia de reacciones cruzadas del ELISA-Stx2 con los microorganismos estudiados. En la Tabla 10 se detallan los microorganismos analizados y las lecturas de OD promedio obtenidas a partir de los ensayos realizados por triplicado.

**Tabla 10.** Reactividad cruzada del ELISA-Stx2 frente a diversos microorganismos.

| Microorganismo   | OD <sub>450/620nm</sub><br>(promedio) |
|--|---------------------------------------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19696                      | 0,005                                 |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966 | 0,005                                 |
| <i>Alcaligenes faecalis</i>                                    | 0,006                                 |
| <i>Alcaligenes faecalis</i>                                    | 0,005                                 |
| <i>Aspergillus niger</i>                                       | 0,010                                 |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                       | 0,007                                 |
| <i>Bulkhordelia cepacia</i>                                    | 0,006                                 |
| <i>Campylobacter coli</i> (P25Ca)                              | 0,005                                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33559                         | 0,030                                 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> (V30Ca)                            | 0,006                                 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231                             | 0,006                                 |
| <i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090                          | 0,005                                 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048                       | 0,005                                 |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155                     | 0,007                                 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047                         | 0,007                                 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212                        | 0,007                                 |

| Microorganismo   | OD <sub>450/620nm</sub><br>(promedio) |
|--|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 700336                          | 0,006                                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 35401                           | 0,010                                 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922                           | 0,012                                 |
| <i>Escherichia coli</i> productora de Stx-1 (L6Ec)           | 0,014                                 |
| EAEC (L25Ec)   | 0,007                                 |
| EIEC (P58Ec)   | 0,006                                 |
| EPEC (L4Ec)  | 0,005                                 |
| EPEC (Vt42Ec)  | 0,005                                 |
| ETEC (Vt44Ec)  | 0,006                                 |
| Estafilococos coagulasa negativos grupo <i>haemolyticus</i>  | 0,006                                 |
| Estafilococos coagulasa negativos grupo <i>saprophyticus</i> | 0,006                                 |
| Estafilococos coagulasa negativos grupo <i>simulans</i>      | 0,003                                 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603                     | 0,005                                 |
| <i>Morganella morganii</i>                                   | 0,007                                 |
| <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906                          | 0,010                                 |
| <i>Proteus penneri</i>                                       | 0,013                                 |
| <i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6380                            | 0,003                                 |
| <i>Providencia stuartii</i> ATCC 33672                       | 0,007                                 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027                      | 0,006                                 |
| <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076                     | 0,004                                 |
| <i>Salmonella</i> spp. (C55Sa)                               | 0,010                                 |
| <i>Salmonella</i> spp. (V3Sa)                                | 0,008                                 |
| <i>Salmonella</i> spp. (Z6Sa)                                | 0,005                                 |

| Microorganismo                                 | OD <sub>450/620nm</sub><br>(promedio) |
|--|---------------------------------------|
| <i>Serratia marscescens</i>                    | 0,006                                 |
| <i>Serratia odorifera</i>                      | 0,005                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903            | 0,006                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> (B1Sh)                | 0,009                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> (P24Sh)               | 0,004                                 |
| <i>Shigella flexneri</i> (Z164Sh)              | 0,006                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930              | 0,006                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> (C117Sh)                | 0,007                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> (B8Sh)                  | 0,005                                 |
| <i>Shigella sonnei</i> (V44Sh)                 | 0,011                                 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538         | 0,063                                 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228   | 0,006                                 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ATCC 13636 | 0,012                                 |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>                  | 0,005                                 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i>                | 0,005                                 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610       | 0,005                                 |
| CPH  | 1,987                                 |
| CN   | 0,008                                 |

OD: absorbancia, EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena, ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica, EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva, CN: control negativo; CPH: control positivo alto, L: cepa perteneciente al cepario del grupo de investigación, Vt: cepa de proveniente de muestra animal, Ec: *Escherichia coli*, P: Hospital Provincial de Rosario, B: Hospital Escuela Eva Perón, C: Hospital del Centenario, Z: Hospital de Niños Zona Norte, V: Hospital de Niños Victor J. Vilela.

### 7.7. Precisión del ELISA-Stx2

Para la evaluación de la precisión del ELISA-Stx2, se calculó el X, la DE y CV%. Los resultados de los ensayos de repetibilidad y precisión intermedia se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Repetibilidad del ELISA Stx-2

| Muestra | OD <sub>450/620nm</sub> | DE    | CV%   |
|---------|-------------------------|-------|-------|
| CPH     | 1,423                   | 0,235 | 9,30  |
| CPL     | 1,310                   | 0,101 | 7,75  |
| CN      | 0,002                   | 0,000 | 13,32 |

OD: absorbancia, DE: desviación estándar, CV%: coeficiente de variación porcentual, CPH: control positivo, CPL: control positivo bajo, CN: control negativo.

**Tabla 12.** Repetibilidad y precisión intermedia del ELISA Stx-2

| Muestra | OD <sub>450/620nm</sub> | DE    | CV%   |
|---------|-------------------------|-------|-------|
| CPH     | 1,423                   | 0,235 | 9,30  |
| CPL     | 1,310                   | 0,101 | 7,75  |
| CN      | 0,002                   | 0,000 | 13,32 |

OD: absorbancia, DE: desviación estándar, CV%: coeficiente de variación porcentual, CPH: control positivo, CPL: control positivo bajo, CN: control negativo.

Entonces, la precisión se evaluó mediante la determinación del CV en dos niveles, repetibilidad y precisión intermedia, resultando valores inferiores a 20% al analizar los controles positivos y el control negativo.

## 7.8. Ensayos de estabilidad térmica acelerada

### 7.8.1. Ensayos de estabilidad térmica de las policubetas sensibilizadas

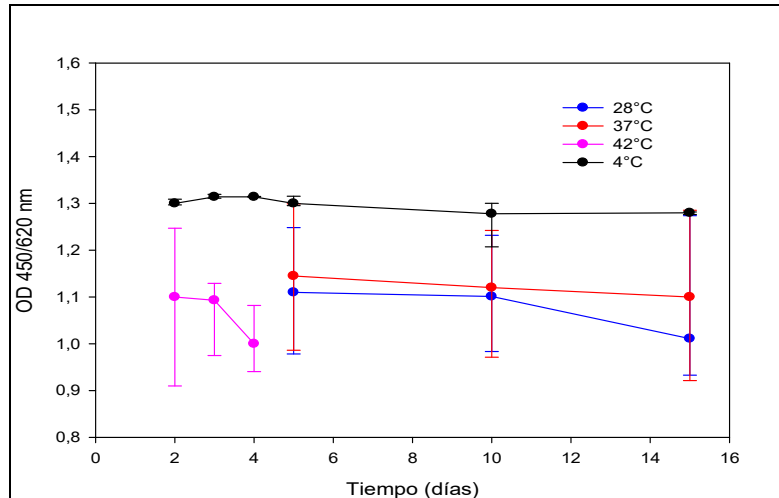
Las policubetas sensibilizadas y sometidas a condiciones extremas de temperatura y tiempo de almacenamiento fueron evaluadas mediante el comportamiento del CPH y del CN sin tratar y tratados térmicamente.

Analizando los valores de OD obtenidos, podemos señalar que no se observaron diferencias significativas al incubar las policubetas a 28 °C y 37 °C ( $p > 0,05$ ) durante el período en el que se realizó el tratamiento térmico.

Por otra parte, se observaron diferencias significativas al ensayar el CPH utilizando las policubetas sin tratar y tratadas a 42 °C ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos al ensayar el CPH con las policubetas se detallan en la Figura 25.

No se observaron diferencias significativas al analizar el CN utilizando las policubetas sometidas a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación con respecto a las conservadas a 4 °C ( $p > 0,05$ ). Las lecturas de este control presentaron valores cercanos a 0 por lo que no fueron incluidas en la Figura 25.

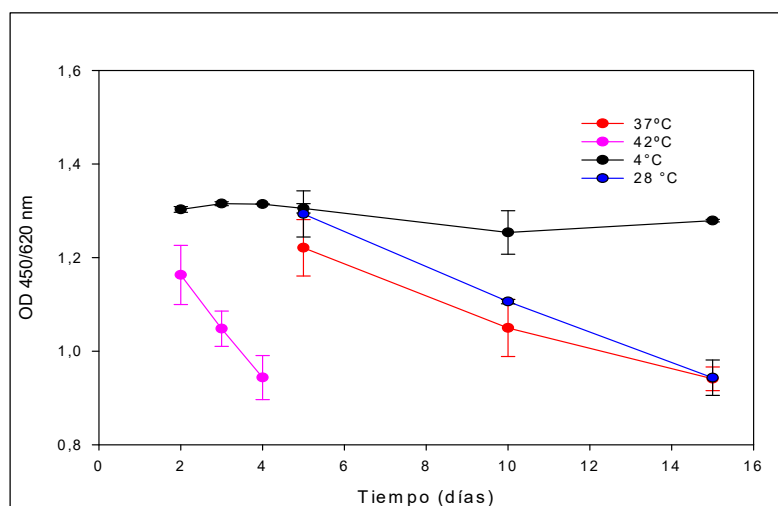


**Figura 25.** Evolución de las absorbancias resultantes al ensayar el CPH utilizando policubetas sensibilizadas sin tratar (negro) e incubadas a temperaturas de 28 °C (azul) y 37 °C (rojo) durante 5, 10 y 15 días, y de 42 °C (rosa) durante 2, 3 y 4 días.

Para determinar la vida útil de las policubetas se seleccionaron las temperaturas de 28°C y 37 °C, y 15 días como parámetros para ser utilizados en la ecuación de Arrhenius. El tiempo de conservación de las policubetas sensibilizadas a temperaturas entre 2 - 8 °C resultó de 834 días (27 meses, aproximadamente).

### 7.8.2. Ensayos de estabilidad térmica del anticuerpo secundario

El anticuerpo secundario empleado en el ELISA-Stx2 fue sometido a las distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Los resultados mencionados se muestran en la Figura 26.



**Figura 26.** Lecturas de absorbancia obtenidas al ensayar el CPH utilizando el anticuerpo secundario sometido a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Tratamiento del anticuerpo secundario a 28 °C (azul), tratamiento a 37 °C (rojo), tratamiento a 42 °C (rosa) y anticuerpo conservado a 4 °C (negro).

Al evaluar los resultados obtenidos, podemos decir que no se observaron diferencias significativas entre el CPH ensayado con el anticuerpo secundario conservado a 4 °C y los ensayos con este anticuerpo sometido a temperaturas de 28 °C y 37 °C durante 5 días ( $p > 0,05$ ). El tratamiento térmico de este anticuerpo a 28 °C y 37 °C durante 10 y 15 días mostró diferencias significativas al compararlo con los valores del CPH utilizando este anticuerpo secundario sin tratamiento térmico ( $p < 0,05$ ).

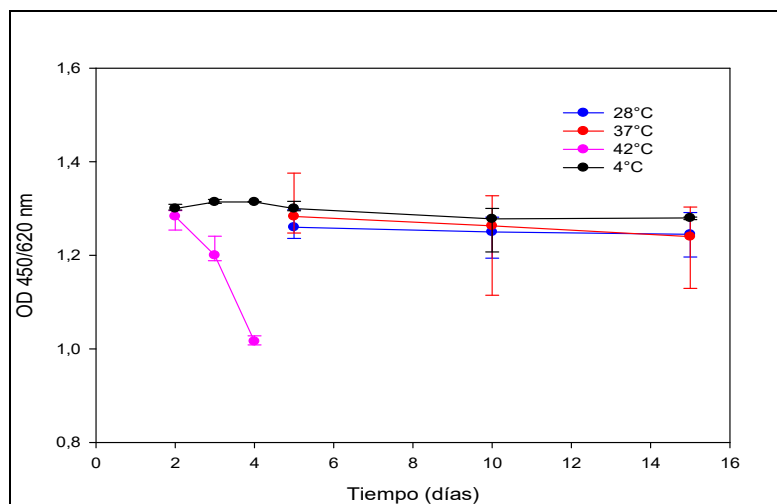
A analizar el tratamiento térmico a 42 °C, se observaron diferencias significativas al ensayar el CPH utilizando el anticuerpo sometido a esta temperatura y el conservado a 4 °C ( $p < 0,05$ ).

No se observaron diferencias significativas al analizar el CN utilizando el anticuerpo secundario sometido a las diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación con respecto a las conservadas a 4 °C ( $p > 0,05$ ). Las lecturas de este control presentaron valores cercanos a 0 por lo que no fueron incluidas en la Figura 26.

Analizando los valores de OD obtenidos para el CPH, se seleccionaron las siguientes condiciones: a 28 °C y 37 °C, 5 días. La aplicación de la ecuación de Arrhenius permitió, en base a las condiciones seleccionadas, inferir la estabilidad térmica entre 2 - 8 °C. El tiempo de conservación del anticuerpo secundario calculado resultó de 278 días (9 meses, aproximadamente).

### 7.8.3. Ensayos de estabilidad térmica del CPH

Los valores de OD obtenidos luego de haber sometido el CPH a las distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación se muestran en la Figura 27.



**Figura 27.** Lecturas de absorbancia obtenidas para el CPH sometido a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Tratamiento a 28 °C (azul), tratamiento a 37 °C (rojo), tratamiento a 42 °C (rosa) y anticuerpo conservado a 4 °C (negro).

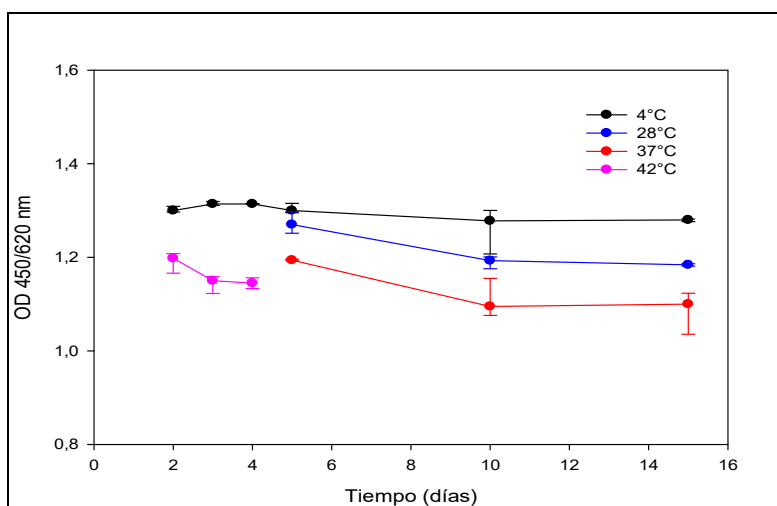
No se observaron diferencias significativas entre las temperaturas de 28 °C y 37 °C durante los 15 días del ensayo y a 42 °C en el segundo día de la evaluación de la estabilidad ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, se observaron diferencias significativas al comparar el CPH sin tratamiento térmico y el sometido a 42 °C durante 3 y 4 días ( $p < 0,05$ ).

Las lecturas del CN presentaron valores cercanos a 0 y no demostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) por lo que no fueron incluidas en la Figura 27.

Analizando los valores de OD obtenidos para el CPH, se seleccionaron las siguientes condiciones: 28 °C, 15 días; 37 °C, 15 días y 42 °C, 2 días. En base a los resultados obtenidos, se definió la estabilidad térmica entre 2 - 8 °C mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius, resultando que el tiempo de conservación del CPH fue de 951 días (31 meses, aproximadamente).

#### 7.8.4. Ensayos de estabilidad térmica del conjugado

Los resultados de OD obtenidos luego de haber sometido el anticuerpo conjugado con HRP a las distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación se detallan en la Figura 28.



**Figura 28.** Lecturas de absorbancia obtenidas para el conjugado sometido a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Tratamiento a 28 °C (azul), tratamiento a 37 °C (rojo), tratamiento a 42 °C (rosa) y anticuerpo conservado a 4 °C (negro).

No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento a temperaturas de 28 °C durante los días 5 y 10 del ensayo ( $p > 0,05$ ) en tanto, la evaluación en el día 15, demostró diferencia significativa con respecto al comportamiento del CPH utilizando el conjugado conservado a 4 °C ( $p < 0,05$ ).

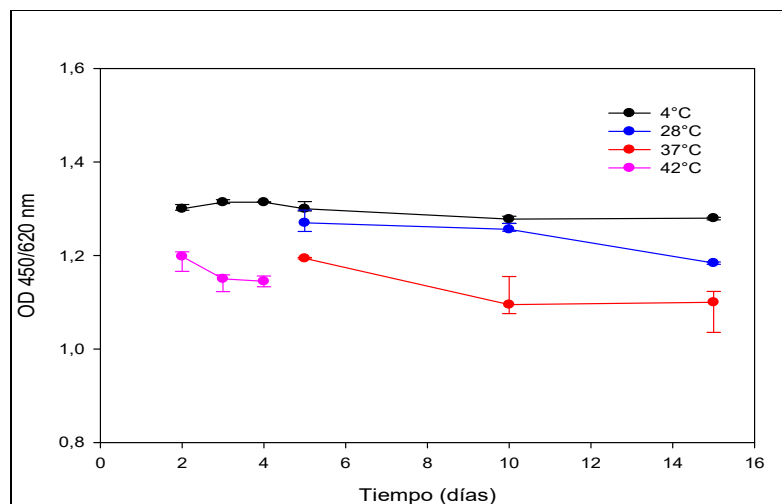
La estabilidad térmica del anticuerpo secundario, ensayada a 37 °C y a 42 °C durante el período en estudio, demostró diferencias significativas al compararla con el anticuerpo sin tratamiento térmico ( $p < 0,05$ ).

Las lecturas del CN presentaron valores cercanos a 0 y no demostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) por lo que no fueron incluidas en la Figura 28.

Analizando los valores de OD obtenidos para el CPH, se seleccionó la condición de 10 días a 28 °C. En base a los resultados obtenidos, se infiere la estabilidad térmica entre 2 - 8 °C mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius, resultando que el tiempo de conservación del conjugado fue de 154 días (5 meses, aproximadamente).

#### 7.8.5. Ensayos de estabilidad térmica del sustrato

El sustrato fue sometido a distintas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura 29.



**Figura 29.** Lecturas de absorbancia obtenidas para el CPH utilizando el sustrato sometido a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Tratamiento a 28 °C (azul), tratamiento a 37 °C (rojo), tratamiento a 42 °C (rosa) y anticuerpo conservado a 4 °C (negro).

No se observaron diferencias significativas entre el sustrato tratado a 28 °C durante los días 5 y 10 del ensayo ( $p > 0,05$ ) comparados con el sustrato sin tratamiento térmico. Sin embargo, el valor obtenido el día 15 a esta misma temperatura mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en comparación con el CPH ensayado con el sustrato sin tratamiento térmico.

La estabilidad térmica ensayada para el sustrato a 37 °C y 42 °C durante el período analizado, mostró diferencias significativas al comparar los valores obtenidos del CPH utilizando el sustrato sin tratamiento térmico ( $p < 0,05$ ).

Las lecturas del CN presentaron valores cercanos a 0 y no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) por lo que no fueron incluidas en la Figura 29.

Analizando los valores de OD obtenidos, se seleccionaron las siguientes condiciones de 28 °C y 10 días. En base a los resultados obtenidos, se infiere la estabilidad térmica entre 2 - 8 °C mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius. El tiempo de conservación del sustrato a temperaturas entre 2 - 8 °C fue de 154 días (5 meses, aproximadamente).

Al aplicar la ecuación de Arrhenius y, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para cada uno de los componentes, podemos inferir que la vida útil del ELISA-Stx2 completo fue de 5 meses.

## Discusión

La enfermedad diarreica aguda tiene importantes implicancias económicas y sociales, tanto para la comunidad como para el sistema de salud, debido a su alta tasa de ocurrencia y mortalidad asociadas. A nivel mundial, la OMS estima que 1,7 millones de personas sufren de enfermedad diarreica cada año y que, aproximadamente, 760000 niños menores de cinco años mueren a causa de esta enfermedad cada año (OMS, 2013). En la Argentina, se registran aproximadamente 1 millón de casos de diarrea aguda anualmente, de las cuales el 50% afectan a niños menores de 5 años. Asimismo, en nuestro país, esta enfermedad origina alrededor del 10% de las internaciones en la primera infancia y es responsable de alrededor de 100 muertes promedio al año, representando el 1,2% de ellas en este grupo etario (Giugno y Oderiz, 2010). Entonces, la enfermedad diarreica aguda es, principalmente, una enfermedad de infantes y niños pequeños.

La enfermedad diarreica puede ser atribuida a una gran variedad de enteropatógenos; los cuales pueden mostrar diferentes patrones epidemiológicos de acuerdo a la edad del huésped, la estación del año y la localización geográfica.

Las diarreas agudas de origen infeccioso pueden ser de etiología bacteriana, viral o parasitaria, siendo frecuente las asociaciones de dos o más microorganismos. Entre los agentes bacterianos se pueden señalar como los más frecuentes a *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* y *E. coli* diarreogénicas, entre otros.

En el caso de las *E. coli* diarreogénicas, el CDC estimó que, en EE.UU., STEC O157:H7 causa 73000 casos de enfermedad anuales, mientras que STEC no O157 causa al menos 37000 enfermos por año, ocasionando más de 2000 hospitalizaciones y 60 muertes por año. La incidencia de las infecciones por *E. coli* O157:H7 es de 2,1 casos/100000 habitantes y representa, después de *Listeria*, la segunda causa (29%) de las hospitalizaciones por ETA en ese país. Respecto a Latinoamérica, en Colombia se comunicó, en forma preliminar, que *E. coli* O157:H7 fue el agente causal del 7,2% de los casos de diarrea. En Chile y Argentina, STEC O157 y no O157 está asociado a casos de diarrea y SUH (Rivas, 2011).

Las STEC pueden presentarse en el hombre con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que van desde diarreas leves a severas, como también CH y

SUH. En los últimos años la relevancia clínica y epidemiológica de las STEC ha permitido que este patógeno sea objeto de numerosos estudios relacionados con sus mecanismos de patogenicidad, al desarrollo de metodologías diagnósticas, al tratamiento y al control de la infección.

Una de las mayores preocupaciones a nivel epidemiológico es la transmisión de STEC a través del consumo de una amplia variedad de alimentos contaminados, a través de la ingesta de agua contaminada, a través del contacto con animales o su entorno y, en forma directa, de persona a persona. Otro factor importante es la baja dosis infectiva que caracteriza a STEC O157 y a STEC O111. Sin embargo, la dosis infectiva en los restantes serogrupos de STEC aún es desconocida (Paton y Paton, 1998a).

Sumado a esto, no podemos dejar de mencionar las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad diarreica por STEC debido a los considerables costos en la atención médica y el ausentismo laboral o escolar. Además, debemos contemplar los costos derivados del agravamiento del cuadro diarreico, tales como la necesidad de diálisis y, eventualmente, el trasplante renal y la medicación derivada de este cuadro y el riesgo de contraer infecciones en los pacientes dializados, entre otros.

En el área de la producción y distribución de alimentos, la falta de control en un mundo cada vez más global puede ocasionar pérdidas desorbitadas al sector productivo. Las consecuencias económicas que se derivan de este fenómeno pueden alcanzar proporciones enormes en el caso de que un alimento o una materia prima con destino al sector alimentario resulten contaminados. Al mismo tiempo, la falta de cumplimiento de las normas internacionales de inocuidad puede ocasionar pérdidas financieras importantes a los países exportadores de alimentos.

Dada la importancia de las STEC para la salud pública, asociada a la alta tasa de morbi-mortalidad principalmente en niños menores de 5 años, y a las grandes pérdidas económicas asociadas al consumo de alimentos contaminados, la detección eficaz, la caracterización y la tipificación de este microorganismo es fundamental y necesaria para cualquier sistema de salud y sanitario.

El diagnóstico rápido y preciso de la infección por STEC es esencial ya que la instauración de un tratamiento certero y temprano en el curso de la infección podría disminuir el daño renal y mejorar el estado clínico general del paciente. Este hecho se basa en que un diagnóstico oportuno evitaría el uso de antimicrobianos o agentes antimotilidad intestinal, los cuales están considerados como perjudiciales en pacientes

con infecciones por STEC ya que conllevan a un agravamiento en el cuadro de la enfermedad.

Por otra parte, la pronta identificación de las STEC es esencial para la aplicación de medidas de control, para una respuesta eficaz y oportuna en casos de brotes, para la detección de los serotipos nuevos y emergentes y para la determinación de la evolución de la epidemiología de esta enfermedad (Pollock y col., 2009; Ake y col., 2005). Por ello, se hace indispensable contar con técnicas diagnósticas de fácil implementación en los laboratorios y que resulten útiles para el desarrollo de estudios epidemiológicos que conlleven a la instauración de las medidas necesarias para el control de la enfermedad.

Tradicionalmente, la detección de los patógenos asociados a las ETA en el laboratorio microbiológico se ha realizado utilizando técnicas de cultivo convencionales y métodos que utilizan diversos modelos animales. Estas técnicas implican un trabajo laborioso y largos períodos en el procesamiento, sin embargo, son ampliamente utilizadas en la actualidad.

El cultivo de las muestras de heces y alimentos es el método de elección para el diagnóstico de las STEC ya que representa el patrón oro o de referencia en comparación con los métodos de detección rápida desarrollados en este último tiempo (Growther y Andrew, 2011).

La mayoría de los aislamientos de STEC O157 pueden ser fácilmente identificados en el laboratorio al utilizar medios selectivos que contengan sorbitol en su formulación, basándose en la propiedad de STEC O157 de no fermentar este azúcar dentro de las 24 horas. Sin embargo, muchos laboratorios clínicos no realizan el cultivo de muestras de heces de manera rutinaria para la búsqueda de STEC O157. Una de las razones de la limitación en la selección de las pruebas para la detección de las STEC se basa en una baja prevalencia local. Sin embargo, en los lugares donde se encontró que la prevalencia era tan baja como para justificar el uso de estas técnicas, posteriormente, se demostró que, en la mayoría de los casos, la prevalencia de STEC aumentaba al implementar la búsqueda de este patógeno (Nataro y Kaper, 1998; Kehl, 2002).

Diversos estudios han encontrado que STEC O157:H7 representa, en forma general, el patógeno entérico más prevalente luego de *Shigella* spp., *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. A pesar de estos hallazgos, el número de infecciones por STEC no O157 documentadas están probablemente subestimadas debido al uso prácticamente exclusivo de técnicas que detectan *E. coli* O157 (Kehl, 2002). Por lo tanto, la

implementación de una prueba que detecte los serotipos de STEC no O157 podría modificar los datos de la prevalencia local (Novicki y col., 2000).

Estudios realizados por Ramotar y col. que involucraron la búsqueda de STEC mediante la determinación de Stx, indicaron que la prevalencia de STEC fue tres veces mayor que la encontrada al emplear técnicas de cultivo. Esto sugiere que una proporción significativa de las infecciones por STEC no están siendo diagnosticadas en zonas de alta endemicidad, lo implica que la epidemiología de la infección por STEC se defina de forma incompleta en la actualidad.

En sus comienzos, las investigaciones de la prevalencia de las infecciones por STEC en pacientes con enfermedad diarreica se limitaron principalmente a la recuperación del serotipo O157:H7 en las heces debido a limitaciones técnicas en la detección de los otros serotipos. Sin embargo, el empleo de técnicas moleculares para la caracterización de los genes que codifican para las toxinas Stx-1 y Stx-2, han facilitado los estudios epidemiológicos (Ramotar y col., 1995).

El creciente reconocimiento del déficit en la detección de STEC ha llevado a un cambio en la prioridad en el desarrollo de métodos de identificación. El cultivo bacteriológico sigue siendo la prueba de referencia y, por esta razón, ha habido una búsqueda hacia la implementación de medios de cultivos sólidos que seleccionen STEC no O157 (Kase y col., 2015). Sin embargo, debido a que los métodos basados en el cultivo son laboriosos y presentan limitaciones en la sensibilidad para la detección de STEC, se recomienda que los laboratorios complementen el cultivo con otras técnicas diagnósticas (Gould y col., 2009).

Considerando las metodologías diagnósticas complementarias al cultivo, los métodos moleculares, especialmente la PCR, se consideran hoy en día una de las técnicas más fiables y sensibles para diferenciar las cepas de *E. coli* diarreogénicas del resto de la flora fecal. En la práctica, estas técnicas representan un método rápido para la investigación de muestras diarreicas y de alimentos y proporcionan una detección específica del microorganismo deseado. A pesar de ello, un aspecto negativo de esta metodología es la incapacidad de discriminar entre células vivas y muertas y la necesidad de un equipamiento de laboratorio más complejo (Nataro y Kaper, 1998).

Otras metodologías para el diagnóstico de STEC disponibles en el mercado internacional son los equipos basados en la técnica de ELISA, la aglutinación con partículas de látex y los métodos inmunocromatográficos. A pesar de la amplia variedad

de metodologías descritas, estas alternativas diagnósticas no se encuentran disponibles en el mercado local o son relativamente costosos.

Los equipos comerciales basados en la técnica de ELISA que permiten la detección de *E. coli* O157 ofrecen tiempos cortos de procesamiento, aproximadamente de 2 horas. Estos equipos son precisos y fáciles de utilizar en laboratorios de diferentes niveles de complejidad. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos mediante esta técnica deben ser considerados presuntivos y deben ser confirmados mediante el cultivo, pruebas de detección de Stx o PCR (Dylla y col., 1995).

En este contexto, surgió el objetivo del presente trabajo respecto al desarrollo de dos prototipos de ELISA para la detección de *E. coli* O157:H7 y *E. coli* no O157 productoras de Shigatoxinas en aislamientos de origen clínico y alimentario.

El desarrollo de estos productos involucró la vinculación científica -tecnológica del grupo de investigación con el laboratorio GT Lab, lo que resultó de gran importancia por su vasta experiencia en el desarrollo de esta metodología diagnóstica. La pretensión a futuro de este desarrollo involucra el escalado de los productos en la empresa GT Lab para su posterior comercialización. Por ello, se definieron ciertas variables en el desarrollo de estos prototipos que involucraron etapas o reactivos previamente estandarizadas por el mencionado laboratorio. Estas incluyeron la formulación de la solución de lavado, del sustrato y de la solución de parada.

El ELISA-O157 desarrollado en este trabajo para la detección de *E. coli* O157 fue un sistema directo donde el anticuerpo primario o de captura utilizado fue un anticuerpo policlonal de cabra anti *E. coli* O157 y el anticuerpo conjugado fue un anticuerpo policlonal de cabra marcado con HRP (anti- *E. coli* O157-HRP). La estandarización de este ensayo involucró varias etapas. La primer etapa consistió en la definición del anticuerpo de captura y la concentración del mismo a utilizar en la sensibilización de las policubetas.

Los ELISA disponibles comercialmente utilizan, indistintamente, anticuerpos policlonales y monoclonales para la detección de aislamientos de STEC. Por ello, decidimos ensayar ambas opciones en la sensibilización de las policubetas (Ochoa y col., 2000). Si bien, la combinación de un anticuerpo de captura monoclonal y de un anticuerpo conjugado policlonal es la elección ideal, al ensayar el comportamiento de los anticuerpos en la reacción de ELISA, encontramos que al emplear el anticuerpo de captura policlonal se obtuvieron lecturas de OD mayores, en comparación a los hallazgos obtenidos cuando se utilizó el anticuerpo monoclonal. En definitiva, se

seleccionó el anticuerpo policlonal comercial anti *E. coli* O157 que fue el que presentó un mejor desempeño.

Al evaluar la concentración del anticuerpo de captura de 0,50 µg/mL, se observó una buena diferenciación entre los controles positivo y negativo coincidiendo con la concentración a la que se observó el valor más alto de OD en el control positivo y un valor significativamente menor en el control negativo.

La concentración óptima y el isotipo del anticuerpo de detección a emplear son muy variables en los diferentes sistemas ELISA. En el presente trabajo se ensayaron dos diluciones del anticuerpo policlonal de cabra anti- *E. coli* O157 conjugado con HRP, la recomendada por el fabricante y una dilución mayor para optimizar el rendimiento del anticuerpo. La dilución seleccionada fue 1:1000 ya que permitió diferenciar claramente los controles empleados en el desarrollo del ELISA-O157 y, del mismo modo, las muestras positivas de las muestras negativas.

Finalmente, la concentración óptima del anticuerpo de captura seleccionada fue de 0,50 µg/mL y, en el caso del anticuerpo conjugado, fue de 0,0005 µg/mL. Una ventaja en la selección de estos anticuerpos fue la optimización en el rendimiento de los reactivos a nivel costos.

Otro de los parámetros establecidos fue el empleo de una marca alternativa de policubetas a la utilizada de rutina en la producción de otros ELISA en el laboratorio de producción de la empresa GT Lab. De esta manera, nos aseguramos la independencia de la marca comercial, manteniendo las especificaciones del tipo y características del material de las placas, es decir, que estas sean de poliestireno cristal de alta capacidad de fijación de proteínas. La posibilidad de utilizar las microplacas marca Greiner Bio-One o Biomart fue indistinta ya que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de OD al analizar las marcas comerciales mencionadas.

Finalmente, se comprobó la viabilidad de la utilización de los controles positivo y negativo conservados a -20 °C, ya que no se encontraron diferencias significativas en los valores de OD entre los controles conservados a 4 °C y a -20 °C. Rocha y Piazza obtuvieron resultados similares al ensayar la estabilidad de sobrenadantes de cultivos de STEC congelados y frescos (Rocha y Piazza., 2007).

Mediante el proceso de validación se pretendió determinar si el prototipo ELISA-O157 cumplía con el propósito para el cual fue desarrollado, es decir, lo suficientemente confiable, sensible y específico.

De acuerdo a los numerosos trabajos publicados, los parámetros para validar un método analítico no cuantitativo son los siguientes: sensibilidad, especificidad, valor predictivo, límite de detección, región de incertidumbre, precisión, presencia de reacciones cruzadas, estabilidad térmica de los reactivos, las policubetas y el control positivo (Trullós y col., 2004; Ruisánchez y col., 2005; *Committee for Medicinal Products for Human Use*, 2011).

Diferentes equipos para la detección de STEC O157 se encuentran disponibles en el mercado internacional, los que en su mayoría, fueron diseñados para la búsqueda de este patógeno en la industria alimentaria. Entre ellos podemos mencionar los ELISA 3M™ Tecra™ *E. coli* O157 Visual Immunoassay (Tecra International Pty Ltd. Australia), Assurance® Enzyme Immunoassay (BioControl Systems Inc., EE.UU.), *E. coli* O157 ELISA (Solus Scientific Solutions Ltd., Reino Unido), *E. coli* O157 (Diagnostic Automation, Inc., EE.UU.), EHEC O157 ELISA Kit (MyBioSource, EE.UU.), Transia Plate *E. coli* O157 (Diffchamb, Francia), Assurance (BioControl Systems Inc., EE.UU.), el ensayo inmunocromatográfico Immunocard STAT! *E. coli* O157 Plus (Meridian Biosciences Inc., EE.UU.) y el equipo automatizado VIDAS ECO O157 (bioMérieux, Francia).

A pesar de las numerosas opciones comerciales mencionadas anteriormente, la elección del método a utilizar en el laboratorio microbiológico no resulta una tarea sencilla, ya que la mayoría de ellos no están a la venta en nuestro país y, lo que resulta más importante aún, es la escasa información sobre las características en el desempeño de cada uno de estos ensayos. El problema sobre la escasa disponibilidad de estos datos derivados de los ensayos de estandarización y validación de los equipos disponibles comercialmente se trasladó a este trabajo, ya que al intentar comparar el desempeño de nuestro prototipo no contábamos con una información completa y suficiente.

Los informes sobre la S y la E del equipo comercial *E. coli* O157 (Diagnostic Automation, Inc., EE.UU.) describieron valores del 92% y 100%, respectivamente (Diagnostic Automation, Inc., 2015).

Dada la escasa información sobre las características de desempeño de los diferentes ELISA comerciales mencionados en relación a la S, la E y los valores predictivos, analizaremos el equipo inmunocromatográfico comercial Immunocard STAT! *E. coli* O157 Plus disponible para la detección de *E. coli* O157. Snapp y col. y Mackenzie y col., evaluaron el desempeño de este equipo informando una sensibilidad del 85% al evaluar muestras almacenadas (Snapp y col., 2000; Mackenzie y col., 2000).

La valoración de la S, E, VPP y VPN del ELISA-O157 se realizó empleando suspensiones de colonias bacterianas provenientes de la zona de confluencia de las muestras de materia fecal y comparándola con el cultivo y la detección del gen *rfbO157* mediante PCR. La S y la E resultante de este análisis fue del 100%, con un VPN y VPP del 100%. Además, se observó una concordancia absoluta del ELISA-O157 con las técnicas de cultivo y PCR.

Continuando con la validación del ELISA-O157, resultó necesaria la determinación del punto de corte del mismo. Para ello se recurrió a la construcción de una curva de ROC en la que se graficó la S frente a la tasa de falsos positivos (1 - E). Cada punto de esta gráfica representó una S y una E correspondiente a un límite de decisión específico. A partir de este análisis, se seleccionó un valor de corte que permitió obtener una buena discriminación en las respuestas, con elevados valores de E (99,9%) y S (100%).

Los valores del LD del antígeno O157 de los diferentes ELISA disponibles en el mercado se encuentran en  $10^5$  UFC/mL en el caso del ELISA *E. coli* O157 (Solus Scientific Solutions Ltd.), del Premier EHEC y del Transia Plate *E. coli* O157 (Solus *E. coli* O157 ELISA, 2015; Chui y col., 2011; Arbault y col., 2000) y en  $10^6$  UFC/mL para el Inmunocard STAT! *E. coli* O157 Plus (Mackenzie y col., 2000).

El LD del prototipo ELISA-O157 desarrollado en el marco de este trabajo de tesis fue de  $4,7 \times 10^6$  UFC/mL, con una zona de incertidumbre de  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL a  $4,7 \times 10^6$  UFC/mL. Estos valores resultaron en el orden del LD del Inmunocard STAT! *E. coli* O157 Plus, equipo ampliamente utilizado y estudiado para el diagnóstico de STEC (Chui y col., 2011; Growther y Andrew, 2011).

Continuando con la validación del ELISA-O157, hemos ensayado la reactividad del mismo, es decir, hemos evaluado el comportamiento de este equipo frente a diferentes cepas de *E. coli* O157, tanto de origen clínico como alimentario. Los resultados demostraron la capacidad de este ELISA de detectar la totalidad de los aislamientos de *E. coli* O157 analizados. Ensayos similares se realizaron al evaluar el equipo ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus sobre 21 aislamientos de *E. coli* O157:H7, no observándose reacciones negativas frente a las *E. coli* O157:H7 probadas (Meridian Bioscience, 2009). Por otra parte, el equipo Transia Plate *E. coli* O157 fue ensayado con 10 aislamientos de *E. coli* O157 evidenciándose reacción positiva en todos los casos (Arbault y col., 2000). En el caso del ELISA 3M™ Tecra™ *E. coli* O157 Visual Immunoassay, se informó que este equipo detecta todas las cepas *E. coli*

O157, incluidos los serotipos de *E. coli* O157:H7 que no siempre expresan el antígeno H7.

Evaluando la posibilidad de la presencia de reacciones cruzadas, Arbault y col., demostraron que el ELISA Transia Plate *E. coli* O157 no presentó reacciones cruzadas con las *E. coli* no O157 ensayadas, sin embargo, 2 cepas de *Salmonella* pertenecientes al serogrupo N presentaron reacción positiva (Arbault y col., 2000). Anteriormente, se informó otra reactividad cruzada con bacterias como *Escherichia hermannii* utilizando otros métodos inmunoquímicos, como la aglutinación con partículas de látex y EIA (Easton, 1997).

Al evaluar la especificidad del sistema inmunocromatográfico ImmunoCard STAT! *E. coli* O157 Plus se identificaron tres bacterias que presentaron reactividad cruzada: *Salmonella hilversum*, *E. coli* O157:H38 y *E. coli* O157:H1 (Mackenzie y col., 2000).

Con respecto a los resultados obtenidos al enfrentar nuestro prototipo con microorganismos Gram positivos y negativos y hongos, no se observaron reacciones positivas. Analizando las reacciones cruzadas de los equipos mencionados anteriormente, es importante aclarar que no se ha recuperado *Salmonella hilversum* en infecciones asociadas a humanos y que, *E. coli* O157:H38 y *E. coli* O157:H, fueron aisladas en el hombre con baja frecuencia, razón por la cual y debido a la dificultad en la disponibilidad de estas cepas, no fueron incluidas en estos ensayos. La ausencia de reacciones cruzadas con los 40 microorganismos ensayados resultó tranquilizador, en particular en el caso de *Campylobacter* spp. y *Shigella* spp. que, al igual que las STEC O157, presentan con frecuencia cuadros de diarrea con sangre.

La repetibilidad de un ensayo se estima mediante el cálculo del CV y cuyos valores, de acuerdo a diferentes autores, deben encontrarse entre un 15% a un 20% para que el ensayo presente una adecuada repetibilidad (Crowther, 2000; Findlay y col., 2000; *Committee for Medicinal Products for Human Use*, 2011). Según la Organización Mundial de la Salud Animal, valores de CV inferiores al 20% indican una reproducibilidad adecuada en la fase de desarrollo de un ensayo, sin embargo, las muestras de baja titulación pueden presentar CV mayores a este valor (OIE, 2008).

En la búsqueda de información sobre la precisión de los equipos comerciales para la detección de *E. coli*, únicamente el ELISA EHEC O157 (MyBioSource) presentó informes sobre los valores de CV intra e inter ensayo, los cuales resultaron menores al 15%.

La precisión del ELISA-O157 desarrollado se evaluó mediante la determinación del CV en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia. En ambos casos, fue inferior al 20% valor próximo al propuesto por Findlay y col., lo que indicó una adecuada repetibilidad y precisión intermedia en el desarrollo del ensayo. Debemos aclarar que al ensayar la precisión intermedia del CN, el CV% se encontró ligeramente por encima del 20%, lo que consideramos como aceptable de acuerdo a lo propuesto por la OIE (OIE, 2008).

Debe prestarse particular atención a la estabilidad del producto desarrollado ya que la misma depende, en gran medida, de la temperatura y las condiciones generales de almacenamiento. Contemplando el tiempo que puede transcurrir entre la producción del equipo hasta que llega a manos del consumidor y la posibilidad de almacenamiento de unidades en los laboratorios clínicos y/o microbiológicos, es deseable que el producto tenga una validez de al menos un año conservado entre 2 - 8 °C. Para evaluar la estabilidad del equipo fue necesario realizar estudios de estabilidad térmica acelerada.

Los componentes de nuestro prototipo de ELISA-O157 analizados en cuanto a su estabilidad térmica presentaron comportamientos variables al ser sometidos a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Al analizar la vida útil de cada uno de los componentes obtenida al aplicar la ecuación de Arrhenius podemos inferir que la vida útil del prototipo completo fue de 9 meses.

Las policubetas y el sustrato fueron los componentes críticos que se deterioraron tempranamente por lo que debe prestarse especial cuidado en las condiciones de almacenamiento de los mismos. Por otra parte, las lecturas de OD del CPH se mantuvieron elevadas aún a los 10 días de incubación a pesar de presentar diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con el CPH sin tratamiento térmico. Si consideramos este punto, podemos describir que el ELISA-O157 fue estable 9 meses luego de su elaboración y que esta estabilidad podría prolongarse 9 meses más allá de la fecha de expiración.

Como ya fue mencionada en numerosos trabajos, y en este en particular, la dificultad en la identificación de las cepas de STEC en muestras de pacientes y alimentos ha planteado un gran problema para los laboratorios desde la aparición de estos patógenos en la década de 1980. Aunque el uso del medio sólido SMAC facilita el aislamiento de STEC O157, los aislamientos de STEC no O157 representan aún un problema en su identificación debido a la escasa disponibilidad de equipos en el mercado local.

Numerosos trabajos recomiendan que las muestras de heces de pacientes con diarrea aguda deberían ser examinadas para la búsqueda de STEC O157 y, de forma simultánea, para STEC no O157 con un ensayo capaz de detectar las toxinas Shiga. También se mencionó que, a pesar que las técnicas de ELISA y que los métodos basados en la PCR son herramientas útiles para el diagnóstico de la infección por STEC, no deben sustituir a las pruebas de cultivo convencionales (Gould y col., 2009).

En alimentos, la vigilancia de STEC no O157 no se realiza en forma generalizada, debido a que no existe una reglamentación que incluya la búsqueda de estos serotipos en la matriz alimentaria. El Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria (SENASA) dispone de dos circulares publicadas en el año 2008, una se refiere al monitoreo obligatorio de la *E. coli* O157:H7 (Circular N° 3834) y la otra referida al monitoreo de *E. coli* Shigatoxigénica en establecimientos faenadores de rumiantes domésticos (Circular N° 4032 A) (SENASA, 2008).

Por ello, numerosos esfuerzos se llevan a cabo para lograr el desarrollo de una metodología para la detección y el aislamiento de todos los serogrupos no O157, sin embargo, muchas veces estos esfuerzos no han sido suficientes. En la actualidad, la detección de STEC no O157 se limita a determinados lugares con una alta capacidad analítica.

En este contexto, el prototipo de ELISA-Stx2 desarrollado en este trabajo podría resultar una herramienta útil en la detección y en la confirmación de las STEC no O157.

El primer ELISA desarrollado para detección de Stx sobre de colonias de STEC estaba basado en la inmovilización de anticuerpos monoclonales anti Stx1 y anti Stx2 sobre membranas (Perera y col., 1988). Desde la creación de este primer ELISA que requería el crecimiento de colonias en un medio sólido, se han desarrollado una serie de ensayos para la detección de la Stx directamente en muestras de heces o de cultivos de heces enriquecidos (Parsons y col., 2016).

El ELISA-Stx2 desarrollado en el contexto de este trabajo de tesis es un EIA sándwich modificado, estrategia que, según numerosos trabajos, presenta la ventaja de aumentar la sensibilidad de esta metodología (Hornbeck, 2001). La selección del tipo de ELISA desarrollado no fue caprichosa, sino que se debió a la falta de disponibilidad de anticuerpos comerciales anti Stx-2 marcados con HRP que podrían haber sido utilizados como anticuerpos conjugados en un formato de ELISA sándwich convencional similar al ELISA-O157 descrito previamente

Los equipos de ELISA comerciales para la detección de Stx, son equipos que fueron desarrollados, en líneas generales, utilizando anticuerpos monoclonales anti Stx como captura y anticuerpos policlonales anti Stx conjugados a HRP. Entre ellos podemos mencionar, Premier EHEC (Meridian Biosciences Inc., EE.UU) y el Shiga Toxin Chek (Techlab Inc., EE.UU). Otros equipos, como el ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) (Remel Europe Ltd., Reino Unido), utilizan anticuerpos policlonales anti Stx como captura y anticuerpos monoclonales anti Stx conjugados a HRP. En cambio, el equipo BioStar OIA SHIGATOX (Inverness Medical-BioStar, Inc., EE.UU) utiliza únicamente anticuerpos policlonales y el Duopath<sup>®</sup> Verotoxin (Merck, Alemania) y el Ridascreen<sup>®</sup> Verotoxin (R-Biopharm AG, Alemania) emplean solo anticuerpos monoclonales (Bryan y col., 2015). Como podemos observar, se utilizaron en el diseño y desarrollo de los ELISA comerciales se emplearon prácticamente todas las combinaciones posibles de anticuerpos, ya sea para la sensibilización de las policubetas como para su utilización como anticuerpos de detección. Finalmente, la selección de la combinación de estos anticuerpos depende de la disponibilidad y el desempeño de los anticuerpos en la reacción inmunoenzimática y de los costos asociados al desarrollo y a la producción del ELISA.

La estandarización del ELISA-Stx2 involucró la evaluación de distintas opciones de anticuerpos de captura y secundario y de sus respectivas concentraciones. Entonces, este equipo de ELISA fue desarrollado utilizando el anticuerpo de captura monoclonal anti Shigatoxina 2 (Hycult Biotech, Países Bajos), el anticuerpo secundario policlonal de conejo anti Stx2 (Butantán, Brasil) y, finalmente, el anticuerpo policlonal de detección de cabra anti IgG de conejo marcado con HRP (Ab Frontier, EE.UU). La combinación de un anticuerpo de captura de tipo monoclonal y de un anticuerpo secundario de tipo policlonal representa la mejor opción en el diseño de un ELISA sándwich (Hornbeck, 2001). Finalmente, las concentraciones de los anticuerpos seleccionados fueron elegidas de acuerdo a aquellas en las que este ELISA presentó un

mejor desempeño permitiendo diferenciar significativamente el control positivo del negativo.

Además, se evaluaron dos marcas de policubetas comerciales, Greiner Bio- One y Biomart que, tal como las describimos anteriormente, se caracterizaban por ser de poliestireno cristal de alta capacidad de fijación de proteínas. Los ensayos demostraron que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de OD al analizar las marcas comerciales mencionadas. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de OD entre los controles positivo y negativo conservados a 4 °C y a -20 °C. Resultados similares, tanto en la comparación de distintas marcas de policubetas como de la estabilidad de los controles, fueron presentados por Rocha y Piazza al analizar un EIA para la detección de Stx (Rocha y Piazza., 2007).

Uno de los equipos de ELISA más evaluado en diversos trabajos científicos y utilizado en distintos laboratorios microbiológicos de diferentes países fue el ELISA en microplaca Premier EHEC (Meridian Bioscience Inc., EE.UU), mencionado anteriormente. Múltiples estudios utilizaron tanto caldos de enriquecimiento de heces incubados durante toda la noche como también muestras clínicas sin una etapa previa de enriquecimiento, describiendo una sensibilidad del 90,5% al 96,8% y una especificidad del 98,5% al 100% (Teel y col., 2007 Grif y col., 2007; Chui y col., 2011; Hermos y col., 2011).

Otro estudio realizado en el Alberta ProvLab evaluó dos inmunoensayos en microplacas, el mencionado Premier EHEC y el ensayo Shiga Toxin Chek (Techlab Inc., EE.UU) (Chui y col., 2011). El Premier EHEC demostró una sensibilidad del 90,5%, similar a la observada en estudios previos (Teel y col., 2007; Hermos y col., 2011), en tanto, el ensayo Shiga Toxin Chek presentó una sensibilidad del 70% al 80% (Chui y col., 2011).

Kehl y col. validaron el equipo Premier EHEC en 974 aislamientos comparándolos con el ensayo de citotoxicidad sobre células Vero. Los valores de sensibilidad fueron del 100% y de especificidad del 99,7% (Kehl y col., 1997). Novicki y col. validaron este mismo equipo con 488 aislamientos utilizando también la citotoxicidad sobre células Vero como método de referencia, resultando una sensibilidad del 82,4% y una especificidad del 100% (Novicki y col., 2000). Estas validaciones mostraron una discordancia en los resultados de sensibilidad del método estudiado.

Otro ensayo de validación del Premier EHEC consideró como técnica de referencia el Dot Blot, informando una sensibilidad del 89% y una especificidad del 91% al analizar 876 aislamientos (Mackenzie y col. 1998). Por otra parte, Grif y col. validaron este equipo con 240 aislamientos utilizando la PCR como técnica de referencia, resultando una sensibilidad del 95,4% y una especificidad del 97,2% (Grif y col., 2007).

Otro EIA en microplaca que se ha sometido a evaluación clínica es el ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (Remel, EE.UU.). Sobre un total de 974 aislamientos analizados, la sensibilidad y la especificidad informadas para este equipo fueron del 100% (Gavin y col., 2004). Gerritzen y col., también evaluaron el ProSpecT Shiga Toxin *E. coli*, demostrándose una sensibilidad menor en comparación con el Premier EHEC, con valores que variaban entre 76,8% al 100% de acuerdo a la metodología de validación empleada (Gerritzen y col., 2011).

Además de los ELISA de microtitulación, otros tipos de inmunoensayos se han desarrollado para detectar STEC. Uno de estos métodos es el inmunoensayo óptico BioStar OIA SHIGATOX (Inverness Medical-BioStar, Inc., EE.UU.), que detecta la Stx por su interacción con los anticuerpos anti-Stx en la superficie de una oblea de silicio. Del mismo modo, el Duopath<sup>®</sup> *Verotoxin* (Merck, Alemania) es un ensayo inmunocromatográfico que emplea anticuerpos anti- Stx inmovilizados a una membrana. Estudios previos, demostraron que el ensayo de BioStar OIA SHIGATOX presentaba un desempeño superior al Duopath<sup>®</sup> *Verotoxin*. Sin embargo, este último ensayo resulta ventajoso ya que permite la diferenciación entre las STEC productoras de Stx-1 y las productoras de Stx-2 (Grif y col., 2007).

Beutin y col. analizaron los parámetros de validación del equipo Ridascreen<sup>®</sup> *Verotoxin* informando una sensibilidad del 95,7% y una especificidad de 98,7%. Para ello, se estudiaron 162 aislamientos positivos y 77 negativos para STEC utilizando la técnica de PCR como metodología de referencia (Beutin y col., 2007).

Estudios comparativos realizados utilizando los ELISA comerciales Premier EHEC, Ridascreen<sup>®</sup> *Verotoxin* y ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* relataron una sensibilidad con valores de un 82,4% a un 100% y una especificidad del 91% al 100%, dependiendo de la metodología de validación utilizada, del número de aislamientos positivos y de la prueba utilizada como método de referencia (Willford y col., 2009).

Evaluando en forma global los resultados expuestos anteriormente, los cuales fueron obtenidos por distintos grupos de investigación sobre los diferentes equipos para

detección de Stx disponibles comercialmente, observamos que las validaciones de los mismos se tornan confusas y de difícil comparación. Esto podría deberse a que los ensayos se realizaron con estudios no comparables, utilizando aislamientos diferentes o tomando como técnicas de referencia distintas metodologías.

En este contexto, al evaluar nuestro prototipo de ELISA-Stx2 frente a 100 muestras de materia fecal y comparándolo con la técnica de PCR para detección del gen *stx2*, este equipo demostró una sensibilidad del 80% y un VPN del 98,95%. Por otro lado, la especificidad y el VPP calculados fueron del 100%. A estos parámetros podemos sumar que la concordancia entre el ELISA-Stx2 y la técnica de PCR para detección del gen *stx2* fue muy buena.

De acuerdo a los trabajos realizados por los distintos autores detallados anteriormente, nuestro esquema de validación fue similar al realizado por Beutin y col. al analizar el ELISA Ridascreen® *Verotoxin*. Comparando los valores de los parámetros de sensibilidad y especificidad obtenidos para ambos métodos, observamos que el ELISA-Stx2 presentó una sensibilidad más baja y una especificidad prácticamente comparable al Ridascreen® *Verotoxin*. Este hecho se evidenció en nuestro trabajo al analizar las muestras de materia fecal empleando el ELISA Ridascreen® *Verotoxin*. Además, esto se evidenció al determinar que el grado de concordancia □ entre el ELISA Ridascreen® *Verotoxin* y nuestro prototipo desarrollado fue muy bueno.

Planteándonos la necesidad de mejorar la sensibilidad de nuestro ELISA-Stx2, sin que esto signifique un detrimento en la especificidad, decidimos ajustar el valor del punto de corte que se había establecido empíricamente. Mediante el análisis de las curvas ROC, se determinó un punto el corte en el cual la prueba mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98%.

Las hojas técnicas de los ensayos inmunoenzimáticos disponibles en el mercado para detección de Stx no describen el LD de los mismos, de modo que no fue posible comparar el LD del ELISA-Stx2 obtenido con otras técnicas de ELISA.

Los ensayos ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC), Shiga Toxin Chek, Premier EHEC y BioStar OIA SHIGATOX informaron un 100% de reactividad al ensayar diversas cepas de STEC. En el caso del ELISA-Stx2, se probaron 10 aislamientos previamente identificados como STEC productores de Stx-2, tanto de origen clínico como alimentario, encontrándose una reactividad absoluta del ELISA frente a la totalidad de los microorganismos ensayados.

De acuerdo al consenso establecido en el año 2009 en el “7° Simposio Internacional sobre Infecciones por *Escherichia coli* productoras de Shigatoxinas” sobre la nomenclatura de los subtipos de Stx, en la actualidad se describen tres subtipos Stx1 (Stx1a, Stx1c y Stx1d) y siete subtipos Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g).

El subtipo Stx2a es a menudo transportado por STEC O157:H7 y otras STEC patógenas, mientras que el Stx2d es transportado únicamente por cepas STEC no O157 (Feng y col., 2011b). Además de los subtipos Stx2a y Stx2d, el Stx2c también ha surgido como un subtipo importante asociado a enfermedad grave (Friedrich y col., 2002; Persson y col., 2007).

La capacidad de otros subtipos Stx2 para causar enfermedad grave sigue siendo incierta. El subtipo Stx2b se propuso para designar un subtipo de Stx2c que no se encuentra en las cepas STEC que causan SUH (Persson y col., 2007) y, por lo tanto, no ha sido implicado en una enfermedad grave.

Las STEC que llevan el subtipo Stx2e se asocian comúnmente con la enfermedad del edema del cerdo y, rara vez, se encuentra en aislamientos de STEC de origen humano o implicado en diarreas o enfermedades graves (Beutin y col., 2008). Del mismo modo, el subtipo Stx2f, encontrado principalmente en STEC aislado de palomas y en 24 casos daneses con síntomas inespecíficos, ha sido implicado raramente en enfermedades humanas graves (Schmidt, y col., 2000). Por último, el subtipo Stx2g fue descrito originalmente en aislamientos de STEC en bovinos (Leung y col., 2003), en un paciente danés sin diarrea y, recientemente, en algunos aislamientos clínicos, aunque se observó que el gen *stx2g* no se había expresado en la mayoría de estas cepas (Prager y col., 2011).

Los subtipos de Stx2 descritos previamente no son necesariamente detectados por los diversos ensayos empleados para este propósito. Feng y col. examinaron 4 equipos de ELISA comerciales, el RPLA Seiken (Denka Seiken, Japón), el ImmunoCard STAT! EHEC (Meridian Biosciences), el Premier EHEC (Meridian Bioscience) y el ProSpectT Shiga toxin *E. coli* (Remel); y encontraron que estos equipos no detectaron muchas de las variantes de Stx2 (Feng y col., 2011b). Sin embargo, algunos de estos resultados fueron inconsistentes con trabajos realizados con anterioridad. En el caso del equipo Premier EHEC, el subtipo Stx2f no fue detectado por Feng y col. mientras que, un estudio realizado por Schmidt y col., demostró que permitía la detección del 33% de las cepas no inducidas ensayadas y del 100% de las

cepas inducidas con mitomicina C (Schmidt, y col., 2000). Además, el Premier EHEC no detectó la variante Stx2c y Stx2e en el estudio realizado por Feng y col., sin embargo, ambos subtipos fueron detectados en otro estudio independientemente de la inducción o no de las cepas (Schmidt, y col., 2000).

El prototipo ELISA-Stx2 desarrollado permitió la detección de los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d. Sin embargo, no pudimos informar la capacidad de detección de los subtipos Stx2b, Stx2e, Stx2f y Stx2g por no disponer de las cepas portadores de estos subtipos de Stx-2.

La capacidad de los ensayos para detectar Stx2a y Stx2d es muy importante dada su asociación con enfermedad humana grave. Por otra parte, dado que la asociación de los restantes subtipos de Stx2 con enfermedad sigue siendo incierta, la incapacidad de los ensayos para detectar algunos de ellos puede no ser de vital importancia para la salud pública.

Otro punto importante a tener en cuenta es la posibilidad que el prototipo desarrollado presente reacciones cruzadas con microorganismos que podrían encontrarse en la matriz a analizar en un futuro. Los equipos diagnósticos que informaron la presencia o no de reacciones cruzadas fueron el ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC), el Shiga Toxin Chek, el BioStar OIA SHIGATOX, el Ridascreen<sup>®</sup> Verotoxin, el Premier<sup>™</sup> EHEC y el Duopath Verotoxin. En todos los casos no se informaron reacciones cruzadas con los microorganismos patógenos ensayados (bacterias Gram positivas y negativas y levaduras) (ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) Microplate Assay, 2012; BioStar<sup>®</sup> OIA<sup>®</sup> SHIGATOX, 2007; Ridascreen<sup>®</sup> Verotoxin, 2004; Premier<sup>™</sup> EHEC, 2009; Duopath Verotoxin, 2015).

Es importante mencionar que la determinación de la especificidad o la presencia de reacciones cruzadas de los distintos equipos se realizaron mediante el empleo de aislamientos de origen clínico, alimentario y cepas control de calidad, pertenecientes a diferentes géneros y especies bacterianas o fúngicas. Estos aislamientos no siempre resultaron coincidentes al comparar los ensayos realizados sobre los distintos equipos comerciales y sobre nuestro prototipo de ELISA, lo que significó una limitación a la hora de comparar los resultados obtenidos. Además, en el caso del equipo Shiga Toxin Chek, se informó la presencia de reactividad cruzada frente a cepas virales, ensayo que no realizado en el marco de la validación del ELISA-Stx2.

Los ensayos de reactividad cruzada mostraron que el ELISA-Stx-2 no presentó reacción positiva frente a los diferentes microorganismos no relacionados con *E. coli* productora de Stx-2, analizados en el marco de la validación del mismo.

Continuando con los parámetros necesarios para validar un ensayo de estas características se determinó la precisión del mismo.

En el caso del ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC), la reproducibilidad intraensayo evaluada mediante el CV fue del 4,59% y la reproducibilidad interensayo fue del 8,69%. El equipo Ridascreen® *Verotoxin* presentó una variabilidad intraensayo del 17,93% al analizar el control negativo y del 7,06% al analizar el control positivo; la variabilidad interensayo fue del 14,80% al ensayar el control negativo y del 14,70% al analizar el control positivo. Por último, el kit Premier™ EHEC, publicó una variabilidad intraensayo de 4,90% e interensayo de 18,90%. Es decir, los diferentes equipos comerciales presentaron una variabilidad aceptable. Sin embargo, equipos como el Shiga Toxin Chek y el Duopath *Verotoxin* no informaron la variabilidad intra e interensayo.

La precisión del prototipo desarrollado se evaluó mediante la determinación del CV en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia. En ambos casos, fue inferior al 20%, valor por debajo de lo propuesto por Findlay y col. para definir la precisión de un ensayo como aceptable.

Con la intención de comparar la estabilidad del ELISA Stx-2 desarrollado frente a las distintas propuestas comerciales, se revisaron las hojas técnicas y los estudios publicados por diferentes autores que realizaron ensayos de validación sobre los mismos. El resultado de esta búsqueda demostró que ninguno de ellos describía la estabilidad térmica o el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los equipos de ELISA.

Los componentes del ELISA-Stx2, analizados en cuanto a su estabilidad térmica, presentaron comportamientos variables al ser sometidos a diferentes condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Al analizar la vida útil de cada uno de los componentes, obtenida al aplicar la ecuación de Arrhenius, se concluyó que la vida útil del prototipo completo fue de 5 meses.

Los componentes más susceptibles a las variaciones de temperatura y tiempo de incubación fueron, en primer lugar, el conjugado y el sustrato (5 meses) seguido del anticuerpo secundario (9 meses). Las lecturas de OD del CPH empleando el conjugado y el sustrato incubados a 28 °C durante 10 días presentaron valores elevados (alrededor

de 1,2). De esta manera, si consideramos este punto al utilizar la ecuación de Arrhenius, podemos indicar que el ELISA-Stx2 permaneció estable 5 meses luego de su elaboración y 3 meses más allá de la fecha de expiración, es decir, presentó una vida útil de 8 meses.

Como es conocido, para estandarizar un ensayo, se deben establecer las condiciones de trabajo óptimas de los reactivos involucrados en la reacción inmunoenzimática, como así también, los controles a utilizar en los sucesivos ensayos. Evidentemente, es preciso tener en cuenta numerosas variables antes de considerar que un ensayo está validado, sin embargo, no existe suficiente información al respecto.

Al intentar validar exhaustivamente los prototipos de ELISA desarrollados, uno no tarda en descubrir que los criterios específicos que este proceso requiere son poco claros y que las técnicas o metodologías que han de conducir a la validación del ensayo no están normalizadas. Sumado a esto, no hay un consenso en torno al concepto es sí mismo de validación, concretamente, sobre si se trata de un proceso durante el cual sólo se optimizan los factores inherentes al ensayo, o bien, si se trata de un proceso continuo, lo que significa una valoración del rendimiento del ensayo durante su utilización.

Entonces, como pudimos demostrar a lo largo de esta discusión, las evaluaciones de los equipos desarrollados en el marco de este trabajo muchas veces se tornaron imposibles de comparar con los equipos comerciales ya estos fueron analizados en diferentes estudios y con ensayos de validación diferentes.

Un tema muy importante que no podemos dejar fuera de esta discusión son los costos que le significa al sistema de salud la falta de un diagnóstico certero del agente etiológico involucrado en el proceso diarreico o en los brotes alimentarios.

Como lo mencionamos anteriormente, arribar a la identificación certera por la metodología clásica comprende una gran variedad de medios de cultivo, pruebas de identificación, trabajo de profesionales altamente capacitados, tiempos prolongados de procesamiento y costos elevados asociados a insumos y reactivos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos científicos y económicos, muchas veces no se logra identificar al agente etiológico responsable de la diarrea debido a la falta de una metodología adecuada o a lo dificultoso que resulta el análisis del cultivo de la materia fecal y/o de los alimentos. Esto lleva a la instauración de tratamientos en ausencia de un diagnóstico seguro lo que resulta no solamente ineficaz, sino también, empeora el cuadro infeccioso. Esto se ve

reflejado en que una parte importante de las diarreas en pediatría, el 60% aproximadamente, son tratadas sin la confirmación del laboratorio.

La incorporación de pruebas diagnósticas de rutina en el laboratorio de microbiología representa un costo adicional significativo, lo que puede llevar a muchos laboratorios, en un esfuerzo por contener los costos asociados al diagnóstico de STEC, a realizar la búsqueda de este patógeno solamente en heces mucosanguinolentas o de acuerdo a la prevalencia local del mismo (Kehl, 2002; Gavin y col., 2004).

La detección e identificación temprana y certera de STEC O157 y STEC no O157 presenta grandes beneficios para el individuo y para la salud pública. Park y col. han demostrado que un diagnóstico temprano de la infección por STEC habría evitado intervenciones potencialmente dañinas y costosas en un número significativo de pacientes. Además, la instauración de un diagnóstico específico puede impedir el tratamiento con agentes antimicrobianos o antimotilidad, potencialmente perjudiciales que causan la progresión a CH o SUH (Park y col., 2002). Asimismo, los beneficios en el diagnóstico de la infección por STEC para la salud pública son evidentes al asociarlo a brotes causados por alimentos contaminados con este patógeno potencialmente letal (Gavin y col., 2004).

Argentina cuenta con aproximadamente 6000 laboratorios de análisis clínicos, entre hospitalarios y de atención ambulatoria, de volumen relevante. La mayor parte de ellos, no obstante, no está en condiciones de abordar la problemática del diagnóstico de STEC ya que actualmente se requiere apelar a la bacteriología clásica o a las técnicas de biología molecular para un diagnóstico certero. Si bien no hay cifras definitivas, se estima que no más del 10% de los laboratorios están en condiciones de realizar un diagnóstico bacteriológico, siendo aún más difícil la implementación de las técnicas de biología molecular ya que requieren equipamiento de mayor complejidad.

Como lo mencionamos anteriormente, en el mercado existen diferentes equipos diagnósticos, como el ELISA, pero estos no son de industria nacional y, por los elevados costos y la demora de los proveedores en la entrega de los mismos, son prácticamente inaccesibles para la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos y microbiológicos de nuestro país.

En este punto es donde la posibilidad de un prototipo de ELISA de desarrollo y producción local para detección de STEC O157 y para la toxina de mayor prevalencia de este patógeno, como lo es la Stx-2, haría frente a esta problemática por sus

características de baja dificultad operativa, fácil implementación en el laboratorio y accesibilidad en el mercado local.

La determinación del costo total de una prueba con fines comparativos resulta difícil, ya que deberíamos tener en cuenta las horas de trabajo, los descuentos o bonificaciones y los gastos indirectos asociados al procesamiento de las muestras que pueden variar ampliamente según la institución analizada. Por ello, la comparación de los costos del material (costos variables) resultan de gran utilidad (Novicki y col., 2000).

Entonces, considerando solo los costos variables, el costo del ELISA-O157 representó el 5% del costo variable del cultivo bacteriológico para la búsqueda de *E. coli* O157, en tanto, el costo del ELISA-O157 significó el 10% del costo de la PCR para la detección del *rfb*O157. Por otra parte, siguiendo la misma línea de análisis, el costo variable del ELISA-Stx2 representó el 14% del costo variable al emplear un ELISA comercial y el 12% del costo variable de la PCR para detección del gen *stx2*. A partir de este análisis de costos podemos notar la conveniencia en términos beneficio/costo que le significará la producción a gran escala de estos equipos a la Salud Pública.

*Ya hemos discutido ampliamente las ventajas en cuanto a la rapidez, sensibilidad y especificidad del empleo de la metodología de ELISA. En este contexto, se ha desarrollado el ELISA-O157 y el ELISA-Stx2 los que proporcionaron resultados confiables en la detección de E. coli O157 y STEC productora de Stx-2. La comparación de los parámetros obtenidos durante la validación con los criterios de aceptación establecidos, evidenció que el desempeño de los mismos resultó satisfactorio, por lo tanto, podrían emplearse en la identificación de este virotipo, posibilitando a los laboratorios de baja y mediana complejidad la utilización y alcance a futuro de técnicas sencillas y de fácil implementación para el diagnóstico de STEC, quedando no sólo limitadas a los laboratorios de referencia.*

## Conclusiones

1- El empleo de una metodología común de estandarización y validación facilitó el desarrollo de los sistemas ELISA-O157 y ELISA-Stx2 discutidos en este trabajo, los que permitirían a futuro, mejorar la calidad en el diagnóstico de STEC y su empleo en estudios epidemiológicos.

2- La optimización de la etapa de sensibilización de las placas de poliestireno con anticuerpos anti *E. coli* O157 y anti Stx2 permitió alcanzar la máxima densidad de biomoléculas adsorbidas y se verificó que la reacción de ELISA mostró independencia de la marca comercial de microplacas utilizadas.

3- La selección y optimización de los anticuerpos secundarios y conjugados seleccionados permitió diferenciar claramente los controles positivos y negativos y, del mismo modo, las muestras de materia fecal positivas de las negativas.

4- Los parámetros de sensibilidad y especificidad del ELISA-O157 resultaron del 100%, en tanto, el ELISA-Stx2 presentó valores del 80% y del 100%, respectivamente.

5- El ajuste de valor de corte mediante el empleo de curvas ROC, significó una sensibilidad del 100% y una especificidad próxima a ese valor para ambos equipos.

6- La validación de estas técnicas de ELISA determinó un LD en el orden de  $10^6$  UFC/mL de *E. coli* Shigatoxigénica.

7- Los ELISA desarrollados presentaron una muy buena correlación con el cultivo convencional, la técnica de PCR aplicada a la detección de los genes *rfbO157* y *stx2* y el equipo comercial Ridascreen® *Verotoxin* (R-Biopharm AG, Alemania) para la detección de Shigatoxina.

8- Se verificó la ausencia de reacciones cruzadas al ensayar un gran número de microorganismos bacterianos y fúngicos, tanto de origen clínico como alimentario.

9- Los ELISA desarrollados presentaron una precisión intermedia y una repetibilidad aceptables, con coeficientes de variación menores al 20%.

10- La utilización de los ELISA en los laboratorios microbiológicos, clínicos y/o de alimentos permitiría reducir el tiempo de procesamiento de las muestras y, por ende, de la entrega de resultados, asimismo, el costo del análisis sería considerablemente menor.

11- La obtención de parámetros de validación adecuados al analizar estos sistemas de ELISA desarrollados para detección de *E. coli* O157 y STEC no O157, avalaría el uso de los mismos en el laboratorio microbiológico.

## ***Desarrollo a futuro – perspectivas***

Los ensayos desarrollados en esta tesis podrían producirse en un formato comercial ya que los estudios de validación demostraron una estabilidad y un desempeño comparable con los equipos comerciales.

Además del valor individual de cada uno, es importante destacar que los ensayos podrían ser utilizados en conjunto como métodos alternativos o complementarios a los establecidos para diagnóstico de STEC en muestras clínicas y en alimentos.

Para ello, nos proponemos como nuevas metas realizar el escalado del producto manteniendo la vinculación científica tecnológica generada con la empresa GT Lab. a partir del desarrollo de estos prototipos y realizar ensayos a campo en hospitales y en laboratorios de control microbiológico de alimentos de la zona del gran Rosario.

## **Referencias bibliográficas**

- Ahmed, R., Bopp, C., Borczyk, A. y Kasatiya S. (1987) Phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis., 155, 806-809.
- Ake, J. A., Jelacic, S., Ciol, M. A., Watkins, S. L., Murray, K. F., Christie, D. L., Klein, E. J. y Tarr, P. I. (2005) Relative nephroprotection during *Escherichia coli* O157:H7 infections: association with intravenous volume expansion. Pediatrics, 115, 673-680.
- Ammon, A., Petersen, L. R. y Karch, H. (1999) A large outbreak of hemolytic uremic syndrome caused by an unusual sorbitol-fermenting strain of *Escherichia coli* O157:H-. J. Infect. Dis., 179, 1274-1277.
- Arbault, P., Buecher, V., Poumerol, S. y Sorin M. L. (2000) Study of an ELISA method for the detection of *E. coli* O157 in food. Prog. Biotech., 17, 359-368.
- Aydin, S. (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 72, 4-15.
- Belnap, W. D. y O'Donnell, J. J. (1955) Epidemic gastroenteritis due to *Escherichia coli* O-111. J. Pediatr., 47, 178-193.
- Bender J. B., Hedberg, C. W., Besser, J. M., Boxrud, D. J., MacDonald, K. L. y Osterholm, M. T. (1997) Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. N. Engl. J. Med., 337, 388-394.
- Bentancor, A. (2006) El rol epidemiológico de las mascotas en el ciclo de transmisión urbana de cepas STEC. Medicina., 66, 37-41.
- Beutin, L. (1999) *Escherichia coli* as pathogen in cats and dogs. Vet. Res., 30, 285-298.
- Beutin, L., Aleksic, S., Zimmermann, S. y Gleier, K. (1994) Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. Med. Microbiol. Immunol., 183, 13-21.
- Beutin, L., Steinruck, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G. y Appel, B. (2007) Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay

- for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *J. Appl. Microbiol.*, 102, 630-639.
- Beutin, L.; Kruger, U.; Krause, G.; Miko, A.; Martin, A. y Strauch, E. (2008) Evaluation of major types of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* bacteria present in food, pigs and the environment as potential pathogens for humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 4806-4816.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Kock, R., Kossow, A., Prager, R., Fruth, A., Orth-Holler, D., Marejková, M., Morabito, S., Caprioli, A., Piérard, D., Smith, G., Jenkins, C., Curová, K. y Karch, H. (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin. Infect. Dis.*, 56, 1373-1381.
- Bielaszewska, M., Idelevich, E.A., Zhang, W., Bauwens, A., Schaumburg, F., Mellmann, A., Peters, G. y Karch, H. (2012) Effects of antibiotics on Shiga toxin 2 production and bacteriophage induction by epidemic *Escherichia coli* O104:H4 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 3277-3282.
- BIOLOG. Biolog. RainbowR Agar O157 Technical Information. Hayward, USA; 2008. Part# 00P 037, Rev. C.
- BioStar OIA SHIGATOX. Inverness Medical-BioStar, Inc., Louisville, USA; 2007.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M. A., Blanco, J. (2004) Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (Verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 311-319.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., González, E., Bernárdez, M. I., Alonso, M. P., Coira, A., Rodríguez, A., Rey, J., Alonso, J. M., Usera, M. A. (2003) Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.*, 228, 345-51.
- Boyce, T. G., Swerdlow, D. L. y Griffin, P. M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 333, 364-368.

- Butler, D. (1996) Novel pathogens beat food safety checks. *Nature*, 384, 397.
- Bryan, A., Youngster, I. y McAdam, A. (2015) Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clin. Lab. Med.*, 35, 247-272.
- Calderwood, S. B., Acheson, D. W. K., Keusch, G. T., Barrett, T. J., Griffin, P. M., Strockbine, N. A., Swaminathan, B., Kaper, J. B., Levine, M. M., Kaplan, B. S., Karch, H., O'Brien, A. D., Obrig, T. G., Takeda, Y., Tarr, P. I. y Wachsmuth, I. K. (1997) Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News*, 62, 118-119.
- Casabonne, C., González, A., Migliore, L., Subils, T., Aquili, V. y Balagué, C. Detección de *Campylobacter jejuni/coli* en muestras de pollo mediante técnicas fenotípicas, inmunológicas y moleculares. XVI Jornadas Argentinas de Microbiología y III Congreso Bioquímico del Litoral- Santa Fe 2015. Santa Fe, Argentina, agosto 2015.
- Casabonne, C.; Gonzalez, A., Aquili, V. y Balagué, C. (2016a) Prevalence and virulence factors of *Shigella* spp. isolated from patients with diarrhoea in Rosario, Argentina. (2016) *Jpn. J. Infect. Dis.*, 69, 477-481.
- Casabonne, C., González, A., Aquili, V., Subils, T. y Balague, C. (2016b) Prevalence of Seven Virulence Genes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Patients with Diarrhea in Rosario, Argentina. *Int. J. Infect.*, 3, e37727.
- Chapman, P. A. y Siddons, C. A. (1997) A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from cases of bloody diarrhoea, non-bloody diarrhoea and asymptomatic contacts. *J. Med. Microbiol.*, 44, 267-271.
- Christie, B. (1996) *E. coli* O157 kills five people in Scotland. *BMJ*, 313, 1424.
- CHROMagar Microbiology. CHROMagar™ O157, Instructions for Use. Paris, Francia; 2013. NT-EXT-003, versión 8.
- CHROMagar Microbiology. CHROMagar™ STEC, Instructions for Use. Paris, Francia; 2014. NT-EXT-058, versión 7.

- Chui, L., Lee, M. C., Malejczyk, K., Lim, L., Fok, D. y Kwong, P. (2011) Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* as detected by enzyme-linked immunoassays and real-time PCR during the summer months in northern Alberta, Canada. *J. Clin. Microbiol.*, 49, 4307-4310.
- Church, D. L., Emshey, D., Semeniuk, H., Lloyd, T. y Pitout, J. D. (2007) Evaluation of BBL CHROMagar O157 versus sorbitol-MacConkey medium for routine detection of *Escherichia coli* O157 in a centralized regional clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3098-100.
- Comba, E. R., Pereyra, N. B., Francois, S. E., Casabonne, C., Aquili, V., Balagué, C., Subils, T., Pidone, C. L. y Tártara, G. P. Patotipos de *Escherichia coli* aislados a partir de patologías porcinas en la República Argentina. XXXV Congreso Chileno de Microbiología. Maitencillo, Chile, noviembre de 2013.
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). (2011) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008) User Protocol for evaluation of qualitative test performance; Approved Guideline- 2<sup>nd</sup> Edition. EP12-A2. 28 (3); Wayne, PA, Estados Unidos.
- Código Alimentario Argentino. [Consultado 26/10/2016]. Disponible en: <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/marco2.php>.
- Cox, K. L., Devanarayan, V., Kriauciunas, A., Manetta, J., Montrose, C. y Sittampalam, S. (2014) Immunoassay Methods. En: Assay Guidance Manual; Editor: Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M, Inglese, J., Iversen, P. W., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J. M., Riss, T., Trask, O. J. y weidner, J. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2014.
- Crowther, J. R. (2000) The ELISA Guidebook. En: Methods in Molecular Biology. Editor: Walker J. M., Human Press., Totowa, New Jersey.

- Currie, L. (1995) Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations). *Pure & Appl. Chem.*, 67, 1699-1723.
- Diagnostic Automation, Inc. *E.coli* O157. California, Estados Unidos; 2015. DAI Code #3.
- Duopath *Verotoxin*, Merk. Microbiology Manual. Darmstadt, Alemania; 2015. 12<sup>va</sup> Ed.
- Dusso, D., Subils, T., Migliore, L., Gonzalez, A., Pérez, J., Larini, S., Caprile, L., Spoleti, M. J., Colombo, L., Casabonne, C., Aquili, V. y Balagué, C. Comparación entre distintos métodos de aislamiento de *Campylobacter jejuni* a partir de muestras de pollo. XXXV Congreso Chileno de Microbiología. Maitencillo, Chile, noviembre de 2013.
- Dylla, B. L., Vetter, E. A., Hughes, J. G. y Cockerill, F. R. (1995) Evaluation of an immunoassay for direct detection of *Escherichia coli* O157 in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 222-224.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013) Scientific opinion on VTEC seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, 11:3138.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, K. y Igarashi, K. (1988) Site of action of a Vero toxin (VT2) from *E. coli* O157:H7 and from Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N- glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.*, 171, 335-337.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.
- Easton, L. (1997) *Escherichia coli* O157: occurrence, transmission and laboratory detection. *J. Biomed. Sci.*, 54, 57-64.
- Falguieres, T., Mallard, F., Baron, C., Hanau, D., Lingwood, C., Goud, B., Salamero, J. y Johannes, L. (2001) Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport

- route in association with detergent-resistant membranes. *Mol. Biol. Cell*, 12, 2453-2468.
- Farmer, J. J. (1999) *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. En: *Manual of Clinical Microbiology*, Editor: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. y Tenover, F. C. y Tenover, R. H. 7ma. ed, ASM Press, Washington DC, pp. 442-458.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condrón, R., De Reu, K., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickx, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K. y Cerf, O. (2013) Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int. J. Food Microbiol.*, 162, 190-212.
- Feng, P. y Lampel, K. A. (1994) Genetic analysis of uidA expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Microbiology*, 140, 2101-2107.
- Feng, P., Weagant, S. D. y Jinneman, K. (2011a) Diarrheagenic *Escherichia coli*. En *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 4A. [Actualizada 02-2013; consultado 10/2016]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>.
- Feng, P. C. H., Jinneman, K., Scheutz, F. y Monday, S. R. (2011b) Specificity of PCR and Serological Assays in the Detection of *Escherichia coli* Shiga Toxin Subtypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 6699-6702.
- Feng, P. (2014) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Produce- A Food Safety Dilemma. *Microbiol. Spectr.*, 2, EHEC-0010-2013.
- Findlay, J. W., Smith, W. C., Lee, J. W., Nordblom, G. D., Das, I., DeSilva, B. S. (2000) Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21, 1249-1273.
- Frankel, G., Phillips, A. D., Trabulsi, L. R., Knutton, S., Dougan, G. y Matthews, S. E. (2001) Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(S)? *Trends Microbiol.*, 9, 214-218.

- Frankel, G., Phillips, A., Novakova, M., Batchelor, M., Hicks, S. y Dougan, G. (1998) Generation of *Escherichia coli* derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol. Microbiol.*, 29, 559-570.
- Friedrich, A. W., Bielaszewska, M., Zhang, W. L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. y Karch, H. (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 genes variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.*, 185, 74-84.
- Gallego, V., Deza, N., Carbonari, C., Gugliada, J., Stambulian, J., Repetto, H. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en adultos asintomáticos que conviven con mascotas. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología. Mar del Plata, Buenos Aires, mayo de 2006.
- Galli, L., Leotta, G., Gugliada, M. y Rivas, M. (2008) In silico analysis of the capability of two polymerase chain reaction techniques for *stx* gene detection. *Rev. Argent. Microbiol.*, 40, 9-12.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J. y Blanch, A. R. (2005) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol. Lett.*, 246, 55-65.
- Garmendia, J., Frankel, G. y Crepin, V. F. (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immunol.*, 73, 2573-2585.
- Garred, O., Dubinina, E., Holm, P. K., Olsnes, S., van Deurs, B., Kozlov, J. V. y Sandvig, K. (1995a) Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants. *Exp. Cell Res.*, 218, 39-49.
- Garred, O., Van Deurs, B. y Sandvig, K. (1995b) Furin- induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.*, 270, 10817-10821.
- Gasser, C., Gautier, E., Steck, A., Siebenmann, R. E. y Oechslin, R. (1955) Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 85, 905-909.

- Gavin, P. J., Peterson, L. R., Pasquariello, A. C., Blackburn, J. Hamming, M. G., Kuo, K. J. y Thomson, R. B. (2004) Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT Shiga toxin *Escherichia coli* microplate assay for detection of Shiga Toxin-Producing *E. coli* in stool samples. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1652-1656.
- Gerritzen, A., Wittke, J. W. y Wolff, D. (2011) Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* directly from stool samples by real-time PCR in comparison to culture, enzyme immunoassay and Vero cell cytotoxicity assay. *Clin. Lab.*, 57, 993-998.
- Gianantonio, C., Vitaco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. y Sojo, E. (1964) Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Pediatr.*, 64, 478-491.
- Gill, A., Huszczyński, G., Gauthier, M. y Blais, B. (2014) Evaluation of eight agar media for the isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Methods*, 96, 6-11.
- Giugno, S. y Oderiz, S. (2010) Etiología bacteriana de la diarrea aguda en pacientes pediátricos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.*, 44, 63-69.
- González, A., Dusso, D., Migliori, L., Perez, J. F., Casabonne, C., Aquili, V. y Balagué, C. Algoritmo diagnóstico para identificación de *Escherichia coli* Enteroinvasiva. 2º Congreso Bioquímico del Litoral. Paraná, Entre Ríos, junio de 2013.
- Gouali, M., Ruckly, C., Carle, I., Lejay-Collin, M. y Weill, F. X. (2013) Evaluation of CHROMagar STEC and STEC O104 chromogenic agar media for detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 51, 894-900.
- Gould, L. H., Bopp, C., Strockbine, N., Atkinson, R., Baselski, V., Body, B., Carey, R., Crandall, C., Hurd, S., Kaplan, R., Neill, M., Shea, S., Somsel, P., Tobin-D'angelo, M., Griffin, P. M., Gerner-Smidt, P. y Centers for Disease Control and Prevention. (2009) Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm. Rep.*, 58, 1-14.
- Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., Garman, K. N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N. L., Webb, T. H., White, P. L., Wymore, K., Gierke,

- R. E., Mathon, B. E. y Griffin, P. M. (2013) Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog. Dis.*, 10, 453-460.
- Grif, K., Orth, D., Dierich, M. P. y Würzner, R. (2007) Comparison of an immunochromatographic rapid test with enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of Shiga toxins from human stool samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 59, 97-99.
- Griffin, P. M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. En *Infections of the gastrointestinal track*; Editor: Blaser, M. J., Smith, P. D., Ravdin, J. I., Greeberg, H. B. y Guerrant, R. L. Raven Press, New York, pp. 739-761.
- Growther, L. y Andrew, N. (2011) Diagnostic methods for Shiga toxin producing *E. coli*. *Ind. J. Fund. Appl. Life Sci.*, 1, 337-342.
- Gyles, C. L. (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci.*, 85, E45-62.
- Hannaoui Rodríguez, E. J., Villalobos, L. B. y Martínez Nazaret, R. E. (2009) *Escherichia coli* shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, 29, 13-20.
- Harlow, E. y Lane, D. (1998) Immunoassays. En: *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 553-612.
- Hartland, E. L., Batcherlor, M., Delahay, R. M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I. y Frankel, G. (1999) Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol. Microbiol.*, 32, 151-158.
- Hartman, A., Venkatesan, M., Oaks, E. y Buysse, J. (1990) Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.*, 172, 1905-1915.

- Hauswaldt, S., Nitschke, M., Sayk, F., Solbach, W y Knobloch, J. K. (2013) Lessons learned from outbreaks of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 15, 4-9.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M. y Shinagawa H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.*, 8, 13.
- Hermos, C. R., Janineh, M., Han, L. L. y McAdam, A. J. (2011) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: diagnosis and clinical manifestations of O157:H7 and non-O157:H7 infection. *J. Clin. Microbiol.*, 49, 955-959.
- Hoey, D. E., Sharp, L., Currie, C., Lingwood, C. A., Gally, D. L. y Smith, D. G. (2003) Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cell. Microbiol.*, 5, 85-97.
- Hoey, D. E., Currie, C., Else, R. W., Nutikka, A., Lingwood, C. A., Gally, D. L. y Smith, D. G. (2002) Expression of receptors for verotoxin 1 from *Escherichia coli* O157 on bovine intestinal epithelium. *J. Med. Microbiol.*, 51, 143-149.
- Hornbeck, P. (2001) Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr. Protoc. Immunol.*, Chapter 2: Unit 2.1.
- Hunt, J. M. (2010) Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Clin. Lab. Med.*, 30, 21-45.
- Hyytia-Trees, E., Smole, S. C., Fields, P. A., Swaminathan, B. y Ribot E. M. (2006) Second generation subtyping: a proposed PulseNet protocol for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). *Foodborne Pathog. Dis.*, 3, 118–131.
- Ibarra, C. y Goldstein, J. (2008) Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* entero-hemorrágica: actualización. *Arch Argent Pediatr.*, 106, 435-442.

- IS/ ISO 11843-1. Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. Génova. 1997. Última revisión: 15/11/2003.
- ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.
- Jacewicz, M. S., Acheson, D. W., Mobassaleh, M., Donohue-Rolfe, A., Balasubramanian, K. A. y Keusch, G. T. (1995) Maturational regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *J. Clin. Invest.*, 96, 1328-1335.
- Jenkis, C., Willshaw, G. A., Evans, J., Cheasty, T., Chart, H., Shaw, D. J., Dougan, G., Frankel, G. y Smith, H. R. (2003) Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogrup O157 associated with disease in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.*, 52, 941-947.
- Kaper, J., Nataro, J. y Mobley, H. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2, 123-40.
- Karch, H., Bohm, H., Schmidt H, Gunzer, F., Aleksic, S. y Heesemann, J. (1993) Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J. Clin. Microbiol.*, 31, 1200-1205.
- Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Cheung, R. y Arbus, G. S. (1985) Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 614-619.
- Kase, J. A., Maounounen-Laasri, A., Son, I., Lin, A. y Hammack, T. S. (2015) Comparison of eight different agars for the recovery of clinically relevant non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from baby spinach, cilantro, alfalfa sprouts and raw milk. *Food Microbiol.*, 46, 280-287.

- Kehl, K. S., Havens, P., Behnke, E. C. y Acheson, D. W. K. (1997) Evaluation of the Premier EHEC Assay for Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 35, 2051-2054.
- Kehl, S. C. (2002) Role of the Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. J. Clin. Microbiol., 40, 2711-2715.
- Konowalchuk, J., Speirs, J. L. y Stavric S. (1977) Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 18, 775-779.
- Lahti, E., Keskimäki, M., Rantala, L., Siitonen, A., Hyvönen, P. y Honkanen-Buzalski, T. (2001) Occurrence of *Escherichia coli* O157 in Finnish cattle. Vet. Microbiol. 2:239-251.
- Law, D. (2000) Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. J. Appl. Microbiol., 88, 729-745.
- Lea N., Lord J. M. y Roberts L. M. (1999) Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. Microbiol., 145, 999-1004.
- Leung, P. H. M., Peiris, J. S. M., Ng, W. W. S., Robins-Browne, R. M., Bettelheim, K. A. y Yam, W. C. (2003) A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 69, 7549-7553.
- Levine, M., Xu, J., Kaper, J., Lior, H., Prado, V. y Tall, B. (1987) A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. J. Infect. Dis., 156, 175-182.
- Levine, I. N. (2004) Mecanismos de Reacción. En: Físicoquímica. 5ª Edición. McGraw-Hill, España
- Leyer, G. J., Wang L. L. y Johnson E. A. (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3752-3755.

- Mackenzie, A. M. R., Lebel, P., Orrbine, E., Rowe, P. C., Hyde, L., Chan F., Johnson, W. y McLaine, P. N. (1998) Sensitivities and apecificities of Premier *E. coli* O157 and Premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with Verotoxin (Shiga-Like Toxin)-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1608–1611.
- Mackenzie, A., Orrbine, E., Hyde, L., Benoit, Chan, F., Park, C., Alverson, J., Lembke, A., Hoban, D. y Kennedy, W. (2000) Performance of the ImmunoCard STAT! *E. coli* O157:H7 Test for Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in Stools. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1866–1868.
- Magnusson, B. y Ornemark, U. (2014) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2<sup>nd</sup> ed.
- March, S. B. y Ratnam, S. (1986) Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 869–872.
- Masana, M. O., Leotta, G. A., Del Castillo, L. L., D’Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodríguez, H. y Rivas, M. (2010) Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.*, 73, 649-656.
- Masana, M. O., D’Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Del Castillo, L. L., Carbonari, C., Leotta, G. A., Vilacoba, E., Irino, K. y Rivas, M. (2011) Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.*, 74, 2008–2017.
- McCarthy, M. (1996) *E. coli* O157:H7 outbreak in USA traced to apple juice. *Lancet*, 348, 1299.
- Mead, P. S. y Griffin, P. M. (1998) *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, 352, 1207-1212.
- Menne, J., Nitschke, M., Stingele, R., Abu-Tair, M., Beneke, J., Bramstedt, J., Bremer, J. P., Brunkhorst, R., Busch, V., Dengler, R., Deuschl, G., Fellermann, K., Fickenscher, H., Gerigk, C., Goettsche, A., Greeve, J., Hafer, C., Hagenmüller, F., Haller, H., Herget-Rosenthal, S., Hertenstein, B., Hofmann, C., Lang, M., Kielstein,

- J. T., Klostermeier, U. C., Knobloch, J., Kuehbacher, M., Kunzendorf, U., Lehnert, H., Manns, M. P., Menne, T.F., Meyer, T. N., Michael, C., Münte, T., Neumann-Grutzeck, C., Nuernberger, J., Pavenstaedt, H., Ramazan, L., Renders, L., Repenthin, J., Ries, W., Rohr, A., Rump, L. C., Samuelsson, O., Sayk, F., Schmidt, B. M., Schnatter, S., Schöcklmann, H., Schreiber, S., von Seydewitz, C. U., Steinhoff, J., Stracke, S., Suerbaum, S., van de Loo, A., Vischedyk, M., Weissenborn, K., Wellhöner, P., Wiesner, M., Zeissig, S., Büning, J., Schiffer, M. y Kuehbacher, T. (2012) Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study. *BMJ.*, 345, e4565.
- Migliore, L., González, A., Dusso, D., Subils, T., Casabonne, C., Caprile, L., Balagué, C. y Aquili, V. Desarrollo de un método de detección, aislamiento e identificación de *Escherichia coli* Shigatoxigénica no-O157 en muestras de carne picada. XXXV Congreso Chileno de Microbiología. Maitencillo, Chile, noviembre de 2013.
- Montenegro, M., Bülte, M., Trumpf, T., Aleksic, S., Reuter, G., Bulling, E. y Helmuth, R. (1990) Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 1417-1421.
- Mori, Y. y Notomi, T. (2009) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, 15, 6-69.
- Muhldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G. T., Acheson, D. W., Tschape, H., Kane, A. V., Ritter, A., Olschlager, T., Donohue-Rolfé, A. (1996) Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 64, 495-502.
- Mukhopadhyay, S. y Linstedt, A. D. (2012) Manganese blocks intracellular trafficking of Shiga toxin and protects against Shiga toxicosis. *Science*, 335, 332-335.
- Nakatani, T., Tsuchida, K., Yoshimura, R., Sugimura, K. y Takemoto, Y. (2002) Plasma exchange therapy for the treatment of *Escherichia coli* O157 associated hemolytic uremic syndrome. *Int. J. Mol. Med.*, 10, 585-588.
- Nataro, J. y Kaper, J. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11,142-201.

- Nataro, J. P., Bopp, C. S., Fields, P. I., Kaper, J. B. y Strockbine, N. A. (2007) *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. En: Manual of Clinical Microbiology, 9° Ed.; Editor: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., ASM press, Washington DC, pp. 670-687.
- Nicholls, L., Grant, T. H. y Robins-Browne, R. M. (2000) Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, 35, 275-288.
- Nishikawa, Y., Zhou, Z., Hase, A., Ogasawara, J., Cheasty, T. y Haruki, K. (2000) Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2440-2442.
- Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Stine, O. C., Morris, J. G., Boxrud, D. J., Dixon, B. y Harrison, L. H. (2003) Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 675-679.
- Novicki, T. J., Daly, J. A., Mottice, S. L. y Carroll, K. C. (2000) Comparison of Sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 547-551.
- O' Brien, A., LaVeck, G. D., Thompson, M. R. y Formal S. B. (1977) Production of *Shigella dysenteriae* type I-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 146, 763-769.
- Ochoa Azze, C. R. F. (2012) Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. Finlay Ediciones, La Habana, Cuba, pp. 1-18.
- Ochoa, R., Martínez, J. C., Ferriol, X., García, A. M., Estrada, E., Blanco, R. (1999) Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor*, 8, 9-13.

- Ochoa, R., Martínez, J. C., Estrada, E., García, A. M., Ferriol, X., Blanco, R. y Sotolongo, F. (2000) Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacciMonitor.*, 9, 17-20.
- Ochoa, R. F, Martínez J. C., Ferriol, X., Estrada, E., García, A. M., Blanco, R. y Sotolongo, F. (2000) Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor*, 9, 13-18.
- O' Kennedy. R., Byrne, M., O'Fagain, C. y Berns, G. (1990) Experimental section: A review of enzyme-immunoassay and a description of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of immunoglobulin concentrations. *Biochem. Educ.*, 18, 130-140.
- Organización Mundial de la Salud. (2013) Enfermedades diarreicas. Nota descriptiva N°. 330. [Actualizada 29-04-2015; consultado 26/10/2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- OIE. Organización Mundial de la Salud Animal. (2008) Principios de la validación para las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 1.1.4. 6ta. Ed. Francia.
- Orskov, F., Orskov, I. y Villar, J. A. (1987) Cattle as a reservoir of verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, ii, 276.
- Padilla, J. E. (2007) Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia. Trabajo de Pregrado Carrera de Microbiológica. Facultad Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C.
- Pai, C. H., Gordon, R., Sims, H. V. y Bryan, L. E. (1984) Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. Clinical, epidemiologic, and bacteriologic features. *Ann. Intern. Med.*, 101, 738-742.
- Park, C., Kim, H. y Hixon, D. (2002) Importance of testing stool specimens for Shiga toxins. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 3542-3543.

- Parsons, B. D., Zelyas, N., Berenger, B. M. y Chui, L. (2016) Detection, characterization, and typing of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.*, 7, 1-12.
- Pass, M. A., Odedra, R. y Batt, R. M. (2000) Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2001-2004.
- Paton, A. W., Bourne, A. J., Manning, P. A. y Paton, J. C. (1995) Comparative toxicity and virulence of *Escherichia coli* clones expressing variant and chimeric Shiga-like toxin type II operons. *Infect. Immun.*, 63, 2450-2458.
- Paton, J. y Paton, A. (1998a) Pathogenesis and diagnosis of shigatoxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11,450-479.
- Paton, A. y Paton, J. (1998b) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.*, 36,598-602.
- Paton, A.W., Woodrow, M. C., Doyle, R. M., Lanser, J. A. y Paton, J. C. (1999) Molecular characterization of Shigatoxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3357-3361.
- Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C. y Paton, J. C. (2001) Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect. Immunol.*, 69, 6999-7009.
- Perera, L. P., Marques, L. R. y O'Brien, A. D. (1988) Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2127-2131.
- Persson, S.; Olsen, K. E. P., S. Ethelberg y F. Scheutz. (2007) Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2020-2024.

- Pierard, D., Muyldermans, G., Moriau, L., Stevens, D., Lauwers, S. (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3317-3322.
- Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. y Rozee, K. R. (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 540-545.
- Pollock, K. G., Stewart, A., Beattie, T. J., Todd, W. T. A., Ahn, C. K., Tarr, P. I. y Cowden, J. M. (2009) From diarrhoea to haemolytic uraemic syndrome when to seek advice. *J. Med. Microbiol.*, 58, 397-398.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcox, J. B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. y Forestier, C. (2000) Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1023-1031.
- Prager, R., Fruth, A.; Busch, U. y E. Tietze. (2011) Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin STIIa encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. *Int. J. Med. Microbiol.*, 301, 181-191.
- Premier™ EHEC. Meridian Bioscience Inc. Cincinnati, Estados Unidos; 2009.
- ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) Microplate Assay. Remel Europe Ltd. Reino Unido; 2012.TSMX7834.
- Radu, S., Mutalib, S. A., Rusul, G., Ahmad, Z., Morigaki, T., Asai, N., Kim, Y. B., Okuda, J. y Nishibuchi, M. (1998) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in the beef marketed in Malaysia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1153-1156.
- Rahal, E. A., Kazzi, N., Nassar, F. J. y Matar, G. M. (2012) *Escherichia coli* O157:H7- Clinical aspects and novel treatment approaches. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2, 138.

- Ramotar, K., Waldhart, B., Church, D., Szumski, R. y Louie, T. (1995) Direct detection of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Stool Samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 519-524.
- Ridascreen® Verotoxin Technical Information. R-Biopharm AG, Alemania, 2004.
- Ridley, A. M. (1998) Genomic Fingerprinting by Application of rep- PCR. En: *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*, Editos: Woodford, N. y Johnson, A. P., Humana Press Inc., New Jersey., U.S.A., pp. 103.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, G. J., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. y Cohen, M. L. (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308, 681-685.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldan, C. D., Balbi, L., Garcia, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani, S., Kincaid, J., Rangel, J. y Griffin P. M. The Case-Control Study Group. (2006) Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog. Dis.*, 3, 88-96.
- Rivas, M. (2011) Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no O157 a partir de especímenes clínicos. Servicio de Fisiopatología. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán.
- Rocha, L. B. y Piazza, R. M. (2007) Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. *Lett. Appl. Microbiol.*, 45, 411-417.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública Mex.*, 44, 464-475.
- Ruisánchez, I., Trullols, E. y Rius, X. F. (2005) Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. *Trends in Anal Chem.*, 24, 516-524.

- Sánchez Ruiz, J. F., Tejada, M. E., Koch, W., Mora, J. L. F., Marroquín, R., Hernández, V., Islas, V., Sánchez, E. G. y De León, A. (2010) Validación de métodos analíticos no cuantitativos. *Rev. Mex Cienc. Farm.*, 41, 15-24.
- Sandvig, K. (2006) The Shiga toxins: proper ties and action on cells. En: *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Editor: Alouf, J. E., Popoff, M. R. 3° Ed., Elsevier Academic Press, Philadelphiapp. 310-322.
- Sandvig, K., Ryd, M., Garred, O., Schweda, E., Holm, P. K. y Van Deurs, B. (1994) Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the non-toxic Shiga B fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J. Cell. Biol.*, 126, 53-64.
- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J. V., Hansen, S. H. y Van Deurs, B. (1992) Retrograde transport of endocytosed Shiga Toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*, 358, 510-511.
- Sandvig, K. y Van Deurs, B. (1996) Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.*, 76, 949-966.
- Scheutz, F., Cheasty, T., Woodward, D., Smith, H. R. (2004) Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS.*, 112, 569-584.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Capriolo, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien, A. D. (2012) A multi-center evaluation of a sequence-based protocol to subtype Shiga toxins and standardize Stx2 nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 2951-2963.
- Schmidt, C. K., McKee, M. L. y O'Brien, A. D. (1991) Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect. Immun.*, 59, 1065-1073.

- Schmidt, H., Beutin, L. y Karch, H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain 933. *Infect. Immun.*, 63, 1055-1063.
- Schmidt, H.; Scheef, J.; Morabito, S.; Caprioli, A.; Wieler, L. H. y Karch, H. (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1205-1208.
- SENASA. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Dirección de Inocuidad de Productos de Origen Animal, Circulares 3834 y 4032, 2008.
- Siegle, R. L., Jennings, B. R., Adams, P. L. y King, L. P. (1980) Development of a model using polypeptide antibodies for scintigraphy of the pancreas. *Invest. Radiol.*, 15,457-461.
- Smith, K. E., Wilker, P. R., Reiter, P. L., Hedican, E. B., Bender, J. B. y hedberg, C. W. (2012) Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 31, 37-41.
- Smith, W. E., Kane, A. K., Campbell, S. T., Acheson, D. W. K., Cochran, B. H. y Thorpe, C. M. (2003) Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 71, 1497-1504.
- Snapp, J. R., Jelacic, S., Yea, Y. L., Klein, E. J., Fischer, M., Clausen, C. R., Qin, X., Swerdlow, D. L. y Tarr, P. I. (2000) Comparison of *Escherichia coli* O157:H7 Antigen Detection in Stool and Broth Cultures to That in Sorbitol-MacConkey Agar Stool Cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 3404-3406.
- Solus *E. coli* O157 ELISA. (2015) Validation ref. No. SOL 37/03-10/15. Válido hasta 14/10/2019. AFNOR.
- Swerdlow, D. L. y Griffin, P. M. (1997) Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day- care centres. *Lancet*, 349, 745-746.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A. y Chandler, W. L. (2005) Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 365,1073-1086.

- Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R. y Besser, T. E. (2001) Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.*, 68, 1400-1407.
- Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Hayashi, T. y Sasakawa, C. (2001) *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect. Immunol.*, 69, 6660-6669.
- Teel, L. D., Melton-Celsa, A. R., Schmitt, C. K. y O'Brien, A. D. (2002) One of two copies of the gene for the activatable Shiga toxin type 2d in *Escherichia coli* O91:H21 strain B2F1 is associated with an inducible bacteriophage. *Infect. Immun.*, 70, 4282-4291.
- Teel, L. D., Daly, J. A., Jerris, R. C., Maul, D., Svanas, G., O'Brien, A. D. y Park, C. H. (2007) Rapid detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by optical immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3377-3380.
- Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Mitobe, J., Miura, M. y Watanabe, H. (2006) Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.*, 3, 68-73.
- Tesh, V. y O'Brien, A. (1991) The pathogenic mechanisms of shiga toxin and the shiga-like toxins. *Mol. Microbiol.*, 5, 1817-1822.
- Tijssen, P. (1993) Outline of the Strategies for Enzyme Immunoassays. En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays.* Editor: Burdon, R. H. y van Knippenberg, P. H. Elsevier, London, pp. 9-20.
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M. e Iwanaga, M. (2003) Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2669-2671.

- Tornieporth, N. G, Jonh, J., Salgado, K., De Jesus, P., Latham, E., Melo, M. C. N., Stuart, T. y Riley, L. W. (1995) Differentiation of Pathogenic *Escherichia coli* strains in Brazilian Children by PCR. J. Clin. Microbiol., 33, 1371-1374.
- Torres, A. G., Giron, J. A., Perna, N. T., Burland, V., Blattner, F. R., Avelino-Flores, F., Kaper, J. B. (2002) Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immunol., 70, 5416-5427.
- Trullols, E., Ruisánchez, I. y Xavier Rius, F. (2004) Validation of qualitative analytical methods. Trends in Anal. Chem., 23: 137.
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS), NOTICE, Verification Activities for Non-O157 SHIGA Toxin Producing *Escherichia coli* (NON-O157:H7 STEC) Under AT60, MT52, and MT53 Sampling Program - 63-12, 27/09/2012.
- Van Weemen, B. K. y Schuurs, A. H. (1971) Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBS Lett., 15, 232-236.
- Vaz, T. M. I., Irino, K., Kato, M. A., Dias, A. M. G., Gomes, T. A. T., Medeiros, M. C., Rocha, M. M. y Guth, B. E. (2004) Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. J. Clin. Microbiol., 42, 903-905.
- Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Motai, M. I., González, S., González, G., Gugliada, G., Carbonari, C. C., Algorta, G., Bernadá, B., Sabelli, R., Pardo, L., Rivas, M. y Schelotto, F. (2008) Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. Rev. Argent. Microbiol., 40, 93-100.
- Villalobo, E. y Torres, A. (1998) PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. Appl. Environ. Microbiol., 6, 1242-1245.
- Voller, A., Bartlett, A. y Bidwell, D. E. (1978) Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. J. Clin. Pathol., 31, 507-520

- Wade, W. G., Thom, B. T. y Evans, B. T. (1979) Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. Lancet, ii, 1235-1236.
- Wang, G., Zhao, T. y Doyle, M. P. (1996) Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2567-2625
- Welch, R. A. (2006) The genus *Escherichia*. En: The prokaryotes; 3° Ed.; Editor: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E.; New York: Springer Science, Business Media LLC, pp. 60-71.
- Welinder-Olsson, C., Badenfors, M., Cheasty, T., Kjellin, E. y Kaijser, B. (2002) Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain in relation to clonality and clinical signs of infection. J. Clin. Microbiol., 40, 959-964.
- Willford, J., Mills, M. y Goodrig, L. D. (2009) Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin. J. Food Prot., 72, 741-747.
- Wilson, M. W. y Bettelheim, K. A. (1980) Cytotoxic *Escherichia coli* serotypes. Lancet, i: 201.
- Whittman, T. S. (1998) Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. En: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains; Editor: Kaper, J. B. y O'Brien, A. D. ASM Press, Washington DC., pp. 195-209.
- Wong, C. S., Mooney, J. C., Brandt, J. R., Staples, A. O., Jelacic, S., Boster, D. R., Watkins, S. L. y Tarr, P. I. (2012) Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. Clin. Infect. Dis., 55, 33-41
- Wong, C. S., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Watkins, S. L. y Tarr, P. I. (2000) The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. N. Engl. J. Med., 342, 1930-1936.

Zhang, W. L., Kohler, B., Oswald, E., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S. y Schmidt, H. (2002) Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 4486-4492.

Zhang, W., Bielaszewska, M., Bauwens, A., Fruth, A., Mellmann, A. y Karch, H. (2012) Real-time multiplex PCR for detecting Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* O104:H4 in human stools. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 1752-1754.