

Guía para la identificación de STEC O157:H7 utilizando espectrometría de masa con el Equipo VITEK MS

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 VITEK MS en sus versiones prime o legacy (Biomérieux).

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 descartable provista por el fabricante

Palillo de madera de punta fina

Placas de agar SMAC

PROCEDIMIENTO (figura 1)

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.
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 descartable proporcionada por el fabricante del Equipo Vitek MS Prime.

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. Sembrar colonias patrón incubadas 24h proveniente de agar sangre en los pocillos para tal fin
8. Añadir en cada spot de la placa 1 µl de solución matriz.
9. Dejar cristalizar aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Incorporar los datos de las muestras en el equipo según la planilla de siembra.
11. Introducir la placa en el Equipo Vitek MS Prime.
12. Comenzar la corrida en el Equipo.
13. Observar en la pantalla de la PC que se encuentra conectada al equipo, el resultado de la determinación de género y especie por IVD
14. Continuar con el análisis del espectro de picos, si se identifica *Escherichia coli*

B-Identificación de picos marcadores de STEC O157:H7

B.1-Procedimiento. (Ver figura 3)

1. Solicitar análisis RUO
2. Abrir SARAMIS
3. Seleccionar el aislamiento a determinar los picos
4. Doble clic
5. Se abre otro cuadro seleccionar el aislamiento
6. Doble clic
7. Seleccionar COMPARISON
8. Se despliega la tabla en orden creciente de los picos comparando los IVD con RUO con el error correspondiente
9. Utilizar el listado de picos de RUO del aislamiento en estudio (lista del medio)
10. Identificar los picos biomarcadores (Ver tabla 1) y anotar la presencia o ausencia de picos $m/z \pm 2$ 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
<p>Presencia</p> <p>10163-10168 m/z</p> <p>5234-5238 m/z</p> <p>Ausencia de pico 9060 m/z</p> <p>(o presencia de baja intensidad < 2.000.000)</p> <p>Acompañado generalmente por la presencia de tres o más de los 9 picos:</p> <p>3017m/z 3083m/z 3595m/z 3770m/z 4012m/z 4939m/z 5238m/z 6037m/z 6169m/z</p>	<p>STEC <i>E. coli</i> O157:H7</p>	<p>Identificación de <i>stx</i> y serotipificación con antisueros anti-O157 y anti-antígeno flagelar H7.</p> <p>Derivación de la muestra de materia fecal y aislamiento al LNR</p>
<p>Presencia de los picos</p> <p>10137-10142 m/z</p> <p>5229-5232 m/z</p> <p>9060 m/z</p> <p>y generalmente menos de 2 picos</p> <p>3017m/z 3083m/z 3595m/z 3770m/z 4012m/z 4939m/z 5238m/z 6037m/z 6169m/z</p>	<p><i>Shigella</i> spp. u otra <i>E. coli</i></p>	<p>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.</p> <p>Derivación de la muestra de materia fecal y aislamiento al LNR</p>

Observaciones

-Si no se encuentran picos biomarcadores o hay duda repetir el ensayo.

- Si con la repetición del mismo se continua con la no obtención de picos, o hay duda en el resultado 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.

-Si se presentan picos mixtos, salvo el 9060m/z (picos de baja intensidad) con picos característicos de STECO157, los demás corresponden a otras *E.coli/Shigella*

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 mass spectrometry directly from the isolate, using 10 potential biomarkers peaks and machine learning predictive models. *Journal of Medical Microbiology* 2023;72:001675. DOI 10.1099/jmm.0.001675

Figura 1

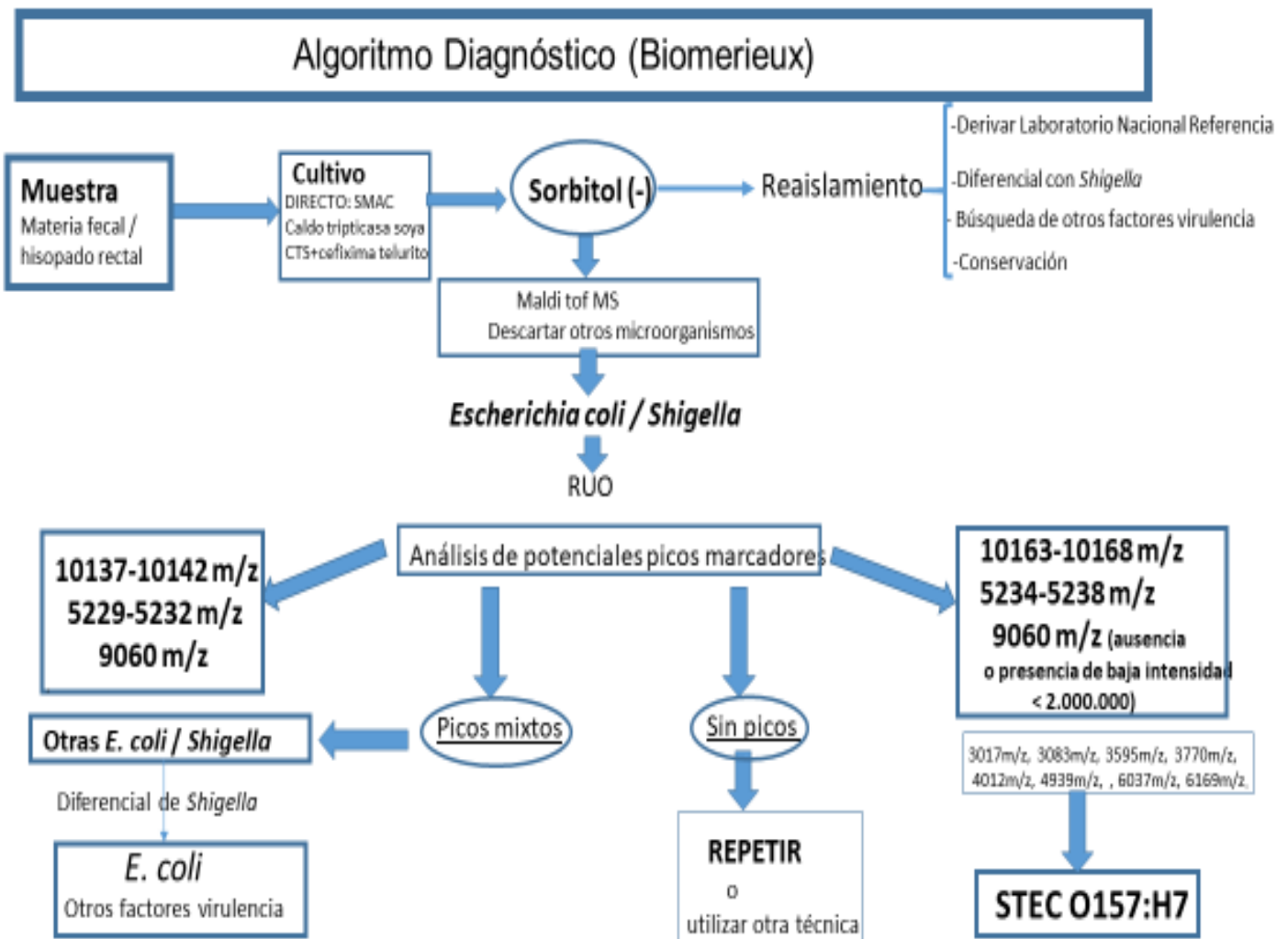
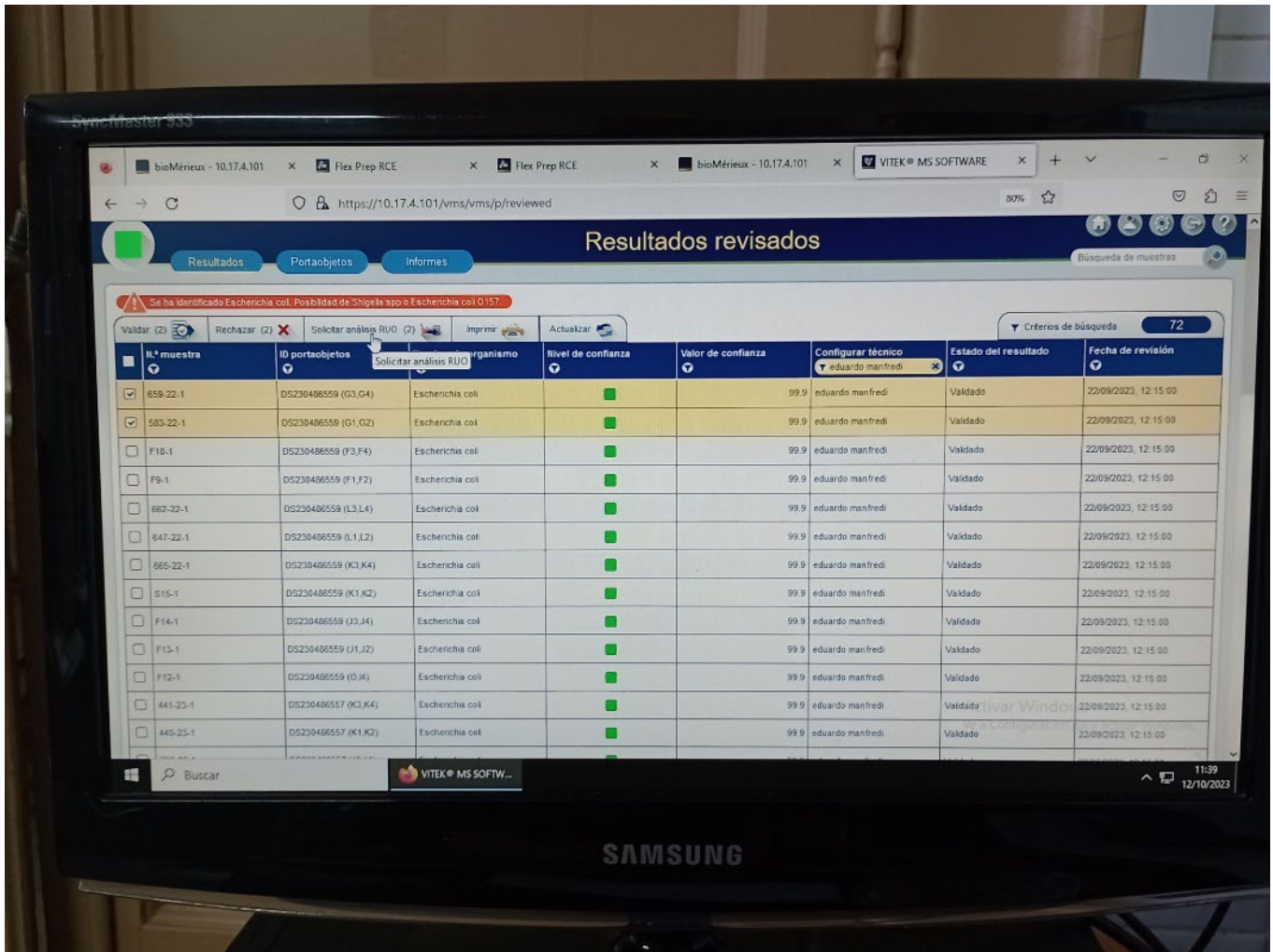
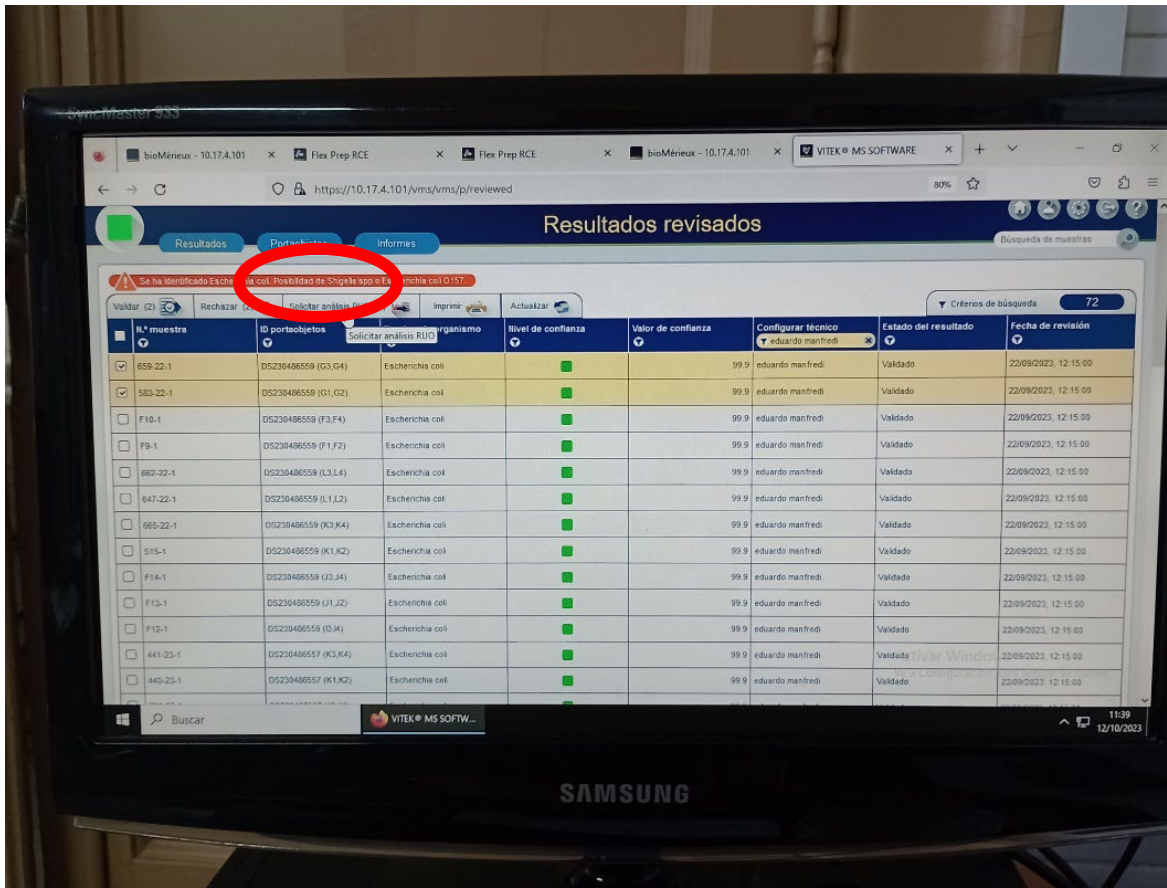


Figura 3. Procedimiento para la identificación de picos marcadores de STEC O157:H7 utilizando RUO

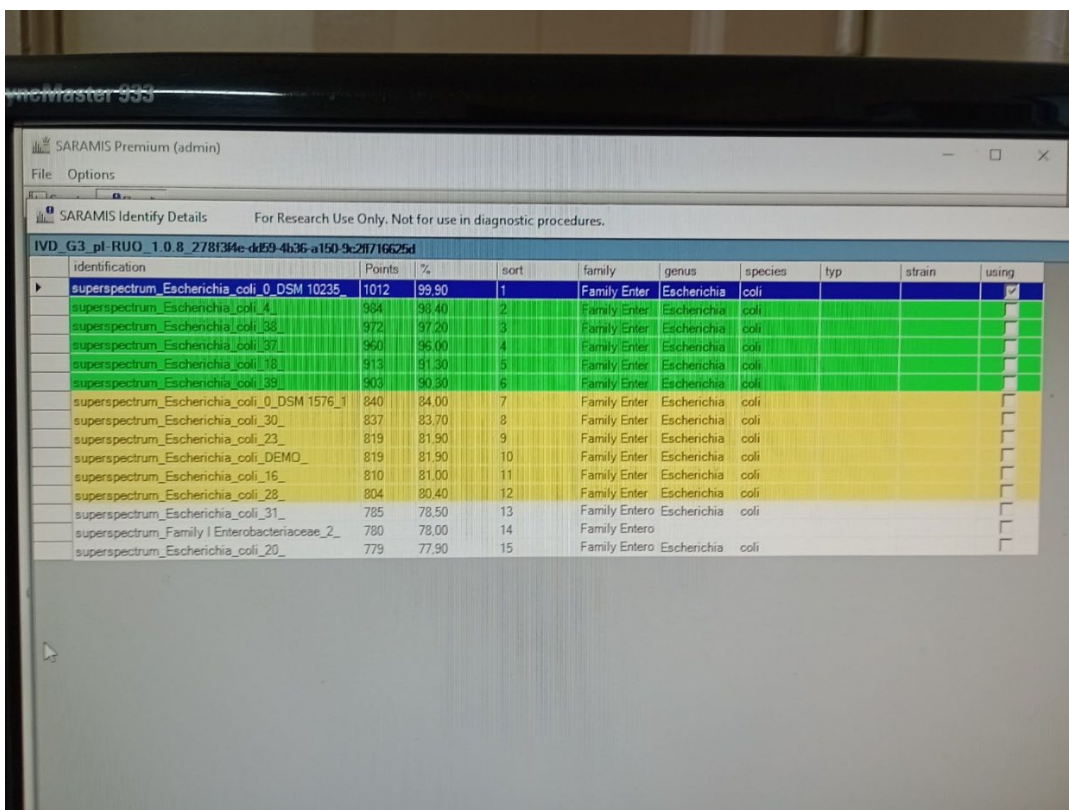
-Determinación género-especie



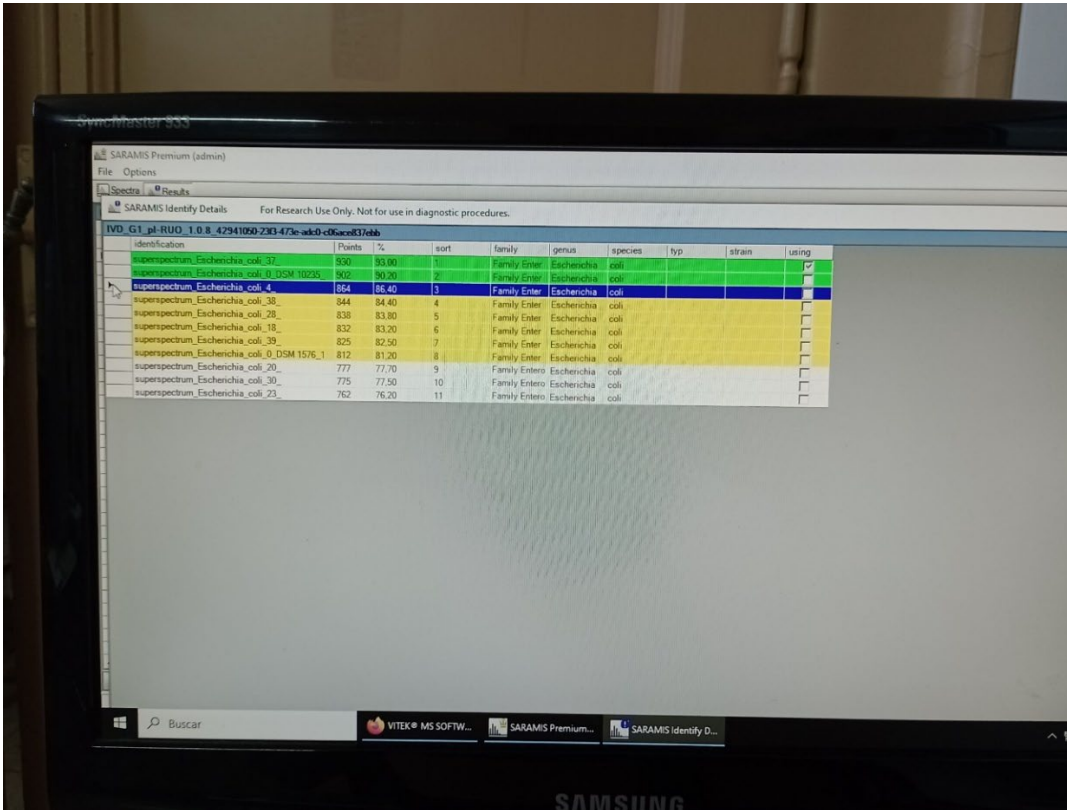
-Solicitar análisis RUO



-Abrir SARAMIS



-Doble clic (azul)



-Doble clic (azul)

-Comparison

-Listado picos orden creciente RUO

