

Trabajo de Fin de Grado

Aplicación de MALDI-TOF para el
análisis rápido de *Escherichia coli*
verotoxigénica

Nutrición Humana y Dietética



Autor: Dña. Beatriz Velasco Arranz

Tutor: Dra. Irma Caro Canales

Curso 2021 - 2022

Facultad de Medicina

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi tutora Dña. Irma Caro Canales toda la ayuda prestada durante la ejecución del ensayo desarrollado en el trabajo, así como en la redacción del mismo. Al igual, dar las gracias al departamento de pediatría, inmunología, obstetricia y ginecología, nutrición y bromatología, psiquiatría e historia de la ciencia, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, al cual pertenece mi tutora, por facilitarme el material necesario para su puesta en práctica.

También, agradecer al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de Valladolid, principalmente a D. Javier Gutiérrez Reguera y Dña. Nora Carrera Aguado, la colaboración en la realización del presente trabajo para la obtención de los resultados.

Finalmente, y no menos importante, hacer referencia a mi familia, compañeros y profesores del Grado en Nutrición Humana y Dietética, por todo el apoyo y conocimientos transmitidos durante estos años.

RESUMEN

Introducción: *Escherichia coli* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* que está presente en el intestino humano, siendo la mayoría de sus cepas inocuas. No obstante, otras cepas *Escherichia coli* son productoras de Toxinas Shiga (STEC) y causan enfermedades tales como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. Para aplicar un tratamiento eficaz a nivel clínico se necesita una rápida identificación a través de técnicas fiables como la espectrometría de masas MALDI-TOF.

Objetivos: estudiar biomarcadores para diferenciar *E. coli* O157 productora de toxinas Shiga a través de los espectros de masas obtenidos por la técnica MALDI-TOF.

Materiales y métodos: en el presente trabajo se estudian cepas de *E. coli* O157 y no O157 mediante MALDI-TOF MS para encontrar biomarcadores que permitan su diferenciación.

Resultados: el estudio del espectro de masas mediante el programa ClinProTools permitió discriminar claramente las *E. coli* O146 de las *E. coli* O157. A través de este programa, se encontraron cuatro fragmentos presentes en *E. coli* O146 pero no en O157: 3445,66 m/z; 5457,35 m/z; 8326,01 m/z; 9062,78 m/z. A partir de estos fragmentos fue posible generar modelos de discriminación: Algoritmo Genético Optimizado (GA), Red Neuronal Supervisada (SNN) y Clasificador Rápido (QC). Su comprobación se llevó a cabo mediante validación externa, alcanzándose un 100 %.

Conclusiones: fue posible generar modelos capaces de separar *E. coli* O146 de *E. coli* O157, pero no se consiguió diferenciar los serotipos O157:H7 y O157:H-.

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli, STEC, MALDI-TOF, ClinProTools, Síndrome Urémico Hemolítico, Análisis de Componentes Principales.

ABSTRACT

Introduction: *Escherichia coli* is a *Enterobacteriaceae* family member, and it is present in the human intestine. Different pathotypes of *Escherichia coli* can produce a large number of human diseases. Particularly, *Escherichia coli* producers of Shiga Toxins (STEC) and that bacteria cause diseases such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. The main problem is having a rapid method to identify the pathogens strains to do an effective treatment at the clinical level. The MALDI-TOF mass spectrometry is one of the techniques that can be give a rapid identification.

Objectives: study biomarkers to differentiate *E. coli* O157 producing Shiga toxins through the mass spectra obtained by the MALDI-TOF technique.

Materials and methods: in the present work, strains of *E. coli* O157 and non-O157 are studied using MALDI-TOF to find biomarkers that quickly allow their differentiation.

Results: the study of the mass spectrum using the ClinProTools program allowed to clearly discriminate *E. coli* O146 from *E. coli* O157. Through this program, four fragments were found present in *E. coli* O146 but not in O157: 3445.66 m/z; 5457.35 m/z; 8326.01 m/z; 9062.78 m/z. From these fragments it was possible to generate discrimination models: Optimized Genetic Algorithm (GA), Supervised Neural Network (SNN) and Rapid Classifier (QC). Its verification was carried out by external validation, reaching 100%.

Conclusions: the models were capable of separating *E. coli* O146 from O157, but it was impossible to differentiate the serotypes O157:H7 and O157:H-.

KEYWORDS

Escherichia coli, STEC, MALDI-TOF, ClinProTools, Hemolytic Uremic Syndrome, Principal Component Analysis.

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	1
1.2. Características generales de <i>E. coli</i>	1
1.3. Tipos de <i>E. coli</i> patógenas	2
1.3.1. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	4
1.3.2. <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	4
1.3.3. <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	5
1.3.4. <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	5
1.3.5. <i>E. coli</i> difusamente adherente (DAEC)	6
1.3.6. <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	6
1.4. Metodología para la identificación de STEC.....	8
1.4.1. Métodos tradicionales (fenotípicos)	9
1.4.2. Métodos moleculares	9
1.4.3. Métodos proteómicos	10
1.5. Serogrupos de STEC comúnmente encontrados en alimentos	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	14

3.1. Objetivo general.....	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Obtención de muestras.....	15
4.2. Recuperación de cepas.....	15
4.3. Extracción de proteínas ribosomales	16
4.4. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF	17
4.5. Tratamiento de resultados.....	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	30
7. BIBLIOGRAFÍA	31

SIGLAS Y ABREVIATURAS

- **EPEC:** *Escherichia coli* enteropatógena.
- **ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénica.
- **EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva.
- **EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica.
- **VTEC:** *Escherichia coli* verotoxigénica.
- **STEC:** *Escherichia coli* productora de toxinas Shiga.
- **DAEC:** *Escherichia coli* difusamente adherente.
- **UPEC:** *Escherichia coli* uropatógena.
- **MNEC:** *Escherichia coli* asociada a meningitis/sepsis.
- **EAF:** factor de adherencia.
- **UFC:** Unidades formadoras de colonias.
- **ST:** termoestables.
- **LT:** termolábiles.
- **GMPc:** guanosina monofosfato cíclico.
- **AMPc:** monofosfato de adenosina cíclico.
- **AAF:** fimbrias de adherencia agregativa.
- **IL8:** interleucina 8.
- **AIDA:** adhesina implicada en la adherencia difusa.
- **SUH:** síndrome urémico hemolítico.

- **LEE:** locus de eliminación de enterocitos.
- **Stx1:** toxina Shiga 1.
- **Stx2:** toxina Shiga 2.
- **Gb3:** globotriaosilceramida.
- **UE:** Unión Europea.
- **SMAC:** Sorbitol MacConey Agar.
- **GyrB:** subunidad β de la ADN girasa.
- **RpoB:** subunidad β de la ARN polimerasa.
- **rrs:** ARNr 16S.
- **pb:** pares de bases.
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **ARN:** ácido ribonucleico.
- **m/z:** relación masa/carga.
- **MALDI-TOF:** desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo.
- **g:** gramo.
- **Da:** dalton.
- **μ L:** microlitro.
- **AESAN:** Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.
- **mL:** mililitro.

- **TSB:** Tryptic Soybean Broth.
- **VRBLA:** Violet Red Bile Lactose Agar.
- **YE:** extracto de levadura.
- **rpm:** revoluciones por minuto.
- **HCCA:** ácido α -cyano-4-hidroxicinámico.
- **LTI:** Laboratorio de Técnicas Instrumentales.
- **SNN:** Red Neuronal Supervisada.
- **GA:** Algoritmo Genético Optimizado
- **QC:** Clasificador Rápido.
- **kDa:** kilodalton.
- **PCA:** Análisis de componentes principales.
- **PC1:** componente principal 1.
- **PC2:** componente principal 2.
- **PC3:** componente principal 3.
- **PTTA:** valor p de t-test.
- **PWKW:** valor p de la prueba de Wilcoxon.
- **PAD:** valor p de la prueba de Anderson-Darling.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Condiciones de recuperación de las cepas de <i>E. coli</i>	15
Figura 2. Extracción de proteínas ribosomales por el método “etanol/ácido fórmico”..	17
Figura 3. Comparación de los espectros medios obtenidos de las cepas de <i>E. coli</i> O146 y O157 mediante ClinProTools.	21
Figura 4. Distribución de los picos de <i>E. coli</i> O146 y O157 obtenidos mediante el programa ClinProTools.	22
Figura 5. Análisis de componentes principales comparando espectros de <i>E. coli</i> O146 y O157.	23
Figura 6. Contribución de las cargas que explica la varianza de los fragmentos que permiten separar los serogrupos de <i>E. coli</i> O146 y O157.	24
Figura 7. Comparación del espectro medio de <i>E. coli</i> O146 y de O157.	25
Figura 8. Localización del espectro de <i>E. coli</i> O166 realizada a través del modelo de clasificación rápida.	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Serotipos característicos de las categorías diarreicas de <i>E. coli</i>	3
Tabla 2. Brotes de enfermedad por EHEC relacionados con alimentos en EEUU entre 2018 y 2021.	12
Tabla 3. Interpretación del score generado por el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).18	
Tabla 4. Patotipos de cepas de serotipos de <i>E. coli</i> O146:H21, O157:H- y O157:H7... 20	

Tabla 5. Valores de p obtenidos del algoritmo t-test de los fragmentos utilizados para la clasificación de <i>E. coli</i> O146 frente a O157.....	26
Tabla 6. Tamaño de los fragmentos de proteínas ribosomales obtenidos de las cepas de <i>E. coli</i> O146, O157:H- y O157:H7 mediante el programa Mmass.	27
Tabla 7. Modelos construidos para la discriminación de los serogrupos de <i>E. coli</i> O146 y O157 usando el modelo "Leave One Out" para la validación cruzada.	29
Tabla 8. Clasificación de <i>E. coli</i> O146 y O157 productora de toxinas Shiga usando los modelos construidos por ClinProTools.	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* es el grupo más relevante de bacilos gramnegativos no esporógenos con importancia clínica, siendo uno de ellos *Escherichia coli*. Esta familia comprende más de 50 géneros clasificados en base a características como la composición de proteínas determinadas por espectrometría de masas. Todos sus miembros presentan unas necesidades nutricionales comunes: fermentan la glucosa, reducen los nitratos y son catalasa-positivos y oxidasa-negativos. Además, comparten un antígeno común situado en el lipopolisacárido de la pared celular.¹

A pesar de la gran diversidad existente pocos géneros causan infecciones en humanos, representando un tercio de todas las bacteriemias, mayoritariamente a nivel urinario e intestinal. Tales infecciones pueden originarse por huéspedes animales, por portadores humanos o por diseminación endógena. Respecto a los géneros se pueden diferenciar tres grupos: los que siempre producen enfermedad en el ser humano, los que causan infecciones oportunistas y los que al adquirir genes de virulencia se vuelven patógenos.¹

1.2. Características generales de *E. coli*

Escherichia coli es el miembro más común del género *Escherichia* perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo gramnegativo, móvil o inmóvil, anaerobio facultativo, mesófilo y no formador de esporas. Bioquímicamente, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa, reduce los nitratos a nitritos y es oxidasa-negativo y catalasa-positivo. En cuanto a sus condiciones de crecimiento, es capaz de proliferar a un pH de 6.0-8.0 y a una temperatura entre 20-40 °C.^{2,3}

Usualmente, se localiza en el intestino humano desde poco después del nacimiento sin ser ofensiva, pero algunas de sus cepas pueden causar graves enfermedades como la infección del tracto urinario, la sepsis/meningitis y la enfermedad entérica/diarreica. Estas cepas actúan colonizando la mucosa del huésped a través de adhesinas, eliminando sus defensas con toxinas, multiplicándose y dañando al huésped.^{4,5,6}

1.3. Tipos de *E. coli* patógenas

En condiciones normales, en el tubo digestivo humano abunda la *E. coli* que se comporta principalmente como un patógeno oportunista, causando enfermedades intestinales (enfermedad entérica/diarreica) y extraintestinales (infecciones urinarias y sepsis/meningitis) al adquirir factores de virulencia. Hay seis grupos de patógenos intestinales: *E. coli* enteropatógena (EPEC); *E. coli* enterotoxigénica (ETEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); *E. coli* enterohemorrágica, también llamada productora de verotoxinas o toxinas “Shiga” (EHEC/VTEC/STEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); y *E. coli* difusamente adherente (DAEC). En el caso de las *E. coli* extraintestinales son: *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (MNEC).^{1,4}

La clasificación serológica de los patotipos de *E. coli* se hace en base a un esquema propuesto por Kauffman en 1944 y modificado posteriormente, referenciándose tres antígenos: O (somático), H (flagelar) y K (capsular). El antígeno de la pared celular es termoestable y define un serogrupo, habiéndose reconocido hasta la fecha 176 diferentes. El antígeno H se relaciona con los flagelos, siendo 112 los determinados actualmente. Por último, el antígeno K es termolábil y se asocia a la cápsula, habiendo 60 tipos de este antígeno reconocidos hasta el momento, aunque generalmente no es utilizado para la identificación de *E. coli*. La combinación de los antígenos O y H determina el serotipo de cada aislamiento. Así, los serotipos y los serogrupos son marcadores cromosómicos de fácil reconocimiento que se asocian con clones virulentos concretos (Tabla 1).^{3,4,5,7}

Tabla 1. Serotipos característicos de las categorías diarreicas de *E. coli*.

CATEGORÍA	SEROGRUPO	ANTÍGENO H ASOCIADO
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
EPEC	O173	NM
	O55	H6, NM
	O86	H34, NM
	O111	H2, H12, NM
	O119	H6, NM
	O125	H21
	O126	H27, NM
	O127	H6, NM
O128	H2, H12	
EHEC	O142	H6
	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111	H8, NM
	O113	H21
EAEC	O117	H14
	O157	H7, H29, H-
	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
EIEC	O111	H21
	O127	H2
	O*	H10
	O28ac	NM
	O29	NM
	O112	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
O143	NM	
EIEC	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM

Fuente: Nataro et al.⁵

*Antígeno O no tipificable por métodos convencionales. NM = no móvil.

1.3.1. *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue el primer patotipo de *E. coli* diarreica descrito serológicamente por John Bray entre 1940 y 1950 tras brotes de diarrea infantil en Reino Unido y Estados Unidos. En la actualidad, es una de las causas más importantes de muerte por diarrea infantil en niños menores de 2 años en países subdesarrollados. Sin embargo, estudios recientes sugieren su aparición en países de América del Norte, Oceanía y Asia Oriental.^{1,4,5,8}

El mecanismo de patogenicidad de la EPEC se conoce como adhesión/eliminación (A/E) debido a que la bacteria, en primer lugar, se adhiere a las células del intestino delgado a través de *pili* formando microcolonias. En segundo lugar, destruye las microvellosidades intestinales perdiendo capacidad de absorción. Finalmente, sintetiza una proteína denominada intimina, codificada por el gen *eaeA*, que polimeriza la actina y altera el citoesqueleto. Así, sus dos factores de virulencia son los pilis rizados “Bfp”, codificados por el plásmido EAF, y el locus de eliminación de enterocitos (LEE).^{1,5,8}

Hay dos tipos de cepas EPEC: típicas y atípicas. Las típicas son aquellas que contienen el gen *eaeA* y el plásmido EAF, mientras que las atípicas solo contienen el gen *eaeA*. La infección se caracteriza por diarrea acuosa aguda frecuentemente acompañada de fiebre, vómitos y malabsorción. Su transmisión se produce vía fecal-oral a través de alimentos y fórmulas infantiles contaminadas.^{1,9}

1.3.2. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

ETEC es el principal patotipo de *E. coli* causante de enfermedad diarreica en menores de 5 años y en viajeros a países en desarrollo. La infección ocurre fundamentalmente en meses cálidos y húmedos por la ingesta de agua o alimentos contaminados por heces, no transmitiéndose entre personas, siempre y cuando se realicen buenas prácticas de limpieza y desinfección. Su dosis infectiva es 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC).^{1,5}

El mecanismo de patogenicidad consiste en adherirse y colonizar la mucosa intestinal y producir al menos un tipo de enterotoxina: termoestables (ST) y termolábiles (LT). Las primeras generan un incremento de las concentraciones de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) y las segundas de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), llevando todo ello a la hipersecreción de líquidos e iones y a la génesis de citocinas inflamatorias. Así, sus factores de virulencia son las enterotoxinas y los factores de adhesión y colonización.^{1,4,9}

La infección genera diarrea secretora tras 1-2 días de incubación y se mantiene durante los 3-5 días posteriores. Su principal síntoma es diarrea acuosa no sanguinolenta con cólicos abdominales y, en menor medida, náuseas, vómitos y dolor de cabeza.^{1,10}

1.3.3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

EIEC se asemeja bioquímica, genética y patógenamente a *Shigella spp*, siendo descarboxilasa negativa, no móvil y no fermentadora de lactosa. Las cepas que pertenecen a estos grupos no son frecuentes y se asocian a los serotipos O124, O143 y O164.^{1,4}

Su mecanismo de acción consiste en la invasión del epitelio colónico por los plásmidos pInv para lisiar las vacuolas endocíticas. Una vez dentro, se multiplican y forman colas de actina que se desplazan por el citoplasma y destruyen las células epiteliales generando inflamación. Por lo tanto, sus factores de virulencia son las toxinas Shiga, la hemolisina y la invasión celular. La infección se caracteriza por diarrea acuosa que precede la aparición de heces disentéricas escasas con sangre y moco.^{1,4}

1.3.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC es un grupo heterogéneo de cepas que producen una autoaglutinación en forma de “pilas de ladrillos” principalmente en el intestino delgado. Su descubrimiento fue llevado a cabo por Cravioto et al.¹¹, Scaletsky et al.¹² y Nataro et al.¹³, quienes observaron cepas de EPEC que se adherían a células HEp-2.⁵

Actúa adhiriéndose a la mucosa intestinal mediante fimbrias de adherencia agregativa (AAF), de las cuales existen cinco variantes diferentes que son codificadas por el plásmido AggR. Tras ello, coloniza y estimula la liberación de citotoxinas como la interleucina 8 (IL8) que puede provocar la acumulación de neutrófilos. Por lo tanto, sus factores de virulencia son las AAF y las citotoxinas. Su infección genera diarrea secretora acuosa acompañada de fiebre, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Además, se ha asociado con diarrea crónica y retraso de crecimiento en niños.^{1,4,9,14}

1.3.5. *E. coli* difusamente adherente (DAEC)

DAEC es una cepa de *E. coli* que se adhiere a las células HEp-2 sin formar microcolonias. En la mayoría de los casos lo hace a través de la adhesina fimbrial F1845 que pertenece a la familia de adhesinas Dr. e induce proyecciones en forma de dedo desde las células HEp-2 infectadas que anclan la bacteria protegiéndola. Solo se une a células que tienen en su superficie la proteína DAF (Factor de aceleración de la descomposición). En otras cepas DAEC, como el serotipo O126:H27, el mecanismo de acción se relaciona con una proteína de membrana externa de 100 kDa llamada AIDA (adhesina implicada en la adherencia difusa). Así, sus factores de virulencia son las adhesinas.^{4,5,8}

Diversos estudios han relacionado las cepas DAEC con la diarrea, con mayor correlación en niños de 1 a 5 años. La infección se caracteriza por diarrea acuosa sin sangre ni leucocitos en heces. No obstante, aún faltan por determinar la forma de adquisición de la infección y otras características epidemiológicas.^{5,9}

1.3.6. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

EHEC fue determinada por primera vez en 1983 por Riley et al.¹⁵ como causa de enfermedad tras dos brotes caracterizados por dolor abdominal severo con calambres, diarrea acuosa y diarrea sanguinolenta con escasa fiebre.

También en 1983, Karmali et al.¹⁶ asoció las cepas productoras de la colitis hemorrágica mencionada al síndrome urémico hemolítico (SUH). Además, se observó que las verotoxinas liberadas se neutralizaban con antitoxinas de *Shigella dysenteriae* tipo 1, de manera que también se denominaron “*stx-like toxin*”. Actualmente, se emplea el término STEC o VTEC para aquellas cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (Stx) y el término EHEC para las cepas de *E. coli* que además de producir Stx contienen LEE.
1.5,9

STEC se caracteriza porque todas sus cepas una vez adheridas al intestino grueso producen toxinas Shiga o verotoxinas de dos tipos: toxina Shiga 1 (Stx1) y 2 (Stx2). La Stx1 es idéntica a la toxina sintetizada por *Shigella dysenteriae*, y la Stx2 se asemeja en un 60%. Ambas se obtienen de bacteriófagos lisogénicos y poseen una subunidad A y cinco subunidades B que se unen al glucolípido “*globotriaosilceramida*” (Gb3) con receptores en el intestino y en el riñón para inhibir la síntesis proteica. Las cepas de STEC que generan ambas toxinas son consideradas más patógenas que las que sintetizan una sola. Algunas cepas, además de producir toxinas también actúan mediante el mecanismo A/E y contienen LEE. Por lo tanto, sus factores de virulencia más importantes son las toxinas Shiga, la intimina y los pilis Bfp.^{1,4,9}

Dentro de STEC, el serotipo O157:H7 es el más frecuentemente asociado a enfermedad grave en el ser humano, el cual se piensa que ha evolucionado a partir del serogrupo EPEC O55 que contiene LEE. Dicho serotipo tiene gran importancia en América del Norte, Reino Unido y Japón, y está relacionado con brotes asociados a alimentos sin cocinar o con tratamientos térmicos insuficientes. Algunos autores indican que la zona geográfica determina la predominancia de la cepa, como por ejemplo los serogrupos O26 y O111 que son más frecuentes en Canadá, Estados Unidos y Japón. En los países subdesarrollados la presencia de cepas EHEC es mucho menor.^{4,5,17}

Por un lado, las cepas de EHEC se clasifican en típicas, si actúan con el mecanismo A/E y presentan LEE, y atípicas, si no ejercen el mecanismo A/E pero pueden expresar LEE. Por otro lado, teniendo en cuenta el serotipo y el fenotipo se puede hablar de cepas *E. coli* O157:H7, las cuales son sorbitol-negativo y β -glucuronidasa-negativo, y cepas *E. coli* no O157:H7, siendo estas sorbitol-positivo y β -glucuronidasa-positivo.⁹

La infección puede causar desde una leve diarrea hasta una colitis hemorrágica con intenso dolor abdominal y diarrea sanguinolenta. Los primeros síntomas aparecen tras 3-4 días de incubación y a los 2 días de la aparición de la enfermedad el 30-65% de los infectados tienen diarrea sanguinolenta con intenso dolor abdominal. Tras 4-10 días desaparecen los síntomas. En algunas ocasiones también pueden cursar vómitos.^{1,4}

En torno al 5-10% de los niños menores de 10 años infectados sufren SUH, caracterizado por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. Su manifestación se asocia principalmente con las cepas productoras de Stx2 que dañan las células glomerulares. Al igual que las personas que padecen colitis hemorrágica, la mayoría de los casos de SUH se resuelven a los 4-10 días, aunque tiene una mortalidad del 3-5% y secuelas graves en el 30% de los enfermos.^{1,2}

Dentro de STEC los serogrupos que provocan la mayoría de los casos de SUH son: O157, O26, O103, O111, O145 y O104. Principalmente, la infección se da en meses cálidos siendo su incidencia mayor en niños menores de 5 años y la tercera zoonosis más usual en humanos dentro de la UE. Hay transmisión entre personas y la enfermedad puede aparecer con la ingesta de menos de 100 bacterias al ser su dosis infectiva baja.^{1,2}

1.4. Metodología para la identificación de STEC

En el laboratorio existen tres tipos de métodos para identificar el agente patógeno causante de una infección: fenotípicos, moleculares y proteómicos.

1.4.1. Métodos tradicionales (fenotípicos)

Los métodos tradicionales que usan la expresión fenotípica se basan en la observación de características como la morfología, el desarrollo y las propiedades bioquímicas y metabólicas. Lo más usual es cultivar la bacteria en un medio de cultivo y en las condiciones más apropiadas de tiempo y de temperatura. Posteriormente, se aíslan y estudian aplicando marcadores de fermentación de azúcares y presencia de enzimas.^{18,19}

En cepas STEC el cultivo debe ser por estría cruzada en una placa de agar MacConey u otro medio selectivo. Se incuba durante 18-24 horas a 37 °C y se eligen entre 5 y 10 colonias de *E. coli* lactosa positivas. Si la muestra procede de heces con sangre, el microorganismo se siembra en agar MacConey con sorbitol 1% (SMAC), se incuba en las mismas condiciones y se seleccionan entre 3 y 10 colonias sorbitol negativas.⁹

Para una correcta identificación se requiere de personal técnico entrenado. Esto permitirá elegir el medio y las condiciones de cultivo más apropiadas por el organismo y realizar una identificación asequible. Existirán problemas de identificación con esta prueba si las características observadas no son concordantes con las de la especie tipo.¹⁸

1.4.2. Métodos moleculares

Los métodos moleculares son una alternativa a los métodos fenotípicos cuando no hay concordancia entre lo observado y el modelo o bien cuando la cepa estudiada no tiene características específicas que permitan su reconocimiento. En la actualidad, las técnicas moleculares son las más usadas debido a su rapidez y precisión en la identificación. En la mayoría de las ocasiones, el ARNr 16S (*rrs*) ha sido el gen empleado como marcador para la identificación. Sin embargo, algunas veces la homología entre bacterias es tan alta que se necesita recurrir a otro gen diana como el ARNr 23S, la subunidad β de la ARN polimerasa (*RpoB*) y/o la subunidad β de la ADN girasa (*GyrB*).¹⁸

El rrs es un polirribonucleótido codificado por el ADN 16S que se localiza en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Tiene un alto grado de conservación, su función es actuar como diana para antimicrobianos y su tamaño es de 1.500 pb.¹⁸

Este proceso para STEC se hace con *colony blot*, es decir, el ADN de una colonia de bacterias se traspa a una fase sólida para su hibridación. Tras incubar las colonias en una placa de agar Luria durante 4 horas a 37 °C, se coloca una membrana de nylon sobre ella y se incuba durante la noche. Como resultado, el ADN se desnaturaliza al entrar en contacto con hidróxido de sodio y se hibrida con una sonda marcada por digoxigenina.⁹

Una nueva técnica molecular de identificación microbiana es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite un reconocimiento rápido pero es muy sensible mostrando más errores. En ella, hay una hibridación del ADN en fase líquida con una secuencia de un gen determinante de la patogenicidad. No ha demostrado lo suficiente como para sustituir el resto de pruebas, teniendo además mayor coste y carga de trabajo. No obstante, permite determinar más de uno de los genes aumentando la eficacia.^{9,18}

1.4.3. Métodos proteómicos

Los métodos proteómicos se fundamentan en el análisis y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma), basándose las más usuales en la electroforesis y en la espectrometría de masas. Esta última permite una identificación bacteriana rápida y fiable midiendo la relación masa/carga (m/z) de los iones resultantes de la separación de moléculas. Los tres elementos principales de un espectrómetro de masas son: fuente de ionización, analizador de masas y detector. El tipo de espectrómetro más empleado es el MALDI-TOF, denominado MALDI por sus siglas en inglés “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization” (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF por “Time of Flight” (tiempo de vuelo).¹⁸

El análisis MALDI-TOF emplea un láser sobre la muestra situada en una matriz orgánica con rayos UV de 337 nm, generándose iones que llegan a un detector. Posteriormente, los picos obtenidos se comparan con los de una base de datos para identificar el microorganismo.

Para poder aplicar MALDI-TOF existen diferentes métodos de extracción para preparar la muestra, siendo uno de ellos el método “etanol/ácido fórmico”. Este permite romper las células y liberar las proteínas tras la adición de diferentes compuestos: agua ultrapura, etanol absoluto, ácido fórmico al 70% y acetonitrilo. Finalmente, se añade ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA).^{18,19,20}

Este método proteómico ha demostrado ser eficaz para el análisis de *E. coli*, permitiendo separar las cepas STEC (O157, O26 y O111) de las no STEC. Para ello, se busca una proteína específica que no debe estar presente en *E. coli* O157 Stx1 y Stx2 positiva para su identificación.¹⁹

Las principales ventajas de esta técnica son la elevada tasa de identificación de forma precisa, la facilidad de preparación, la rapidez de obtención de resultados fiables y su bajo coste. No obstante, el espectrómetro requiere controles de calidad y calibraciones frecuentes, mantenimiento constante del vacío y una formación previa del trabajador.¹⁸

1.5. Serogrupos de STEC comúnmente encontrados en alimentos

E. coli es uno de los microorganismos contaminantes de alimentos más prevalentes. Dicha contaminación puede darse en las fases de producción, procesamiento, preparación/lavado, distribución y comercialización del alimento. Dentro de *E. coli* se encuentra el grupo EHEC que se transmite al ser humano a través del consumo de agua y alimentos contaminados, siendo el serotipo O157:H7 el más importante que ha causado brotes por la ingesta de frutas y verduras, harinas, leches y carnes contaminados.²²

El principal reservorio de STEC es el intestino animal, como ya se mencionó anteriormente, incluyendo una gran diversidad de especies tales como vacas, ovejas, cabras, cerdos, gatos, perros, pollos y gaviotas. Pese a que el serotipo O157:H7 está implicado en la mayoría de los brotes, gran parte de los serotipos aislados de estos animales son no O157. En EEUU, Canadá, Europa y Australia existe una alta prevalencia de la enfermedad por STEC transmitida por alimentos. (Tabla 2).^{1,4,5,21,22,23}

Tabla 2. Brotes de enfermedad por EHEC relacionados con alimentos en EEUU entre 2018 y 2021.

Año	Agente causal	Vehículo	Casos	Hospitalizaciones	Muertes
2021	<i>E. coli</i> O121	Mezcla para pastel	16	7	0
2021	<i>E. coli</i> O157:H7	Fuente desconocida	22	11	1
2020	<i>E. coli</i> O157:H7	Fuente desconocida	18	6	0
2020	<i>E. coli</i> O157:H7	Verduras de hoja verde	40	20	0
2020	<i>E. coli</i> O157:H7	Fuente desconocida	32	15	1
2020	<i>E. coli</i> O103	Brotes de trébol	51	3	0
2019	<i>E. coli</i> O157:H7	Ensalada	10	4	0
2019	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga romana	167	85	0
2019	<i>E. coli</i> O121	Bisonte terrestre	33	18	0
2019	<i>E. coli</i> O26	Harina	21	3	0
2019	<i>E. coli</i> O103	Carne picada	209	29	0
2018	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga romana	62	25	0
2018	<i>E. coli</i> O26	Carne picada	18	6	1
2018	<i>E. coli</i> O157:H7	Lechuga romana	210	96	5

Fuente: Enciso-Martínez et al.²²

Los primeros brotes de la enfermedad se relacionaron con la ingesta de hamburguesas poco cocinadas, aunque posteriormente se ha asociado con otros muchos alimentos. La mayoría de las infecciones aparecen tras el consumo de ternera u otros derivados cárnicos escasamente cocinados, agua, leche no pasteurizada y sus productos, zumos de fruta, semillas germinadas y verduras crudas (coles de Bruselas, espinacas, lechuga, etc).^{1,2,4,5}

Para evitar la presencia de STEC en los alimentos, las empresas alimentarias deben ejecutar unas adecuadas prácticas de higiene para cerciorarse de que los alimentos comercializados son banales. Así, por ejemplo, las empresas productoras de brotes de semillas germinadas deben vigilar los serogrupos más relacionados con el SUH. Una vez el alimento llega al hogar, el consumidor también puede llevar a cabo unas prácticas para garantizar la seguridad alimentaria. En el caso de las carnes deben ser cocinadas a más de 70 °C durante al menos dos minutos para destruir la bacteria.^{2,21}

2. JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli es una bacteria presente en el intestino humano, siendo la mayoría de sus cepas inocuas, pero otras son patógenas y se asocian a enfermedades humanas como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. *E. coli* enterohemorrágica es considerada uno de los biotipos patógenos frecuentemente asociados a la ingesta de alimentos contaminados. Según los datos de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), en el año 2020 se notificaron en la UE 4.446 casos de enfermedad por STEC en personas, siendo 72 de ellos en España.

E.coli productora de toxinas Shiga forma parte de la microbiota intestinal de una amplia gama de animales que actúan como reservorio. Es el caso de rumiantes como las ovejas pueden transmitir la bacteria a través de la carne y leche consumidos sin un tratamiento térmico adecuado y, con ello, generar brotes de enfermedad por *E. coli*.

La identificación de este microorganismo a través de métodos de cultivo dependientes e independientes requiere un periodo largo de tiempo, es decir, diversos días. Además, si las medidas preventivas no han sido eficaces y se ha producido la infección, es necesaria una rápida identificación del microorganismo patógeno. Para ello, desde el punto de vista microbiológico, la espectrometría de masas MALDI-TOF es una técnica que permite la evaluación rápida y efectiva con un bajo coste económico. En la actualidad, existen muchos estudios que ayudan a encontrar una estrategia para la identificación de los serogrupos de STEC que causan enfermedades.

Finalmente, desde el punto de vista personal, la elección del tema responde a una necesidad propia de aumentar los conocimientos sobre la microbiología alimentaria, y, proporcionar una herramienta que ayude a una identificación rápida del microorganismo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar biomarcadores que permitan diferenciar *E. coli* O157 productora de toxinas Shiga a través de los espectros de masas obtenidos por la técnica MALDI-TOF.

3.2. Objetivos específicos

Identificar las muestras aisladas obtenidas de leche de oveja mediante el uso de la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Establecer un modelo para *E. coli* O157 productora de toxinas Shiga que permita su diferenciación con *E. coli* no O157.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Obtención de muestras

Las cepas de *Escherichia coli* fueron aisladas y serotipadas durante los años 2001 y 2003 a partir de leche de oveja por Irma Caro Canales. En este trabajo se han estudiado 78 cepas de *E. coli*, 24 identificadas como *E. coli* O157 y 54 como *E. coli* no O157.

4.2. Recuperación de cepas

Las cepas fueron recuperadas según la Figura 1. De esta manera, 10 μ L de las cepas conservadas a menos 80 °C se sembraron en 1 mL de caldo de TSB (Tryptic Soybean Broth, Millipore) al que se agregó un 0,5% de extracto de levadura. Una vez sembradas, se incubaron en una estufa a 37 °C durante 18-24 horas. Posteriormente, las cepas se sembraron en Violet Red Bile Lactose Agar (VRBLA) usando la técnica por agotamiento. Posteriormente, las bacterias fueron incubadas en una estufa a 37 °C durante 18-24 horas.

Finalmente, a partir del crecimiento en VRBLA se aisló una colonia y se sembró en 1 mL de caldo de TSB que contenía un 0,5% de extracto de levadura. Las cepas de *E. coli* se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Con ese crecimiento, se realizó la extracción de proteínas para llevar a cabo el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF con el sistema MALDI BioTyper (Bruker Daltonik).

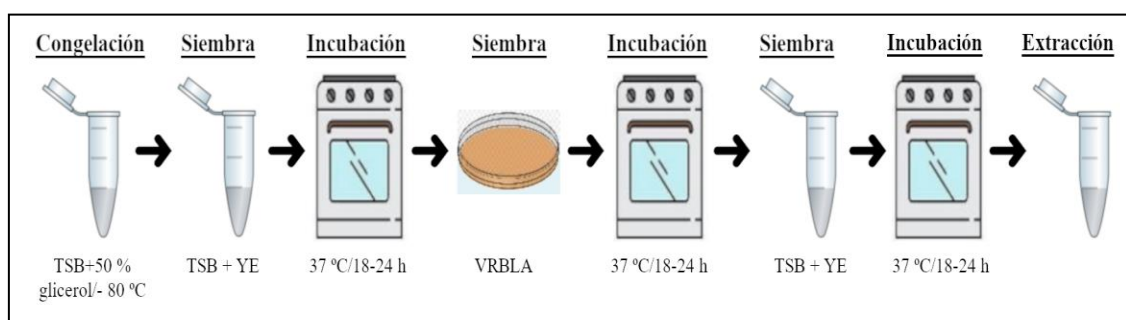


Figura 1. Condiciones de recuperación de las cepas de *E. coli*.

Fuente: elaboración propia.

4.3. Extracción de proteínas ribosomales

La extracción de las proteínas ribosomales se hizo según se muestra en la Figura 2. Tras la recuperación y crecimiento de las bacterias aisladas, se realizó la extracción de sus proteínas ribosomales con el método “etanol/ácido fórmico”.

Para ello, los últimos tubos incubados se centrifugaron a 13.500 rpm durante 2,5 minutos en una centrífuga de la marca “Eppendorf”. El sobrenadante fue retirado y se añadió al pellet 1 mL de agua desionizada estéril. Posteriormente, se centrifugó a 13.500 rpm durante 2,5 minutos, proceso repetido dos veces consecutivas. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se agregaron, en este caso, 900 μ L de etanol absoluto (96%, Scharlab®) y 200 μ L de agua desionizada estéril. Los tubos se centrifugaron nuevamente 5 minutos a 15.000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar en un baño de calor seco a 37 °C durante 45-60 minutos aproximadamente.

Cuando el pellet se secó por completo, se agregaron 15 μ L de ácido fórmico (PanReac AppliChem®) al 70%, se agitó con la ayuda de un agitador de tubos durante 2 minutos y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron otros 15 μ L de acetonitrilo (Supelco®), se agitó nuevamente y se centrifugó durante 3 minutos a 15.000 rpm. A partir del sobrenadante final, 1 μ L de cada muestra se depositó sobre cada uno de los pocillos de la placa de análisis MALDI-TOF y, una vez secado al aire, se agregó a cada pocillo 1 μ L de solución de matriz HCCA (ácido α -cyano-4-hidroxicinámico) preparada horas antes para lograr mayor precisión en el análisis.

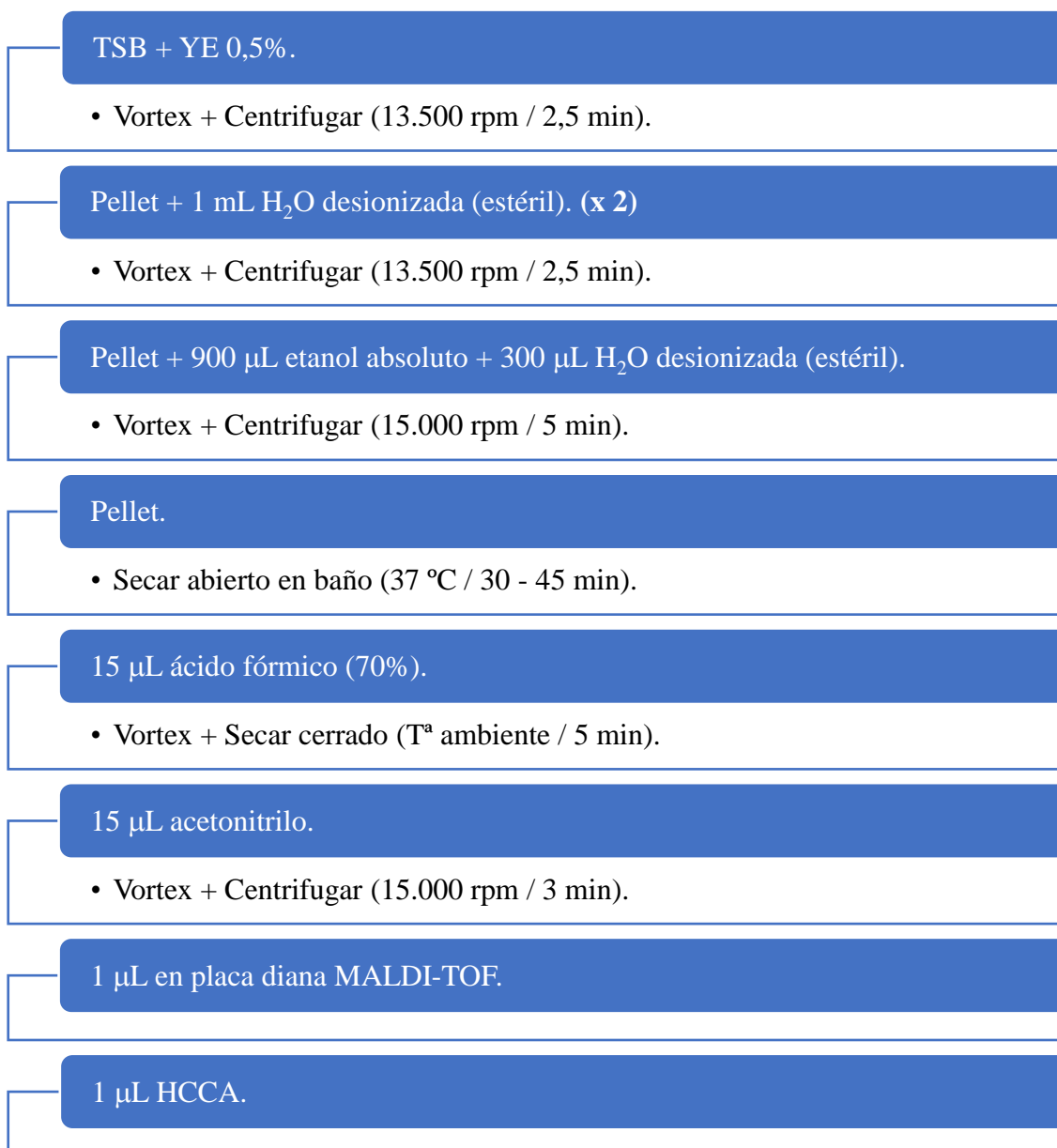


Figura 2. Extracción de proteínas ribosomales por el método “etanol/ácido fórmico”.

Fuente: elaboración propia.

4.4. Análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

La placa fue llevada al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de Valladolid para su análisis. La relación m/z se midió con el programa Flex Analysis (versión 3.4; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) y la identificación de *E. coli* se realizó con el programa MALDI BioTyper (versión 3.1; Bruker Daltonik). Previamente, se llevó a cabo una calibración externa del espectro con el estándar *E. coli* DH5.

La lista de picos obtenida en el proceso se comparó con la biblioteca de referencia de MALDI BioTyper 3.1, empleando un algoritmo de comparación contenido en el programa. Una vez importado el espectro, el proceso se ejecutó de forma automática sin intervención del usuario mediante el programa MALDI Biotyper RTC.

Según el grado de similitud existente entre el espectro analizado y los almacenados en la biblioteca de referencia, se obtiene una puntuación denominada *score*. En función del valor obtenido, se identifica con un color y un símbolo (Tabla 3). Una puntuación de 1.7-1.99 indica que es probable la identificación del género, pero se necesitan puntuaciones superiores a 2.0 para que dicha identificación sea segura.

Tabla 3. Interpretación del score generado por el MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

SCORE	DESCRIPCIÓN	SÍMBOLO	COLOR
2.3 – 3.0	Alta probabilidad de identificación de especies	(+++)	Verde
2.0 – 2.299	Identificación segura de género y probable de especie	(++)	Verde
1.7 – 1.999	Identificación probable de género	(+)	Amarillo
0.0 – 1.699	Identificación irrelevante	(-)	Rojo

Fuente: elaboración propia a partir de la información obtenida del proveedor.²⁴

Asimismo, el programa MALDI BioTyper clasifica también la calidad de los espectros generados para indicar la pureza o posibles anomalías en la identificación del género y especie (Tabla 4). De esta manera, categoriza los espectros agregando a la identificación unas letras y unos símbolos. Para llevar a cabo el estudio de los espectros se han elegido aquellos que mostraron la letra y el símbolo A++ y/o A+++.

Tabla 4. Categorías de los espectros analizados por MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN
A	Especie consistente
B	Género consistente
C	Sin consistencia

Fuente: elaboración propia a partir de la información obtenida del proveedor.²⁴

4.5. Tratamiento de resultados

Los resultados obtenidos con el análisis de MALDI-TOF y Flex Analysis (versión 3.4, Bruker Daltonik) fueron tratados con el programa ClinProTools (versión 3.4) para el análisis de componentes principales y así observar si había separación entre los distintos serogrupos y generar los modelos. Los espectros de *E. coli* O157 fueron asignados a la clase 1 y los de *E. coli* O146 a la clase 2. Los picos utilizados como biomarcadores fueron automáticamente identificados con la función “Peak Statistic Table”.

La clasificación supervisada de modelos fue realizada usando los algoritmos del programa ClinProTools: Red Neuronal Supervisada (SNN), Algoritmo Genético Optimizado (GA) y Clasificador Rápido (QC). En cada modelo se calcularon parámetros que muestran el comportamiento teórico que podría tener en futuras clasificaciones: capacidad de reconocimiento y porcentaje de validación cruzada.

Además, se realizó una segunda búsqueda de biomarcadores con el programa Mmass (versión 5.5.0) para comparar los espectros de un mismo serotipo y obtener los picos representativos de cada uno. Las condiciones en las que se realizó dicho análisis fueron: corrección de la línea base con una precisión del 18% y un desplazamiento relativo del 25% para descartar los picos con menor altura; y recogida de la masa (tamaño molecular) de cada uno de los picos con una altura del 90%. Los datos se trasladaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel para su tratamiento.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 4 se muestran los genes que albergan las cepas de *E. coli* O146 y O157 utilizadas. La principal diferencia entre ambos serogrupos es la ausencia del gen *eaeA* en las cepas de *E. coli* O146. Además, tres de las cepas estudiadas de *E. coli* O157:H- son portadoras los genes *stx1* y *stx2*. Finalmente, una cepa de *E. coli* O157:H7 no muestra ninguno de los dos genes que codifican la formación de verotoxinas.

El gen *eaeA* es el responsable de la lesión de adhesión/eliminación que codifica la formación de intimina, proteína de membrana externa que facilita la unión de las bacterias a las células epiteliales del huésped²⁵. Debido a esta característica, es posible que las cepas de *E. coli* O146:H21 muestren un nivel de patogenicidad menor.

Los genes *stx1* y *stx2* son productores de verotoxinas 1 y 2 respectivamente, e intervienen en la unión de estas a los receptores celulares Gb3 provocando daño en las células endoteliales y producción de citotoxinas proinflamatorias. Estos mecanismos de patogenicidad pueden provocar enfermedades severas como el SUH⁵. Es por ello que las cepas de *E. coli* O157 con los dos genes de virulencia podrían ser más citotóxicas.

Tabla 4. Patotipos de las cepas de los serotipos de *E. coli* O146:H21, O157:H- y O157:H7.

Serotipo	Nº de cepas	Genes			
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>
O146:H21	33	+	+	-	+
	1	-	+	-	+
O157:H-	11	-	+	+	+
	3	+	+	+	+
O157:H7	5	-	+	+	+
	1	-	-	+	+

Fuente: elaboración propia a partir de los datos facilitados por la Dra. Irma Caro Canales.

En la Figura 3 se observan los fragmentos obtenidos de las proteínas ribosomales mediante MALDI-TOF para ambos serogrupos. Se han estudiado los espectros medios obtenidos para *E. coli* O146 y O157 de 61 y 81 ensayos, respectivamente. Los espectros utilizados en este estudio tuvieron un *score* entre 2.0 y 3.0, fueron consistentes con la especie y pertenecían a una cepa aislada según lo detallado por el proveedor^{24,26}. Los fragmentos usados en este estudio estuvieron en un rango de masas entre 3.000 y 11.200 kDa y se encuentran resaltados en color azul. De acuerdo con Nakano et al.²⁶, las puntuaciones de los espectros obtenidos a través del programa MALDI Biotyper, utilizadas para buscar biomarcadores, deberán ser superiores a 2.0. En este trabajo de investigación se han utilizado puntuaciones que situadas en el rango 2.001 - 2.279, lo que ha permitido realizar un estudio robusto para la diferenciación de serogrupos de *E. coli*.

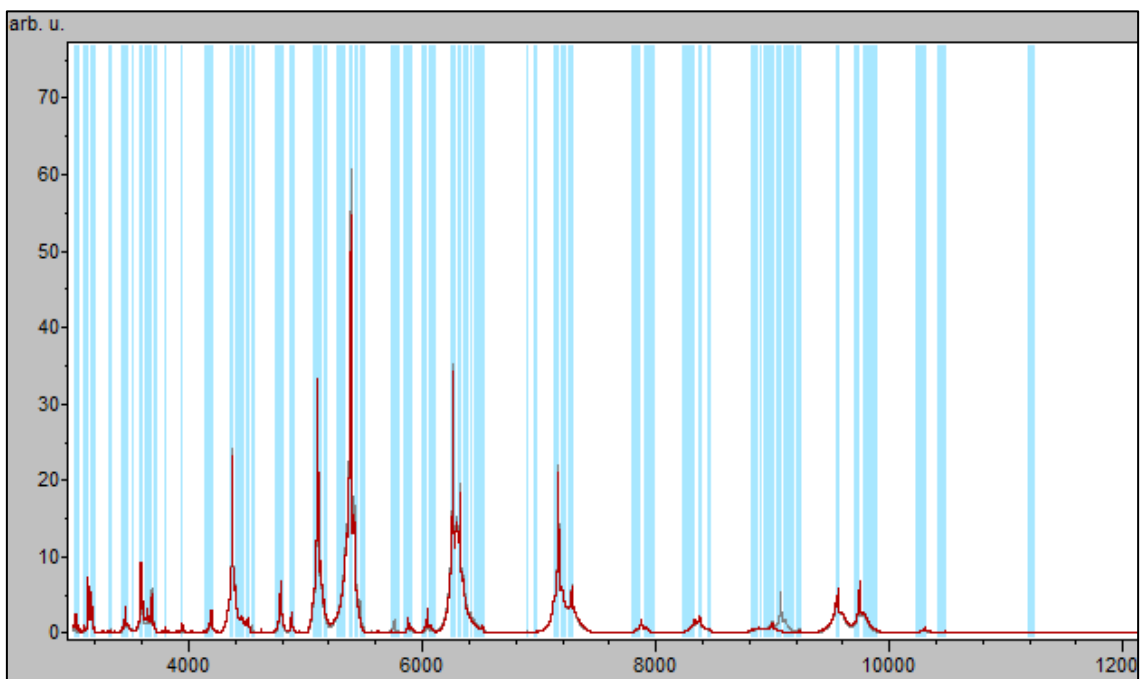


Figura 3. Comparación de los espectros medios obtenidos de las cepas de *E. coli* O146 y O157 mediante ClinProTools.

Fuente: programa ClinProTools.

En la Figura 4 se observa la distribución bidimensional de los espectros de cada una de las clases estudiadas evaluados a través del programa ClinProTools²⁷. En esa figura se pueden ver claramente dos poblaciones: *E. coli* O146 en color verde y *E. coli* O157 en color rojo. En el caso de las cepas estudiadas de *E. coli* O157 hay una mayor dispersión en comparación con *E. coli* O146. Dicha variabilidad podría ser explicada por la presencia de dos antígenos flagelares, H7 y H-, en el serogrupo O157. Es posible que debido a la gran variabilidad observada entre las cepas de *E. coli* O157 no haya sido posible generar modelos de clasificación que permitan separar las cepas de *E. coli* O157 según su antígeno flagelar (datos no mostrados). También cabe resaltar que algunos picos encontrados en los espectros de *E. coli* O157 se localizan en el área de los picos de *E. coli* O146. Similares resultados fueron obtenidos por Carbonari et al.²⁸ durante el estudio de *E. coli* O157:H7 productora de verotoxinas. Este hecho indica que los picos que representan proteínas ribosomales son semejantes en ambos serogrupos.

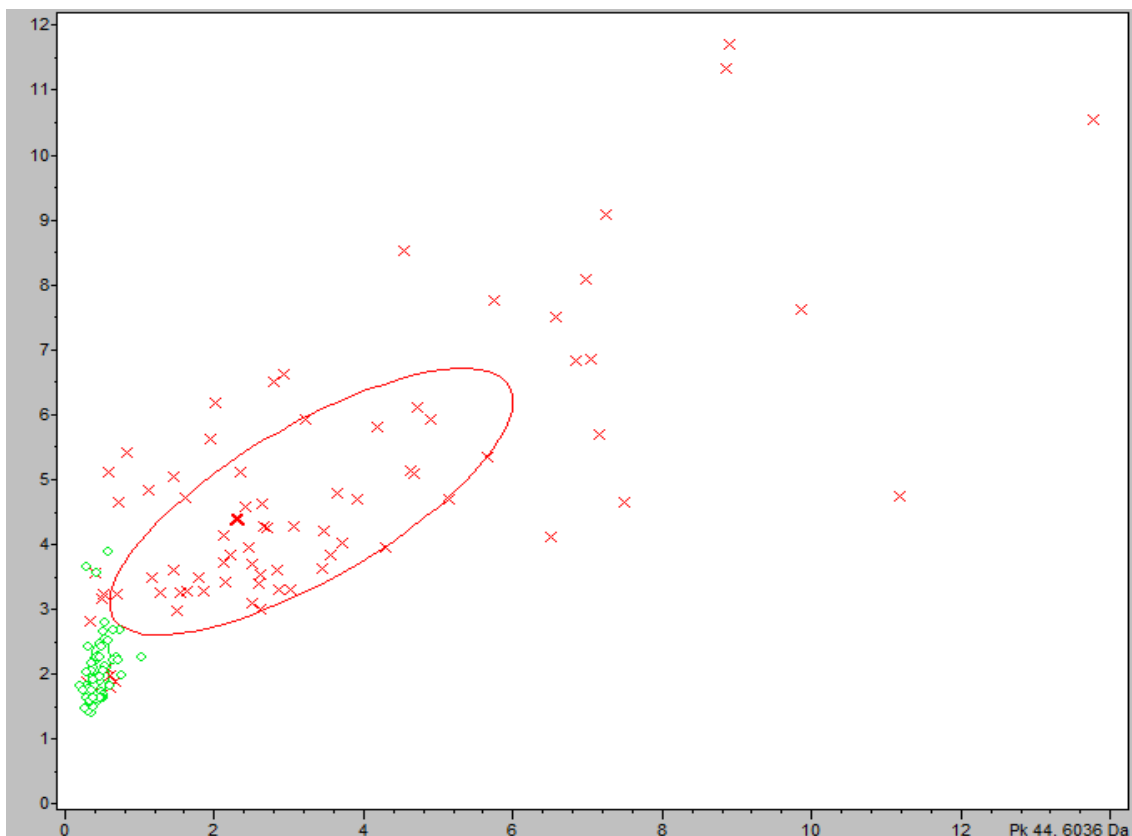


Figura 4. Distribución de los picos de *E. coli* O146 y O157 obtenidos mediante el programa ClinProTools.

Fuente: programa ClinProTools.

La Figura 5 representa el análisis de componentes principales (PCA) de las cepas de *E. coli* O146 y O157. La Figura 5.A muestra la localización espacial en tres dimensiones de los espectros estudiados: componente principal 1 (PC1), componente principal 2 (PC2) y componente principal 3 (PC3). Se puede observar una clara separación entre los dos serogrupos de *E. coli*: O146 en verde y O157 en rojo. Las Figuras 5.B, 5.C y 5.D muestran la colocación espacial en dos dimensiones de ambos serogrupos: PC1 frente al PC2, PC1 frente a PC3 y PC2 frente al PC3. En las Figuras 5.B y 5.C se ve que el PC1 contribuye a la separación de *E. coli* O146 y O157 con una precisión del 95,5%. Este análisis muestra que las poblaciones son distintas y, por lo tanto, que podrían usarse estos espectros para generar modelos de clasificación para la identificación rápida.

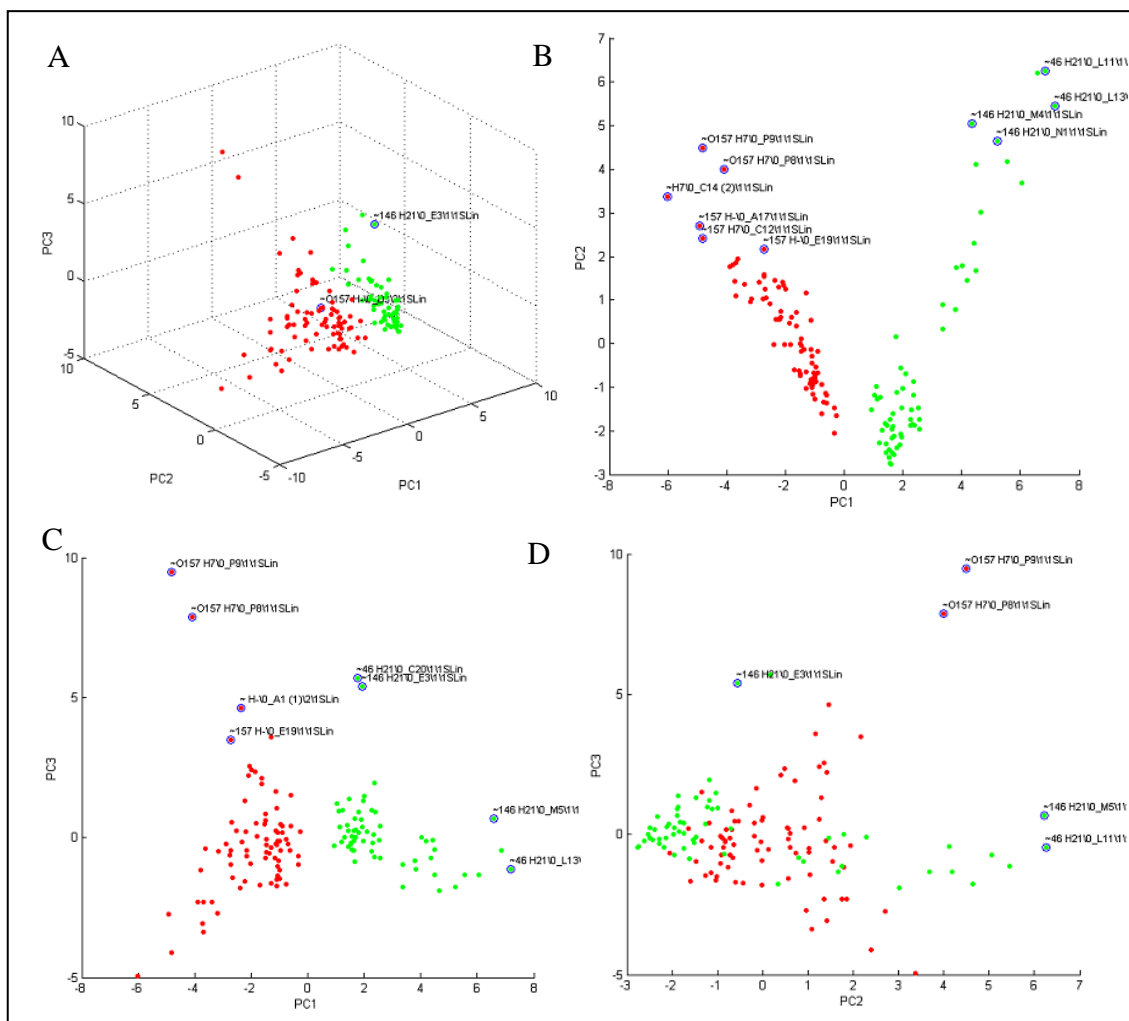


Figura 5. Análisis de componentes principales comparando espectros de *E. coli* O146 y O157.

Fuente: programa ClinProTools.

La Figura 6 muestra la dispersión espacial de los picos según su contribución de cargas a los tres componentes principales. Cada punto resaltado en negro permite diferenciar los valores de intensidad de los picos y distinguir aquellos que se encuentra más alejados del centro de los ejes. La media de las masas de esos picos son: 3327 m/z, 5457 m/z, 5742 m/z, 5779 m/z, 6036 m/z, 9062 m/z y 9095 m/z. Los picos 6038 m/z y 6064 m/z que se encuentra localizados en el cuadrante izquierdo inferior contribuyen a la separación de *E. coli* O157. Estos picos permitirán explicar la varianza de los componentes principales. Los valores de las cargas se encuentran en el eje Y entre -0,4 y 0,6 y en el eje X entre -1 y 1.

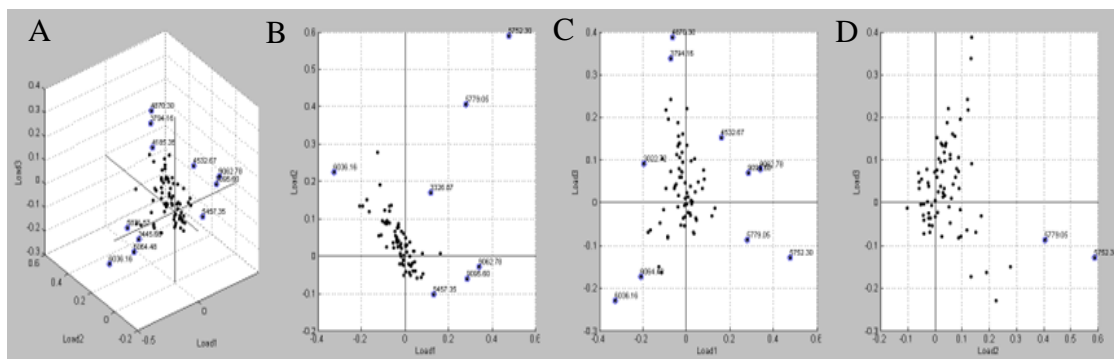


Figura 6. Contribución de las cargas que explica la varianza de los fragmentos que permiten separar los serogrupos de *E. coli* O146 y O157.

Fuente: programa ClinProTools.

En la Figura 7 se resaltan los fragmentos en el espectro medio de ambos serogrupos que permiten la diferenciación entre ellos. Las relaciones 5457,35 m/z y 9062,78 m/z están presentes en *E. coli* O146, pero no en *E. coli* O157.

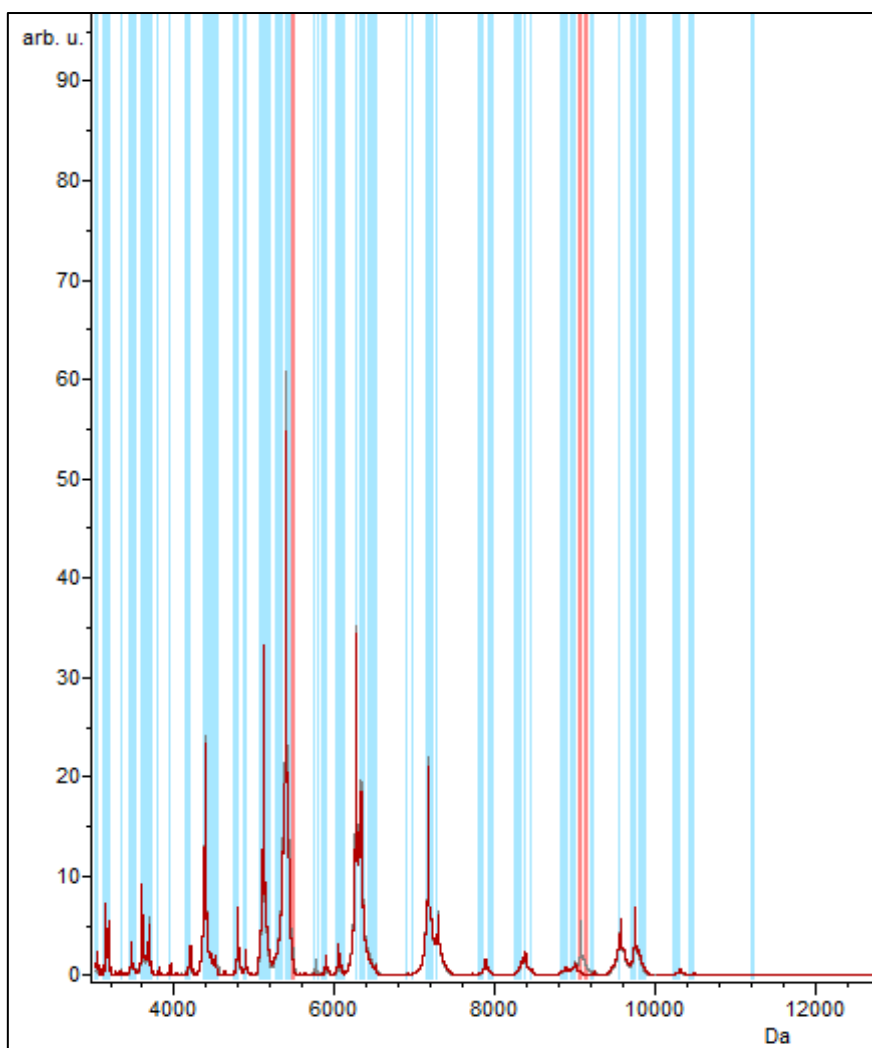


Figura 7. Comparación del espectro medio de *E. coli* O146 y de O157.

Fuente: programa ClinProTools.

En la Tabla 5 se observan los valores de p del t-test y la media de los picos identificados por el PCA. De acuerdo con el valor medio que compara los picos de ambos serogrupos, se pueden identificar hasta cuatro picos (3445,66 m/z; 5457,35 m/z; 8326,01 m/z; 9062,78 m/z) que han permitido la identificación de *E. coli* O146 y O157. Los estadísticos t-test, valor de p del test de Anderson-Darling, valor de p de Wilcoxon y los valores de media del grupo 1 y 2, son utilizados para seleccionar los picos característicos de las dos clases, siempre y cuando el valor de p sea $< 0,05$. En este momento, no existen estudios que permitan la comparación de estos resultados, pero los picos anteriormente mencionados podrían ser empleados como marcadores para la separación de cepas.²⁹

Tabla 5. Valores de *p* obtenidos del algoritmo t-test de los fragmentos utilizados para la clasificación de *E. coli* O146 frente a O157.

Índice	m/z	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2
44	6036,16	< 0,000001	0	< 0,000001	3,68	0,52
14	3595,98	< 0,000001	0	< 0,000001	5,18	2,29
1	3022,72	< 0,000001	0	< 0,000001	3,38	1,11
35	5148,68	< 0,000001	0	0,00259	5,08	3,74
15	3619,61	< 0,000001	0	0,0000206	2,71	1,55
43	5897,62	< 0,000001	0	0,00000276	1,53	0,54
77	10471,45	< 0,000001	0	0,0000206	0,58	0,26
69	9062,78	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	0,81	10,87
70	9095,6	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	0,46	3,69
39	5457,35	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	2,86	6,89
30	4532,67	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	0,97	2,55
52	6410,89	< 0,000001	< 0,000001	0,00336	2,55	3,79
71	9207,4	< 0,000001	< 0,000001	0,135	0,49	0,81
38	5407,91	< 0,000001	< 0,000001	0,392	16,1	20,87
45	6064,48	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	1,68	0,64
53	6427,01	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	2,09	2,96
11	3474,69	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	1,82	1,17
10	3463,15	< 0,000001	< 0,000001	0,00000109	2,04	1,29
42	5871,57	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	2,46	1,14
2	3045,07	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	2	1,16
8	3426,63	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	1,55	0,93
40	5752,3	0,00000361	< 0,000001	< 0,000001	0,59	3,74
9	3445,66	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	4,09	2,16
22	4164,91	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	1,96	1,2
37	5381,3	< 0,000001	< 0,000001	0,878	55,45	67,56
46	6092,27	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	0,98	0,7
63	8326,01	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	2,12	1,49
78	11221,26	< 0,000001	< 0,000001	0,000056	0,33	0,24
21	3936,2	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	1,85	1,2
36	5341,47	< 0,000001	< 0,000001	0,686	13,68	16,49
56	6893,15	0,00000215	< 0,000001	0,668	0,52	0,67
57	6969,1	< 0,000001	0,00000132	0,0217	0,74	0,6

Fuente: programa ClinProTools.

PTTA = valor *p* de t-test. PWKW = valor *p* de la prueba de Wilcoxon. PAD = valor *p* de la prueba de Anderson-Darling. Ave1 = valor medio *E. coli* O157. Ave 2 = valor medio *E. coli* O146.

En la Tabla 6 se muestran las medias de los picos presentes en las cepas estudiadas de *E. coli* O146, O157:H- y O157:H7. Los datos han sido obtenidos mediante el programa Mmass. Los picos que no están resaltados son aquellos que están presentes en los tres serotipos al ser característicos de *E. coli*. No obstante, otros picos solo están presentes en uno de los dos serogrupos, lo que permite la separación de ambos. Es el caso del fragmento 4534 m/z solo está presente en *E. coli* O146, lo cual concuerda con los datos aportados por Kubo et al.¹⁹. Al contrario ocurre con los picos resaltados en color verde, que solo están presentes en *E. coli* O146. Así, los fragmentos resaltados en la Tabla 6 podrían ser utilizados como biomarcadores para la separación de los dos serogrupos pero no de los serotipos O157:H- y O157:H7.

Tabla 6. Tamaño de los fragmentos de proteínas ribosomales obtenidos de las cepas de *E. coli* O146, O157:H- y O157:H7 mediante el programa Mmass.

O146	O157:H-	O157:H7
AUSENTE	3002,9745	3002,5917
3059,2087	AUSENTE	AUSENTE
3128,8521	3129,8984	3130,2721
3158,9661	3159,8124	3160,3640
3325,8882	AUSENTE	AUSENTE
3444,9823	3445,7508	3445,9906
3581,5756	3580,9504	3581,5165
AUSENTE	3596,4282	3596,5020
3637,7296	3639,1785	3639,2774
3674,8935	3675,4302	3675,6798
4184,3057	4186,1468	4185,9174
4365,3402	4365,6951	4366,1370
4384,4851	4384,9820	4384,6530
4534,4009	AUSENTE	AUSENTE
4777,8744	4778,2946	4778,2689
4870,2516	4870,8807	4870,9389
5096,6457	5096,9966	5097,2563
5120,8411	5120,7735	5120,4915
5149,2853	AUSENTE	AUSENTE
5381,2139	5381,5880	5381,8618
5407,8501	5407,7149	5408,1625
5457,3803	AUSENTE	AUSENTE
5752,2799	AUSENTE	AUSENTE
AUSENTE	5872,7683	5872,2532

AUSENTE	6036,1987	6037,0218
6255,0210	6255,5894	6255,9097
6285,5495	6284,8660	6285,6155
6315,0172	6315,5750	6315,9913
7157,8011	7158,6511	7159,1059
7185,7230	7187,3036	7186,6294
7273,5883	7274,5227	7274,9375
7869,2411	7870,8805	7868,3095
8365,7891	8370,3799	8369,3433
9062,3404	AUSENTE	AUSENTE
9542,1451	9538,9296	9533,6470
9552,7413	9554,7514	9556,8122
9738,0445	9739,8912	9741,1603
10298,5972	AUSENTE	AUSENTE

Fuente: elaboración propia a partir de los datos facilitados por el programa Mmass.

En la Tabla 7 se muestran los modelos usados para la diferenciación de *E. coli* O146 y O157. En este estudio se empleó “Leave One Out” para el cálculo de los diversos modelos. Debido a esta condición, el análisis de algoritmos solo muestra el fragmento que tiene mayor influencia para la diferenciación de ambos serogrupos, siendo su tamaño medio 9095,6 m/z. Esta masa es similar a la del fragmento 70 resaltado en color naranja y negrita en la Tabla 5. Un fragmento de tamaño semejante (9062 m/z) se encontró en *E. coli* O146 y estuvo ausente en *E. coli* O157 cuando los espectros fueron analizados con la ayuda del programa Mmass (ver Tabla 6). La diferencia entre el tamaño de ambos fragmentos puede deberse a la manera del cálculo de la media del programa.

Los resultados de la validación cruzada y la capacidad de reconocimiento obtenidos para los tres modelos fue del 100%, indicando esto que todos los modelos tienen una alta capacidad de discriminación. Estos resultados son superiores a los encontrados por Kubo et al.¹⁹, quien referenció valores para el modelo de GA de un 92,5% y 95,8% para los estadísticos de validación cruzada y capacidad de conocimiento, respectivamente. Debido a esto, los modelos generados en el presente estudio podrían ser usados para realizar la discriminación de ambos serogrupos al medir la validación cruzada la fiabilidad.

Tabla 7. Modelos construidos para la discriminación de los serogrupos de *E. coli* O146 y O157 usando el modelo "Leave One Out" para la validación cruzada.

Algoritmo de clasificación	Validación cruzada (%) ^a			Capacidad de reconocimiento (%) ^b		
	Total ^c	O157	O146	Total ^c	O157	O146
Algoritmo genético	100	100	100	100	100	100
Clasificador rápido ^d	100	100	100	100	100	100
Red de supervisión neuronal	100	100	100	100	100	100

Fuente: programa ClinProTools.

^a La validación cruzada es una medida estadística de fiabilidad para los modelos calculados y el valor normalizado de la capacidad relativa de predicción.

^b La capacidad de reconocimiento es una medida que explica la capacidad de los modelos calculados y se calcula como el número relativo de datos correctamente clasificados. Es igual a la sensibilidad.

^c "Total" es el valor obtenido con el promedio de la validación cruzada y la capacidad de reconocimiento.

^d El modelo de salida "valor p de la prueba de Wilcoxon".

Finalmente, se hizo una clasificación externa de una cepa de *E. coli* O166 que alberga los genes *stx1*, *stx2* y *hlyA*, y la cepa se incluyó en el grupo de *E. coli* O146 pero no en el grupo *E. coli* O157. Estos hechos indican que los modelos generados por este estudio permiten separar las cepas *E. coli* O146 de las de *E. coli* O157, pero no permiten separar entre otros serogrupos. Los valores obtenidos en la clasificación externa fueron 0,69 y 1,31. Según las instrucciones del programa, una buena identificación muestra valores superiores a 1 y una mala identificación valores menores a 1.²⁷

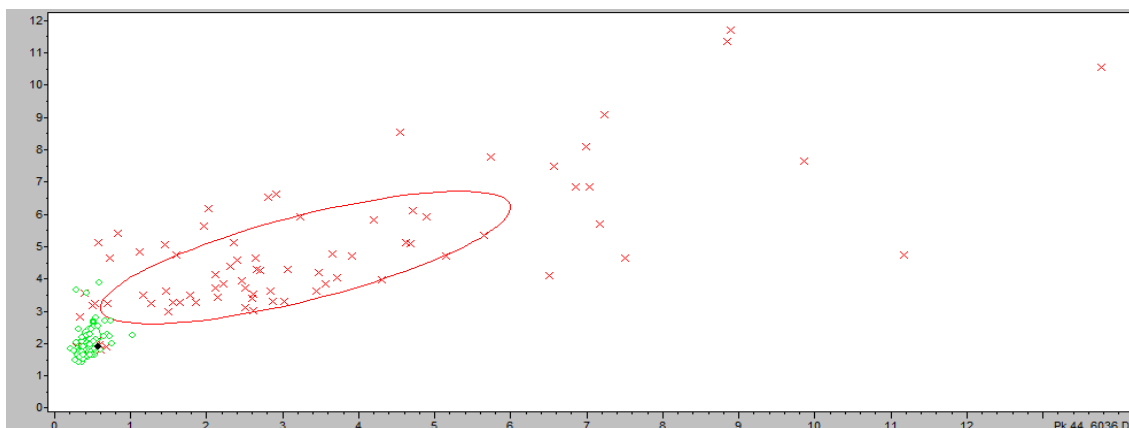


Figura 8. Localización del espectro de *E. coli* O166 realizada a través del modelo de clasificación rápida.

Fuente: programa ClinProTools.

La validación de los modelos se realizó utilizando un espectro sin normalizar y sin calibrar los resultados. Estos datos se observan en la Tabla 8 donde se puede ver una gran exactitud para cada una de las cepas estudiadas. Sin embargo, estos modelos deberían validarse con un mayor número de cepas.

Tabla 8. Clasificación de *E. coli* O146 y O157 productora de toxinas Shiga usando los modelos construidos por ClinProTools.

Clase	Clasificación	O157	O146	Ambos	Inv.
<i>E. coli</i> O157	100%	1	0	0	0
<i>E. coli</i> O146	100%	0	1	0	0

Fuente: programa ClinProTools.

6. CONCLUSIONES

La espectrometría de masas MALDI-TOF, en combinación con el programa MALDI Biotyper, permite una identificación rápida y efectiva de *E. coli* O157 productora de toxinas Shiga. La identificación rápida de este microorganismo permitirá una actuación clínica a tiempo, mejorando de esta manera la recuperación de las personas enfermas.

En segundo lugar, el estudio de las cepas de *E. coli* O146 y O157 con el programa ClinProTools permitió la separación de ambos serogrupos usando los fragmentos 3445,66 m/z; 5457,35 m/z; 8326,01 m/z; 9062,78 m/z. No obstante, no fue posible la diferenciación de serotipos de O157, en concreto O157:H7 y O157:H-. En este trabajo de investigación se consiguió establecer un modelo capaz de discriminar *E. coli* O157 de no O157.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Patrick R, Murray P, Ken S, Rosenthal P, Michael A, Pfaller M. Microbiología Médica, 2014. 996 p.
- (2) AESAN - Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Infección por *Escherichia coli*, 2022. Recuperado el 25 de abril de 2022. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/Escherichia_coli.htm.
- (3) Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. Microbiología (2a ed.), Barcelona: Wolters Kluwer Health, 2008.
- (4) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004;2(2):123-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro818>.
- (5) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998;11(1):142-201. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.11.1.142>.
- (6) Organización Mundial de la Salud. *E. coli*, 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
- (7) Hernández AL, Vivanco MVD, Silva JZ. Microbiología y parasitología médicas. Alianza Editorial; 2001, 550 p.
- (8) Lee JB, Kim SK, Yoon JW. Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection. J Vet Sci. 2022;23(2): e28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.21160>.
- (9) Rodríguez-Angeles MG. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 2002;44(5):464-75. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1.590/s0036-36342002000500011>.

- (10) Mirhoseini A, Amani J, Nazarian S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microb Pathog.* 2018;117:162–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.032>.
- (11) Cravioto A, Gross R J, Scotland S M, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.* 1979;3(2):95–99. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02602439>.
- (12) Scaletsky I C A, Silva M L M, Trabulsi L R, Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun.* 1984;45:534–536. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.45.2.534-536.1984>.
- (13) Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.* 1987;6(9):829–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-198709000-00008>
- (14) Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018;416:27-50. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/82_2018_105.
- (15) Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 1983;308(12):681–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198303243081203>
- (16) Karmali M A, Steele B T, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983;321:619–620. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6).

- (17) Yun Y-S, Kim N-O, Chun J-H, Hwang KJ, Hong S. The prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated by the enteric pathogens active surveillance network (Enter-Net) in the Republic of Korea, 2009-2018. *Microb Pathog.* 2021;158(105005):105005. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105005>
- (18) Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(8):601–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>.
- (19) Kubo Y, Ueda O, Nagamitsu S, Yamanishi H, Nakamura A, Komatsu M. Novel strategy of rapid typing of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using MALDI Biotyper and ClinProTools analysis. *J Infect Chemother.* 2021;27(8):1137–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2021.03.002>.
- (20) Fernández A, García C, Saéz JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2010. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.
- (21) Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(12):6235–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10126235>.

- (22) Enciso-Martínez Y, González-Aguilar GA, Martínez-Téllez MA, González-Pérez CJ, Valencia-Rivera DE, Barrios-Villa E, et al. Relevance of tracking the diversity of *Escherichia coli* pathotypes to reinforce food safety. *Int J Food Microbiol.* 2022;374(109736):109736. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109736>.
- (23) G M Gonzalez A, M F Cerqueira A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the animal reservoir and food in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2020;128(6):1568–82, Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14500>.
- (24) Bruker Daltonik. MALDI Biotyper 3.1 User Manual. 2012.
- (25) Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1418–24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI116718>
- (26) Nakano S, Matsumura Y, Kato K, Yunoki T, Hotta G, Noguchi T, et al. Differentiation of *vanA*-positive *Enterococcus faecium* from *vanA*-negative *E. faecium* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(3):256–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.006>
- (27) Bruker Daltonik GmbH. ClinProTools 2.2. User Manual. 2017.
- (28) Carbonari CC, Miliwebsky ES, Zolezzi G, Deza NL, Fittipaldi N, Manfredi E, et al. The importance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM[H28]/H28 infections in Argentina, 1998-2020. *Microorganisms.* 2022;10(3):582. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10030582>

- (29) Shao C, Tian Y, Dong Z, Gao J, Gao Y, Jia X, et al. The use of principal component analysis in MALDI-TOF MS: A powerful tool for establishing a mini-optimized proteomic profile. *Am J Biomed Sci.* 2012;4(1):85–101. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5099/aj120100085>