

Guía para la identificación de STEC O157:H7 utilizando espectrometría de masa con el Equipo Microflex® LT

PROPÓSITO: Transferir un documento Guía que describa los pasos a seguir para el tamizaje de colonias presuntivas de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) O157:H7 en placa de cultivo de materia fecal utilizando espectrometría de masa.

ALCANCE: Tamizaje de colonias presuntivas de STEC O157:H7 mediante la detección de picos marcadores utilizando espectrometría de masa con el Equipo Microflex® LT (Bruker Daltonics).

DEFINICIONES:

Agar SMAC: Agar MacConkey con sorbitol

Caldo CTS: Caldo tripticasa de soya

Caldo CT-CTS: CTS con cefixima 0,05 mg/l (medio) y telurito de potasio 2,5 mg/l (medio)

Solución Matriz: Solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 50% de acetonitrilo y 2.5% de ácidotrifluoroacético.

MATERIALES:

Solución Matriz

Placa de acero para Equipo Microflex® LT - Bruker Daltonics

Palillo de madera de punta fina

Placas de agar SMAC

PROCEDIMIENTO:

A-Preparación y corrida de la muestra

1. Realizar la siembra de las muestras de materia fecal en forma directa en placa de agar SMAC y luego del enriquecimiento en CTS (a 37°C por 6 h) y en CT-CTS (a 37°C por 6 h).
2. Incubar las placas de agar SMAC a 37°C por 18 h.
3. Observar si en las placas de SMAC desarrollaron colonias pequeñas, incoloras y translúcidas, presuntivas de ser colonias no fermentadoras de sorbitol *E. coli* O157. (Figura 1)
4. Completar la planilla de siembra y de análisis (Figura 2) con la denominación de las muestras cuyas colonias presuntivas se van a ensayar por duplicado en la placa de acero proporcionada por el fabricante del Equipo Microflex® LT (Bruker Daltonics).

5. Sembrar una única colonia aislada presuntiva de *E. coli* O157 con palillo de madera y realizar el extendido en el spot lo más fino posible e ir directamente al siguiente spot, sin volver a tomar colonia.
6. Sembrar concomitantemente las colonias presuntivas a ensayar en otra placa de SMAC para preservarlas para futuros ensayos e incubar a 37°C por 18 h.
7. Añadir en cada spot de la placa de acero 1 µl de solución matriz.
8. Dejar cristalizar aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Incorporar los datos de las muestras en el equipo según la planilla de siembra.
10. Introducir la placa en el Equipo Microflex® LT (Bruker Daltonics).
11. Comenzar la corrida en el Equipo.
12. Observar en la pantalla de la PC que se encuentra conectada al equipo, el resultado de la determinación de género y especie, y registrar el valor del score correspondiente obtenido para cada spot.
13. Continuar con el análisis del espectro de picos, si se identifica *Escherichia coli* con un score $\geq 2^*$.

Observación

*Solo se puede hacer el análisis de los picos si se obtuvo una identificación confiable a nivel de especie (score ≥ 2). En caso de no verificarse dicho score repetir el ensayo.

B-Identificación de picos marcadores de STEC O157:H7utilizando el software Flex análisis v3.4

B.1-Procedimiento. (Ver figura 3)

1. Abrir el software Flex análisis
2. Seleccionar File
3. Seleccionar Open
4. Seleccionar Browser en el recuadro
5. Buscar el archivo de la corrida
6. Marcar con OK todas las muestras correspondientes a la corrida
7. Marcar la muestra a analizar
8. Seleccionar Open (Aparece la muestra con el duplicado)
9. Colorear la muestra a analizar
10. Seleccionar Mass List
11. Seleccionar Find
12. Desplegar la tabla en orden creciente de los picos (m/z) con la intensidad correspondiente.
13. Identificar los picos biomarcadores (Ver tabla 1) y anotar la presencia o ausencia de picos $m/z \pm 10$ en la planilla de siembra y de análisis.

B.2-Análisis de los picos biomarcadores:

Identificar los picos biomarcadores según la siguiente Tabla

Tabla 1

Presencia y ausencia de picos biomarcadores obtenidos (m/z± 10)	Presencia	Confirmación
Ausencia de pico 9060 m/z y presencia de uno o más de los 9 picos: 3017m/z 3083m/z 3595m/z 3770m/z 4012m/z 4939m/z 5238m/z 6037m/z 6169m/z	STEC <i>E. coli</i> O157:H7	Identificación de <i>stx</i> y serotipificación con antisueros anti-O157 y anti-antígeno flagelar H7. Derivación de la muestra de materia fecal y aislamiento al LNR
Presencia de pico 9060 m/z y ausencia de los picos 3017m/z 3083m/z 3595m/z 3770m/z 4012m/z 4939m/z 5238m/z 6037m/z 6169m/z	<i>Shigella</i> spp. u otra <i>E. coli</i>	Identificación de <i>Shigella</i> spp u otra <i>E. coli</i> : STEC no O157, EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, EIEC, <i>E. coli</i> sin factores de virulencia. Derivación de la muestra de materia fecal y aislamiento al LNR

Observaciones

- Con la observación de los picos biomarcadores perteneciente a una colonia, en el original o el duplicado, se considerará como válido el resultado.
- Si en el original y el duplicado, no se encuentran picos biomarcadores, repetir el ensayo.
- Si con la repetición del mismo se continua con la no obtención de picos, contrastar los resultados con otro ensayo (por ej. aglutinación con antisuero anti-LPS O157) o derivar al Laboratorio Nacional de Referencia Servicio Fisiopatogenia del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" para su confirmación.

REFERENCIA

Manfredi Eduardo, Rocca María Florencia, Zintgraff Jonathan, Irazu Lucía, Miliwebsky Elizabeth, Carbonari Carolina, Deza Natalia, Prieto Mónica, Chinen Isabel. Rapid and accurate detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O157:H7 by

Figura 1

Algoritmo Diagnóstico

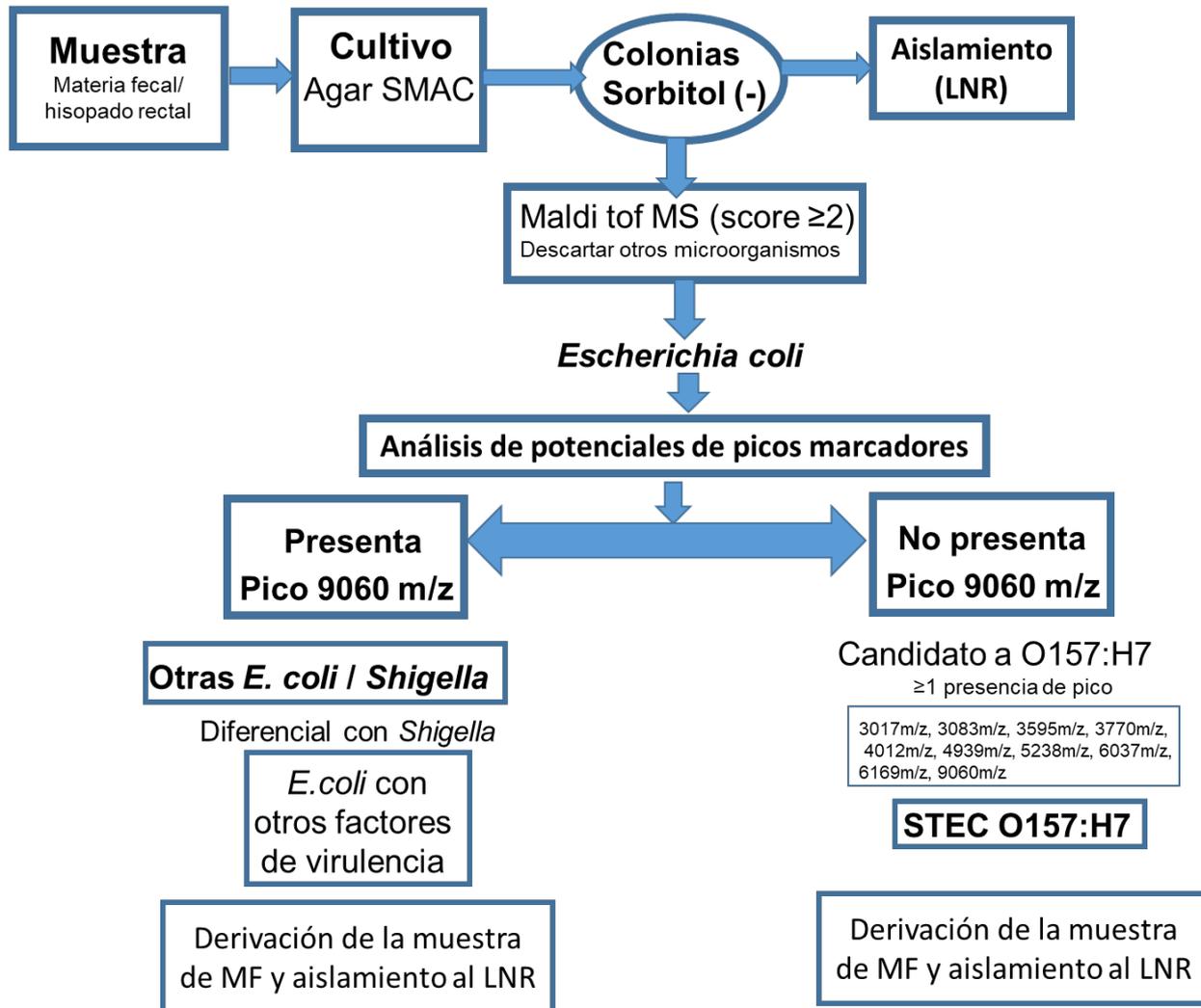
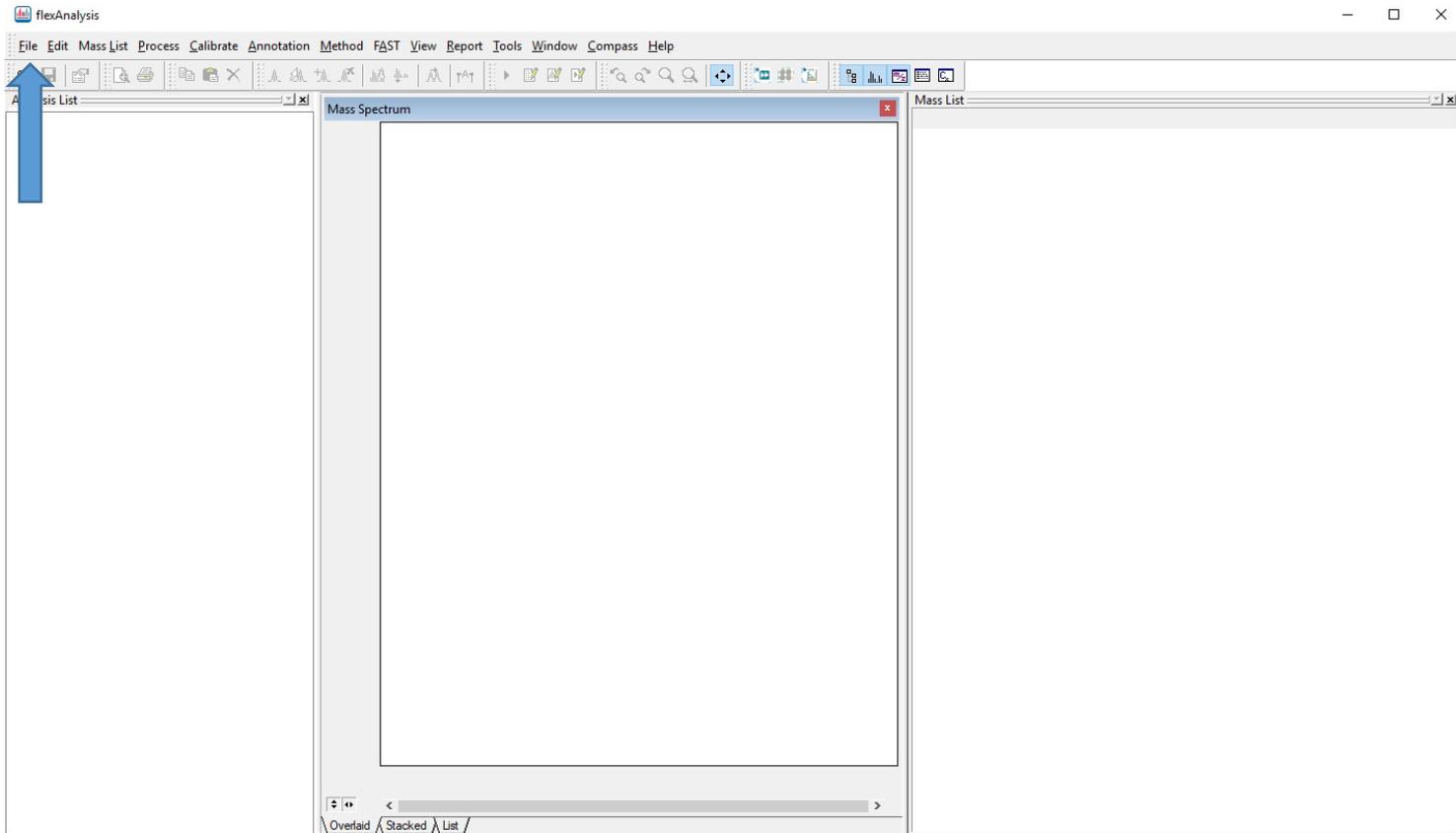
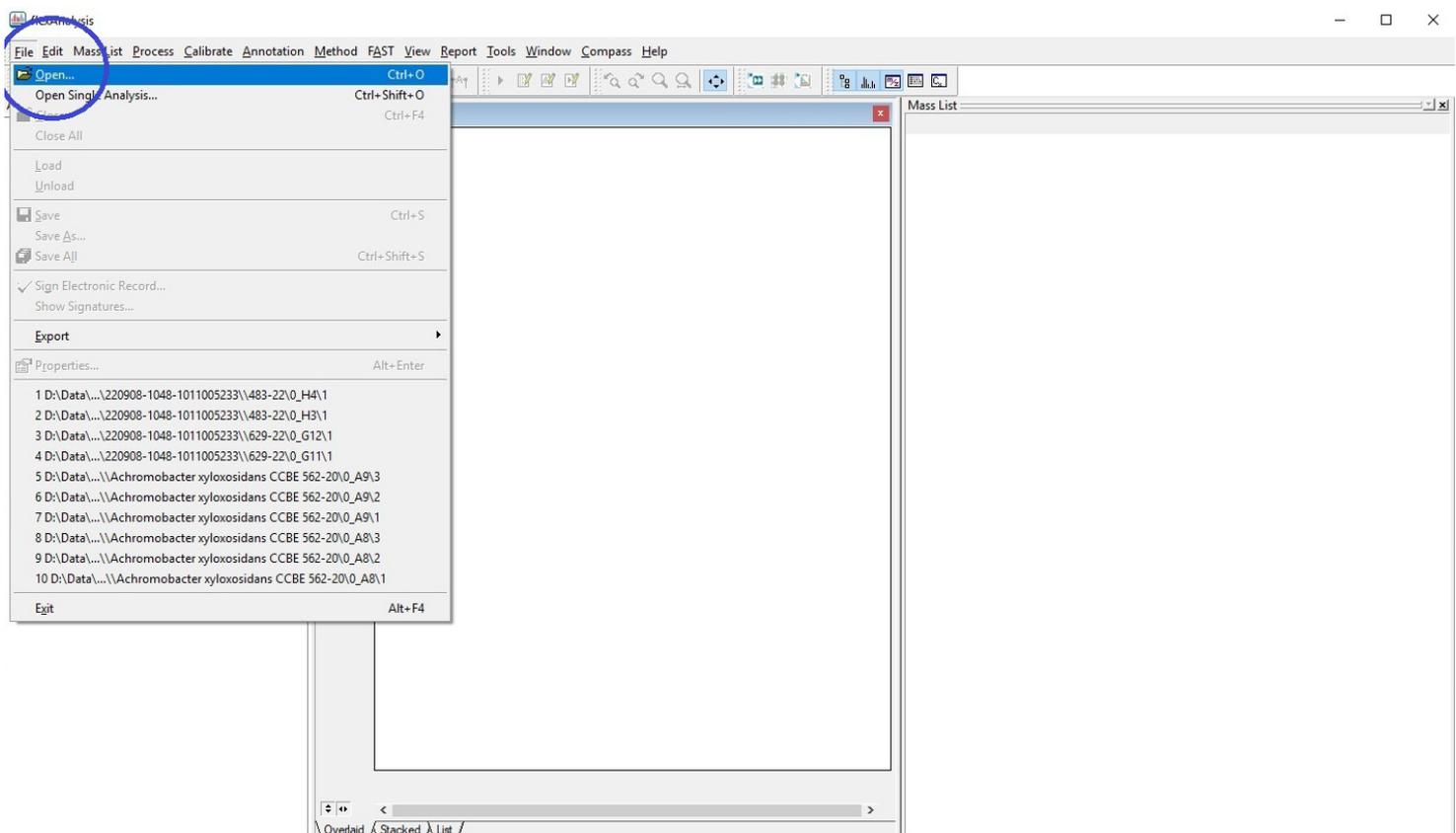


Figura 3. Procedimiento para la identificación de picos marcadores de STEC O157:H7 utilizando el software Flex análisis v3.4

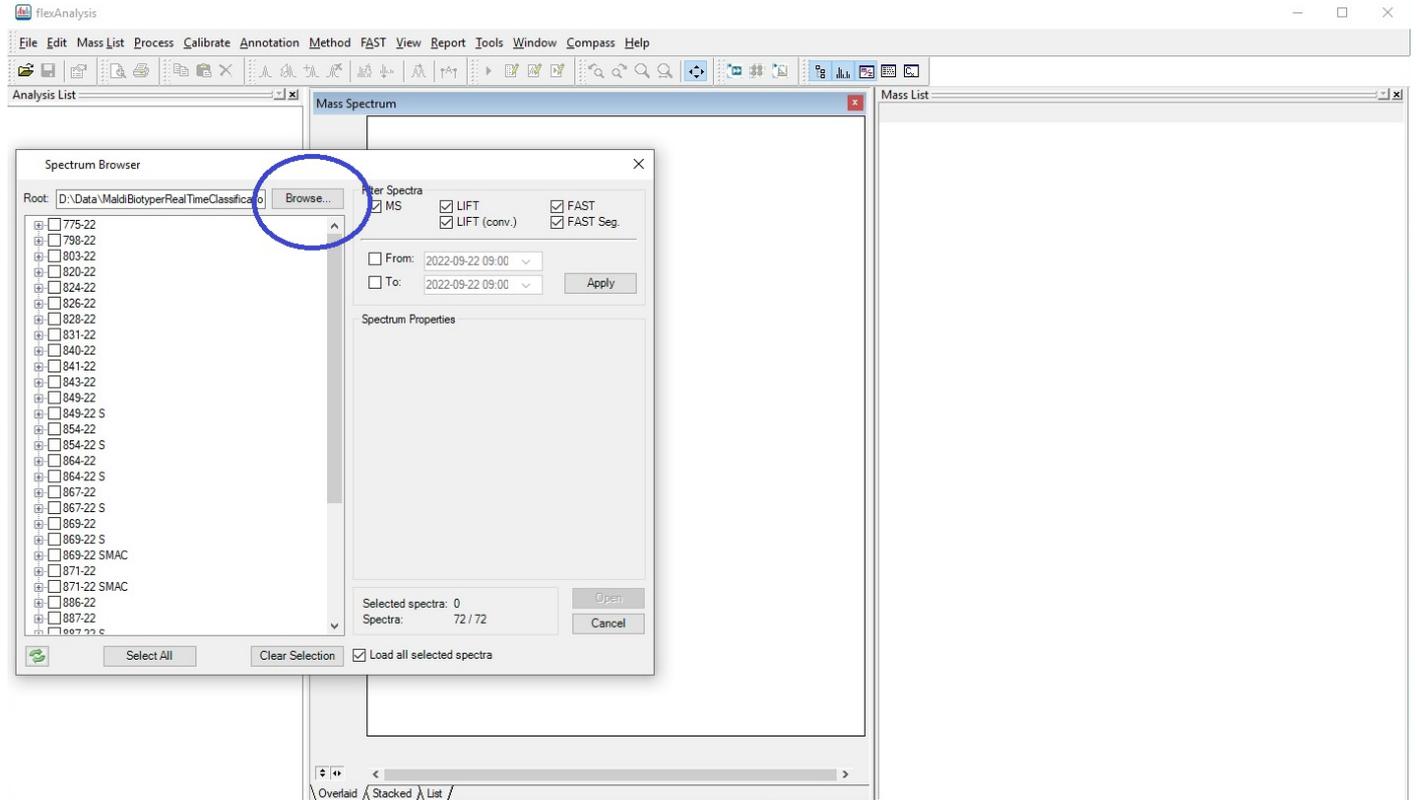
Abrir el software Flex análisis y seleccionar File



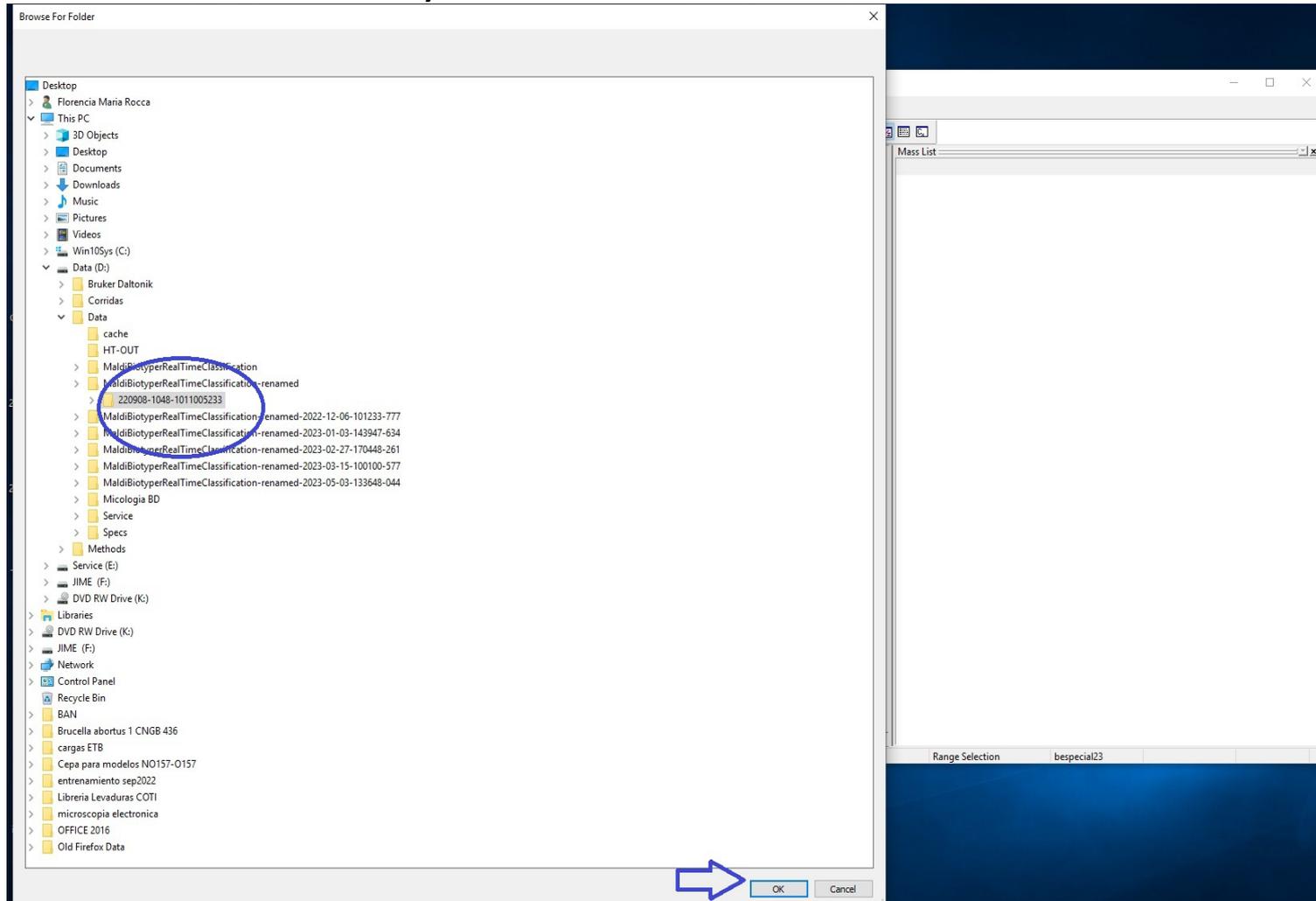
Seleccionar open



Seleccionar Browser



Buscar el archivo de la corrida y marcar ok



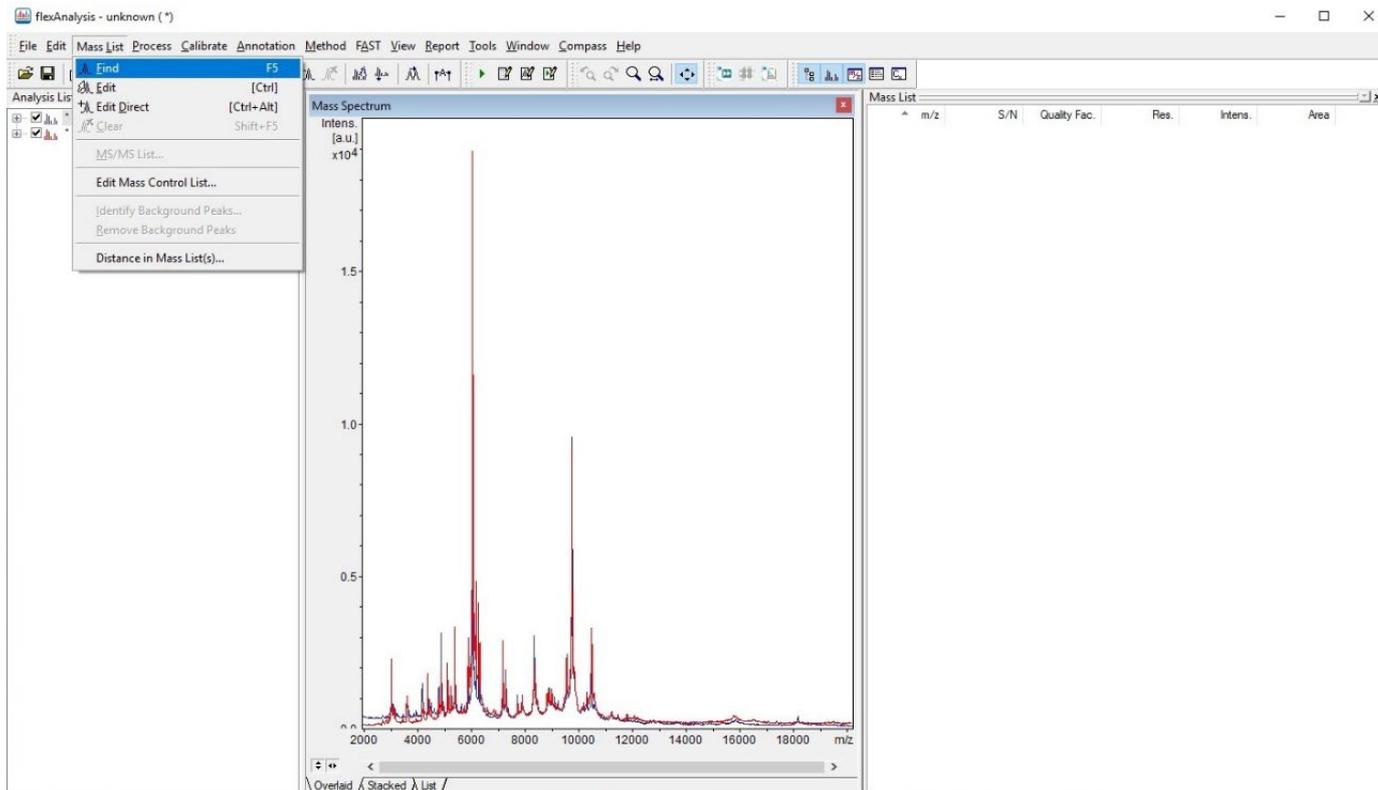
Marcar la muestra a analizar y seleccionar open

The screenshot shows the 'Spectrum Browser' dialog box. The 'Root' is set to 'D:\Data\MaldBiotyperRealTimeClassification'. The list of spectra includes files like '775-22', '798-22', '803-22', '820-22', etc. The 'Filter Spectra' section has checkboxes for 'MS', 'LIFT', 'FAST', 'LIFT (conv.)', and 'FAST Seg.'. The 'From' and 'To' date ranges are both set to '2022-09-22 09:00'. The 'Open' button is circled in blue. The background shows the 'Mass Spectrum' window with a plot.

Colorear la muestra a analizar y seleccionar Mass List

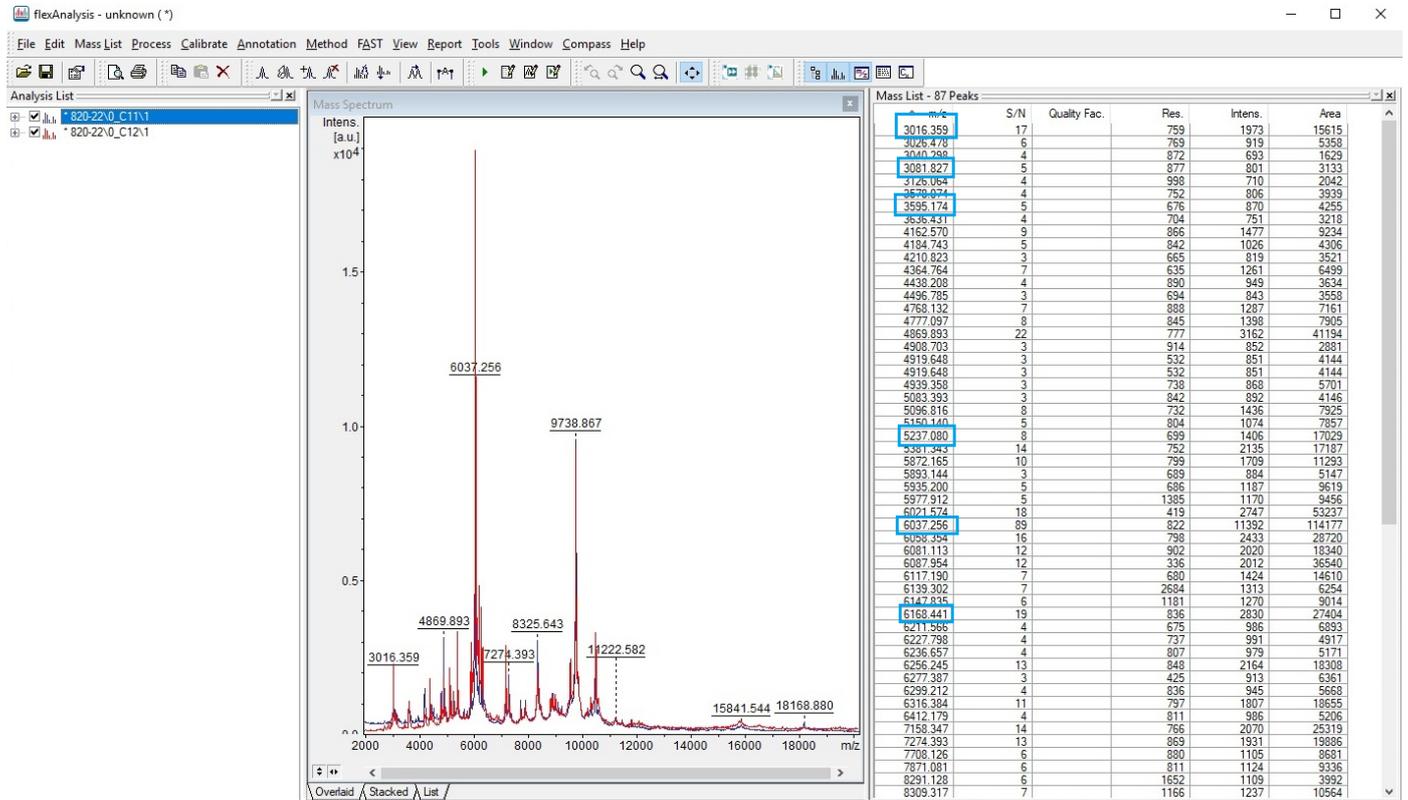
The screenshot shows the software interface. The 'Analysis List' window has '820-22_0_C11\1' selected. The 'Mass Spectrum' window shows a plot of intensity versus m/z. The 'Mass List' window is also visible, showing columns for m/z, S/N, Quality Fac., Res., Intens., and Area. A blue arrow points to the '820-22_0_C11\1' entry in the 'Analysis List' window.

Seleccionar Find



Desplegar la tabla en orden creciente de picos

Espectro de picos de una cepa STEC O157:H7



Espectro de picos de una cepa de E. coli o Shigella

