



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Desarrollo de un candidato a material de referencia para la detección y cuantificación de *Escherichia coli* *O157:H7* por PCR

Claudia Patricia Tere Peña

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá D.C., Colombia

2020

Desarrollo de un candidato a material de referencia para la detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7 por PCR

Claudia Patricia Tere Peña

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Maestría en Ciencias Bioquímica

Directora:

Ph. D. Química Martha Nancy Calderón Ozuna

Codirector:

M. Sc. Bioquímica John Emerson Leguizamón Guerrero

Línea de Investigación:

Metrología en Bioanálisis

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Metrología Química y Bioanálisis (GIMQB)

Bioquímica y Biología Molecular de Micobacterias (BBMM)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá D.C., Colombia

2020

Dedico este trabajo a quienes creen en lo que hacen y motivan a los demás a seguir sus sueños.

“La educación es el arma más poderosa que se puede utilizar para cambiar el mundo.”

Nelson Mandela

Agradecimientos

Dedico esta tesis a todos aquellos que creyeron en mí y me apoyaron durante todo este proceso.

A mi familia, especialmente a mis padres, José Rubén Tere Cañón y Graciliana Peña Ballén, por su guía, motivación y apoyo incondicional. A mis hermanos, Jenny Consuelo Tere Peña y Rubén Darío Tere Peña, por inspirarme y motivarme a seguir adelante.

A mi pareja, Jhon Jairo Galán Rincón, por su cariño, paciencia, comprensión, motivación, apoyo, inspiración y por la pasión con la que hace las cosas.

A la Universidad Nacional de Colombia por la mejor formación académica, profesional y personal, que me ha permitido obtener muchos logros. Además de la financiación de los estudios de Maestría como asistente docente. Al Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia por la formación como científica y como persona.

A COLCIENCIAS por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado "Desarrollo de materiales de referencia o biometrológicos para la detección de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en productos agroindustriales del programa de transformación productiva", avalado en la convocatoria "Convocatoria 745 para proyectos de CTel y su contribución a los retos de país 2016"

A la DIB - Dirección de Investigación Sede Bogotá por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado "Búsqueda de marcadores génicos de las enterobacterias *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella spp.* de aplicabilidad en los protocolos de control sanitario en Colombia" (Código: 37670), avalado en la convocatoria "Convocatoria Nacional de Proyectos para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018"

A la Profesora Martha Nancy Calderón por ser mi directora de tesis y ser una gran guía. Por sus enseñanzas y confianza durante el desarrollo de la investigación. Gracias por todos los consejos académicos, profesionales y personales.

A John Emerson Leguizamón Guerrero por ser mi co-director de tesis, por su guía y enseñanzas. Por ser una gran persona y por la inspiración a aprender cada día más.

Al Grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias por el entrenamiento, formación y crecimiento personal. Además de todos los momentos compartidos con mis compañeros Carolina Villamil, Vanesa Vásquez, Marcela López, Cristian Rosales, Milena Maya y Paola Santos de quienes aprendí muchas cosas.

Al Grupo de Metrología en Bioanálisis del Instituto Nacional de Metrología por facilitar el espacio, las herramientas y el entrenamiento necesario para la validación del método de medición y la producción piloto del material de referencia. En especial a María Mercedes Arias Cortés por su apoyo y comprensión.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia por toda la colaboración brindada.

Al laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud por la donación de los ADN de Salmonella y a Magdalena Wiesner por su asesoría en el cultivo de microorganismos.

Resumen

E. coli O157:H7 es una bacteria enterohemorrágica productora de toxinas Shiga capaz de desencadenar enfermedades como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica. Se ha encontrado asociada a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, por lo que es importante garantizar su ausencia en toda la cadena productiva de los productos agroindustriales a través del uso de sistemas de medición sensibles, rápidos y específicos como la PCR. Actualmente hay diferentes métodos para identificar y cuantificar *E. coli* O157:H7 en varias matrices, pero no existe equivalencia o comparabilidad entre los resultados de las mediciones producidas por estas metodologías, debido a la ausencia de materiales de referencia trazables al sistema internacional de unidades.

Con el objetivo de contribuir a la comparabilidad y trazabilidad de las medidas realizadas por métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos, se produjo en Colombia por primera vez un candidato a material de referencia (MR) de ADN genómico de *E. coli* O157:H7. Luego de optimizar las condiciones de cultivo y extracción de ADN del microorganismo se prepararon dos lotes con concentraciones de 172 ± 30 copias/ μ L y 164864 ± 13096 copias/ μ L ($U_{\alpha=0,95}; k=2$), los que demostraron ser homogéneos y estables durante 3 meses. En la caracterización del candidato a MR se empleó un método por PCR digital en modo gota, previamente validado para detectar y cuantificar ADN de *E. coli* O157:H7 en un intervalo de medición de 8 a 8000 copias/ μ L con incertidumbre de medición entre 1.5 a 10% según el nivel de concentración.

El material de referencia producido se podría emplear para el control de calidad de las medidas realizadas por PCR tiempo real, permitiendo establecer equivalencias entre los resultados de medición obtenidos por los distintos ensayos comerciales y garantizar la trazabilidad al sistema internacional de unidades.

Palabras clave: *E. coli* O157:H7, cuantificación absoluta, material de referencia, validación de método, PCR digital.

Abstract

The *E. coli* O157: H7 is an enterohemorrhagic bacteria producing Shiga toxin. It can trigger diseases such as hemolytic uremic syndrome (HUS) and hemorrhagic colitis. It has been found associated with outbreaks of foodborne illness. Therefore, it is important to ensure their absence in the production chain of agroindustrial products through the use of sensitive, fast and specific measurement systems such as PCR. There are currently different methods to identify and quantify *E. coli* O157: H7 in several matrices, but there is no equivalence or comparability between the results of the measurements produced by these methods, due to the absence of traceable reference materials to the international system of units.

In order to contribute to the comparability and traceability of the measures carried out by methods based on nucleic acid amplification, a candidate for reference material (MR) of genomic DNA from *E. coli* O157: H7 was first made in Colombia. After optimizing the culture and DNA extraction conditions of the microorganism, two batches were prepared with concentrations of 172 ± 30 copies / μL and 164864 ± 13096 copies / μL ($U_{\alpha=0,95}; k=2$), they proved to be homogeneous and stable for 3 months. In the characterization of the MR candidate a method was used by digital PCR in droplet mode, validated to detect and quantify *E. coli* O157: H7 DNA in a measurement range of 8 to 8000 copies/ μL with measurement uncertainty between 1.5 to 10% depending on the concentration level.

The reference material produced could be used for the quality control of the measurements made by real-time PCR, allowing to establish equivalences between the measurement results obtained by the different commercial tests and guarantee traceability to the international system of units.

Keywords: *E. coli* O157: H7, absolute quantification, reference material, method validation, digital PCR.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XVIII
Introducción	1
Justificación	3
1. Marco Teórico	5
1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	5
1.2 <i>Escherichia coli</i>	6
1.2.1 <i>E. coli</i> O157:H7.....	7
1.3 Importancia del control microbiológico.....	8
1.4 Métodos de análisis.....	9
1.4.1 Método de referencia: Cultivo de microorganismos	10
1.4.2 Métodos alternativos.....	11
1.5 Reacción en cadena de la polimerasa.....	12
1.5.1 Fundamento	12
1.5.2 Clasificación de la PCR	12
1.5.2.1 PCR en tiempo real	13
1.5.2.2 PCR digital.....	14
1.5.3 Ventajas y limitaciones	15
1.5.4 Aplicaciones	16
1.6 Métodos de detección comerciales	17
1.7 Aseguramiento de calidad	19
1.7.1 Trazabilidad metrológica.....	19
1.7.2 Validación de métodos analíticos.....	21
1.7.2.1 Parámetros de validación	21
1.7.2.2 Niveles de validación	22
1.7.3 Materiales de referencia	23
1.7.3.1 Producción de materiales de referencia.....	25
1.7.3.2 Homogeneidad	25
1.7.3.3 Caracterización.....	25
1.7.3.4 Estabilidad.....	26
2. Objetivos	27

2.1	Objetivo General:.....	27
2.2	Objetivos específicos:	27
3.	Materiales y métodos.....	29
3.1	Reactivos y materiales.....	29
3.2	Detección y cuantificación de <i>E. coli</i> O157.....	30
3.2.1	Selección de genes y diseño de oligonucleótidos.....	30
3.2.2	Análisis de fragmentos génicos de <i>E. coli</i> O157:H7.....	31
3.2.2.1	Amplificación de los fragmentos por qPCR.....	31
3.2.2.2	Intervalo lineal y eficiencia de amplificación	31
3.2.2.3	Selectividad oligonucleótidos.....	31
3.2.2.4	Equivalencia simplex y dúplex.....	32
3.2.3	Optimización del método	33
3.2.4	Validación del método	34
3.3	Cultivo de <i>E. coli</i> O157:H7 y extracción de ADN.....	35
3.3.1	Reconstitución de cepas y control de calidad	35
3.3.2	Optimización condiciones de cultivo	36
3.3.2.1	Caracterización del preinóculo	37
3.3.2.2	Caracterización del cultivo masivo	37
3.3.3	Extracción de ADN a gran escala	38
3.3.4	Obtención ADN para el candidato a MR.....	38
3.4	Producción piloto de un candidato a material de referencia	39
3.4.1	Preparación de lotes.....	39
3.4.1.1	Etiquetado y envasado.....	40
3.4.1.2	Almacenamiento muestras	40
3.4.2	Determinación de cantidad mínima de muestra.....	40
3.4.3	Estudio de homogeneidad.....	40
3.4.3.1	Homogeneidad entre viales.....	41
3.4.3.2	Homogeneidad dentro de viales	41
3.4.4	Asignación valor de referencia	41
3.4.1	Estudio de estabilidad a corto plazo	42
4.	Resultados y discusión	43
4.1	Detección y cuantificación de <i>E. coli</i> O157.....	43
4.1.1	Selección de genes y diseño de oligonucleótidos.....	43
4.1.2	Evaluación de oligonucleótidos por qPCR.....	46
4.1.2.1	Intervalo lineal y eficiencia de amplificación	48
4.1.2.2	Selectividad de oligonucleótidos.....	50
4.1.2.3	Equivalencia dúplex simplex por qPCR	53
4.1.3	Optimización de método para cuantificación por PCR digital	54
4.1.3.1	Temperatura de anillamiento	55
4.1.3.2	Digestión enzimática	57
4.1.3.3	Concentración de primers	58
4.1.3.4	Intervalo de trabajo.....	59
4.1.3.5	Equivalencia simplex-dúplex y rampas de temperatura	62
4.1.4	Validación de método para cuantificación por PCR digital.....	67
4.1.4.1	Intervalo lineal y límite de cuantificación.....	67
4.1.4.1	Límite de detección	69
4.1.4.2	Precisión	70
4.1.4.3	Incertidumbre	71

4.2	Cultivo y extracción de ADN	73
4.2.1	Evaluación crecimiento de cepas <i>E. coli</i> O157:H7	73
4.2.2	Caracterización preinóculo	75
4.2.3	Caracterización del cultivo masivo	77
4.2.4	Extracción de ADN	80
4.2.5	Obtención de ADN para candidato a material de referencia	81
4.2.5.1	Evaluación de calidad	82
4.2.5.2	Cuantificación por PCR.....	84
4.3	Producción candidato a material de referencia	85
4.3.1	Preparación lotes piloto	85
4.3.1.1	Etiquetado y envasado	86
4.3.2	Determinación de cantidad mínima de muestra	86
4.3.3	Estudio de homogeneidad	87
4.3.3.1	Homogeneidad entre viales	87
4.3.3.1	Homogeneidad dentro de viales	89
4.3.4	Estabilidad a corto plazo	89
4.3.1	Asignación del valor y estimación de incertidumbre	92
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	98
5.1	Conclusiones.....	98
5.1	Perspectivas.....	99
5.2	Recomendaciones.....	99
	Anexo A: Cepario y extracción de ADN.....	101
	Anexo B: Análisis de secuencias de primers.....	107
	Anexo C: Análisis secuencias modo dúplex	113
	Anexo D: Análisis estadístico	119
	Anexo E: Datos producción piloto	123
	Bibliografía	125

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Cadena de trazabilidad metrológica	20
Figura 3-1: Diseño experimental para estimar el valor de referencia	42
Figura 3-2: Diseño experimental estudio de estabilidad a corto plazo	42
Figura 4-1: Amplificación de fragmentos por qPCR.	47
Figura 4-2: Fragmentos amplificados por qPCR.	47
Figura 4-3: Curvas de temperatura de fusión de fragmentos amplificados.	48
Figura 4-4: Linealidad de secuencias amplificadas por PCR tiempo real.	49
Figura 4-5: Perfil de amplificación de ADN 1ng/μL por qPCR.	50
Figura 4-6: Perfiles de amplificación de genes de E. coli O157:H7 por ddPCR	54
Figura 4-7: Concentración estimada por genes de E. coli O157:H7 por ddPCR.	55
Figura 4-8: Efecto de temperaturas de anillamiento en cuantificación	56
Figura 4-9: Amplificación por ddPCR a diferentes temperaturas de anillamiento.	56
Figura 4-10: Cuantificación de ADN IRMM 449® con y sin digestión enzimática	58
Figura 4-11: Efecto de concentración de primers en poblaciones de dPCR	58
Figura 4-12: Efecto de concentración de primers en la cuantificación	59
Figura 4-13 Perfiles de amplificación en función de la concentración de ADN.	60
Figura 4-14 Intervalo lineal cuantificación E. coli O157:H7 por ddPCR.	61
Figura 4-15: Diagrama de poblaciones de gotas en modo dúplex por ddPCR.	63
Figura 4-16 Perfiles de poblaciones en modo simplex vs dúplex de genes <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	64
Figura 4-17 Equivalencia simplex dúplex por ddPCR de genes.	65
Figura 4-18: Efecto de rampas de calentamiento en perfiles de poblaciones	66
Figura 4-19: Intervalo lineal cuantificación de ADN por ddPCR	67
Figura 4-20: Determinación límite de detección de método por ddPCR.	69
Figura 4-21: Fuentes de incertidumbre asociadas a la cuantificación	72
Figura 4-22: Incertidumbre de medida para cada nivel de concentración	73

Figura 4-23: Colonias de <i>E. coli</i> O157:H7 en agares.....	74
Figura 4-24: Crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en preinóculo de 50 mL.	76
Figura 4-25: Crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en diferentes volúmenes de preinóculo.....	77
Figura 4-26: Crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en 300 mL de medio ECB+n.....	78
Figura 4-27: Concentración y calidad de ADN <i>E. coli</i> O157:H7 en función del tiempo	79
Figura 4-28: Integridad de ADN de <i>E. coli</i> O157:H7.....	81
Figura 4-29. Espectro UV-VIS de ADN de <i>E. coli</i> O157:H7.....	82
Figura 4-30: Electroforesis de ADN <i>E. coli</i> O157:H7.....	83
Figura 4-31. Estimación concentración Stock ADN por ddPCR.....	84
Figura 4-32: Diseño de etiqueta de los lotes del material preparado.....	86
Figura 4-33: Volumen mínimo de muestra para cuantificación.....	87
Figura 4-34: Estudio de homogeneidad entre botellas.....	88
Figura 4-35: Estudio de homogeneidad intrabotellas.....	89
Figura 4-36: Estabilidad a corto plazo de lotes del piloto de <i>E. coli</i> O157:H7.....	90
Figura 4-37: Concentración estimada para cada lote.....	94
Figura 4-38: Principales fuentes de incertidumbre en lotes.....	95
Figura 4-39. Aporte incertidumbre para los lotes evaluados.....	95
Figura 4-40. Fuentes incertidumbre asociadas a la caracterización.....	96

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Plataformas comerciales para detección y cuantificación de <i>E. coli</i>	18
Tabla 3-1 ADN de cepas usadas en la evaluación de selectividad	32
Tabla 3-2: Medios de cultivo usados para el crecimiento del microorganismo.....	36
Tabla 4-1: Genes usados para la amplificación de <i>E. coli</i> por PCR	43
Tabla 4-2: Análisis <i>in silico</i> de selectividad.....	45
Tabla 4-3: Primers y sondas de <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> O157 por PCR.....	46
Tabla 4-4: Eficiencias de amplificación para de los genes en ADN <i>E. coli</i> O157:H7.....	49
Tabla 4-5: Selectividad de genes por PCR.....	51
Tabla 4-6: Ciclos de amplificación promedio de cada gen en modo dúplex.....	53
Tabla 4-7: Amplificación en modo dúplex de parejas de oligonucleótidos evaluados.....	54
Tabla 4-8 Variación por nivel de concentración en cuantificación por ddPCR	60
Tabla 4-9: Resultados análisis de regresión lineal de genes validados	67
Tabla 4-10: Porcentaje de variación en cuantificación de ADN por ddPCR	68
Tabla 4-11: Variación por repetibilidad en cuantificación de ADN por ddPCR	70
Tabla 4-12: Incertidumbre debida a la precisión.	72
Tabla 4-13: Concentración de <i>E. coli</i> O157:H7 en crioviales	75
Tabla 4-14: Rendimiento de extracción de ADN a partir de cultivos de <i>E. coli</i> O157:H7	80
Tabla 4-15. Diluciones de ADN stock de <i>E. coli</i> O157:H7 derivado de ATCC® 35150	83
Tabla 4-16. Eficiencias de amplificación en ADN <i>E. coli</i> O157:H7.....	84
Tabla 4-17: Códigos asignados a los lotes del piloto de <i>E. coli</i> O157:H7.....	86
Tabla 4-18. Unidades seleccionadas para el estudio de homogeneidad.....	88
Tabla 4-19: Unidades seleccionadas para el estudio de estabilidad a corto plazo.	90
Tabla 4-20: Incertidumbre por estabilidad para los lotes del piloto.....	91
Tabla 4-21: Muestras seleccionadas para establecer el valor de referencia	92
Tabla 4-22: Estimación incertidumbre candidato a material de referencia.	93
Tabla 4-23. Valor asignado e incertidumbre para los lotes evaluados	94

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
μL	Volumen microlitros
~	Aproximadamente
λ	Lambda, copias por partición

Abreviaturas

Abreviatura	Término
%GC	Porcentaje Guanina citosina
[ADN]	Concentración de ADN
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AFNOR	Asociación Francesa para la estandarización, siglas en francés
AOAC	Asociación Oficial de Química Analítica, siglas en inglés
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	Colección americana de tipos de cultivo, siglas en inglés
BBMM	Grupo de investigación en bioquímica y biología molecular de las micobacterias
CM	Cuadrado medio
Codex	Codex Alimentarius
C_q	Ciclos de amplificación
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CT-SMAC	Medio MacConkey Sorbitol suplementado con cefixima y telurito
CV	Coeficiente de variación
ddPCR	PCR digital en modo gotas
Dil.	Dilución
OD	Densidad óptica

Abreviatura Término

<i>dPCR</i>	PCR digital
<i>eaeA</i>	Gen codificante de proteína invasión
<i>ECA</i>	Medio sólido E.C.
ECAD	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
<i>ECB+n</i>	Medio líquido selectivo E.C. suplementado con novobiocina (20mg/L)
ECEA	<i>E. coli</i> enteroagregativas
<i>ECEH</i>	<i>E.coli</i> enterohemorrágicas
ECEI	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ECEP	<i>E. coli</i> enteropatogénicas
ECET	<i>E. coli</i> enterotoxigénicas
ECMN	<i>E. coli</i> de meningitis neonatal
ECUP	<i>E. coli</i> uropatogénicas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, siglas en inglés
EMA	Bromuro de Etidio Monoazida
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
EP	Error
ERM	Materiales de Referencia Europeos, siglas en inglés.
ETA	Enfermedades transmitidas por alimentos
FA	Falta de ajuste
FAO	Organización de alimentos y agricultura, siglas en inglés
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos, siglas en inglés
<i>fliC</i>	Gen codificante de proteína flagelar
GL	Grados de libertad
<i>GUS</i>	Beta-D-glucuronidasa
INS	Instituto Nacional de Salud
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
ISO	Organización Internacional de Estandarización, siglas en inglés
JCTLM	Comité Conjunto de Trazabilidad en Laboratorios de Medicina, siglas en inglés
JRC	Centro Conjunto de Investigación, siglas en inglés
<i>lacY</i>	Gen codificante de proteína lactosa
LOD	Límite de detección
<i>LPS</i>	Lipopolisacáridos

Abreviatura Término

MicroVal	Organización Internacional de certificación de validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y bebidas
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado
NIMJ	Instituto Nacional de Metrología de Japón, siglas en inglés
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, siglas en inglés.
NMP	Número más probable
NordVal	Comité Nórdico en Análisis de alimentos de certificación de validación de métodos
NTC	Blanco de reactivos (No template control)
OMC	Organización Mundial de Comercio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés.
PMA	Propidio de monoazida
qPCR	PCR en tiempo real
Reg	Regresión
Res	Residual
<i>rfbE</i>	Gen codificante proteína membrana
SC	Suma de cuadrados
<i>stx</i>	Gen de toxinas Shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
<i>TE 1X</i>	Buffer Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM
<i>TSA</i>	Medio sólido tripticasa soya, siglas en inglés
<i>TSB</i>	Medio líquido tripticasa soya, siglas en inglés
<i>UFC</i>	Unidades formadoras de colonia
<i>uidA</i>	Gen codificante de β -glucuronidasa
UV	Ultravioleta
VBNC	Microorganismos viables no cultivables
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología
WT	Cepa "wild type" o cepa silvestre
Z3276	Gen codificante proteína frimbial

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un conjunto de dolencias que se presentan tras el consumo de alimentos o agua contaminada con agentes patógenos[1]. Se han reportado 31 peligros alimentarios debidos principalmente a bacterias, virus y parásitos[2]. La organización mundial de la salud (OMS) reporta que al menos 1 de cada 10 personas en el año sufren de alguna ETA. De 600 millones de casos en el mundo, las enfermedades diarreicas representan cerca del 90%, de estas el 64% son debidas a bacterias [3].

Se estima que cerca de 2'801.000 casos anuales son debidos a cepas de *E. coli* productoras de Toxina Shiga (EHEC) [4]. Dentro de este grupo, la cepa *E. coli* O157:H7 puede conducir a enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH), colitis hemorrágica o la muerte [5]. La contaminación con *E. coli* O157:H7 se ha relacionado principalmente, con el consumo de carne bovina y aviar, lácteos y vegetales frescos [6].

Debido al aumento en el comercio internacional de alimentos y el riesgo de ETA, se hace necesario el desarrollo de estrategias para verificar y controlar la inocuidad microbiológica del alimento durante todo el proceso de producción y comercialización, con el fin de disminuir el riesgo alimentario sin afectar el intercambio económico [7]. El método estándar para la detección de patógenos en alimentos es el método de cultivo, sin embargo, este presenta dificultades en cuanto a la sensibilidad, la gran cantidad de pasos para aislar el microorganismo y el tiempo de análisis, ya que requieren de varios días para el análisis de una muestra, lo que puede repercutir en la posible pérdida de cargamentos de alimento. En los últimos años, con el fin de superar estas dificultades se han desarrollado y validado múltiples métodos alternativos como los métodos inmunoenzimáticos, métodos basados en ácidos nucleicos y basados en proteínas, que pueden hacer los análisis de microorganismos más rápido que el método estándar de cultivo [8].

El método con mayor proyección para uso de manera rutinaria en análisis microbiológico de alimentos es la PCR en tiempo real (qPCR) por su sensibilidad, rapidez y alta selectividad

debida a la amplificación específica de genes de microorganismos [9]. Actualmente se cuenta con múltiples ensayos comerciales para la identificación y cuantificación de distintos patógenos en alimentos [10]–[14]. La comparabilidad y trazabilidad metrológica se logra al emplear materiales de referencia certificados en las mediciones de microorganismos patógenos en alimentos, lo que además contribuye a la confianza de los resultados permitiendo tomar decisiones acertadas frente a la comercialización de productos alimenticios. Para la cuantificación por qPCR no se cuenta con materiales de referencia certificados (MRC) que contribuyan a establecer la equivalencia o comparabilidad entre los resultados de las mediciones producidos por distintos ensayos [5,9]. Por lo tanto, la investigación, desarrollo y regulación de productos alimenticios juega un papel importante en la comercialización de productos agropecuarios y en la inocuidad de los alimentos. En el mercado se encuentran diferentes materiales de referencia de ADN a nivel plasmídico [16] o genómico [17] y MR de ARN[18], sin embargo, debido a que muchos de estos no se encuentran certificados o se encuentran certificados en identidad, no es posible establecer la cadena de trazabilidad de dichos resultados y por lo tanto no son comparables desde el punto de vista metrológico.

La variabilidad inherente de los materiales biológicos presenta desafíos para establecer estándares para sistemas de modelos *in vitro* como la PCR y para establecer procesos que cumplan con los lineamientos ISO para su producción [19]. Un estudio de comparación internacional realizado entre institutos de metrología demostró una excelente comparabilidad entre los resultados de PCR digital (dPCR) y qPCR, en general, la dPCR mostró mejor precisión [20]. Por lo anterior, varios institutos de metrología están utilizando ahora la dPCR como método de referencia para asignar valores a los MRC que producen, permitiendo diseminar la trazabilidad metrológica al mol, en las mediciones realizadas por los laboratorios de rutina a través del uso de dichos MRC en la calibración realizada en los ensayos moleculares cuantitativos [21].

Justificación

El programa Colombia Productiva ha identificado alimentos en el sector agroindustrial con alto potencial de exportación como la trucha, tilapia, carne bovina, productos lácteos, chocolatería, confitería y materias primas de estos, piña y aguacate Hass [22]. Por esta razón, se están desarrollando estrategias que contribuyan al fortalecimiento de estos sectores para hacerlos más productivos y competitivos, dentro de estas se busca el desarrollo de mecanismos que contribuyan a la eliminación de las barreras fitosanitarias.

Dentro de los parámetros de calidad asociados a un producto alimenticio se encuentran su valor nutricional y su inocuidad. Cada país, establece la normativa para garantizar la calidad en los productos comercializados a nivel interno siguiendo los lineamientos de organizaciones internacionales como la comisión del Codex Alimentarius (Codex), la organización mundial de la salud (OMS), la organización de alimentos y agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la organización mundial de comercio (OMC) [23].

En Colombia el Instituto Nacional de Salud (INS) y el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) son las entidades encargadas de realizar la vigilancia y establecer los lineamientos normativos para el control de microorganismos en alimentos [24]. La normatividad de Colombia, presenta límites para coliformes totales hasta 150 ufc/g[25], y no existe regulación frente a la *E. coli* O157:H7 [26]. Mientras que, en Corea, Estados Unidos y en la Unión Europea exige el uso de pruebas microbiológicas para la detección específica de cepas de *E. coli*, entre ellas la *E. coli* entero hemorrágica O157:H7, así como ausencia total de las toxinas Shiga liberadas [27], [28]. Las diferencias en las regulaciones frente al contenido máximo permisible de microorganismos en alimentos representan una barrera fitosanitaria.

El país actualmente cuenta con métodos de medición de patógenos en alimentos [29] que no son lo suficientemente rápidos y sensibles. Los resultados se dan en unidades de número más probable (NMP) o unidades formadoras de colonia (UFC), no trazables al SI. Por lo tanto,

es necesario la producción de materiales de referencia certificados que contribuya la comparabilidad y trazabilidad de resultados obtenidos por diferentes laboratorios.

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la producción piloto de un candidato a material de referencia, el cual podría ser empleado para la detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7, permitiendo asegurar la trazabilidad y comparabilidad del resultado obtenido por distintos ensayos comerciales. Adicionalmente, se validó un método por PCR digital modo gotas (ddPCR) para la detección y cuantificación de *E. coli* O157:H7. Estas herramientas biometrológicas contribuirán el fortalecimiento del monitoreo de seguridad alimentaria.

1. Marco Teórico

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un conjunto de patologías que se desarrollan tras el consumo de agua o alimentos contaminados con sustancias o microorganismos patógenos. Generalmente presentan síntomas agudos como náuseas, vómito y diarrea, o enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades de riñón e hígado, y desordenes cerebrales o neuronales, o en el peor de los casos la muerte [2].

Según un reporte de la OMS, las ETA son causadas por 31 agentes patógenos dentro de los cuales hay bacterias, virus, parásitos, toxinas y sustancias químicas [30]. Se clasifican en tóxicas e infecciosas, cuando son causadas por un agente químico tóxico natural o sintético, o por contaminación con microorganismos patógenos respectivamente [31].

La incidencia de ETA ha aumentado en el tiempo a nivel mundial, se estima que 1 de cada 10 personas en el mundo sufre una ETA al año, y aproximadamente 420000 personas mueren a consecuencia de la enfermedad. En Colombia en el año 2018 se presentaron 11502 casos de ETA [32]. Debido a la morbilidad, mortalidad y costos económicos que las ETA generan se hace necesario el desarrollo de políticas y medidas sanitarias para su control [7].

En distintos países del mundo, las ETA más comunes se encuentran aquellas causadas por variedades enterotóxicas y enteropatogénicas de *Escherichia coli* [33]. Puede estar presente en alimentos frescos como vegetales y frutas, o procesados como productos cárnicos y lácteos. Puede producir enfermedades como diarrea aguda, síndrome urémico hemolítico o enfermedad renal en etapa terminal [34]. Por lo anterior es necesario analizar la presencia de patógenos, que permita asegurar el consumo de alimentos minimizando la incidencia de ETA, estos análisis requieren que se realicen bajo los mejores estándares de calidad, que permitan dar resultados precisos y confiables.

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria tipo bacilo perteneciente a la familia de las enterobacterias, Gram negativa, es móvil peritrica, ya que cuenta con múltiples flagelos, y tiene un tamaño aproximado de 0.5-3.0 μm . Es una bacteria con actividad catalasa positiva, no cuenta con capacidad oxidasa y puede reducir los nitratos a nitritos. Es anaerobia facultativa, fermenta la glucosa y lactosa con producción de gas [35], [36].

E. coli presenta múltiples serotipos y aunque la mayoría de las cepas no son patógenas, algunas son causantes de enfermedades en el tracto intestinal u otros órganos como gastroenteritis, infecciones en vías urinarias, torrente sanguíneo y sistema nervioso central [37]. *E. coli* se encuentra principalmente en la flora intestinal de los mamíferos y; rara vez en el medio ambiente, pero puede sobrevivir varias horas en distintos ambientes extra intestinales. Debido a esto, este microorganismo es usado como indicador de contaminación fecal en alimentos [38].

E. coli es un microorganismo que ayuda al procesamiento de residuos, producción de vitamina K y la absorción de los alimentos, pero bajo ciertas condiciones pueden generar diversas condiciones patológicas. Las cepas patógenas de *E. coli* se clasifican según los mecanismos comunes de patogenicidad en enteropatógenas (ECEP), entero hemorrágicas o verotoxigénicas (ECEH), enterotoxigénicas (ECET), entero invasivas (ECEI), entero agregativas (ECEA) y de adherencia difusa (ECAD), las anteriores generalmente asociadas a diarreas, *E. coli* uropatogénicas (ECUP) y *E. coli* de meningitis neonatal (ECMN) [35]. Los síntomas generados por la bacteria se caracterizan por dolor abdominal, fiebre y diarrea con sangre, generada tras 24 h de la infección. En algunos casos se puede generar necrosis intestinal, síndrome urémico hemolítico, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía debido a la acción de cepas virulentas [39].

La infección ocurre cuando el microorganismo ingresa al ingerir alimentos o agua contaminada, dirigiéndose al intestino delgado, donde se adhiere a la superficie de las células epiteliales del intestino por medio de los pilis [40]. Tras la unión, la bacteria debe irrumpir los procesos de la célula invadida, generalmente usando proteínas de virulencia secretadas, las cuales afectan los canales transportadores de distintos iones que, a su vez, causan arreglos al citoesqueleto e inhiben cotransportadores importantes para la célula. Las cepas ECEH

inyectan toxinas tipo Shiga (*stx*) o verotoxinas que contribuyen al avance de la enfermedad [41].

El método de referencia para realizar la identificación y cuantificación de *E. coli* se basa en normas ISO 16649 en las que se describe el método para la enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa positiva en medios cromogénicos [42], [43]. La detección de *E. coli* por el método de cultivo se hace por la técnica de número más probable (NMP). En este método se realiza una serie de diluciones seriadas hasta obtener cero bacterias en la muestra, posteriormente son sembradas en un agar de crecimiento para visualizar la cantidad de unidades formadoras de colonia y a partir de los resultados se puede estimar el número más probable de microorganismos presentes en la muestra inicial, con base en un parámetro estadístico [44]. La *E. coli* se confirma mediante la siembra de colonias presuntivas en un agar selectivo que permite diferenciar entre especies fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Las colonias de *E. coli* se observan amarillas en el Agar Tergitol 7, rosadas en el agar MacConkey (MAC) y de púrpura a verde metálico en el agar Eosina Azul de Metileno (EMB) [45].

1.2.1 *E. coli* O157:H7

Es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Escherichia*. Es productora de toxinas tipo Shiga, Shiga 1 (*stx1*) y Shiga 2 (*stx2*), que causan la destrucción de glóbulos rojos obstruyendo los riñones, desencadenando el síndrome urémico hemolítico (SUH) y en algunos casos accidentes cerebrovasculares [41]. Los niños, personas de edad avanzada y personas inmunocomprometidas tienen mayor susceptibilidad a infecciones por *E. coli* [5].

Aunque el crecimiento de las *E. coli* se da entre 10 °C a 46°C, se ha visto que *E. coli* O157 tiene mecanismos genéticos que le permiten crecer a temperaturas bajas (<15°C) comparadas con cepas no patogénicas de *E. coli*. Esto le permite sobrevivir semanas o meses en carne, frutas, helado y yogurt cuando son almacenados de -18°C a -20°C. Un método de identificación de *E. coli* O157 se encuentra la norma ISO 16654:2001 [46], en donde emplean para su identificación los genes *stx1*, *stx2* codificantes de las proteínas del mismo nombre, y el gen *fliC* que codifica el antígeno flagelar H7. Otro método para la identificación de *E. coli* O157 y otros serotipos ECEH se describe en la ISO 13136:2012, en donde tras el

enriquecimiento del microorganismo se realiza la detección de virulencia y serotipificación con genes relacionados [47].

Aunque la detección de *E. coli* O157:H7 en el producto final no reduce el riesgo para los consumidores, debido a la liberación de toxinas Shiga, el análisis microbiológico en la cadena de producción puede reducir la contaminación fecal y los riesgos alimentarios. Los alimentos en donde frecuentemente se ha encontrado *E. coli* O157 que representan un peligro de salud pública son la carne vacuna cruda o poco cocinada, carne picada o fermentada y derivados, leche cruda y sus derivados crudos o sin pasteurizar, productos frescos como semillas germinadas, zumos de frutas y hortalizas sin pasteurizar [48].

1.3 Importancia del control microbiológico

El aumento de comercio internacional, viajes y comunicación masiva ha potenciado la globalización y a su vez, aumentado el riesgo de seguridad alimentaria, lo que hace necesario garantizar la inocuidad de alimentos a nivel mundial. Esto contribuiría la protección de los consumidores a nivel mundial y facilitar los intercambios comerciales de alimentos. Las organizaciones que han contribuido en el establecimiento de legislación para el control de inocuidad de alimentos a nivel mundial son el Codex, la OMS, la FAO [23].

Además, la Organización Mundial de Comercio (OMC) estableció un acuerdo en el que los países pueden definir y registrar medidas fitosanitarias de los alimentos, estos requerimientos deben basarse en conocimiento científico, con el fin de velar por la seguridad de los consumidores y las transacciones comerciales equitativas [23], [49].

La vigilancia epidemiológica de las ETA es una importante herramienta que proporciona la información necesaria para implementar estrategias que fortalezcan las medidas fitosanitarias, y a su vez, mejorar la seguridad alimentaria, salud y vida de los consumidores. Es así, que cada país establece unos requerimientos fitosanitarios para la importación de alimentos desde otras partes del mundo, siguiendo los lineamientos establecidos por distintas organizaciones gubernamentales como el *Codex Alimentarius*. El *Codex* proporciona la información necesaria para garantizar la seguridad de alimentos como los requerimientos técnicos, procedimientos a realizar y el uso de estándares, entre otros.

Cuando se presenta incumplimiento de los requerimientos fitosanitarios establecidos, los cargamentos de alimento contaminado, generalmente, son devueltos a su país de origen

emitiendo una alerta de seguridad alimentaria [50], que puede afectar la imagen comercial del país exportador. Aunque Colombia tiene gran potencial en el sector agrícola, la exportación de productos agroindustriales ha presentado dificultades por el incumplimiento de los requerimientos fitosanitarios exigidos en los países de destino, debido a que los umbrales máximos permitidos no son los mismos. De acuerdo con cifras de Proexport Colombia entre 2001-2012, para el total de alimentos rechazados por la FDA para ingresar a Estados Unidos, el 32% fue por etiquetado, 24% por adulteración, 12% por plaguicidas, 9% por condiciones higiénicas y 8% por bacterias entre otros [51]. En Holanda y España se han reportado 3 alertas de comida para perros contaminada con *Salmonella* y *Enterobacteriaceae* [52]

Los requerimientos fitosanitarios establecidos en Colombia son altos con respecto a los internacionales, por ejemplo para *Escherichia coli* se acepta de 10 a 400ufc/g de pescados, para jugos se piden menos de 10 ufc/g o ml de jugos o pulpas de fruta [53]. Mientras que en los países con los que Colombia tiene tratados de libre comercio, se encuentra que para coliformes se exige una prueba microbiológica para la detección específica cepas de *E. coli*, entre ellas la enterohemorrágica *E. coli* O157:H7 [27]. En el exterior se está solicitando ausencia de serotipos de *ECEH* debido a que se encuentra relacionada con carnes contaminadas o lácteos sin pasteurizar [27], [28]. Por lo que se debe contar con una técnica lo suficientemente sensible para su detección.

Las diferencias en la regulación entre Colombia y los países destino de las exportaciones, constituye una barrera que conlleva la necesidad de desarrollar métodos que permitan el cumplimiento de los estándares internacionales de calidad de los alimentos producidos en el país. Actualmente varios países han empezado a implementar sistemas de control para la verificación de inocuidad microbiológica en alimentos, que emplea técnicas moleculares, automatizadas y rápidas que realizan la detección, identificación y cuantificación de microorganismos [54].

1.4 Métodos de análisis

Actualmente hay una amplia variedad de métodos para el análisis microbiológico de alimentos, cada uno de ellos cuenta con distintos enfoques basados en propiedades medibles de los microorganismos. Los métodos usados se pueden clasificar en métodos convencionales o alternativos. Los métodos convencionales son ampliamente usados y se consideran como métodos de referencia, se basan en la identificación de características fenotípicas de los

microorganismos. Los métodos alternativos se basan en el análisis y reconocimiento de macromoléculas en los microorganismos, éstos tienden a ser más rápidos y sensibles que los métodos convencionales [55].

1.4.1 Método de referencia: Cultivo de microorganismos

El cultivo de microorganismos es considerado como referencia ya que se encuentra ampliamente caracterizado y se usa en la mayoría de laboratorios de análisis. El análisis por cultivo requiere del (i) enriquecimiento, (ii) siembra en medios selectivos y/o diferenciales, (iii) conteo de unidades formadoras de colonia para estimar la concentración del microorganismo [56], y (iv) la identificación del microorganismo mediante análisis bioquímico [57]. La identificación fenotípica se basa en la observación de características de la bacteria como morfología, desarrollo, sensibilidad a antimicrobianos, propiedades bioquímicas y metabólicas, entre otros, mediante el aislamiento del microorganismo [58]. El límite de detección de esta técnica está del orden de 10 a 100 ufc/g [59].

Dependiendo del tiempo de crecimiento y de la capacidad del organismo para crecer en diferentes medios, el tiempo análisis se requieren de 3 a 5 días para hacer un análisis preliminar, y más de una semana para la confirmación de la especie de microorganismo. Este método se ve limitado cuando el microorganismo que se desea analizar es difícil de cultivar por dificultades en imitar las condiciones óptimas de crecimiento y lo anterior puede llevar a detección de falsos negativos [60]. En el caso de *E. coli* genérica, hay varios protocolos en los que se describe el recuento de *E. coli* o coliformes totales por la técnica de NMP, conteo en placa o filtración por membrana. Para la identificación de otras especies patogénicas de *E. coli*, después de realizar el protocolo de identificación bioquímica se requieren métodos de genotipificación [42].

Aunque el método de cultivo ofrece ventajas como la facilidad en el análisis de resultados y su bajo costo, presenta diversas limitaciones como (i) alta manipulación de la muestra (ii) contaminación cruzada, (iii) retardo en la obtención resultados, ya que, el análisis puede tardar de 3 a 5 días, (iv) presencia de falsos positivos o negativos que conducen a una inadecuada estimación de microorganismo en la muestra, (v) baja sensibilidad ya que se basa en la observación de unidades formadoras de colonia que no necesariamente provienen de un único microorganismo [60].

1.4.2 Métodos alternativos

Debido a las limitaciones presentadas por el método tradicional de cultivo de microorganismos, en las últimas décadas se han desarrollado metodologías alternativas que son más rápidas, específicas y sensibles [61]. Permiten hacer la distinción de células viables y analizar algunas cepas viables pero no cultivables [60]. Con la incorporación del uso de materiales de referencia durante el procesamiento hacen que los resultados obtenidos sean comparables en el tiempo y espacio [62], [63]. Estos métodos se basan en el análisis de macromoléculas presentes en los microorganismos patógenos de interés. Se encuentran métodos basados en proteínas, ácidos nucleicos, fluorescencia o biosensores [64].

Los biosensores son dispositivos capaces de reconocer distintos analitos como enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos y receptores de células. Constan de un bioreceptor y un transductor que convierte la señal biológica en señal eléctrica, pueden ser ópticos [65], electroquímicos [66] o basados en masa. Los biosensores son simples de manejar y no requiere de pre enriquecimiento cómo otras técnicas [67],[68].

Los métodos inmunológicos se basan en la interacción selectiva entre antígeno-anticuerpo. Usan anticuerpos monoclonales o policlonales marcados con un compuesto fluorescente o una enzima que permiten detectar y medir. Los ensayos más usados en la detección de patógenos son el de inmunoadsorción ligado a enzimas, comúnmente conocido como ELISA [8], [69], y el inmunoensayo de flujo lateral [59].

La espectrometría de masas permite la identificación de microorganismos según la presencia de proteínas específicas para cada microorganismo [70]. Por ésta técnica se pueden obtener límites de detección de 10^6 - 10^7 ufc/ml [71]. Los espectros obtenidos son comparados con bases de datos permitiendo la identificación del microorganismo a nivel de género [72].

Los métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos detectan secuencias específicas de ADN o ARN del microorganismo patógeno en el alimento [54]. En los últimos años, los métodos basados en ácidos nucleicos han reemplazado o complementado gradualmente los métodos basados en cultivo y los inmunoensayos en los laboratorios que realizan control de alimentos [73], [74]. Las metodologías que amplifican ácidos nucleicos son rápidas, y presentan ventajas en la cuantificación frente a los métodos basados en proteínas, así como una especificidad mayor debido al uso de primers y sondas específicas, lo cual aumenta la sensibilidad del proceso de detección [55].

1.5 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es una técnica de biología molecular que permite la amplificación de múltiples copias de secuencias de interés de ADN en una serie de ciclos de denaturación, anillamiento y elongación [75]. La detección del producto se puede hacer por fluorescencia o mediante electroforesis en gel de agarosa. Es capaz de replicar pequeñas cantidades de ADN usando enzimas polimerasas sin la necesidad de un organismo vivo [76].

1.5.1 Fundamento

Para llevar a cabo una reacción de PCR se requiere una plantilla de ADN que contenga la región de interés a amplificar, un par de cebadores o primers que flanqueen los extremos de la región que se desea amplificar, una o una mezcla de polimerasas de ADN que realicen la amplificación (usualmente se usa Taq polimerasa), desoxinucléotidos para que la polimerasa genere nuevos polímeros de ADN, cationes que son cofactores usados por las enzimas y un buffer que proporcione las condiciones adecuadas para que se lleve la reacción [76]. Los genes que se usan generalmente como dianas moleculares son altamente conservados, presentes en un amplio grupo de bacterias, que permiten identificar o clasificar el microorganismo [77], [78].

La reacción de PCR generalmente se lleva a cabo en un termociclador, el cual realiza aproximadamente 35 ciclos de (i) calentamiento hasta 96°C permite la disociación de los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las dos hebras de la cadena de ADN. (ii) disminución de la temperatura permite el anillamiento de los primers a las secuencias de ADN. (iii) la extensión de la hebra de ADN por acción de la polimerasa a partir de los primers insertados, este paso se lleva a cabo según la temperatura óptima de la enzima. El tiempo requerido por el ensayo varía según el tamaño del fragmento a amplificar, así como de la procesividad de la enzima [76].

1.5.2 Clasificación de la PCR

La PCR ha tenido una evolución a través del tiempo desarrollando metodologías de mayor sensibilidad. En la primera generación de la PCR denominada convencional, se observan los productos de amplificación mediante geles de agarosa. La segunda generación denominada cuantitativa, emplea fluoróforos que permiten hacer el seguimiento de la reacción en función

del tiempo midiendo la intensidad de fluorescencia [60]. La tercera generación denominada PCR digital (dPCR), permite determinar la concentración de ácidos nucleicos en número de copia con alta precisión [79].

Debido a la versatilidad de la técnica, se han generado múltiples variaciones de la PCR con aplicaciones en distintos campos [76]. Las más usadas en análisis microbiológico de alimentos son PCR cuantitativa tiempo real (qPCR) y PCR digital, ya que permiten identificar y cuantificar microorganismos en distintas muestras [80],[81]. La primera generación de la PCR en la que la reacción de amplificación se lleva a punto final y los productos se visualizan mediante gel de electroforesis en agarosa se denomina PCR convencional. Es una técnica sencilla que permite hacer la detección de secuencias específicas presentes en diversas muestras.

1.5.2.1 PCR en tiempo real

La qPCR es una variación de la PCR convencional en la que se requiere el uso de fluoróforos que permiten hacer el seguimiento de la reacción en tiempo real. Los fluoróforos más usados para la detección por este método son el SYBR Green, sondas Taqman y Molecular Beacons. El SyBR Green es un intercalante fluorescente inespecífico que al interactuar con el zurco menor de la hebra doble de ADN emite una señal fluorescente proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Debido a que es inespecífico, no discrimina entre las secuencias de interés y otras secuencias amplificadas durante el desarrollo de la PCR como la formación de dímeros de primers u otras secuencias amplificadas por uniones inespecíficas entre los primers y secuencias de ADN [82].

Las sondas TaqMan son oligonucleótidos con secuencia complementaria a ADN de interés. Poseen en su extremo 5' un fluoroforo y en su extremo 3' un enmascarante de fluorescencia, que cuando se encuentran cerca no emite fluorescencia. Cuando la sonda se une a región intermedia del ADN objetivo, la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa cliva la sonda y separando el fluoroforo del enmascarante. Así se genera la fluorescencia en función de la cantidad de ADN de manera específica, ya que sólo se unen a secuencias amplificadas del ADN blanco [83]. Las sondas Molecular Beacon son cadenas sencillas de oligonucleótidos con la forma de una horquilla, que se genera por complementariedad entre secuencias de pares de bases en cada extremo de la sonda, y un loop en donde se encuentra la secuencia complementaria al ADN de interés. Cuando la sonda se acerca a la molécula de ADN de interés, la horquilla se abre y se genera la fluorescencia. Este tipo de sonda al igual que las TaqMan son específicas para detección de secuencias amplificadas por PCR [84].

La sensibilidad de la PCR depende de la especificidad, la secuencia y la temperatura de anillamiento de los primers diseñados. La elección de la sonda no afecta tanto la sensibilidad del método, aunque el uso de éstas hace la qPCR mucho más sensible que la PCR convencional y minimiza el riesgo de contaminación cruzada [85]. Se han cuantificado múltiples patógenos por qPCR como la detección de *Salmonella spp.* en vegetales y frutas recién cortadas con un límite de detección (LOD) de 4 ufc/25g [86], cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos, con un LOD de 10^2 ufc/ml o la cuantificación de *Staphylococcus aureus* en leche cruda con un LOD de 10^4 ufc/ml entre otros. También se han hecho adecuaciones a la PCR múltiplex que permite hacer la cuantificación de microorganismos patógenos en alimentos usando sondas con distintos fluoróforos [65], [87]–[89].

1.5.2.2 PCR digital

El término de “PCR digital” fue usado por Kinzler y Vogelstein para describir un nuevo enfoque para transformar la señal exponencial de la qPCR a una señal lineal adecuada para realizar cuantificación de ADN [90]. Realizaron particiones de las muestras con el fin de realizar la reacción de PCR en placas de 384 pozos, que les proporcionó una medida confiable y cuantitativa de la proporción de secuencias variantes dentro de las muestras de ADN [91].

La PCR digital es una técnica en la que una muestra de PCR convencional es diluida y dividida en múltiples particiones (1000 a 10 millones de micropozos dependiendo la plataforma), se busca que en cada pozo haya 1 molécula de ADN plantilla, aunque puede ocurrir que en algunos pozos no haya plantilla o haya más de una [92], y todos aquellos componentes de una qPCR [90]. Luego se lleva a cabo la reacción de amplificación, posteriormente las secuencias amplificadas son detectadas por fluorescencia en punto final por un escáner, en el que se realiza el conteo de pozos positivos y negativos, lo que permite hacer la cuantificación absoluta de las cantidades de ADN en la muestra inicial al normalizar el resultado, teniendo en cuenta la estadística de la ecuación de Poisson [55]. Esta distribución estadística permite tener en cuenta la probabilidad de que en un pozo de reacción haya más de una hebra plantilla.

La reacción se puede llevar a cabo en un microchip que contienen múltiples pozos de volumen definido, o en micro gotas similar a una emulsión donde cada uno actúa como un mini reactor. Debido al proceso de dilución y partición de la muestra, dPCR es menos sensible a la

presencia de inhibidores, la cuantificación no depende de la eficiencia de la reacción, por lo que permite la medición de ácidos nucleicos con una mejor precisión, sensibilidad y reproducibilidad con respecto a qPCR [9], [93]–[95]. La técnica es altamente sensible para la detección de secuencias de ADN en muy baja concentración, por lo que se puede omitir los procesos de pre-amplificación y en consecuencia disminuye la posibilidad de aumentar tanto la dispersión como el sesgo de los resultados [96].

La dPCR no requiere una curva de calibración para proporcionar un resultado absoluto de cuantificación, lo cual es una gran ventaja frente a qPCR, que sí requiere dicha curva [91], por lo que ha sido considerada como un método potencialmente primario para la cuantificación de ácidos nucleicos [97]. Además, ha mostrado tener mayor precisión en la cuantificación de ácidos nucleicos que la espectrofotometría UV [98]. La cuantificación absoluta de ADN por dPCR es una gran ventaja, ya que una precisa estimación de la concentración de ADN en una muestra es un paso crítico para muchos procesos analíticos [99], desafortunadamente es una técnica costosa, por lo que no es viable que sea empleada de manera rutinaria en los laboratorios.

1.5.3 Ventajas y limitaciones

Las principales ventajas de la PCR es su alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad [92]. Además, es una técnica rápida comparada con el tradicional método de cultivo para análisis microbiológico. Éstas características permiten obtener bastante información a partir de poca muestra [55]. Debido a su versatilidad, la PCR tiene múltiples aplicaciones en clínica, industria e investigación [92], [100]–[102]. Es una técnica que permite la detección de microorganismos viables pero no cultivables (VBNC), los cuales no son detectables por el método de cultivo [103].

Los métodos basados en amplificación de ácidos nucleicos, tienen parámetros analíticos compatibles con los métodos estándar para análisis microbiológico, por lo que sólo se requiere de validación y estandarización para su implementación en la detección de microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos [102], [104]. Por esto, actualmente son reconocidos y estandarizados por las directrices de la ISO 22118:2011 para el análisis de patógenos en alimentos.

La qPCR requiere de una curva de calibración preparada con un patrón de concentración conocida para para la cuantificación absoluta. Muchos de estos patrones son elaborados por

laboratorios como patrones de trabajo internos o controles positivos, que sirven como verificadores del método, pero no ofrecen resultados comparables en caso de que sean realizados por otros laboratorios [60].

Una de las desventajas de la PCR, es que requiere de múltiples pasos para hacer el análisis, y estos son posibles fuentes de error, principalmente la extracción y cuantificación de ADN. Para superar esta falencia se han desarrollado varios controles, como el uso de un control interno de amplificación (IAC). Este es un control interno exógeno positivo que permite hacer una revisión ante la ausencia de plantilla [105] y sirve como control de pipeteo, pero no sirve como control de todo el procedimiento desde la extracción. Un tipo de control ideal sería aquel que evaluara todo el procedimiento, capaz de crecer en todos los medios pero que crezca a una tasa inferior al microorganismo blanco y que pase por todas las etapas de análisis donde posteriormente se detectaría selectivamente con el objetivo. Aunque actualmente no se ha reportado ninguno con éstas características [55].

Otra dificultad es que la PCR no discrimina entre ADN de organismos vivos e inviables. Aunque avances recientes utilizan un colorante intercalante de ADN previo a la extracción de ADN. Los intercalantes más usados en este propósito son propidio de monoazida (PMA) y bromuro de etidio de monoazida (EMA), los cuales ingresan a las células inviables por permeabilidad de la membrana, luego por un proceso de fotólisis se unen covalentemente al ADN de la célula inviable e impiden la acción de la polimerasa durante la amplificación, cuantificando así sólo células viables [106]–[108]. Finalmente, se ha observado que la amplificación de genes multicopia, como 16S, puede llevar a errores en la cuantificación, por esto se prefieren genes unicopia en las células a amplificar. El uso de genes multicopia disminuye los límites de detección del microorganismo, haciéndolos útiles para la detección, pero no para cuantificación [102].

1.5.4 Aplicaciones

La PCR tiene múltiples aplicaciones como la identificación de varias especies de bacterias patógenas en alimentos [109], identificación de serotipos de microorganismos [59], obtención de información sobre la presencia de genes importantes para la virulencia o la resistencia a los antibióticos, sirve para detectar importantes patógenos transmitidos por los alimentos para los que no se dispone de otros métodos, por ejemplo, virus patógenos [55].

La qPCR es una importante herramienta en la detección de patógenos. Sin embargo, el uso de diferentes componentes de reacción, materiales de calibración y métodos de extracción, dificultan la comparabilidad entre los resultados de diversos laboratorios. Lo anterior puede conducir a diagnósticos erróneos y tratamientos inadecuados [110], es por esto, que la dPCR tendría un papel importante en el desarrollo de materiales de referencia certificados de ADN para el análisis de patógenos en diversos campos [111].

La dPCR puede ser usada en la identificación, presencia o abundancia de mutaciones raras y cuantificación absoluta de ácidos nucleicos [105]. En el campo clínico ofrece métodos sensibles y reproducibles para realizar pruebas diagnósticas. En la industria de alimentos se usa para determinar la viabilidad, caracterización, cuantificación de cultivos probióticos y cuantificación de patógenos en alimentos [112],[113]. Actualmente es usada en la cuantificación absoluta de diversas muestras de ácidos nucleicos y en la asignación de valor en la producción de materiales de referencia [21], [114]–[120], que son usados para procesos de detección y cuantificación de secuencias de ADN por PCR en tiempo real. Debido al alto interés en esta nueva tecnología se publicó una guía que explica los parámetros a tener en cuenta para la publicación de resultados obtenidos por dPCR [121].

La detección de coliformes en alimentos por qPCR se basa en la amplificación del gen *lacZ* el cual codifica para la enzima β -galactosidasa, ya que estos microorganismos son fermentadores de lactosa [122]. Dentro de este grupo de bacterias se encuentra la *E. coli*, la cual se identifica mediante la actividad enzimática de β -glucuronidasa o por la amplificación del gen *uidA* mediante qPCR [123]. Debido a que una parte de los genes esenciales de *E. coli* se conservan en varias bacterias, es difícil identificar oligonucleótidos para la detección específica de *E. coli*. La detección de las ECEH de las cuales la *E. coli* O157: H7 es la cepa más estudiada, se hace a partir de la amplificación de los genes *stx1* y *stx2* los cuales codifican para las toxinas tipo Shiga, y se encuentran ubicados en el plásmido de virulencia *pO157* [39].

1.6 Métodos de detección comerciales

Debido a los requerimientos fitosanitarios exigidos para la verificación de inocuidad alimentaria en la cadena productiva y la necesidad de métodos más rápidos, precisos y sencillos de implementar. Varios laboratorios han desarrollado kits o métodos comerciales que cumplen con los requerimientos anteriormente mencionados [39], [122], [123].

Para garantizar la validez de los resultados obtenidos por los distintos kits, se requiere de un proceso de validación del método y comparación con un método de referencia. Esto permite establecer si el método propuesto tiene igual o mejor desempeño que el método de referencia usado. Las organizaciones encargadas de certificar la capacidad analítica de un método son AOAC, AOAC IR, en Estados Unidos, AFNOR en Francia, MicroVal y NordVal en Europa [64], [124], [125].

Hay varios métodos alternativos validados para detección identificación y/o cuantificación de *E. coli* en muestras ambientales y alimentos. Para certificar los métodos se requiere evaluar los parámetros de desempeño del método como la exactitud, especificidad, sensibilidad y límite de detección relativo frente al método de referencia. Actualmente hay 11 métodos certificados por AFNOR [126] y 11 métodos certificados por AOAC [127], de los cuales cerca del 60% son basados en PCR. De manera general se reportan LOD de 1 a 3 ufc/25g

Tabla 1-1: Plataformas comerciales para detección y cuantificación de *E. coli*.

Ensayo comercial	ER %	SR %	EsR %	LDR	Referencia
3M Molecular Detection Assay <i>E. coli</i> O157 including H7	77,3	92,7	70,8	0,2-1,0 UFC/25g	[128]
ADIAFOOD <i>E. coli</i> O157:H7	72,1	92,9	66,0	0,4-0,9 UFC/25g	[129]
BAX <i>E. coli</i> O157:H7 MP	89,1	85,2	94,0	0,1-1,7 UFC/25g	[130]
BAX Real-Time PCR Assay <i>E. coli</i> O157:H7	73,6	64,9	90,2	0,1-1,0 UFC/25g	[131]
GeneDisc <i>E. coli</i> O157:H7	77,3	88,1	100	2,5 UFC/25g	[132]
iQ-Check <i>E. coli</i> O157:H7	95,2	96,9	93,3	0,1-0,7 UFC/25g	[133]
MicroSEQ <i>E. coli</i> O157:H7	75,6	74,7	77,8	0,1-0,9 UFC/25g	[134]

Exactitud relativa (ER), Sensibilidad relativa (SR), Especificidad relativa (EsR), Límite de detección relativo (LDR). Los métodos se comparan con el método de referencia ISO 16654.

Cada kit tiene elementos de aseguramiento de calidad como controles positivos, negativos, de extracción de ADN, internos de amplificación o de inhibición que permiten garantizar la validez del resultado. A pesar de esto, se ha visto que diferentes protocolos comerciales generan distintos resultados a partir de la misma muestra [135],[136]. Lo anterior se debe principalmente a la falta de controles positivos en común, ya que cada laboratorio desarrolla su propio control positivo que no es comparable y no tiene un grado de equivalencia con el del otro laboratorio, lo cual tiene distintas implicaciones de tipo legal, económico, social o de salud [137].

1.7 Aseguramiento de calidad

1.7.1 Trazabilidad metrológica

La comparabilidad entre los resultados obtenidos por procesos de medición sólo se logra a través de la trazabilidad metrológica. El vocabulario internacional de metrología (VIM) define la trazabilidad como “la propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida” [138].

En las mediciones biológicas la trazabilidad metrológica se alcanza a través del uso de materiales de referencia certificados (MRC) [15]. Según la norma ISO 17511:2003 el valor asignado a los MRC debe ser trazable hasta una referencia del SI, a través de la secuencia de calibración y asignación de valor en la que la incertidumbre asociada al valor asignado va creciendo de acuerdo a la propagación de incertidumbre (Figura 1-1). Sin embargo, en la mayoría de casos no hay trazabilidad más allá de los procedimientos de medición o las sustancias calibradoras establecidas por el proveedor, así la veracidad del resultado está sujeto a ese nivel de jerarquía hasta que un procedimiento de medición o material de referencia estén disponibles [139].

Dependiendo de la disponibilidad de procedimientos de medición, calibrantes o materiales de referencia, la norma propone 5 casos de trazabilidad. (i) Existe procedimiento de medición primario y uno o más materiales de referencia certificados, lo cuales se usan como calibradores. En este caso, los resultados de medición son trazables al SI. (ii) Existe un procedimiento de medición de referencia por acuerdo internacional, que no es primario, y uno o más materiales de referencia establecidos por acuerdo internacional, cuyos valores han sido asignados por ese procedimiento. En este y los siguientes casos los resultados de medición no son trazables al SI. (iii) Existe un procedimiento de medición de referencia por acuerdo internacional, pero no hay disponibles materiales de referencia por acuerdo internacional. (iv) Existe uno o más materiales de referencia establecidos por acuerdo internacional junto con un protocolo para la asignación de valor, pero no existe un procedimiento de medición de referencia. (v) No hay disponibles, ni materiales, ni procedimientos de medición de referencia por acuerdo internacional. En este caso el proveedor puede establecer sus procedimientos de medición y/o sus calibradores internos, para soportar la asignación de valor a sus productos o ensayo [139].

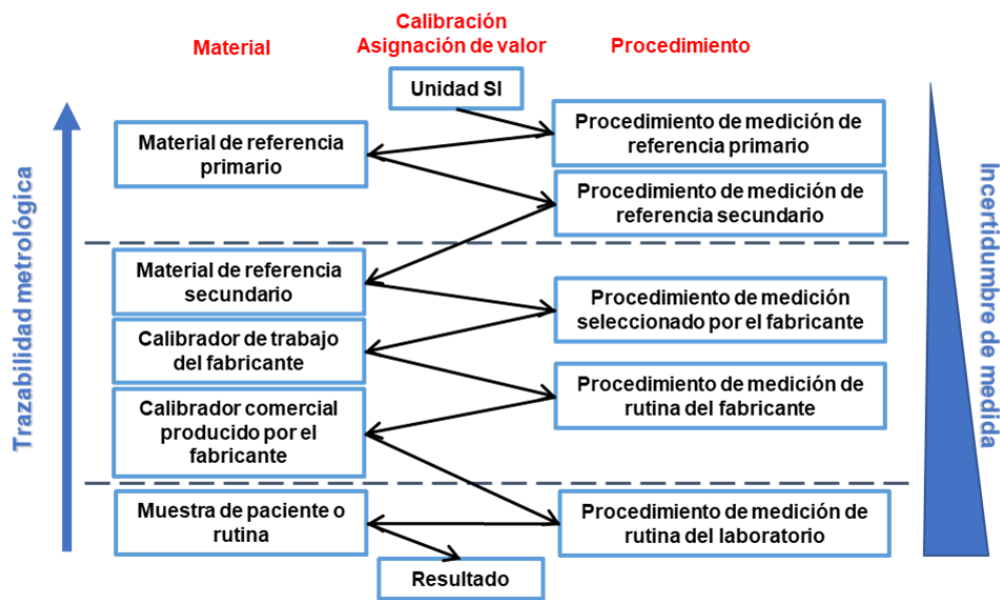


Figura 1-1: Cadena de trazabilidad metrológica

Cadena ininterrumpida de comparaciones de los resultados de medición hacia una unidad del SI.

En el caso de los métodos de ensayo para detección de patógenos hay varios procedimientos de medición de referencia por acuerdo internacional. En el caso de *E. coli* y *E. coli* O157:H7 se tienen las normas ISO 16649 e ISO 16654 respectivamente, las cuales están referidas al método de referencia de cultivo celular. Respecto a los métodos rápidos para detección de estos patógenos, la norma ISO/TS 13136: 2012 establece el procedimiento para la identificación de *E. coli* ECEH por PCR en tiempo real, sin embargo, no existen materiales de referencia, por lo que de acuerdo con ISO 17511 se ubicaría en el caso 3 de la norma para las magnitudes no trazables al SI [42], [46].

Los proveedores de ensayos comerciales validan sus productos frente a organizaciones como AOAC, AFNOR, entre otros, al compararlo con el procedimiento estándar, con el fin de demostrar que su ensayo tiene características iguales o superiores que el método estándar. Después de aprobar el ensayo, cada proveedor sigue su propio procedimiento con sus propios controles, de tal forma que esta situación es igual al caso 5 de trazabilidad metrológica, en la que la trazabilidad del resultado llega hasta al procedimiento o el material generado por el proveedor [139].

La exactitud del ensayo y del resultado dependen del ensayo comercial utilizado. En el momento que se cambie de ensayo comercial, cambia la exactitud y así mismo los criterios

de aceptación o rechazo. Esto puede tener implicaciones importantes en la seguridad alimentaria, en la transacción comercial de los productos de un país, así como en su credibilidad en un determinado mercado cuando en diferentes partes usan distintos ensayos para hacer los análisis [15].

1.7.2 Validación de métodos analíticos

A partir de los resultados obtenidos por un método analítico se pueden tomar decisiones de alto impacto en diferentes ámbitos, por lo que es necesario que los métodos sean exactos, reproducibles, comparables y trazables. La validación permite demostrar la idoneidad de un método de medición de los resultados obtenidos por un laboratorio [64].

La validación se realiza con el objetivo de demostrar el desempeño de un método para su uso previsto. El proceso de validación permite conocer las limitaciones y la identificación de las variables de mayor relevancia que influyen en el desempeño del método. Los parámetros de desempeño a evaluar dependen del tipo de método, nivel de validación y del uso previsto del método [137].

1.7.2.1 Parámetros de validación

Los parámetros de validación son las propiedades, características o capacidades cuantificables que indican la idoneidad del método [140], [141]. Estos parámetros incluyen:

- **Exactitud:** Es el grado de concordancia entre un valor medido y un valor verdadero de un mesurando [142].
- **Precisión:** Grado de concordancia entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas.
- **Intervalo lineal:** Intervalo en el cual el instrumento de medición tiene la capacidad de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito.
- **Intervalo de trabajo:** Intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre definida.
- **Sensibilidad:** Es el cambio de respuesta del instrumento que se realiza cuando existe un cambio en la concentración del analito.

- **Especificidad:** Capacidad de determinar el analito inequívocamente en presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente, esto puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.
- **Selectividad:** Propiedad de un sistema de medición por la que el sistema proporciona valores medidos para uno o varios mensurandos, de modo que los valores de cada mensurando son independientes entre sí o de otras magnitudes existentes en el fenómeno, cuerpo o sustancia en estudio.
- **Límite de detección:** Es la concentración mínima detectable con cierto nivel de confianza.
- **Límite de cuantificación:** Es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con desempeño aceptable.
- **Robustez:** Es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico para no afectarse por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método.

1.7.2.2 Niveles de validación

Dado que los métodos pueden ser novedosos o variaciones de métodos ya validados, el proceso de la validación depende de la procedencia del método. La validación debe ser más rigurosa cuando se emplean métodos no normalizados, métodos diseñados y/o desarrollados por el laboratorio, métodos normalizados fuera de su ámbito de aplicación, o ampliaciones o modificaciones de métodos no normalizados [137]. Hay varios niveles de validación según los requerimientos del método.

- **Nivel uno o nivel de emergencia:** Se realiza por un solo laboratorio en el caso que se requiera usa un método de manera inmediata. Sólo tiene en cuenta los parámetros de validación más importantes como linealidad y precisión, con esto se busca tener un mínimo grado de confiabilidad a los resultados que se produzcan por medio del método usado.
- **Nivel dos o intra-laboratorio:** Es desarrollado por un único laboratorio y se tienen en cuenta todos los parámetros de calidad del método como límites de detección (LOD), cuantificación (LOQ), repetitividad, precisión intermedia, entre otros. Los parámetros son escogidos de acuerdo a las características del método y de lo solicitado en la norma.

- **Nivel tres o inter-laboratorio:** Es llevado a cabo por más de un laboratorio y se realiza la comparación con un método de referencia existente. Los laboratorios participantes deben tener cumplir los requisitos establecidos por AOAC.
- **Nivel cuatro o nivel de estudio colaborativo:** Es realizado con mínimo ocho laboratorios, este nivel es equivalente a un estudio colaborativo completo establecido por la AOAC, que debe cumplir con todos los requisitos del caso. Se propone el método oficial en cuanto se tenga la información de todos los niveles por los cuales pasó el método si éste cumple con todos los parámetros de validación.

1.7.3 Materiales de referencia

Según el VIM [142], un MR es un “material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas”. Éstas son herramientas usadas en los laboratorios para compensar los errores sistemáticos y asegurar la calidad de sus mediciones.

Los materiales de referencia pueden ser: (i) Sustancias puras (ii) Solución estándar y mezclas de gases. (iii) Materiales de referencia en matriz, los cuales son preparados a partir de matrices que contienen los componentes de interés. (iv) Materiales de referencia físico-químicos [143]. Se clasifican en materiales de referencia primarios, secundarios y de trabajo. Los materiales de referencia primarios son aquellos cuya caracterización fue realizada con un método de medición primario. Los secundarios son aquellos que su valor ha sido asignado con respecto a un material de referencia primario y los de trabajo son aquellos que han sido preparados por el usuario, empleados como control interno positivo en los procesos de medición [144].

Los MRC a diferencia de los MR, van acompañados de documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas con incertidumbres y trazabilidades asociadas. Son usados en procesos de validación de métodos y estimación de la incertidumbre, verificación del uso correcto del método y la calibración de equipos o instrumentos de medida. Su uso permite hacer trazables los resultados a una referencia común, en la mayoría de los casos al SI, lo que garantiza que los resultados de una medida sean comparables entre distintos laboratorios [145],[146].

Los MR para mediciones biológicas se pueden encontrar puros o en matriz, pueden ser células enteras, material genético o proteínas. Hay varios productores de materiales de referencia

biológicos como el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés) [147], Centro conjunto de investigación (JRC, por sus siglas en inglés) [148], la OMS [149], El instituto Nacional de Metrología de Japón (NMIJ, por sus siglas en inglés), entre otros. En la base de datos del Comité Conjunto de Trazabilidad en Laboratorios de Medicina (JCTLM, por sus siglas en inglés) [150] se pueden encontrar los MRC de alto nivel metrológico. El único material de referencia certificado en cantidad de ADN es el ERM AD-623 que cuenta con 6 niveles de concentración [114] el cual se emplea para validación o control de calidad de métodos por dPCR [151]

Las principales técnicas de caracterización y asignación de valor de los materiales de referencia certificados son espectrofotometría UV, Fluorescencia [152], gravimetría, qPCR [153] y recientemente PCR digital [154]-[155]. Los más grandes productores de estos materiales son JRC-IRMM, quienes disponen de cerca de 130 MRC para detección de organismos genéticamente modificados (OGM), 4 para ADN. Mientras tanto, NIST actualmente registra más de 11 MRC para diferentes aplicaciones relacionadas con ADN.

En el caso particular de *E. coli*, existen diferentes materiales de referencia, caracterizados en diferentes unidades y por diferentes métodos. Hay un MRC a nivel celular para *E. coli* O157:H7, es negativo en la producción de toxinas Shiga la cual es una característica importante en los serotipos patogénicos. Hay un MRC a nivel de ADN genómico de *E. coli* O157:H7 certificado en identidad con un valor nominal de $1.3 \pm 0.7 \mu\text{g}$, que fue caracterizado por espectrofotometría UV VIS con el método PicoGreen. Se usó PCR para identificar la especie a través de la amplificación de un segmento del gen *fliC*, proteína estructural característica del flagelo de la bacteria [17].

Actualmente hay disponibles varios materiales de *E. coli* que podrían emplearse como controles en los procesos de medición, pero éstos se encuentran cuantificados por espectrofotometría UV-VIS y no tienen una declaración de trazabilidad ni incertidumbre [156], lo que los hace no aptos para considerarse materiales de referencia que puedan establecer la comparabilidad entre los resultados de las mediciones.

La identificación y cuantificación de patógenos en alimentos puede verse beneficiado por el uso de dPCR ya que permite la cuantificación exacta de patógenos presentes en una muestra, sin la necesidad de un estándar. Por lo tanto, es un método prometedor para la calibración de

técnicas y materiales de referencia que vayan a ser usados en varios laboratorios de todo el mundo.

1.7.3.1 Producción de materiales de referencia

Según la norma ISO 17034:2016 la producción de un material de referencia requiere de varias actividades como planeación, control, manipulación, procesamiento y almacenamiento del material, evaluación de la homogeneidad y estabilidad, caracterización, asignación del valor de la propiedad, incertidumbre y emisión de certificado entre otros documentos [157]. Después de determinar la homogeneidad, estabilidad del material y realizar la asignación del valor de la propiedad, se realiza la estimación de la incertidumbre del material, teniendo en cuenta todas las fuentes de incertidumbre [158]–[160]. El productor de MR debe garantizar la trazabilidad, idoneidad de los métodos y del personal involucrado [161]. La OMS brinda algunas recomendaciones a tener en cuenta en la producción de materiales de referencia biológicos [162]

1.7.3.2 Homogeneidad

La homogeneidad es la variación de una propiedad de un material de referencia ya sea dentro de un envase o de un envase a otro [163]. Su evaluación permite determinar el grado en que las unidades del lote producido tienen el mismo valor de concentración con cierto grado de confianza [164]. Cuando se producen MR en el que el tamaño de la muestra requerida para el análisis es menor que la cantidad en el envase, lo que permite el uso repetido del material, es necesario evaluar la homogeneidad dentro de los viales. Por lo que se requiere determinar la cantidad mínima de muestra que se debe tomar para realizar los análisis, en la cual la incertidumbre establecida es válida [165].

1.7.3.3 Caracterización

La caracterización de un MR es el proceso por el cual se determinan los valores de las propiedades que van a ser cuantificadas. La medición puede realizarse empleando uno o varios procedimientos, los cuales deben demostrar trazabilidad a referencias establecidas. Los valores de propiedad asignados a un MRC pueden ser trazables al SI u otras referencias acordadas internacionalmente durante la producción [163].

1.7.3.4 Estabilidad

La evaluación de la estabilidad permite determinar el tiempo en el cual el MR mantiene el valor de la propiedad bajo las condiciones establecidas. El seguimiento a corto plazo permite determinar la variación del material bajo las condiciones de transporte, mientras que seguimiento a largo plazo permite determinar la variación del material bajo las condiciones de almacenamiento y uso[166].

La estabilidad se puede evaluar mediante estudios clásicos o isócronos. En los estudios clásicos las muestras son analizadas en la medida que transcurre el tiempo, esto puede introducir variabilidad debido al análisis interdías. Mientras que, en los estudios isócronos las muestras se analizan en conjunto en condiciones de repetibilidad, una vez ha transcurrido el tiempo del estudio, permitiendo evaluar diferentes condiciones (temperatura, tiempo, humedad relativa) de almacenamiento [167].

2. Objetivos

2.1 Objetivo General:

Desarrollar un candidato a material de referencia usado en la detección y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7 por PCR

2.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar una metodología por PCR para la identificación y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7.
- Preparar un candidato a material de referencia a nivel de ADN que se usará en la identificación y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7
- Evaluar la homogeneidad y estabilidad a corto plazo del candidato a material de referencia para la identificación y cuantificación de *Escherichia coli* O157:H7

3. Materiales y métodos

Para obtener el candidato a material de referencia (MR) de *E. coli* O157:H7 se realizó una producción piloto de ADN genómico en 3 etapas. En la primera se optimizó y validó un método para la detección y cuantificación de ADN de *Escherichia coli* O157:H7 por PCR digital para la caracterización del material. En la segunda se optimizaron las condiciones de cultivo y extracción de ADN a gran escala para la obtención de ADN de *E. coli* O157:H7, el cual se usó en la tercera etapa para la producción piloto del candidato a MR siguiendo los lineamientos establecidos por la norma ISO 17034:2016 [161] y la guía ISO 35:2017 [168].

3.1 Reactivos y materiales

Se usó como plantilla de amplificación, el material de referencia IRMM 449® cuya propiedad certificada es la identidad de ADN de *E. coli* O157 cepa EDL931. El ADN se encontraba en presentación liofilizada (con valor informativo de $1,3 \mu\text{g} \pm 0,7 \mu\text{g}$) y se resuspendió en buffer TE 1X para obtener una concentración aproximada de $13,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ($\sim 2,14 \cdot 10^6$ copias / μL). Los oligonucleótidos (primers y sondas) liofilizados se resuspendieron y diluyeron hasta una concentración de $10 \mu\text{M}$, se alicuotaron y almacenaron a -30°C hasta su uso. La enzima EcoRI R601A de Promega se usó para la digestión del ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El buffer iTaq™ Universal Probes Supermix se empleó para los ensayos por qPCR. El buffer dPCR™ Supermix for Probes, aceite generador de gotas Oil for Probes, cartuchos droplet generator DG8™ Cartridge, láminas perforables PX1™ PCR Plate Sealer y aceite para lectura de gotas dPCR™ Droplet Reader Oil se emplearon para los ensayos por ddPCR.

La amplificación de los fragmentos se hizo en el termociclador CFX96 touch deep well C1000/S1000™ (Bio-Rad). En la cuantificación de los fragmentos se empleó el sistema de PCR digital en gotas QX200 ddPCR (Bio Rad Referencia: 186-4003). La extracción de ADN a

gran escala se realizó en la centrífuga Sorvall Lynx 4000 con rotores Bioflex HC y TH13, mientras que a pequeña escala se empleó la centrífuga Heraeus™ Megafuge™ 16R con rotor Microliter 30 x 2.

Las cepas de referencia de *E. coli* O157:H7 usadas para la optimización y preparación del candidato fueron ATCC® 700728™ y ATCC® 35150™. La cepa ATCC® 700728™ tiene silenciados los genes *stx1* y *stx2*, se usó en la optimización de las condiciones de cultivo y extracción de ADN. La cepa ATCC® 35150™ es enterohemorrágica y se usó para la obtención del ADN para la producción del candidato a material de referencia.

El crecimiento de los microorganismos se realizó en los medios de cultivo tripticasa soya CM0131 de OXOID, *Brilliance*™ para *E. coli*/coliformes CM1046 de OXOID y MacConkey Sorbitol 01-729-500 suplementado con cefixima y telurito 06-146LYO1 de Scharlau. Además, se usaron los medios líquidos tripticasa soya CM0876 de OXOID y E.C. suplementado con novobiocina (20mg/L) SR-181 de OXOID. En el envasado del candidato a MR se emplearon crioviales de polipropileno de 1.2 mL Nalgene.

3.2 Detección y cuantificación de *E. coli* O157

En el desarrollo y validación de un método para detectar, clasificar y cuantificar ADN de *E. coli* O157:H7 por PCR, se diseñaron oligonucleótidos (primers y sondas) para la amplificación de fragmentos génicos de interés. Se evaluó la amplificación de los oligonucleótidos por qPCR, se optimizó y validó las condiciones de amplificación del ADN por ddPCR.

3.2.1 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos

Se realizó la búsqueda de genes de única copia, conservados y frecuentemente usados en la detección de varios serotipos de *E. coli* por métodos basados en PCR. Se diseñaron oligonucleótidos que permitieron la amplificación de un segmento de los genes, con un tamaño inferior a 160 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron caracterizadas *in silico*, con los programas SnapGene® Viewer y BLASTN, mediante el tamaño del producto de amplificación en pares de bases (pb), el porcentaje GC de los productos de amplificación, la formación de auto dímeros, la formación de heterodímeros y la selectividad de los primers *in silico*.

3.2.2 Análisis de fragmentos génicos de E. coli O157:H7

3.2.2.1 Amplificación de los fragmentos por qPCR

La mezcla de reacción para la amplificación de las secuencias de ADN estaba compuesta por 2 µL de ADN, primers con concentración de 500 nM, sondas con concentración de 300nM y agua libre de nucleasas en buffer iTaq Universal for Probes a un volumen final de 20µL. La reacción de amplificación inició con una denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 15 s con anillamiento y extensión a 58°C durante 60 s y una etapa final de enfriamiento de 18°C por 10 min.

La selectividad de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes seleccionados, se evaluó usando curvas de amplificación y electroforesis de agarosa (2% m/m, 80V, 2 horas). Las condiciones de amplificación para todos los genes se optimizaron de tal manera que pudieran ser amplificados simultáneamente. La temperatura de fusión para cada uno de los productos amplificados se evaluó mediante qPCR usando SYBR Green, siguiendo el protocolo de amplificación descrito anteriormente. Adicionando una rampa de calentamiento de 60°C a 95°C (0,1°C/ s)

3.2.2.2 Intervalo lineal y eficiencia de amplificación

La eficiencia de amplificación para cada uno de los genes seleccionados y el intervalo de trabajo del método se evaluó por qPCR, a partir de un conjunto de diluciones gravimétricas seriadas del ADN IRMM 449® en el intervalo 1.2×10^{-5} y 1.2 ng/µL.

3.2.2.3 Selectividad oligonucleótidos

La selectividad de cada uno de los oligonucleótidos diseñados, se evaluó por qPCR empleando soluciones de ADN de 1 ng/µL de los microorganismos expuestos en la Tabla 3-1. (En el Anexo A: Cepario y extracción de ADN se presenta el procedimiento de extracción de ADN de los microorganismos empleados en el presente estudio).

Tabla 3-1 ADN de cepas usadas en la evaluación de selectividad

Grupo	Microorganismo	Referencia
Grupo Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 6538
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC® 10876
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 14506
Grupo Gram (-)	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC® 17802
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048
	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC® 17802
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048
	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC® 33420
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC® 43864
	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	ATCC® 13882
<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	ATCC® 23715	
Grupo <i>Shigella</i>	<i>Shigella boydii</i>	ATCC® 9207
	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC® 9290
Grupo <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922
	<i>Escherichia coli</i>	Medicina (Donada)
	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 10538
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739
Grupo <i>E. coli</i> enterohemorrágica	<i>Escherichia coli</i> O104:H4	ATCC® BAA-2326™
	<i>Escherichia coli</i> O145:NM	CDC 99-3311
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC® 700728™
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC® 35150™
Grupo <i>Salmonella spp</i>	<i>Salmonella Thyphimurium</i>	INM (Donada)
	<i>Salmonella Thyphi</i>	INM (Donada)
	<i>Salmonella enteritidis</i>	INM (Donada)

3.2.2.4 Equivalencia simplex y dúplex

La equivalencia de la amplificación simplex/dúplex se evaluó amplificando 12 combinaciones de genes empleando una solución de ADN IRMM 449® en concentración aproximada de $6,34 \times 10^{-2}$ ng/ μ L (10460 copias/ μ L). Las condiciones de amplificación se describen en el numeral 3.2.2.1.

3.2.3 Optimización del método

La mezcla de reacción para la amplificación de las secuencias estaba compuesta por 2 μL de ADN, primers (800 nM), sondas (300nM) y agua libre de nucleasas en buffer Super mix ddPCR for probes a un volumen final de 22 μL . Las mezclas se prepararon gravimétricamente usando como control negativo una mezcla con todos los componentes excepto ADN, el cual se reemplazó con buffer TE 1X.

La generación de gotas se realizó empleando un cartucho, al cual se adicionaron 21 μL de la mezcla de reacción con 70 μL de aceite y se transfirieron 42 μL de la suspensión de gotas a la placa de ddPCR. Esta fue sellada al calor con una lámina perforable y dispuesta en el termociclador para amplificación de los fragmentos.

La reacción de amplificación inició con una denaturación inicial a 95°C por 10 minutos para activar la enzima polimerasa Hot Start, seguida de 40 ciclos de a 95°C por 15 s con anillamiento y extensión a 58°C durante 60 s, y una etapa final de 18°C por 10 min. En el proceso se emplearon rampas de calentamiento de 0.5°C/s. Finalmente, las muestras fueron analizadas en el lector de gotas.

El análisis de datos se realizó utilizando el programa QuantaSoft (BioRad), definiendo el umbral de fluorescencia como un valor entre la fluorescencia de las particiones positivas y negativas, que distingue claramente las poblaciones. En el laboratorio se usó un volumen de partición de 0,819 nL \pm 0,086 nL, para calcular la concentración de la muestra en términos de copias por μL . Las ecuaciones 3-1 y 3-2 describen el modelo matemático empleado para establecer el valor del mesurando.

$$C_m = \frac{\lambda}{V*d} \quad \text{Ecuación (3-1)}$$

Donde

$$\lambda = -\ln\left(\frac{PN}{PT}\right) \quad \text{Ecuación (3-2)}$$

Donde C_m es la concentración de la muestra de PCR en número de copias/ μL , PN el número de particiones negativas, PT el número total de particiones, V el volumen de partición y d la dilución del ADN en el tubo de PCR y lambda (λ) corresponde al número de copias por partición.

Los perfiles de amplificación de cada uno de los genes se caracterizaron por ddPCR usando la dilución de ADN de *E. coli* O157 con una concentración aproximada de $6,33 \times 10^{-2}$ ng/ μ L (10460 copias/ μ L). Para optimizar el método de medición se evaluaron algunos factores que afectan la amplificación y cuantificación por ddPCR, teniendo como criterios de aceptación la precisión (medida a través del CV), la resolución obtenida entre las poblaciones positivas y negativas. Los factores evaluados fueron

- Temperatura de anillamiento: Se evaluó la amplificación en modo simplex en 61.5 °C, 58.2 °C y 55.6 °C.
- Digestión enzimática: Se realizó la amplificación de los genes con ADN digerido y sin digerir con la enzima EcoRI.
- Concentración de primers: Se evaluó a 500 y 800 nM.
- Intervalo de trabajo: Se emplearon 9 niveles de concentración aproximada entre 9.23×10^{-6} ng/ μ L a 1.26×10^{-2} ng/ μ L (1.52 copias/ μ L a 20891.1 copias/ μ L), amplificando las secuencias en modo simplex. Con el objetivo de identificar la región donde el método presenta un intervalo lineal con una precisión menor al 25%.
- Equivalencia simplex dúplex: Se evaluó la amplificación de 12 combinaciones de genes en modo simplex y dúplex, usando como plantilla de amplificación ADN IRMM 449® a una concentración aproximada de $6,33 \times 10^{-2}$ ng/ μ L (10460,5 copias/ μ L).
- Rampa de calentamiento: Se evaluó a 1°C/s y 0,5°C/s.

3.2.4 Validación del método

Una vez se optimizaron las condiciones de amplificación y cuantificación de ADN de *E. coli* por ddPCR, se realizó una validación intralaboratorio del método estimando la concentración en número de copias/ μ L de cada uno de los genes en modo simplex. Los parámetros evaluados fueron [170]

- Intervalo lineal: Se cuantificaron 6 niveles de concentración por triplicado, de IRMM 449® con una concentración aproximada de $1,29 \times 10^{-4}$ ng/ μ L a $6,61 \times 10^{-1}$ ng/ μ L (21 copias/ μ L a 109132 copias/ μ L). A partir de los datos se construyó la gráfica de número de copias en función de la dilución de ADN.

- Precisión: Se evaluaron 4 niveles de concentración, en tres días diferentes con tres analistas diferentes. A partir de los datos se empleó un análisis de varianzas para determinar la precisión como repetibilidad entre réplicas y la precisión intermedia para los ensayos interdías. El criterio de aceptación fue la dispersión inferior al 25% en cada nivel medida como CV.
- Límite de cuantificación (LOQ): Se estableció como el nivel más bajo de concentración del intervalo lineal que cumpla con los criterios de precisión.
- Límite de detección (LOD): Se evaluaron 6 niveles de concentración (por triplicado) por debajo del límite de cuantificación en un intervalo de concentración aproximado de $1,2 \times 10^{-5}$ ng/ μ L a 1,2 ng/ μ L. El LOD se estableció como la concentración para la cual se presenta amplificación en todas las réplicas, presentando en conjunto al menos nueve particiones positivas.
- Incertidumbre: Se estimó la incertidumbre estándar combinada para el método de ensayo para cada uno de los genes evaluados usando los datos de desempeño del método [141]

3.3 Cultivo de *E. coli* O157:H7 y extracción de ADN

Las condiciones de cultivo y extracción de ADN se optimizaron empleando la cepa ATCC® 700728. Posteriormente, se usó la cepa ATCC® 35150 para obtener el ADN de trabajo.

3.3.1 Reconstitución de cepas y control de calidad

Las cepas de *E. coli* O157:H7 se reconstituyeron inoculando 50 mL de medio TSB con un escobillón del microorganismo e incubando a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Luego, se prepararon 50 crioviales, mezclando 150 μ L de glicerol 50% estéril y 350 μ L de medio crecido, los cuales se almacenaron en ultracongelador (-80°C).

El crecimiento y las características de las colonias para cada cepa de *E. coli* O157:H7 se evaluaron en los medios TSA, ECA y CT-SMAC, con el fin de hacer el seguimiento de los cultivos en cada pase durante el proceso. La Tabla 3-2 presenta las características de los medios usados para el crecimiento de los microorganismos.

Se inoculó 10 mL de TSB con 100 μ L de cada cepa criopreservada en glicerol y se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 20 horas. Adicionalmente, de cada criovial se prepararon 6 diluciones seriadas de 100 μ L en 900 μ L de PBS 1X y se sembraron las

diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en TSA, ECA y CT-SMAC, los cuales se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 14h.

Tabla 3-2: Medios de cultivo usados para el crecimiento del microorganismo

Medio de cultivo	Descripción
Agar Tripticasa soya (TSA)	Medio nutritivo sólido usado para el crecimiento de los microorganismos. Se usó para hacer el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC).
Agar EC (ECA)	Agar sólido selectivo que tiene cromóforos que permiten diferenciar bacterias lactosa (+) y glucuronidasa(+). Se usó como control de calidad para el crecimiento de las enterobacterias durante el proceso.
Agar Mac Conkey Sorbitol (modificado) suplementado con cefixima y telurito (CT-SMAC)	Agar sólido selectivo que permite la diferenciación de bacterias sorbitol negativas. Suplementado con 25 µg de cefixima y 1,25 mg de telurito de potasio. Se usó como control de calidad para las bacterias de <i>E. coli</i> O157:H7 durante el proceso.
Caldo tripticasa soya (TSB)	Medio líquido nutritivo se usó para la recuperación y crecimiento de los microorganismos.
Medio EC suplementado con novobiocina (ECB+n)	Medio líquido selectivo suplementado con novobiocina (20mg/L) que permite el crecimiento de coliformes fecales y <i>E. coli</i> . Además, inhibe crecimiento de bacterias Gram positivas. Se usó para el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7

El seguimiento de los cultivos se hizo por (i) espectrofotometría, tomando medidas de absorbancia a 600nm y 625 nm; (ii) por comparación con escala de McFarland, usando una reglilla con líneas horizontales blancas y negras en donde se comparó la turbidez del cultivo en tubos de vidrio de 150mm x 13 mm; (ii) por conteo de unidades formadoras de colonia, en donde se realizaron diluciones seriadas (1/10) en PBS 1X que se sembraron en TSA, ECA y SMAC, e incubaron a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 12h-20h.

3.3.2 Optimización condiciones de cultivo

Para la preparación de un candidato a material de referencia a nivel de ADN, fue necesario obtener un cultivo masivo, haciendo un escalamiento a partir de un cultivo más pequeño. Las condiciones de cultivo se estandarizaron empleando la cepa *E coli* O157:H7 ATCC® 700728 teniendo en cuenta el tamaño del inóculo, la temperatura y el tiempo de incubación, la velocidad de agitación y el volumen de medio usado.

Para escalar el cultivo, primero se obtuvieron colonias aisladas en medio nutritivo, luego a partir de una colonia se inocularon 20 mL de medio selectivo (preinóculo) y se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ hasta que alcanzó una fase estacionaria tardía (aproximadamente 1×10^9 UFC/mL), posteriormente el preinóculo se amplió a 200 mL (cultivo masivo) para obtener finalmente la biomasa a partir de la cual se hizo la extracción de ADN.

3.3.2.1 Caracterización del preinóculo

Para optimizar las condiciones de crecimiento del preinóculo, se prepararon diluciones seriadas 1/10 en PBS 1X o NaCl 0.9% estéril a partir de un glicerol de *E. coli O157:H7 ATCC® 700728™*. Se sembró la dilución 10^{-6} en medios TSA, ECA y SMAC, luego se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 12h - 20 h para obtener colonias aisladas de 2 mm de diámetro aproximadamente.

Una vez se determinó el tiempo de crecimiento de la colonia en el medio nutritivo, se procedió a determinar el tiempo al cual se alcanza la mitad de la fase estacionaria de crecimiento en el medio ECB+n a partir de una colonia. Se usaron 20 mL y 50mL de medio para evaluar la diferencia de crecimiento. Los cultivos se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm por aproximadamente 12 h y se realizó seguimiento cada hora.

3.3.2.2 Caracterización del cultivo masivo

Tras establecer las condiciones de crecimiento del preinóculo, se establecieron las condiciones óptimas para hacer el escalamiento del cultivo a 300 mL. Se inoculó con una colonia aislada un cultivo de 20 mL crecido por 5 horas a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm. Del preinóculo se tomaron 15 mL para ampliar el cultivo a 300 mL de medio ECB+n y se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm por 12 horas.

Posterior a la inoculación del cultivo masivo, se hizo seguimiento mediante medidas de densidad óptica (OD) y conteo de unidades formadoras de colonia cada hora. Para las medidas de OD las muestras se diluyeron 4 veces en NaCl 0,9% y se tomaron medidas de absorbancia a 600 nm y 625 nm, para determinar el punto en el cual el cultivo alcanza la fase estacionaria. Para la estimación de concentración bacteriana se realizaron diluciones seriadas 1/10 en NaCl 0,9% y se sembraron las diluciones en las que se estimaba obtener entre 300 y 30 colonias.

A partir de 1 ml de cultivo medido cada hora se realizó la extracción de ADN empleando el método CTAB-NaCl a pequeña escala (Anexo A), con el fin de evaluar el punto en el que se obtiene la mejor calidad y sin cambios apreciables en la concentración de ADN. Las muestras se cuantificaron usando NanoDrop™ One C de ThermoFisher, en donde se determinó la concentración y calidad de ADN mediante la relación 260/280 y 260/230. La integridad del ADN obtenido se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, sembrando 5 µL de cada muestra con 5 µL de buffer carga y desarrollo a 100 V por 35 min.

3.3.3 Extracción de ADN a gran escala

Tras definir las condiciones de crecimiento de *E. coli* O157:H7 a gran escala, se procedió a realizar la extracción de ADN con el fin de determinar la eficiencia de extracción. Para esto, se escaló un cultivo hasta 200 y 300 mL incubados a $37.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ y 150 rpm de agitación por 4h. Y se procedió a hacer la extracción de ADN empleando el método de extracción CTAB-NaCl a gran escala (Anexo A: Cepario y extracción de ADN).

La calidad del ADN obtenido se evaluó por espectrofotometría UV observando el espectro de absorción del ADN entre 220 nm y 350 nm, y la pureza a partir de las relaciones 260/280 y 260/230. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis, para lo cual se cargaron 5 µL de la dilución 1/10 y 1/100 del ADN en un gel de agarosa al 1% (100V, 40 min). La concentración de ADN en ng/µL se estimó por la absorbancia a 260 nm, usando como factor de conversión 1uA que es equivalente a 50 ng/µL de ADN de doble hebra. La presencia de inhibidores se analizó por qPCR a partir de la medición de la eficiencia de amplificación para los genes *uidA*, *lacY*, *eaeA*, *rfbE*, *stx1*, *stx2* y *Z3276*, usando 6 niveles de concentración del ADN obtenido.

3.3.4 Obtención ADN para el candidato a MR

Una vez se establecieron las condiciones óptimas para el escalamiento del cultivo hasta 200 mL y la extracción de ADN, se procedió a evaluar el procedimiento usando la cepa *E. coli* O157:H7 ATCC® 35150™, con el fin de confirmar el crecimiento bajo estas condiciones y obtener el ADN para la producción del candidato a MR.

El microorganismo se reconstituyó a partir de un escobillón de *E. coli* O157:H7, 4° pase derivado de ATCC 35150, en 25 mL de caldo nutritivo tripticasa soya (TSB), se incubó a 37°C

y 150 rpm por 24 horas. A partir de éste se prepararon crioviales de 500 µL como stock de trabajo y se almacenaron a -80°C.

A partir de un criovial se realizaron 6 diluciones seriadas en PBS, en TSA se sembraron 100 µL de la última dilución, e incubaron a 37°C por 15 horas. A partir de una colonia, se inocularon 20 mL de ECB+n (pre-inóculo) y se incubaron por 4 horas a 37°C y 150 rpm. Se escaló a 200 mL de medio ECB+n con 10 mL del pre-inóculo y se incubó por 4 horas a 37°C y 150 rpm. El seguimiento de la morfología de las colonias del microorganismo durante todo el proceso se realizó en tres medios de crecimiento: TSA, ECA y CT-SMAC.

La extracción de ADN se realizó empleando el método de CTAB-NaCl a gran escala (Ver Anexo A: Cepario y extracción de ADN). El ADN obtenido se resuspendió en 1 mL de buffer TE 1X y se almacenó a 4°C durante la evaluación de calidad y cuantificación por ddPCR. Los parámetros de pureza, integridad y presencia de inhibidores se evaluaron por espectrofotometría, gel de agarosa y qPCR respectivamente.

3.4 Producción piloto de un candidato a material de referencia

La producción piloto de un candidato a material de referencia de *E. coli* O157:H7 a nivel de ADN, se realizó a partir del ADN obtenido de la cepa *E. coli* O157:H7 ATCC® 35150. Para ello, se prepararon 7 diluciones gravimétricas del stock de ADN en buffer TE 1X y se estimó la concentración del stock de ADN (copias/µL) amplificando el gen Z3276 por ddPCR en tres diluciones gravimétricas del stock.

3.4.1 Preparación de lotes

A partir del stock de ADN se prepararon cuatro diluciones gravimétricas para obtener 40 mL de los niveles de concentración del piloto, con concentración nominal de 100 copias/µL y 100000 copias/µL. Se empleó como diluyente buffer TE 1X con RNA total de levadura como estabilizador (40ng/µL). Cada nivel fue homogenizado por 2 horas en agitador orbital a temperatura ambiente.

3.4.1.1 Etiquetado y envasado

Se diseñó una etiqueta para rotular los tubos empleados en la producción, todos los tubos empleados para el material se etiquetaron previo al envasado. Las etiquetas se imprimieron en vinilo adhesivo resistente a solventes, con dimensiones de 2 x 3 cm y fueron numeradas de unidad 1 a 100 para cada lote. El envasado de los niveles del material se realizó en crioviales de polipropileno de 1.2 mL, certificados como libre de pirógenos, ADNasas, ARNasas. En cada tubo se adicionaron 500 µl de solución.

3.4.1.2 Almacenamiento muestras

Las soluciones candidatas se almacenaron a 4°C, durante la primera semana mientras se realizaron los estudios de homogeneidad y la determinación del valor de referencia de los lotes. Posteriormente, se realizó la selección de las muestras requeridas para el estudio de estabilidad y monitoreo, las cuales se almacenaron a 4°C y -20 °C, en cajas de cartón debidamente marcadas. Finalmente, las muestras remanentes se almacenaron a -80°C.

3.4.2 Determinación de cantidad mínima de muestra

El volumen mínimo de muestra se evaluó empleando volúmenes entre 1 µL a 6 µL y 0.5 µL a 4 µL para los lotes de 100 copias/µL y 100 000 copias/µL respectivamente. La medición se realizó por triplicado, usando tres alícuotas independientes para cada volumen y amplificando el gen Z3276 en modo simplex. Como límite máximo de variación se tuvo en cuenta la variación del método a ese nivel de concentración.

3.4.3 Estudio de homogeneidad

El número de muestras para la evaluación de la homogeneidad, se determinó como la raíz cuadrada del número total de viales generados para cada lote. Las unidades se seleccionaron a través de un muestreo aleatorio sistemático. Para definir la homogeneidad del material se estableció como incertidumbre objetivo 4.0% para el lote 190402-10P y 3.0% para el lote 190402-08P.

3.4.3.1 Homogeneidad entre viales

La evaluación de la homogeneidad entre viales se realizó empleando 8 unidades de cada lote, seleccionadas a través de un muestreo aleatorio sistemático. Cada una se midió por ddPCR en modo simplex con el fragmento correspondiente al gen *Z3276*, bajo las condiciones previamente validadas. En el lote de alta concentración (190401-08P) se midieron tres réplicas, mientras que en el lote de baja concentración (190401-10P) se emplearon seis réplicas. La contribución a la incertidumbre por homogeneidad se estimó a partir del análisis de varianza (ANOVA) de los datos.

3.4.3.2 Homogeneidad dentro de viales

Para evaluar homogeneidad dentro del vial, se seleccionó aleatoriamente un vial de cada lote. De cada vial se tomaron 6 alícuotas independientes y cada una se midió por triplicado. Cada muestra se amplificó por ddPCR en modo simplex con el fragmento correspondiente al gen *Z3276*. A partir del análisis de varianza (ANOVA) se determinó la homogeneidad intrabotella del material

3.4.4 Asignación valor de referencia

Una vez se estableció que el material producido era homogéneo, se procedió a estimar el valor de referencia para cada lote. Para esto, se siguió el diseño experimental presentado en la

Figura 3-1. De cada lote se tomaron tres muestras durante tres días. La medición se realizó empleando las secuencias correspondientes a los fragmentos *Z3276* y *rfbE* en modo simplex por triplicado. A partir de los resultados de medición obtenidos se determinó el valor promedio para cada gen y se estableció un valor consenso para cada lote, luego se evaluó el sesgo por la medición con ambos genes y se estimó la incertidumbre por el proceso de medición.

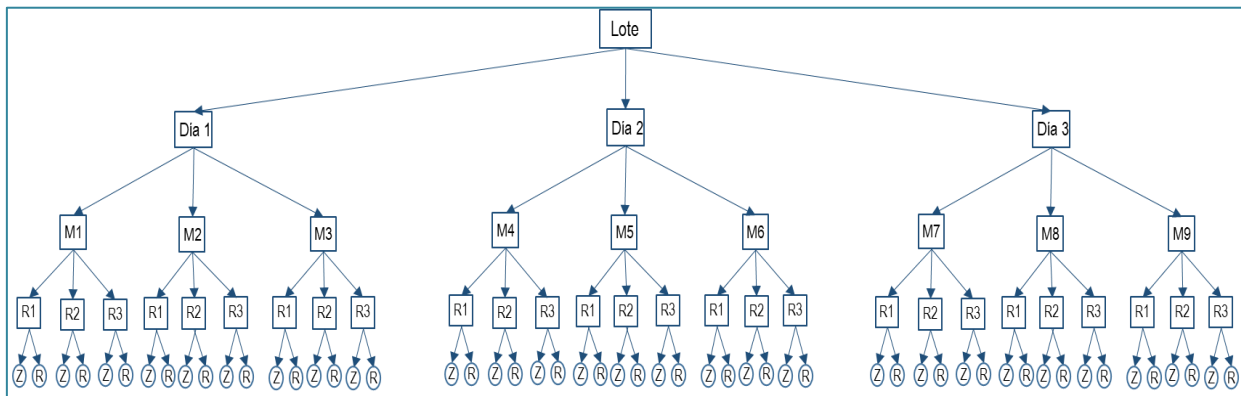


Figura 3-1: Diseño experimental para estimar el valor de referencia

3.4.1 Estudio de estabilidad a corto plazo

La estabilidad a corto plazo se evaluó empleando un estudio isócrono [171], siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura 3-2 en condiciones de repetibilidad. Se tomaron 2 muestras de cada lote a las 2, 4, 8 y 12 semanas, almacenadas a temperaturas de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y se transfirieron a la temperatura de referencia $-80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Después de las 12 semanas, las muestras se midieron por ddPCR en modo simplex usando el gen Z3276. La estabilidad del material bajo cada una de las condiciones evaluadas y su aporte a la incertidumbre de medición se estimó a partir del análisis de tendencia (análisis de regresión).

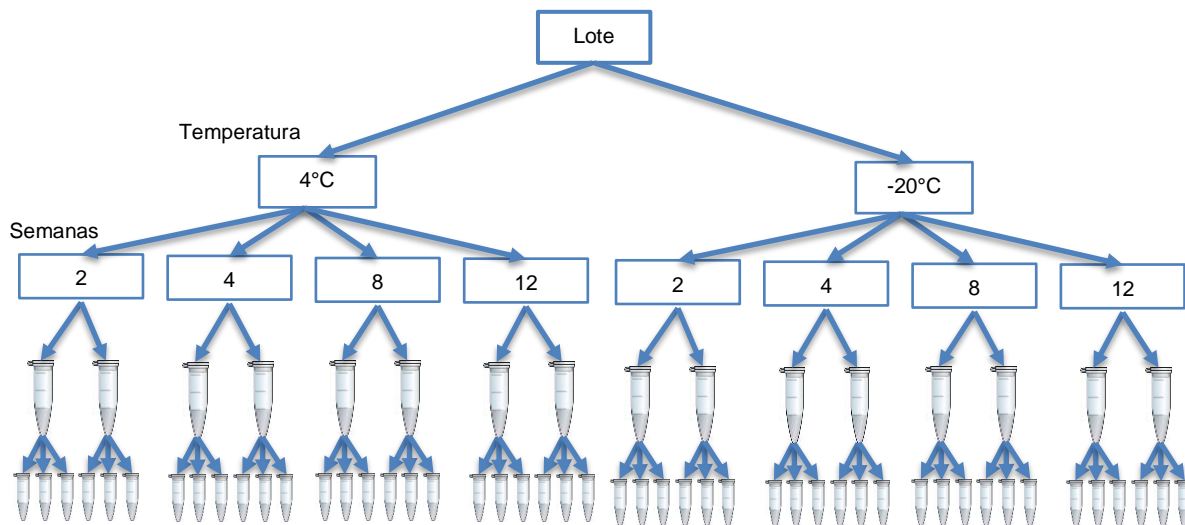


Figura 3-2: Diseño experimental estudio de estabilidad a corto plazo

4. Resultados y discusión

4.1 Detección y cuantificación de *E. coli* O157

4.1.1 Selección de genes y diseño de oligonucleótidos

En la Tabla 4-1 se presentan los genes seleccionados para desarrollar el método de detección y cuantificación de ADN de *E coli* O157:H7. Se encontró que las secuencias son altamente conservadas en varias cepas de *E coli* WT y *E. coli* O157. El gen *eaeA* mostró ser característico en cepas patogénicas diferentes a *E. coli* O157.

Tabla 4-1: Genes usados para la amplificación de *E. coli* por PCR

Microorganismo	Gen	Características	Referencias
<i>Escherichia coli</i>	<i>uidA</i>	Codifica proteína con actividad beta-D- glucuronidasa, relacionada con procesos de obtención de energía. Se encuentra en al menos 95% de las <i>E. coli</i> .	[172]
<i>Escherichia coli</i> diarreogénicas	<i>eaeA</i>	Codifica una proteína de adhesión involucrada en el proceso de invasión de <i>E. coli</i> al enterocito, pertenece a familia de autotransportadores tipo 3 y es un componente integral de la membrana. Se encuentra en serotipos asociados a producción de diarrea.	[173]
<i>Escherichia coli</i> enteropatógenicas (O157)	<i>rfbE</i>	Codifica para una enzima asociada a la biosíntesis de lipopolisacáridos (LPS) de membrana que es parte de la biogénesis de la membrana externa, relacionados con los antígenos-O.	[174]
<i>Escherichia coli</i> productoras de toxina shiga	<i>stx1</i> y <i>stx2</i>	Subunidad A similar a toxina shiga 1 y 2, tienen actividad N-glicosilasa RNA. Involucrado en la regulación negativa de traducción en las células del huésped.	[174]

Una vez se seleccionaron los genes de interés, los primers se diseñaron con una longitud entre 18 a 24 pares de bases, un contenido de guanina y citosina (%GC) entre el 40 a 60%, de tal forma que la temperatura de anillamiento de cada pareja de primers no difiera en más de 2°C y que la temperatura de anillamiento de la sonda este al menos 5 °C por encima que

la de los primers. Se buscó que los primers tuvieran las dos primeras y últimas bases purínicas, ausencia de secuencias repetitivas o palindrómicas de nucleótidos, que generaran fragmentos con tamaño máximo de 160 pb.

Cada oligonucleótido se analizó usando SnapGene Viewer y OligoAnalyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyze>) con el fin de verificar el %GC, temperatura de anillamiento y la posible formación de estructuras secundarias, autodímeros o heterodímeros con los otros oligonucleótidos. Se observó que las temperaturas reportadas por OligoAnalyzer eran altas, con respecto a las temperaturas de amplificación reportadas en los artículos, por lo que se usaron las temperaturas reportadas en SnapGene Viewer para hacer el análisis de las secuencias.

En el análisis de estructuras secundarias o dímeros, se tuvo en cuenta que la temperatura de fusión de los dímeros fuese menor a la temperatura de amplificación de primers y la energía libre de Gibbs fuera mayor a -9 kcal/mol [175]. En la formación de autodímeros o heterodímeros con el otro primer se tuvo en cuenta el número de bases que participan en el dímero y la energía libre de Gibbs.

La especificidad de los oligonucleótidos se evaluó *in silico*, tomando como referencia los genomas curados de *Escherichia coli* str. K12 substr. MG1655 (NC_000913.3), *Escherichia coli* O157:H7 str. Sakai (NC_002695.1) y *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933 (NC_002655.2). Con las secuencias de los genes escogidos se usó el programa SnapGene Viewer para determinar la longitud del producto obtenido a partir de amplificación de las secuencias de primers, como criterio de selección se tuvo en cuenta que los fragmentos fueran de máximo 160 pb.

Se realizó alineamiento en BLASTn de los productos amplificados contra las bases de datos de genomas, excluyendo el taxón *Escherichia coli* para determinar su unión a otros microorganismos distinto al de interés. Durante el análisis se tuvo en cuenta el porcentaje de cobertura, el valor E (posible error de BLAST) y el porcentaje de identidad. Los resultados del análisis de primers se presentan en el Anexo B: Análisis de secuencias de primers

Mediante el análisis de las secuencias amplificadas por cada grupo de oligonucleótidos se encontró que los productos de amplificación de los genes seleccionados se encuentran en varios microorganismos diferentes a *E. coli*, particularmente en variedades de *Shigella*, (Tabla 4-2). Por esta razón se buscó un gen de *Escherichia coli* que permitiera la diferenciación de

otras enterobacterias relacionadas, particularmente *Shigella*, y un gen de amplificación específico de *E. coli* O157:H7.

Tabla 4-2: Análisis *in silico* de selectividad

Gen	Microorganismos en que se presenta
<i>uidA</i>	<i>E. coli</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Shigella sonnei</i> ,
<i>eaeA</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. Albertii</i> , <i>Shigella boydii</i> y <i>Citrobacter Rodentium</i>
<i>Stx1</i>	<i>E. coli</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Shigella Flexnery</i> , <i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Stx2</i>	<i>E. coli</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>Salmonella enterica</i>
<i>rfbE</i>	<i>E coli</i> , <i>Rikertsiales</i> , <i>Alfa proteobacterium</i>

Se encontró en literatura el gen *lacY* que permite la diferenciación entre *Shigella* y *E. coli* [176], [177]. Además, un fragmento de los genes *lacY* y *phoA* permiten la diferenciación de *Shigella* y *E. coli* de otras enterobacterias [176]. Y los genes *LacZ*, *uidA*, *cyd* y *lacY* usados en conjunto permiten la diferenciación específica de *E. coli* frente a otras bacterias [177].

El análisis de la secuencia del gen *lacY* de *Escherichia coli* K12 (NC_000913.3:c363179-361926) en la base de datos curada RefSec gene, y mediante el alineamiento en BLASTN indicó que se encuentra conservado en varios serotipos de *E. coli*. Al realizar un alineamiento excluyendo *E. coli* (taxid:562) se encontró que está presente en bacterias como *Kluyvera*, *Cronobacter* y *Enterobacter* con alto porcentaje de cobertura y en *Shigella* con un porcentaje de cobertura del 38%.

El alineamiento del producto de amplificación del gen *lacY* reportado en la literatura [176], [177], mostró que este no es específico para *E. coli* sino que también amplifica en *Shigella*, por lo tanto, para aumentar la especificidad al microorganismo de interés se realizó un rediseño de los oligonucleótidos usando el programa bioinformático primer 3 y la secuencia reportada [176], para amplificar una región no mayor a 180 pb.

Al realizar análisis bioinformático del gen *rfbE*, se evidenció que es selectivo para las cepas de *E. coli* O157, pero no es un gen específico para el serotipo *E. coli* O157:H7. Dado que el método en el cual se emplearán las secuencias es para cuantificar ADN *E. coli* O157:H7, se requiere de otro gen que amplifique únicamente en ese serotipo.

En literatura se reporta un marco de lectura denominado Z3276 que se encuentra entre la región 2933340 y 2934474 pb de genoma de *E. coli* O157:H7 EDL933 (Gen ID: 957303), este codifica para una proteína del pili (proteína fimbrial) [108], [178]. Al hacer el análisis *in silico*

contra bases de datos, se encontró que el producto de amplificación es específico para las cepas de *E. coli* O157:H7.

Se seleccionó un juego de oligonucleótidos (primers y sonda) para la amplificación de cada uno de los 7 genes seleccionados (*uidA*, *lacY*, *stx1*, *stx2*, *rfbE*, *eaeA* y *Z3276*, Tabla 4-3). En la selección de los fluoróforos se tuvo en cuenta el sistema de detección del equipo de PCR digital en modo gotas para la amplificación en modo dúplex de algunas parejas de genes.

Tabla 4-3: Primers y sondas de *E. coli* y *E. coli* O157 por PCR

Gen	Nombre	Secuencia	Tamaño Producto (pb)	Ref.
<i>uidA</i>	uidA-F	GCAAGGTGCACGGGAATATT	75	[107]
	uidA-R	CAGGTGATCGGACGCGT		
	uidA-P	HEX-CGCCACTGGCGGAAGCAACG-BHQ1		
<i>lacY</i>	lacY-F	TGCTGGCTGGCACTATTATG	153	[176]
	lacY-R	GCACTTCAAACCTGGCTGGTA		
	lacY-P	FAM-CCGTTCTGCTGGTGGGCTGCTT-BHQ1		
<i>eaeA</i>	eaeA-F	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA	102	[179]
	eaeA-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA		
	eaeA-P	FAM-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC-BHQ1		
<i>rfbE</i>	rfbE-F	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA	88	[87]
	rfbE-R	CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT		
	rfbE-P	HEX-AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG-BHQ1		
<i>Stx1</i>	stx1-F	TTTGTTACTGTGACAGCTGAAGCTTTACG	131	[87]
	stx1-R	CCCCAGTTCAATGTAAGATCAACATC		
	stx1-P	FAM-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA-BHQ1		
<i>Stx2</i>	stx2-F	TTTGTCACTGTCACAGCAGAAGCCTTACG	128	[87]
	stx2-R	CCCCAGTTCAGAGTGAGGTCCACGTC		
	stx2-P	HEX-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC-BHQ1		
<i>Z3276</i>	Z3276-F	CGGGGGATACATTTACGCTT	115	[14]
	Z3276-R	TTTCTGAGCTGGAACAAGGC		
	Z3276-P	FAM-ACGGTGTTTTTCAGGCTTACAGGTCGT-BHQ1		

BHQ1- Black hole quenchers, FAM- Fluoresceína, HEX-Hexacloro fluoresceína

4.1.2 Evaluación de oligonucleótidos por qPCR

5.1.2.1. Amplificación fragmentos génicos

Al evaluar la amplificación de los oligonucleótidos seleccionados sobre ADN genómico de *E. coli* O157:H7 mediante qPCR, las secuencias se amplificaron siguiendo un crecimiento exponencial. Las sondas marcadas con HEX mostraron una fluorescencia relativa máxima alrededor de 2000 UFR mientras que las sondas con FAM presentan fluorescencias máximas entre 3800 y 4800 UFR (Figura 4-1)

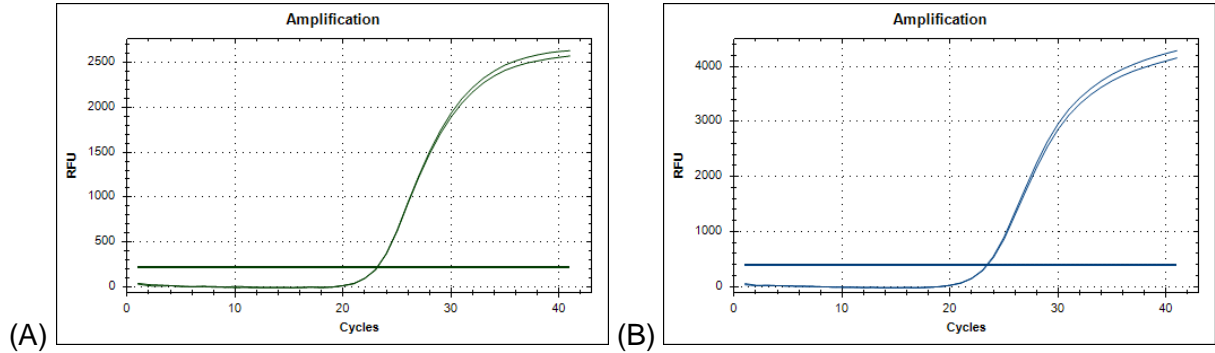


Figura 4-1: Amplificación de fragmentos por qPCR.

Curvas de fluorescencia relativa en función el número de ciclos del gen *stx2* (A) marcado con HEX y el gen *eaeA* (B) marcado con FAM. Cada muestra se amplificó por duplicado.

Al visualizar los productos de amplificación de la PCR en gel de agarosa los tamaños obtenidos corresponden a los esperados para cada fragmento, no se detectó la presencia de productos inespecíficos. (Figura 4-2). Debido a que la amplificación de inespecificidades como dímeros no son detectables en el gel de agarosa, se realizó una amplificación de las secuencias usando SYBR® Green y posteriormente una curva de fusión para analizar el T_m de los productos amplificados.

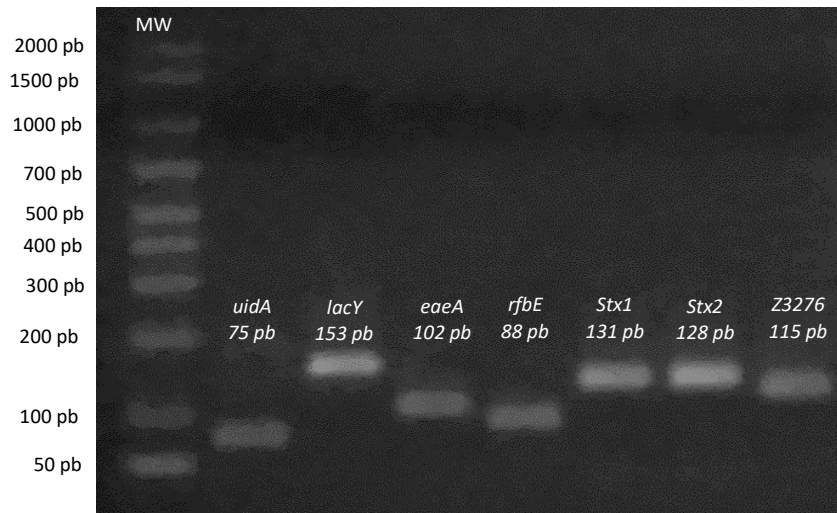


Figura 4-2: Fragmentos amplificados por qPCR.

Electroforesis agarosa 2% separados a 100V 90 min. Línea 1 marcador de peso ADN (AmpliSize®); Línea 2 gen *uidA*; Línea 3 gen *lacY*; Línea 4 gen *eaeA*; Línea 5 gen *rfbE*; Línea 6 gen *stx1*; Línea 7 gen *stx2*; Línea 8 gen *Z3276*. Los controles negativos de cada gen no amplificaron (no mostrados).

Se observó que cada fragmento de amplificación tiene una única temperatura de fusión característica (*uidA* 82°C; *lacY* 80,5°C; *eeA* 77°C; *rfeE* 75,5°C; *stx1* 78°C y *stx2* 81°C). A partir de las curvas de temperatura de fusión, en donde el pico corresponde a la temperatura característica de cada fragmento, se pudo concluir que cada juego de oligonucleótidos amplifica un único fragmento por gen (Figura 4-3).

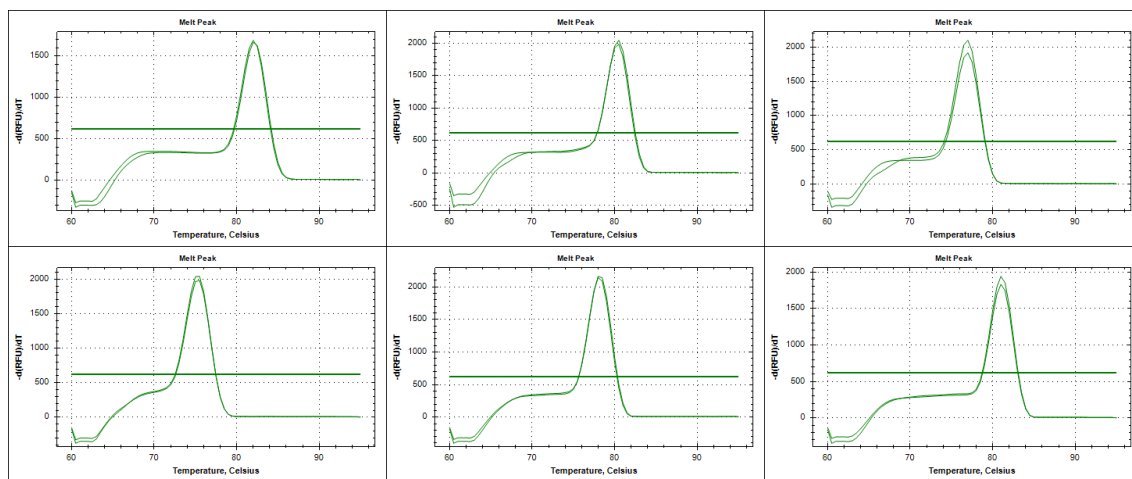


Figura 4-3: Curvas de temperatura de fusión de fragmentos amplificados.

Gen *uidA*, *lacY*, *eaeA*, *rfeE*, *stx1* y *stx2*. De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo respectivamente.

Recientemente se han desarrollado métodos por qPCR que permiten la serotipificación de microorganismos empleando múltiples genes [180]. Dado que cada fragmento evaluado presenta un tamaño y una temperatura de fusión característica, se podrían desarrollar un método de detección por qPCR usando SYBR Green para amplificar los genes en conjunto con el objetivo de detectar, identificar y/o serotipificar microorganismos de manera rutinaria en los laboratorios de análisis.

4.1.2.1 Intervalo lineal y eficiencia de amplificación

La linealidad de cada gen se evaluó amplificando cada conjunto de oligonucleótidos en modo simplex, usando como plantilla diluciones seriadas del ADN de *E. coli* O157:H7 MRC IRMM 449® (Figura 4-4). La eficiencia se evaluó mediante el análisis de regresión lineal del logaritmo de la dilución en función el ciclo de amplificación. La eficiencia se determinó usando la ecuación 4-1, donde E es la eficiencia de amplificación y m es la pendiente de la curva de la gráfica [181].

$$E = 10^{-\frac{1}{m}} - 1$$

Ecuación 4-1

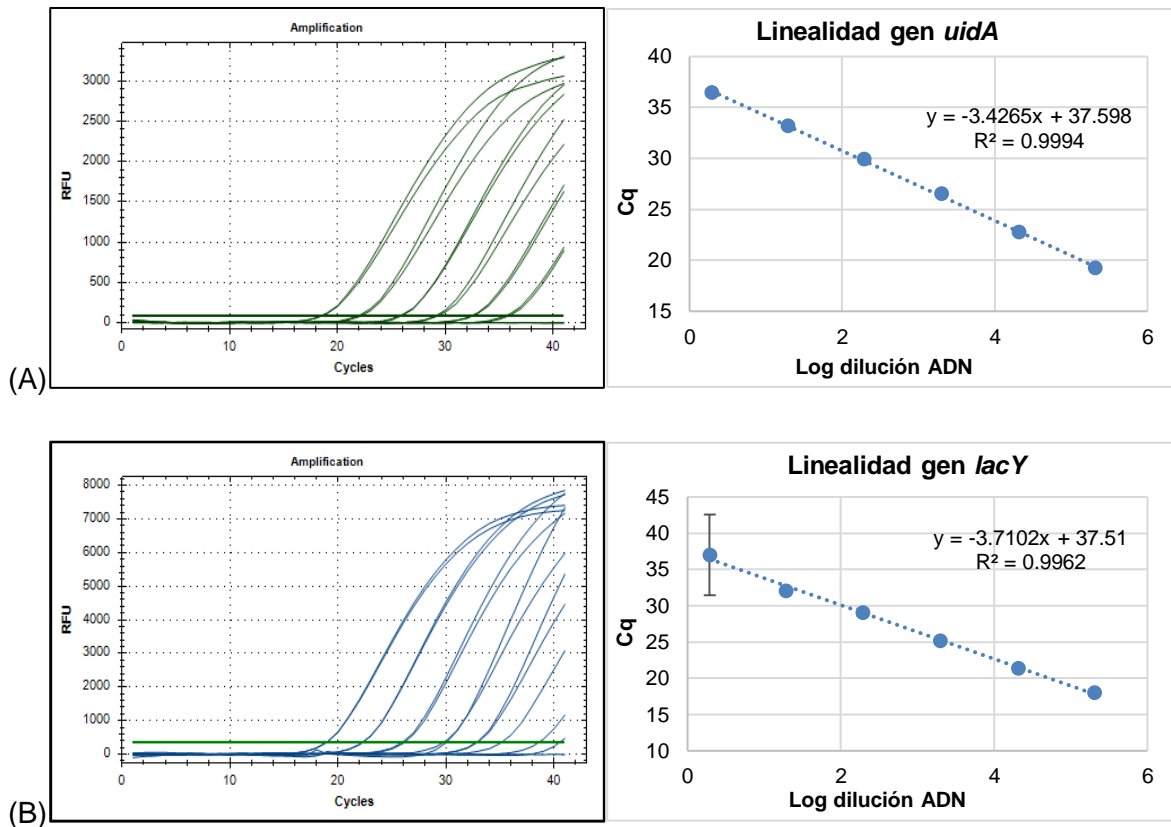


Figura 4-4: Linealidad de secuencias amplificadas por PCR tiempo real.

Curvas de amplificación por qPCR (izquierda) y gráficas de linealidad (derecha) para el gen *uidA* (A) y *lacY* (B).

Todos los fragmentos amplificados mostraron un comportamiento lineal del ciclo de amplificación en función del logaritmo de la dilución de ADN (Tabla 4-4), así como eficiencias de amplificación entre 86% y 99%.

Tabla 4-4: Eficiencias de amplificación para de los genes en ADN *E. coli* O157:H7.

Gen	Pendiente	Intercepto	R	Eficiencia	% Eficiencia
<i>uidA</i>	-3.427	37.598	0.999	1.96	95.8
<i>lacY</i>	-3.710	37.510	0.965	1.86	86.0
<i>eaeA</i>	-3.357	36.507	0.988	1.99	98.6
<i>rfbE</i>	-3.346	36.678	0.996	1.99	99.0
<i>stx1</i>	-3.661	38.201	0.989	1.88	87.6
<i>stx2</i>	-3.632	37.903	0.998	1.89	88.5
Z3276	-3,408	36.834	0.999	1.96	96.5

Los genes *lacY*, *stx1* y *stx2* presentaron eficiencias inferiores al 90% lo que podría estar relacionado con la posible formación de estructuras secundarias como horquillas o al tamaño de sus productos de amplificación, dado que son de mayor tamaño con respecto a los otros genes [182]. La optimización de las condiciones de amplificación de todos los genes mejoraría la eficiencia y los haría adecuados para emplearlos en el método de amplificación por PCR digital.

4.1.2.2 Selectividad de oligonucleótidos

La selectividad en PCR es la capacidad de amplificar inequívocamente un gen en presencia de sustancias que estén presentes en las muestras. En este caso que amplifique únicamente los genes presentes en cepas de *E. coli* o *E. coli* O157:H7 frente a ADN de otros microorganismos que posiblemente se encuentren en las muestras. La selectividad se evaluó de las secuencias empleando ADN de otros microorganismos de interés en alimentos (Ver Tabla 3-1). Cada ADN tenía una concentración aproximada de 1 ng/μL, por lo que se esperaba un Cq entre 20 y 22 ciclos de amplificación, según valor de control positivo (Figura 4-5).

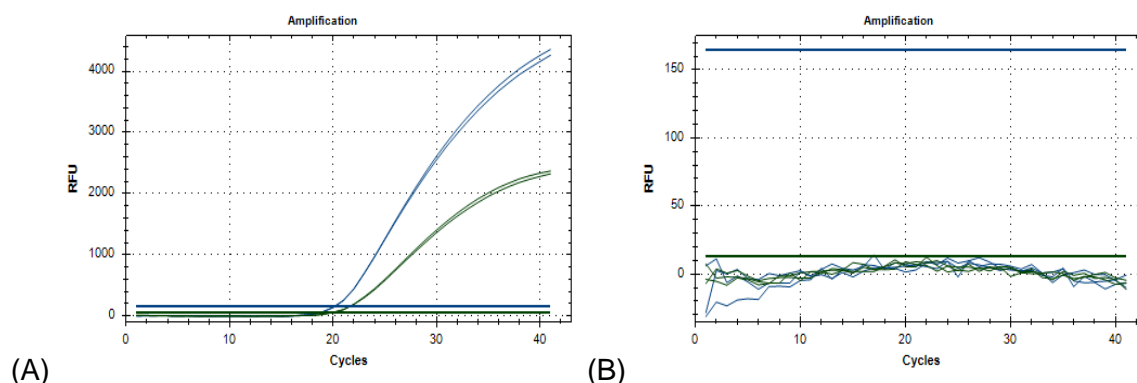


Figura 4-5: Perfil de amplificación de ADN 1ng/μL por qPCR.

Amplificación de ADN *E. coli* O157:H7 IRMM 449 (1ng/μL) como control positivo (A) y ADN de *Staphylococcus aureus* derivado de ATCC® 25923 (1ng/μL) como control negativo (B). Cada muestra se amplificó por duplicado.

Al evaluar la selectividad de los genes se presentaron diferentes perfiles de amplificación en varios grupos de microorganismos (Tabla 4-5). El gen *uidA* amplificó en bacterias de *E. coli* y *Shigella*, en cambio, el gen *lacY* amplificó en algunas cepas de bacterias Gram (-) y *E. coli* pero no en *Shigella*, por lo que la amplificación en conjunto de *uidA* y *lacY* podría usarse para la identificación de especie de bacterias de *E. coli*.

Tabla 4-5: Selectividad de genes por PCR.

Grupo	Microorganismo	Referencia	<i>uidA</i>	<i>lacY</i>	<i>eaeA</i>	<i>rfbE</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Z3276
Grupo G(+)	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 6538	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC® 10876	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 14506	-	-	-	-	-	-	-
Grupo G(-)	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC® 17802	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC® 33420	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC® 43864	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC® 13882	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC® 23715	-	-	-	-	-	-	-
Grupo SH	<i>Shigella boydii</i>	ATCC® 9207	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC® 9290	+	-	-	-	-	-	-
Grupo EC	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	+	+	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	Donada ¹	+	+	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	NCTC 10538	+	+	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739	+	+	-	-	-	-	-
Grupo STEC	<i>Escherichia coli</i> O104:H4	ATCC® BAA-2326™	+	+	-	-	-	+	-
	<i>Escherichia coli</i> O145:NM	CDC 99-3311	+	+	+	-	+	+	-
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC® 700728™	+	+	+	+	-	-	+
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC® 35150™	+	+	+	+	+	+	+
Grupo SAL	<i>Salmonella thyphimurium</i>	Donada ²	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Salmonella thyphi</i>	Donada ²	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Salmonella enteritidis</i>	Donada	-	-	-	-	-	-	-

G(+): Gram positivas, G(-): Gram negativas, SH: *Shigella*, EC: *E. coli*, STEC: *E. coli* productoras de toxina Shiga y SAL: *Salmonella*.

El fragmento del gen *lacY* no amplificó en ADN de *Shigella* aunque según el análisis *in silico* el fragmento estaba presente. Lo anterior evidencia algunas discrepancias entre en análisis bioinformático y experimental, debidas posiblemente a que en el análisis bioinformático se empleó una base de datos no curada, en la que se podrían presentar diferencias en la secuencia reportada con respecto al genoma de la cepa empleada.

El gen *eaeA*, amplificó las cepas de *E. coli* O157:H7 y O145:NM del grupo STEC pero no en la cepa de *E. coli* O104:H4. El gen podría usarse como indicador de cepas con capacidad de

¹ Donada por Laboratorio de Medicina UNAL

² ADN de Salmonella, donado por Instituto Nacional de Salud, grupo de Microbiología.

adherencia al huésped, aunque los oligonucleótidos diseñados no distinguen todas las cepas con capacidad de adherencia. Lo anterior se debe a que este gen presenta múltiples variantes en varios serotipos de STEC, por lo tanto se deben usar primers degenerados para su identificación [179].

Los genes *stx1* y *stx2* amplificaron en aquellas bacterias de *E. coli* enterohemorrágicas que tenían los genes que codifican las proteínas similares a toxinas Shiga. El gen *stx2* amplificó en la cepa *E. coli* O104:H4, mientras que en las cepas de *E. coli* O145:NM y *E. coli* O157:H7 amplificaron los dos genes. Esto evidencia que los oligonucleótidos diseñados permiten identificar cepas que contengan genes que codifican para las toxinas Shiga. Los genes *rfbE* y Z3276 amplificaron únicamente en las cepas de *E. coli* O157:H7, demostrando su selectividad hacia esa cepa.

La evaluación de la selectividad de la amplificación de las secuencias por qPCR es importante, dado que la presencia de genes relacionados a los de interés, que posiblemente amplifiquen con bajas eficiencias por qPCR podrían generar lluvia en el proceso de cuantificación por PCR digital, haciendo que sobreestime la concentración de ADN. La evaluación de la selectividad empleando soluciones individuales de ADN de otros microorganismos presentes en alimentos es una adecuada aproximación, dado que las secuencias se emplearán en un método para cuantificar soluciones puras de ADN de *E. coli* O157:H7 en la producción de materiales de referencia. En el caso de emplear un método para detección en muestras provenientes de alimentos se requiere evaluar la selectividad con mayor rigurosidad.

A partir de los resultados bioinformáticos y experimentales, el gen Z3276 mostró ser adecuado para la identificación inequívoca de cepas de *E. coli* O157:H7. Además, los perfiles de amplificación mostrados por cada cepa evaluada con los genes empleados en el estudio demuestran que la amplificación de varios genes en conjunto, permitirían la clasificación y/o identificación de varios serotipos de *E. coli*. Se han reportado casos en los que emplean varios genes para la serotipificación o discriminación de microorganismos [88], [183], por lo que se podría diseñar un método por qPCR para detectar y/o hacer un tamizaje del tipo de microorganismos presentes en una muestra.

4.1.2.3 Equivalencia dúplex simplex por qPCR

Antes de evaluar experimentalmente la amplificación dúplex de varias combinaciones de genes, se realizó un análisis *in silico* en OligoAnalyzer® con el fin de predecir la interacción entre los oligonucleótidos de los distintos genes. Para aquellas parejas de oligonucleótidos que presentarán una energía inferior a -9.0 Kcal/mol, habría alta probabilidad de formación de estructuras diméricas, lo que repercutía en disminución en la eficiencia de amplificación usando esas parejas de oligonucleótidos. Los resultados del análisis bioinformático se presentan en el Anexo C: Análisis secuencias modo dúplex.

La amplificación en modo simplex y modo dúplex de las posibles combinaciones de genes se evaluó experimentalmente. Se amplificó en modo simplex los 7 fragmentos de genes en ADN de *E. coli* O157:H7, IRMM 449® con concentración aproximada de 6.34×10^{-2} ng/μL (10460 copias/μL), en donde se observó un Ct promedio de 23.2. Luego se realizó la combinación en modo dúplex, los genes con fluoróforos FAM (*lacY*, *eaeA*, *stx1*, Z3276) con los genes con fluoróforos HEX (*uidA*, *rfbE*, *stx2*) (Tabla 4-6).

Tabla 4-6: Ciclos de amplificación promedio de cada gen en modo dúplex

	<i>uidA</i>	<i>lacY</i>	<i>eaeA</i>	<i>rfbE</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Z3276
<i>uidA</i>	23.6	22.8	23.2	N/A	23.5	N/A	22.9
<i>lacY</i>	23.8	23.0	N/A	23.2	N/A	23.4	N/A
<i>eaeA</i>	23.7	N/A	23.3	23.0	N/A	23.3	N/A
<i>rfbE</i>	N/A	23.0	23.1	23.0	23.4	N/A	23.0
<i>stx1</i>	23.6	N/A	N/A	23.0	23.0	23.2	N/A
<i>stx2</i>	N/A	22.8	23.2	N/A	23.3	23.3	22.4
Z3276	24.2	N/A	N/A	23.3	N/A	23.1	23.2

La región sombreada indica los Cq para los genes evaluados en modo simplex.

Para evaluar diferencias significativas entre la respuesta de cada gen en modo dúplex vs el modo simplex, se realizó una prueba t-student por parejas. Al hacer al análisis estadístico de todos los datos, se obtuvo que el gen *uidA* se puede amplificar en modo dúplex con los genes *lacY*, *eaeA* y *stx1* sin que haya diferencias significativas entre los resultados. El gen *rfbE* se puede amplificar en modo dúplex con cualquiera de los genes evaluados, y el gen *stx2* sólo se puede amplificar en modo dúplex con los genes *lacY* y *eaeA* sin diferencias significativas.

A partir de los anteriores resultados se podría inferir que los factores por los cuales se obtienen respuestas diferenciales entre los genes podrían ser (i) diferencias en las temperaturas óptimas de anillamiento, (ii) diferencias en eficiencias de amplificación, el acceso de los

oligonucleótidos al ADN plantilla, entre otros. La combinación permitida de amplificación en modo dúplex para los genes evaluados por qPCR se presenta en la Tabla 4-7.

Tabla 4-7: Amplificación en modo dúplex de parejas de oligonucleótidos evaluados

Genes	lacY	eaeA	Stx1	Z3276
uidA	✓	✓	✓	X
rfbE	✓	✓	✓	✓
Stx2	✓	✓	X	X

4.1.3 Optimización de método para cuantificación por PCR digital

Cada uno de los fragmentos génicos amplificó sobre ADN de *E. coli* O157:H7 MRC IRMM 449® por PCR digital en modo gotas (ddPCR). El análisis de las amplificaciones muestra la adecuada separación de las poblaciones de eventos positivos y negativos para cada uno de los genes, en el eje Y se muestran las unidades de fluorescencia relativa y en el eje X se muestran el número de eventos para cada muestra, en la parte inferior (negro) se encuentra la población de eventos negativos y en la parte superior (verde (HEX), azul (FAM)) se encuentra la población de eventos positivos para cada muestra (Figura 4-6). En las gráficas se observó pocos eventos entre la población de positivos y negativos (lluvia) lo que indica una uniformidad en los patrones de amplificación.

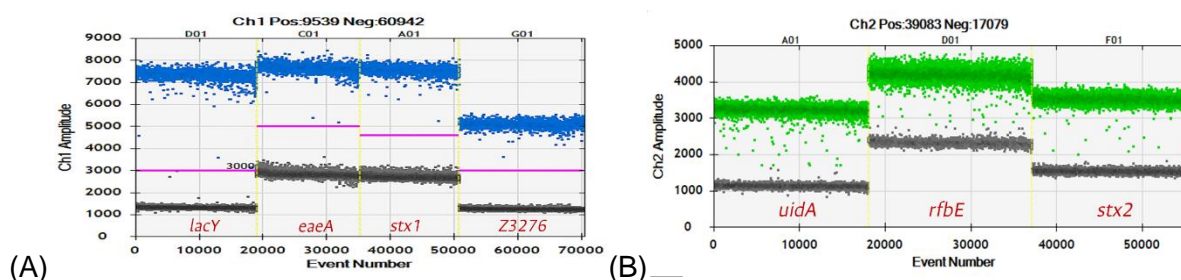


Figura 4-6: Perfiles de amplificación de genes de *E. coli* O157:H7 por ddPCR

Perfiles de amplificación para los genes (A) *lacY*, *eaeA*, *stx1* y *Z3276* (B) *uidA*, *rfbE* y *stx2*. Muestras separadas por líneas punteadas amarillas.

Al evaluar la cuantificación absoluta de ADN en la plantilla de *E. coli* O157:H7 por parte de cada uno de los genes amplificados, se observó una variación entre genes del 26%, debida principalmente al resultado obtenido por el gen *rfbE*. Teniendo en cuenta que todos los genes

son única copia en el genoma, se esperaría que se obtuvieran valores cercanos en la cuantificación del mismo genoma (Figura 4-7)

En la optimización del método se evaluaron algunos parámetros que afectan la reacción de amplificación, para lograr una respuesta homogénea entre los genes evaluados. La optimización cubrió los parámetros de temperatura de anillamiento, digestión enzimática, concentración de primers y rampas de calentamiento, donde los criterios de selección se basaron en la precisión de los resultados y la cantidad de lluvia obtenida [151], [184].

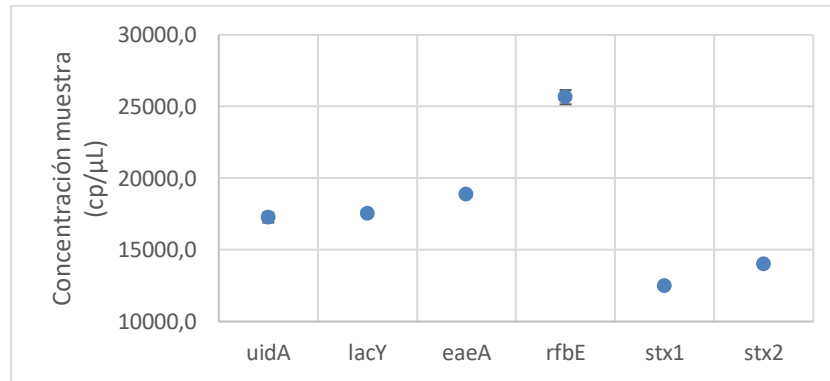


Figura 4-7: Concentración estimada por genes de *E. coli* O157:H7 por ddPCR. Barras de error representan resultados de triplicado de muestras.

4.1.3.1 Temperatura de anillamiento

Cada juego de oligonucleótidos seleccionado, tenía diferentes condiciones de amplificación reportadas en literatura (tabla B-2 en Anexo B: Análisis de secuencias de primers), por lo que se modificaron algunos parámetros con el objetivo de amplificar en conjunto los fragmentos de diferentes genes bajo las mismas condiciones de amplificación. El primer ensayo que se realizó consistió en hacer un gradiente de temperatura para todos los genes en el estudio. Para cada par de oligonucleótidos se reportaban en literatura diferentes temperaturas de anillamiento, que oscilaban entre 56°C y 62°C, por lo que se hizo la cuantificación de ADN a 61.5°C, 58.2°C y 55.0°C.

Al evaluar la concentración de ADN (copias/μL) en función de la variación de la temperatura para cada uno de los genes (Figura 4-8), no se observaron diferencias significativas, la variación medida como CV entre genes fue del 12%, consecuencia especialmente de la mayor concentración obtenida en *stx2*. Lo anterior puede deberse a la accesibilidad de los primers

al ADN plantilla o a las eficiencias de amplificación de cada gen bajo las condiciones de amplificación usadas.



Figura 4-8: Efecto de temperaturas de anillamiento en cuantificación

Las barras muestran los valores estimados de concentración del ADN IRMM® 449 en número de copias/μL para cada gen. Las barras de error corresponden a la variación del triplicado.

Al analizar las fracciones de positivos y negativos para cada gen a las distintas temperaturas no se observaron cambios apreciables en los perfiles de las poblaciones de los genes *uidA* y *stx1*, por lo que se pueden amplificar en un intervalo de 55°C a 61.5°C sin cambios en la cuantificación.

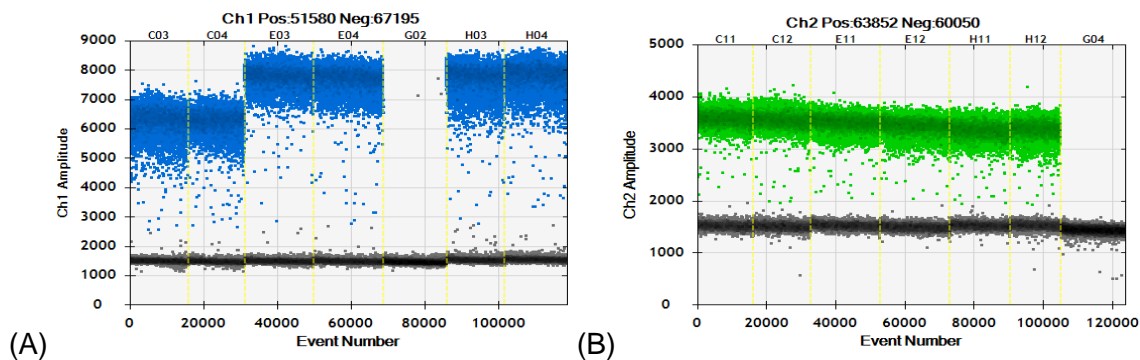


Figura 4-9: Amplificación por ddPCR a diferentes temperaturas de anillamiento.

Perfil de las poblaciones en función de la disminución de la temperatura, para los genes *lacY* (A) y *stx2*. (B). Cada muestra está por duplicado a 61.5°C, 58.2°C y 55.0°C, separadas por una línea amarilla punteada. El pozo G02 en (A) y G04 (B) corresponden a los blancos de reacción.

En el caso de los genes *lacY*, *eaeA* y *rfbE* se observó que al aumentar la temperatura disminuye la separación entre las poblaciones, lo que dificulta establecer un umbral entre las

poblaciones, por lo que se determinó que la temperatura óptima para la amplificación de estas secuencias es 58.2°C, la misma que se estaba manejando en los ensayos.

Por último, en la gráfica del gen *stx2* se observa un aumento en la separación de las poblaciones de positivos y negativos al aumentar la temperatura (Figura 4-9 (B)), lo que no afecta la cuantificación del ADN. A partir del ensayo se pudo concluir que todos los genes se pueden amplificar a 58°C sin que esto afecte la cuantificación de ADN.

4.1.3.2 Digestión enzimática

Se ha reportado que hacer digestión enzimática del ADN genómico mejora la accesibilidad de primers a la secuencia de interés [184]. Para evaluar el efecto de la digestión enzimática en la cuantificación de ADN (i) se hizo un análisis *in silico en SnapGene* del ADN plantilla para seleccionar la enzima que no realizara el corte en los fragmentos de interés. (ii) se realizó una digestión enzimática del ADN IRMM 449® con la enzima de restricción EcoRI (Promega) según las condiciones del fabricante [185]. (iii) Se prepararon diluciones gravimétricas del ADN digerido y sin digerir hasta obtener una concentración de 1,21 ng/μL (~20026 copias/μL). (iv) Se cuantificó el ADN con y sin digestión para determinar diferencias si existen significativas entre estos.

Se empleó como prueba de contraste el test t-student para datos emparejados, con el fin de determinar si hay diferencia entre la cuantificación de las muestras al digerir o sin digerir. El análisis estadístico de los datos se presenta en la Tabla D-1 en el Anexo D. Se evidenció diferencias significativas entre la respuesta del ADN con y sin digestión, debido a que la respuesta para todos los genes aumenta al hacer la digestión enzimática del ADN con respecto al ADN sin digerir. Lo anterior podría indicar que la digestión aumenta la accesibilidad de los oligonucleótidos a la región objetivo, pero aún se observan diferencias de la respuesta entre los genes. Los datos entre genes con digestión muestran una variación entre genes del 3.5% mientras que sin digestión muestran una variación del 5.3% (Figura 4-10). En donde el fragmento que presenta la mayor concentración es el gen *stx2*.

Teniendo en cuenta que la digestión enzimática del ADN implica un paso adicional en el proceso de medición, así como, un aporte adicional al presupuesto de incertidumbre del método de medición. Además, el elevado número de mediciones implicadas tanto en la validación como en los procesos de caracterización del material, se decidió no emplear la digestión enzimática de las muestras.

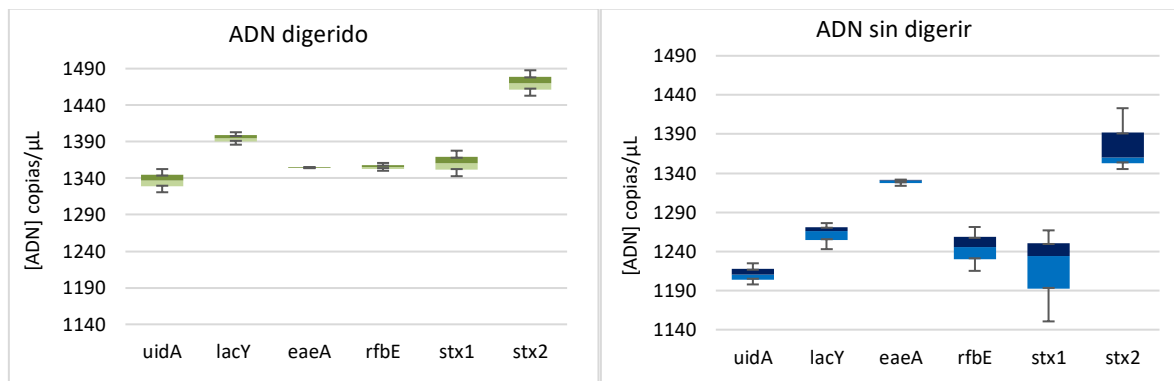


Figura 4-10: Cuantificación de ADN IRMM 449® con y sin digestión enzimática

Diagrama de cajas y bigotes presenta los datos de cuantificación de ADN con digestión enzimática con EcoRI (verde) y sin digestión (azul) para cada gen.

4.1.3.3 Concentración de primers

El efecto del aumento de la concentración de primers sobre la cuantificación absoluta del ADN plantilla, se evaluó empleando una concentración de primers de 500 nM y 800 nM. Al observar los perfiles de amplificación para cada uno de los genes, no hubo diferencias para los genes *stx1*, *stx2* y *rfbE*, en cambio para los genes *uidA*, *lacY*, *eaeA* y *Z3276* se observó un aumento en la fluorescencia relativa para la población de gotas positivas (figura 4-11).

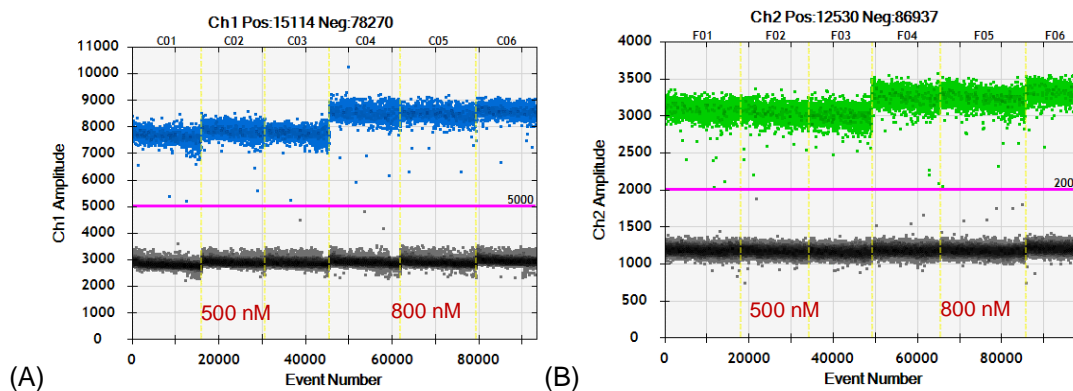


Figura 4-11: Efecto de concentración de primers en poblaciones de ddPCR

Efecto del aumento de la concentración de primers en los perfiles de amplificación por ddPCR para los fragmentos de genes *eaeA* (A) y *uidA* (B). Cada muestra se midió por triplicado empleando 500 y 800 nM de primers. Cada réplica está separada por una línea amarilla punteada.

Al evaluar el efecto de la concentración de primers en la cuantificación del ADN, no se observaron diferencias significativas entre las respuestas obtenidas al emplear 500 nM u 800 nM de primers, el análisis estadístico de los datos se presenta en la tabla C-1 (Anexo C). Sin embargo, se evidencia la disminución de la dispersión de la cuantificación entre los genes al aumentar la concentración de primers de 500 nM (CV 12.5%) a 800 nM (CV 8.6%) (Figura 4-12). La disminución de la dispersión puede deberse a que al aumentar la concentración de primers hay mejor distribución de reactivos en todas las particiones, obteniendo mayor uniformidad en los datos entre muestras.

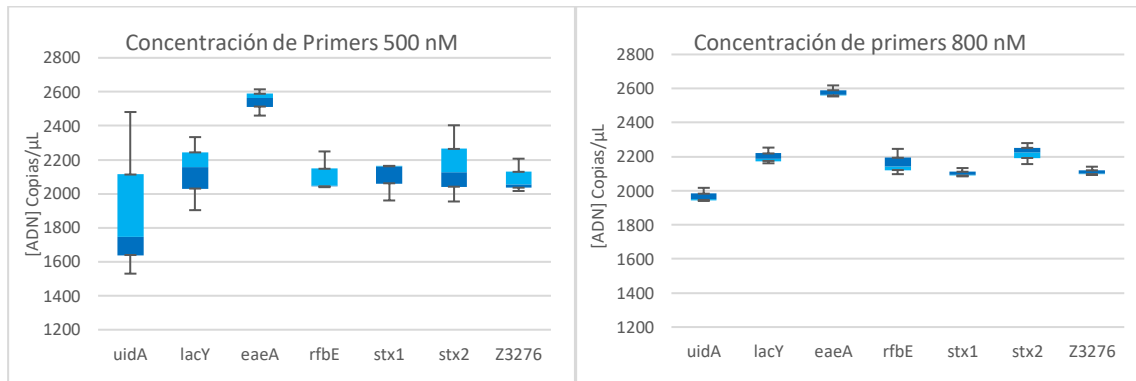


Figura 4-12: Efecto de concentración de primers en la cuantificación

Diagramas de cajas y bigotes de concentración de ADN IRMM 449® de *E. coli* O157:H7 por cada gen al emplear 500 nM de primers (izquierda) y 800 nM de primers (derecha).

4.1.3.4 Intervalo de trabajo

Nueve niveles de concentración de ADN de IRMM 449® se cuantificaron por ddPCR, empleando los genes en modo simplex para determinar el intervalo de trabajo del método de acuerdo con las condiciones descritas en 3.2.3. En los perfiles de amplificación se evidencia la disminución de particiones positivas al disminuir la cantidad de ADN en la mezcla de reacción, sin cambios apreciables en la fluorescencia relativa en las poblaciones (Figura 4-13)

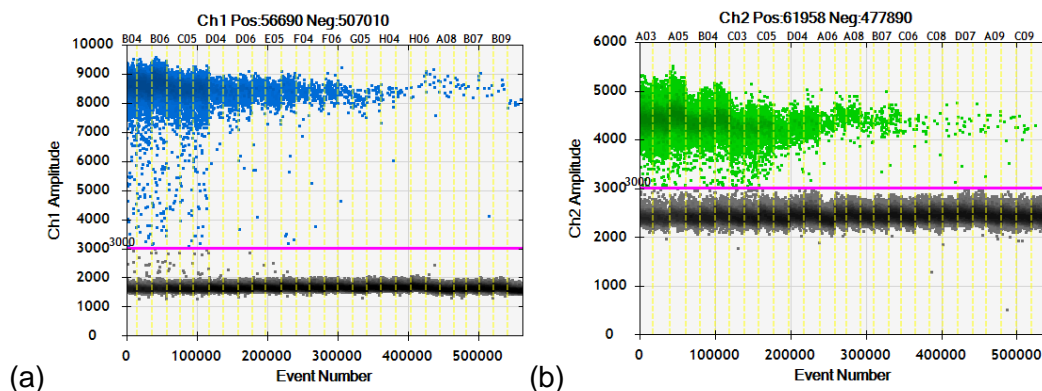


Figura 4-13 Perfiles de amplificación en función de la concentración de ADN

Amplificación de los genes *lacY* (a) y *rfbE* (b) al disminuir la cantidad de ADN en la mezcla de izquierda a derecha. Intervalo de concentración mostrado entre 0.5 copias/ μ L a 1200 copias/ μ L.

De acuerdo con la relación entre la cantidad de ADN en el tubo de PCR y la dilución de ADN, y teniendo en cuenta los datos de regresión, se evidenció un comportamiento lineal para todos los genes entre aproximadamente 1 copia/ μ L y 7400 copias/ μ L en el tubo de PCR. Por debajo de 1 copia/ μ L se observa la desviación de la tendencia lineal (Figura 4-14).

Al calcular la variación por nivel de concentración se observó el aumento en la dispersión de los datos al disminuir la concentración de ADN. Por lo que el intervalo que presenta una variación inferior al 25% como CV, en el cual se podría hacer cuantificación se encuentra entre 7 y 7400 copias/ μ L para todos los genes (Tabla 4-8). Sin embargo, con los ensayos dirigidos a *uidA*, *lacY*, *rfbE*, *stx2* y *Z3276* se podría cubrir un nivel más hacia concentraciones bajas.

Tabla 4-8 Variación por nivel de concentración en cuantificación por ddPCR

[ADN] copias/ μ L	Precisión (CV%)						
	<i>uidA</i>	<i>lacY</i>	<i>eaeA</i>	<i>rfbE</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>Z3276</i>
7408.3	1.92	3.55	3.63	4.65	4.59	2.13	3.28
1204.8	1.90	1.08	1.04	1.86	4.05	0.98	1.67
758.9	3.95	5.86	4.02	1.53	2.13	1.36	2.78
70.5	1.32	5.16	5.33	4.87	2.12	6.53	1.31
6.8	11.68	9.50	17.31	8.77	11.61	16.97	3.30
1.5	5.97	23.54	32.98	11.32	26.00	21.47	17.94
0.7	33.59	35.43	32.50	35.43	14.94	71.46	40.21
0.5	18.81	16.65	78.08	16.65	31.37	27.83	61.06
0.2	44.41	19.60	87.04	19.60	173.21	93.36	96.56

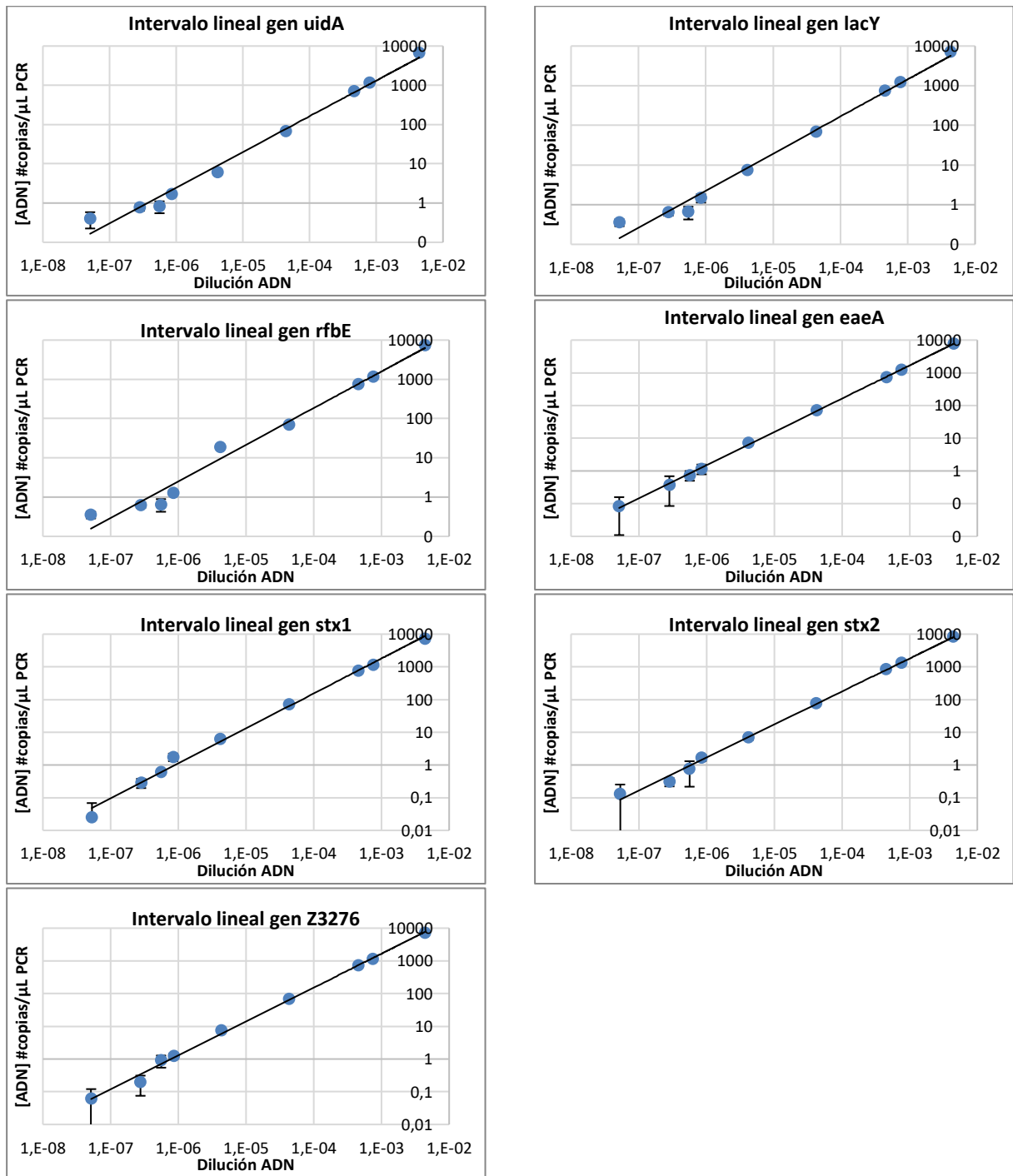


Figura 4-14 Intervalo lineal cuantificación *E. coli* O157:H7 por ddPCR

Concentración estimada de copias/ μ L en función de la dilución de ADN para los 9 niveles de concentración evaluados

4.1.3.5 Equivalencia simplex-dúplex y rampas de temperatura

Para hacer la adecuada cuantificación de secuencias por ddPCR en modo dúplex, se requiere que las fluorescencias relativas de las poblaciones de gotas positivas y negativas se encuentren lo suficientemente separadas para asignar adecuadamente un umbral de fluorescencia (Figura 4-15). La población negra (3) corresponde a los eventos negativos para los fluoróforos FAM y HEX, la población en azul (1) son los eventos positivos para FAM, la población en verde (4) son los eventos positivos para HEX y la población naranja (2) son los eventos positivos de FAM y HEX (dobles positivos).

El comportamiento ideal al realizar la cuantificación por ddPCR en modo dúplex se presenta cuando la población de dobles positivos se encuentra completamente separada de la población de positivos para FAM y para HEX, como se puede observar en la Figura 4-15 (A), esto permite identificar y cuantificar de manera más precisa la fracción de positivos de cada gen en el ensayo dúplex, facilitando la cuantificación de cada gen en la muestra

Al realizar la amplificación de fragmentos en modo dúplex se puede presentar corrimiento en la fluorescencia de la población de dobles positivos debido a competencia de los oligonucleótidos por el fragmento, falta de accesibilidad de los oligonucleótidos al gen, competencia de los oligonucleótidos por los reactivos, diferencias en las eficiencias de amplificación, interacciones entre los oligonucleótidos, entre otros casos. El desplazamiento de la población de eventos se puede dar hacia la derecha o izquierda (Figura 4-15 B), o hacia abajo (Figura 4-15 C).

La combinación dúplex de los genes *uidA - eaeA* y *uidA - Z3276* presentó un ligero corrimiento hacia la derecha de la población de dobles positivos, como en figura 4-15 (B), esto no generó inconvenientes al fijar los umbrales de fluorescencia, ni los valores de cuantificación reportados por estos genes. En el caso de la combinación *rfbE-stx1* se presentó un ligero corrimiento hacia la izquierda, sin que afectara los valores de concentración reportados.

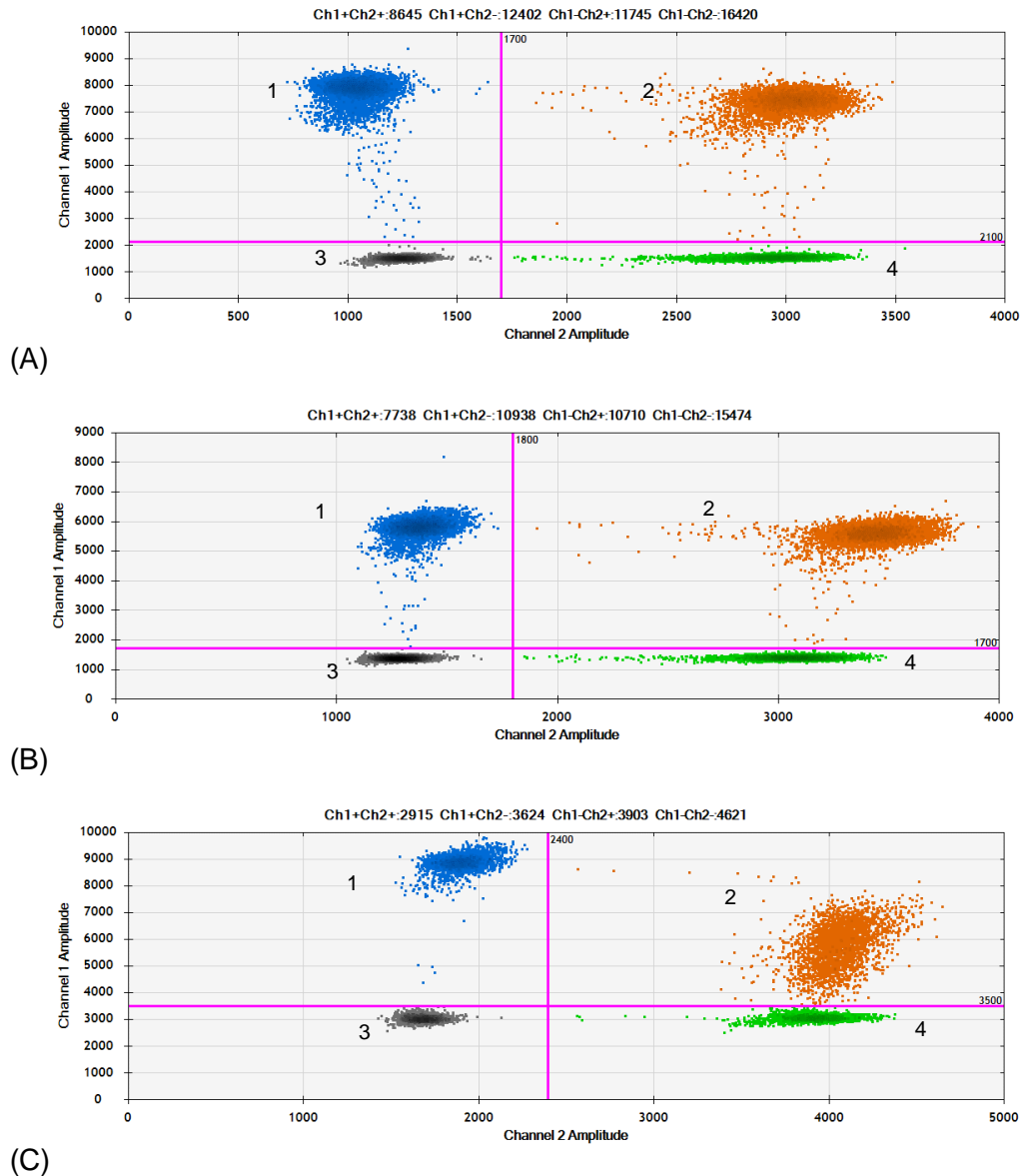


Figura 4-15: Diagrama de poblaciones de gotas en modo dúplex por ddPCR

Perfil de las poblaciones en modo dúplex para los genes *uidA-lacY* (A) *uidA-Z3276* (B) y *stx1-stx2* (C).

Para la combinación *stx1* y *stx2* se presentó un ligero corrimiento hacia valores de fluorescencia menor, como en Figura 4-15 C, sin que se afectaran los valores de concentración reportados. En cambio, las otras combinaciones de genes (*rfbE-lacY*, *stx2-lacY*, *eaeA-rfbE*, *stx2-eaeA*, *Z3276-rfbE* y *Z3276-stx2*) presentaron un corrimiento mucho mayor hacia fluorescencias bajas, que impidió fijar adecuadamente un umbral de fluorescencia para la población de FAM positivos, afectando así la cuantificación de la concentración por ddPCR. Por lo tanto, ensayos en dúplex factibles por dPCR son *uidA* con *lacY*, *eaeA*, *stx1* o *Z3276*, el gen *rfbE* con *stx1* y el gen *stx2* con *stx1*.

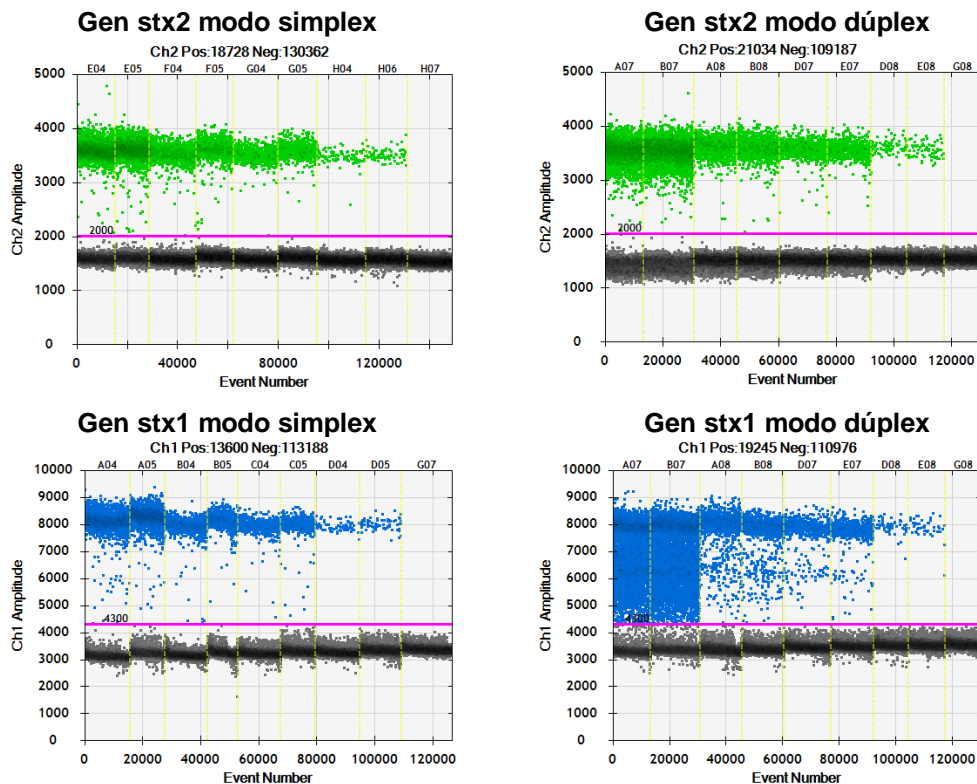


Figura 4-16 Perfiles de poblaciones en modo simplex vs dúplex de genes *stx1* y *stx2*

Amplificación de genes *stx1* y *stx2* en modo simplex (izquierda) y genes amplificados en modo dúplex (derecha) en el intervalo de 88 a 8000 copias/ μ L. Se muestran dos réplicas por concentración evaluada, cada réplica está separado por las líneas punteadas amarillas.

Para determinar el intervalo de medición en el modo dúplex se analizó la equivalencia entre el modo simplex y dúplex empleando las secuencias *stx1* y *stx2*. Se amplificaron 4 niveles de concentración entre 88 copias/ μ L y 8000 copias/ μ L en modo simplex y dúplex en el mismo ensayo. Se observó que al aumentar la concentración de ADN en la muestra aumentaba la cantidad de lluvia entre las poblaciones en el modo dúplex para el gen *stx1*, (Figura 4-16) dificultando así establecer adecuadamente el umbral de fluorescencia para la cuantificación en el nivel de 8000 copias/ μ L.

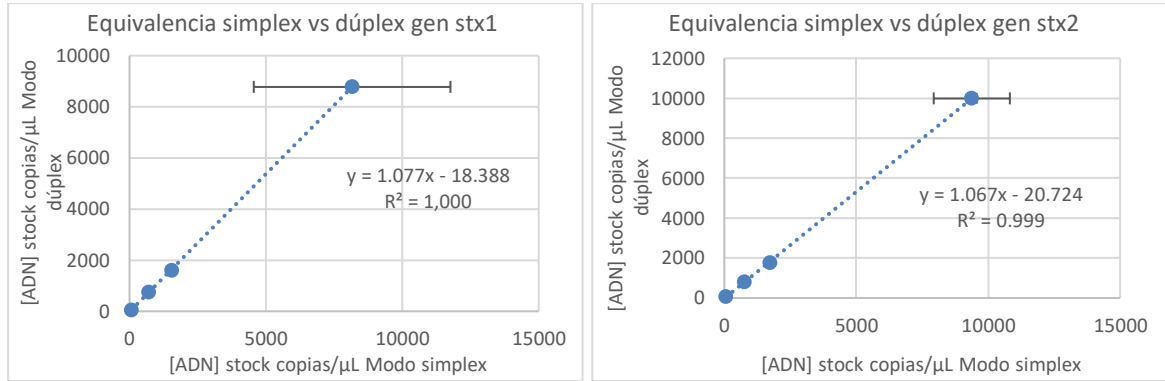


Figura 4-17 Equivalencia simplex dúplex por ddPCR de genes

Comportamiento lineal entre datos de concentración en copias/μL reportados por gen stx1 (izquierda) y stx2 (derecha) en modo dúplex en función de modo simplex.

A partir de los datos de concentración reportados, se construyó una gráfica de concentración en modo simplex en función de la concentración en modo dúplex. Aunque los datos aparentemente presentaron un comportamiento lineal (Figura 4-17.), al realizar el análisis estadístico de regresión, se observó que las gráficas no cumplen con los criterios de linealidad (Tabla D-4 en Anexo D), lo cual se pudo deber a la alta dispersión de los datos en el nivel de máxima concentración evaluada en el modo dúplex.

Con el objetivo de separar las poblaciones de positivos y negativos en muestras con concentración cercana a 1000 copias/μL en modo dúplex, se evaluó la disminución de la rampa de calentamiento en el proceso de termociclado. Se usó una rampa de 0,5°C/s para mejorar un calentamiento homogéneo de toda la muestra, obteniendo una mayor separación de las poblaciones en modo dúplex (Figura 4-18).

Al hacer la cuantificación en modo dúplex se observó que el valor de cuantificación obtenido por el gen que presenta el desplazamiento de fluorescencia es menor con respecto al gen que no presenta dicho desplazamiento, esto puede deberse a la dificultad de establecer el umbral entre las poblaciones de positivos y negativos para esta secuencia. Además, disminuye el intervalo lineal del método de 8000 a 1000 copias/μL. Esto posiblemente es consecuencia de la competencia entre los oligonucleótidos por la secuencia de interés. Por lo anterior, se recomienda realizar la amplificación de las secuencias por ddPCR para cuantificar en modo simplex.

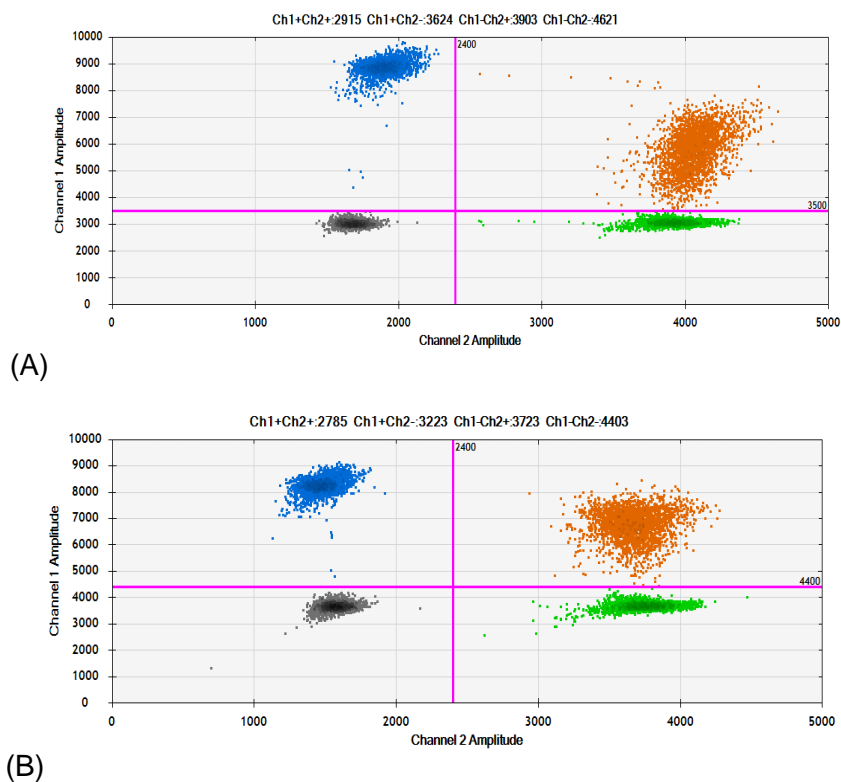


Figura 4-18: Efecto de rampas de calentamiento en perfiles de poblaciones

Perfil de las poblaciones en modo dúplex para los genes *stx1-stx2* Con rampa de calentamiento 1°C/s (A) y 0.5°C/s (B).

A partir de los resultados obtenidos se determinó que para realizar la cuantificación de *E. coli* O157:H7 por dPCR se recomienda emplear ADN genómico íntegro y realizar la amplificación de los siete genes en el estudio en modo simplex con una temperatura de anillamiento de 58.2°C y 800 nM de primers. Los valores de eficiencia obtenidos para cada uno de los genes son similares a aquellos reportados en literatura [87], [88], [186], por lo que son adecuados para emplearlos en el método de medición. Los genes evaluados mostraron que se podrían amplificar en modo dúplex por qPCR sin diferencias significativas, mientras que, por dPCR se pueden amplificar en modo dúplex sólo si se va a determinar la concentración de ADN entre 8 copias/ μ L a 1000 copias/ μ L.

4.1.4 Validación de método para cuantificación por PCR digital

Con base en los resultados de la optimización del método, se procedió a validar un método por ddPCR para cuantificar ADN genómico de *E. coli* O157:H7 con el objetivo de usarlo en la caracterización de un candidato a material de referencia. La amplificación de los genes *uidA*, *lacY*, *eeA*, *rfbE*, *stx1*, *stx2* y *Z3276* se validó en modo simplex, empleando 6 niveles de concentración, como se describe en 3.2.4.

4.1.4.1 Intervalo lineal y límite de cuantificación

A partir de los datos obtenidos para las réplicas evaluadas en cada nivel se estimó la concentración promedio y se graficó en número de copias/ μ L en función de la dilución de ADN (Figura 4-19). Todos los genes presentaron el mismo comportamiento para los niveles de concentración evaluados.

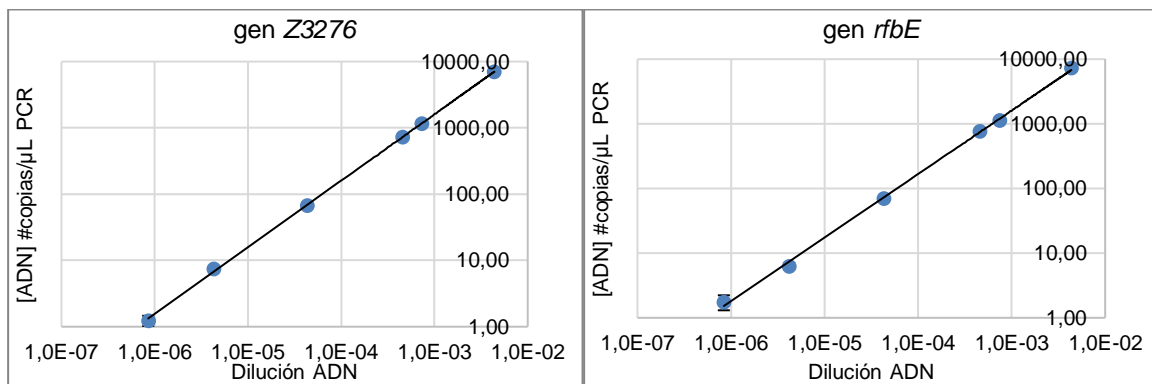


Figura 4-19: Intervalo lineal cuantificación de ADN por ddPCR

Relación lineal de concentración de ADN en número de copias/ μ L en función de la dilución de ADN para los genes *Z3276* y *rfbE*.

Tabla 4-9: Resultados análisis de regresión lineal de genes validados

Gen	Pendiente	Intercepto	Coefficiente de correlación (r^2)
<i>uidA</i>	1516070 \pm 7553	-5.3 \pm 13.9	0.999
<i>lacY</i>	1652697 \pm 14605	-17.8 \pm 26.5	0.999
<i>eeA</i>	1732747 \pm 15360	-21.2 \pm 28.8	0.999
<i>rfbE</i>	1688518 \pm 19028	-12.1 \pm 34.8	0.999
<i>stx1</i>	1683566 \pm 19537	-23.5 \pm 35.4	0.999
<i>stx2</i>	1894405 \pm 11534	-22.3 \pm 21.3	1.000
<i>Z3276</i>	1612203 \pm 12551	-6.5 \pm 22.9	0.999

El análisis de regresión se realizó teniendo como criterios de aceptación un coeficiente de correlación lineal (R^2) mayor a 0.990, una pendiente significativamente diferente de cero, un intercepto significativamente igual a cero con un 95% de confianza, así como una prueba de falta de ajuste (Tabla 4-9)

Para determinar el intervalo de trabajo del método, se estableció como criterio adicional una precisión medida como CV inferior al 25%, los resultados indican que la menor variación del método se encuentra hacia una concentración de 1200 copias/ μ L y hacia concentraciones mayores o menores aumentaba la variación (Tabla 4-10). El nivel de concentración de aproximadamente 1 copia/ μ L presentó una variación superior al 25% en varios genes, por lo que a este nivel de concentración no se recomienda hacer cuantificación.

Tabla 4-10: Porcentaje de variación en cuantificación de ADN por ddPCR

Concentración (copias/ μ L) PCR	Gen						
	<i>uidA</i>	<i>lacY</i>	<i>eaeA</i>	<i>rfbE</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	Z3276
7408,3	1.92	3.55	3.63	4.65	4.59	2.13	3.28
1204,8	1.90	1.08	1.04	1.86	4.05	0.98	1.67
758,9	3.95	586	4.02	1.53	2.13	1.36	2.78
70,5	1.32	5.16	5.33	4.87	2.12	6.53	1.31
8,6	11.68	9.50	17.31	8.77	11.61	16.97	3.30
1,5	5.97	23.54	32.98	11.32	26.00	21.47	17.94

A partir de los resultados anteriores, se estableció que el intervalo lineal del método está entre 1,48 a 7408 copias/ μ L en la mezcla de reacción, mientras que el intervalo de medición se encuentra entre 8,6 a 7408 copias/ μ L en la mezcla de PCR. Se observó en literatura que los criterios para establecer el LOQ para métodos de cuantificación por dPCR varían según el uso previsto del método [112], [151]. Como a bajas concentraciones de ADN los efectos estocásticos tienen gran impacto en la cuantificación de ácidos nucleicos es de gran importancia establecer la máxima variación permitida para el límite de cuantificación, esto hace que, al estimar la concentración de soluciones de ADN a bajas concentraciones se tenga confianza en el resultado de la medida.

4.1.4.1 Límite de detección

Al cuantificar los seis niveles de concentración empleando muestras entre 1 copia/ μL a 20 copias/ μL , se alcanzó una concentración estimada de 0,09 copias/ μL a 1,60 copias/ μL en las mezclas de PCR. Se observó la disminución de las particiones positivas al disminuir la cantidad de ADN plantilla (Figura 4-20) En todos los genes amplificados se observó que el límite de detección corresponde a una concentración aproximada de 0,27 copias/ μL en la mezcla de reacción y una dilución de ADN del orden de $1,55 \times 10^{-6}$, lo cual sería equivalente a detectar ADN en una muestra que contiene alrededor de 3 copias/ μL .

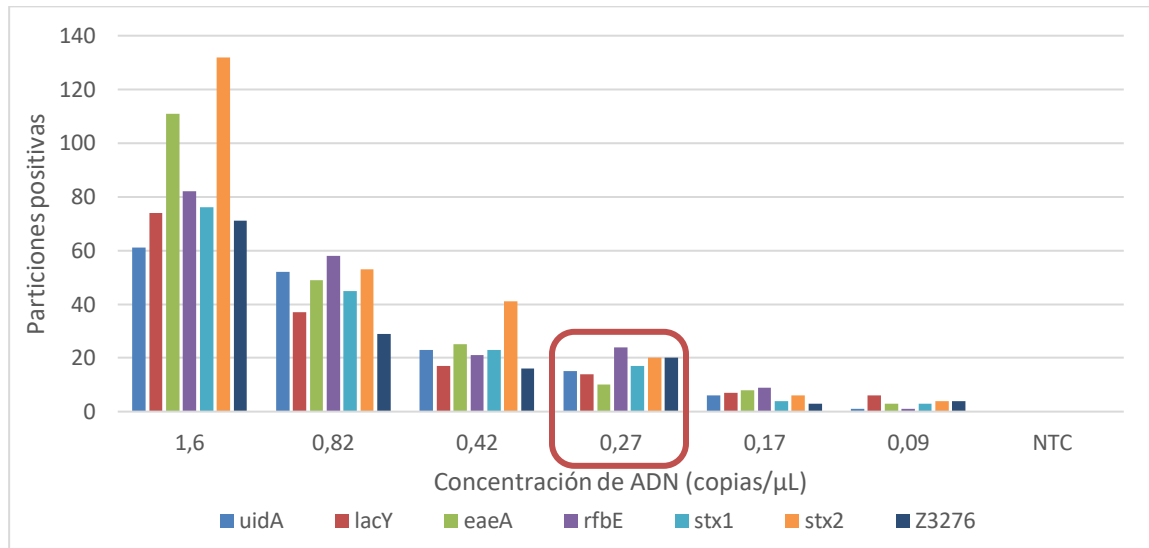


Figura 4-20: Determinación límite de detección de método por ddPCR.

Cada barra corresponde a la suma de las particiones positivas obtenida a partir de tres réplicas para cada uno de los genes.

El límite de detección basado en el criterio de la amplificación de todas las réplicas con al menos nueve particiones positivas entre todas, permite diferenciar con confianza un blanco de una muestra positiva con baja concentración. Dado que el uso previsto del método es la cuantificación de ADN para la caracterización de materiales de referencia, la concentración del número de copias de la secuencia objetivo en las muestras siempre se encontrará muy por encima de la LOD, por lo que la estimación aproximada del LOD es suficiente [151]. Al revisar en literatura LOD reportado para métodos por dPCR, se observó que se encuentran por debajo de 1 copia/ μL y los criterios de aceptación varían según el uso previsto del método [112], [187], [188].

4.1.4.2 Precisión

La precisión del método se evaluó midiendo cada nivel de concentración por triplicado durante 3 días. Se empleó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para evaluar precisión a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. La repetibilidad es la dispersión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo y la precisión intermedia es la dispersión obtenida dentro del laboratorio por diferentes analistas, diferentes equipos, días distintos con la misma muestra homogénea. La repetibilidad se calculó empleando los datos del ANOVA mediante la ecuación 4-2 y la precisión intermedia con la ecuación 4-3.

$$S_{rep,rel} = \frac{\sqrt{CMD}}{C_{promedio}} \quad \text{Ecuación 4-2}$$

$$S_{interm,rel} = \frac{\frac{\sqrt{CME - CMD}}{n_{replicas}}}{C_{promedio}} \quad \text{Ecuación 4-3}$$

Donde CME : cuadrado medio entre calculado mediante ANOVA, CMD : cuadrado medio entre calculado mediante ANOVA, $n_{replicas}$: número de réplicas por ensayo, $C_{promedio}$: concentración promedio en copias/ μ L calculada a partir de todos los ensayos.

Tras hacer el análisis se evidenció que en la mayoría de los niveles evaluados la variación entre las réplicas fue mayor que la variación entre muestras, por lo que se asumió que no hubo variación por precisión inter días significativa [163]. En la Tabla 4-11 se presenta la variación por repetibilidad para cada nivel de concentración evaluado, en donde se demostró que al disminuir la concentración de ADN aumenta la variación para todos los genes. Además, el gen que mostró menor variabilidad al hacer la cuantificación de ADN es el Z3276, el cual es específico para amplificar *E. coli* O157:H7.

Tabla 4-11: Variación por repetibilidad en cuantificación de ADN por ddPCR

Dilución	[ADN] (cp/ μ L) Muestra	[ADN] (cp/ μ L) mezcla PCR	%CV Repetibilidad						
			uidA	lacY	eaeA	rfbE	stx1	stx2	Z3276
1	88685.3	7920.7	3.70	3.16	5.08	3.70	3.86	4.77	2.13
2	8644.6	718.3	3.31	4.00	6.23	1.05	1.53	2.89	3.69
3	816.2	66.5	6.20	3.72	10.05	4.27	3.16	13.62	3.34
4	80.9	6.6	9.95	9.67	10.63	6.46	10.98	12.73	6.11

Los resultados evidencian que el nivel al cual se presenta la mejor precisión es cercano a las 800 copias/ μL , por lo que, si se desea obtener un valor de concentración de ADN con baja incertidumbre asociada se debe buscar que la muestra alcance dicha concentración en la mezcla de PCR. Si bien el método presenta alta dispersión por repetibilidad, debida principalmente a la variabilidad propia del método (eficiencias de amplificación, sesgo entre genes, efectos aleatorios de distribución de muestra, entre otros), la variabilidad por repetibilidad es lo suficientemente grande que no permite ver la variación por precisión intermedia, además daría indicios de que el método es poco influenciado por pequeñas variaciones realizadas intencionalmente [151].

4.1.4.3 Incertidumbre

La contribución a la incertidumbre por el método se estimó usando un análisis de varianza ANOVA a partir de los datos de cuantificación obtenidos en tres días diferentes (Anexo E: Datos producción piloto). La incertidumbre debida a la repetibilidad del método se estimó a partir de los datos de precisión mediante el análisis de ANOVA, empleando las ecuaciones 4-4, 4-5 y 4-6.

$$u_{muestra} = \sqrt{u_{modelo}^2 + u_{precisión}^2} \quad \text{Ecuación 4-4}$$

$$u_{modelo} = C_{muestra} * \sqrt{\left(\frac{u_{\lambda}}{\lambda}\right)^2 + \left(\frac{u_D}{D}\right)^2 + \left(\frac{u_v}{v}\right)^2} \quad \text{Ecuación 4-5}$$

$$u_{precisión} = \sqrt{\frac{s_{repeat}^2 + s_{interm}^2}{n}} \quad \text{Ecuación 4-6}$$

En donde $u_{muestra}$ y u_{modelo} corresponden a las incertidumbres de la muestra y del modelo matemático empleado respectivamente, n los días de medición, λ el número de copias por partición, D la dilución del ADN y v el volumen de la gota. s_{repeat} y s_{interm} son las desviaciones estándar relativas estimadas en precisión (4.1.4.2). En la Figura 4-21 se presentan las fuentes que aportan a la incertidumbre del resultado de medición.

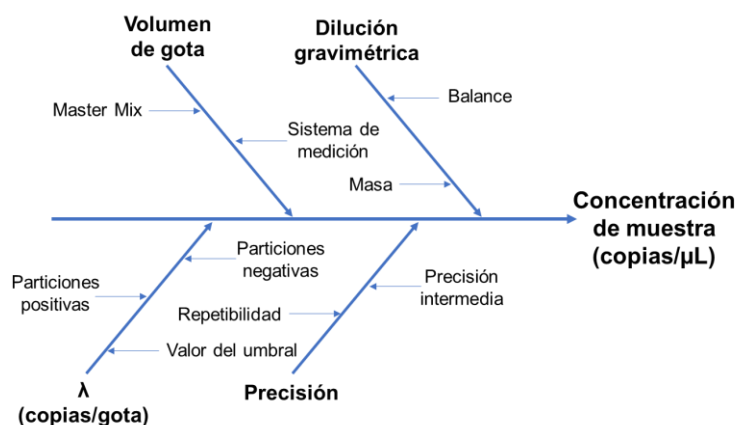


Figura 4-21: Fuentes de incertidumbre asociadas a la cuantificación

Tabla 4-12: Incertidumbre debida a la precisión.

Dilución	[ADN] (cp/μL) Muestra	[ADN] (cp/μL) mezcla PCR	u precisión (%)							u modelo matemático (%)
			uidA	lacY	eaeA	rfbE	uidA	stx2	Z3276	
1	7920.7	88685.3	2.06	1.64	5.59	1.86	2,21	5.03	1.31	3.3
2	718.3	8644.6	1.97	2.37	3.84	1.04	1.10	1.48	2.25	1.7
3	66.5	816.2	3.14	2.23	5.20	2.70	1.88	7.09	1.73	3.8
4	6.6	80.9	6.60	6.53	5.35	3.30	6.41	7.08	3.56	11.3

En la Tabla 4-12 se presentan los aportes a la incertidumbre debidos a la precisión y al modelo matemático para cada gen por nivel de concentración. De acuerdo con todos los datos obtenidos en la validación, la incertidumbre asociada a la precisión varía entre el 1% y 7% mientras que, la incertidumbre relativa asociada con el modelo matemático varía entre 2% y 11%, en donde la máxima contribución corresponde al factor λ , el cual representa del 50% al 90% del aporte a la incertidumbre asociada al modelo.

Al tener en cuenta la incertidumbre combinada relativa se observó que aumenta al disminuir el nivel de concentración, lo cual se debe principalmente al aporte incertidumbre por el modelo matemático. El nivel en el que se presentó la menor incertidumbre es el de 700 copias/μL y los genes que mostraron menor incertidumbre fueron *rfbE* y *Z3276*, mientras que los genes *eaeA* y *stx2* presentaron las mayores incertidumbres (Figura 4-22).

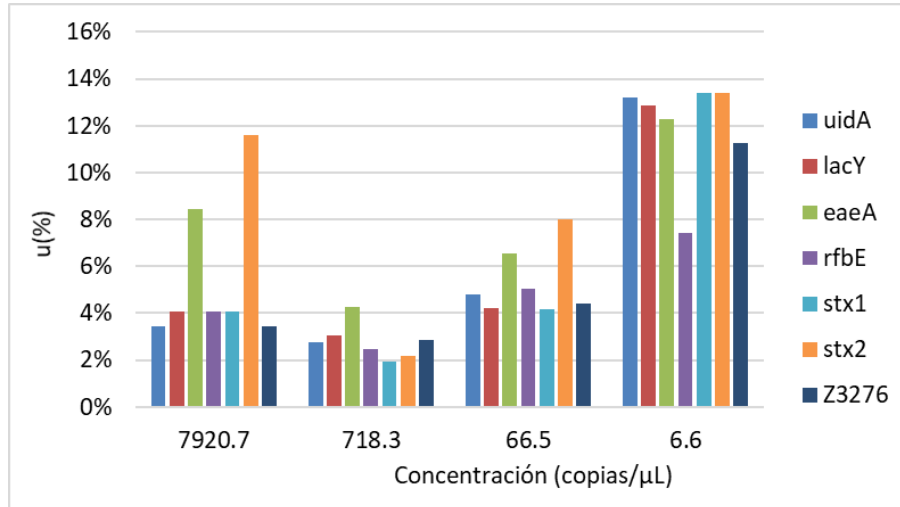


Figura 4-22: Incertidumbre de medida para cada nivel de concentración

Según los resultados de la validación, el método presentado puede cuantificar la concentración de ADN genómico de serotipos de *E. coli* de 8 copias/μL a 8000 copias/μL, con un límite de detección de 0.3 copias/μL en la mezcla de PCR. El método presentó una precisión entre 1% a 10%, con incertidumbres relativas entre 1.0% a 12.0% en el intervalo de trabajo. Debido a la selectividad presentada por los genes evaluados, el método puede usarse para estimar la concentración de ADN de las muestras en la producción de materiales de referencia de este microorganismo y para distinguir entre varios serotipos de *E. coli*.

Teniendo en cuenta los resultados de incertidumbre y precisión intermedia, se propuso la amplificación de los genes *Z3276* y *rfbE* para la caracterización del ADN de *E. coli* O157:H7 candidato a material de referencia, mientras que los otros genes podrían ser empleados para suministrar información adicional. Finalmente, para obtener datos de concentración con las menores incertidumbres se recomienda preparar la mezcla de reacción de tal forma que haya cerca de 1000 copias/μL, dado que a ese nivel de concentración se presentó la menor incertidumbre y mayor precisión.

4.2 Cultivo y extracción de ADN

4.2.1 Evaluación crecimiento de cepas *E. coli* O157:H7

Las cepas de *E. coli* O157:H7 se crecieron en los medios TSA, ECA y CT-SMAC. Tras la incubación de los medios se realizó el conteo y se observaron las características de las colonias. Las colonias de *E. coli* O157:H7 derivadas de ATCC® 700728 no crecieron en el

medio CT-SMAC, por lo que el seguimiento de su crecimiento se hizo en el medio sin suplementar (SMAC). La morfología de las colonias fue la misma para las dos cepas en el estudio. En la Figura 4-23 se presenta la morfología de las colonias (i) En medio TSA colonias redondas, convexas de aproximadamente 2mm de diámetro, bordes definidos y con efecto tornasol sobre la superficie al verlas a contraluz. (ii) En medio ECA colonias puntiformes redondas convexas de aproximadamente 1mm de diámetro, con el centro rosado, bordes definidos y un halo rosa tenue debido a la ausencia en la expresión de la enzima glucuronidasa. (iii) En medio CT-SMAC se observaron colonias puntiformes redondas, convexas de aproximadamente 1mm de diámetro, bordes definidos, translúcidas sin virar el medio rojo-violeta.

Debido a que los medios selectivos diferenciales presentan restricciones nutricionales con respecto a los medios nutritivos, se esperaba que crecieran más colonias en el medio nutritivo TSA, con respecto a los medios selectivos ECA y SMAC. Al analizar los datos obtenidos en el conteo (Tabla 4-13), se observó mayor crecimiento de colonias en el medio ECA que en el TSA, lo que puede deberse a que en este medio se presenta la mayor tasa de recuperación de las bacterias. En el agar SMAC se observó alrededor de 40% de crecimiento de colonias menos con respecto al crecimiento en el agar TSA. No se observó el crecimiento de colonias en los controles de esterilidad de los medios empleados (incubación de 1 caja Petri a $37,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 24-48 h).

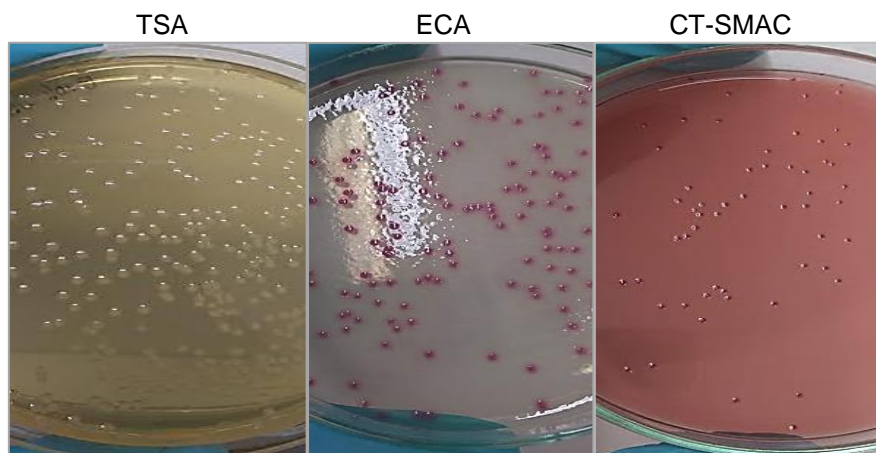


Figura 4-23: Colonias de *E. coli* O157:H7 en agares

Crecimiento de colonias de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC® 35150 en agares TSA, ECA y CT-SMAC. Se sembraron 100 μL de la dilución 10^{-6} del criovial de preservación del microorganismo y se incubó a 37°C por 15 horas.

Tabla 4-13: Concentración de *E. coli* O157:H7 en crioviales

Cepa	Medio	UFC/caja		UFC/mL crioviales
		Dilución 10 ⁻⁵	Dilución 10 ⁻⁶	
ATCC® 700728	TSA	385/405	31/37	3,68x10 ⁸
	ECA	526	54	5,33x10 ⁸
	SMAC	272	35	3,11x10 ⁸
ATCC® 35150	TSA	516/554	42	4,97x10 ⁸
	ECA	721	41	5,66x10 ⁸
	SMAC	613	INC #	6,13x10 ⁸

INC# Incontable

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y que el medio ECA no puede ser esterilizado por autoclave debido a la degradación de los cromóforos que contiene, se eligió el TSA como medio para realizar el conteo de UFC/mL, mientras que los agares ECA y SMAC se usaron para hacer seguimiento de control de calidad.

4.2.2 Caracterización preinóculo

Tras obtener una colonia aislada de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC 700728 en medio TSA, se inocularon 50 mL de medio líquido selectivo suplementado con novobiocina (20mg/L) (ECB+n) y se incubaron a 37.0 ± 2.0 °C a 150 rpm (Figura 4-24).

En los datos obtenidos de microorganismo viable (UFC/mL) se observó un crecimiento exponencial hasta las 4 horas, alcanzando la fase estacionaria después de las 5 horas. En cambio, al tener en cuenta la OD y la escala de Mac Farland se observó un aumento con cambio en la pendiente después de las 7 horas, debido a disminución de nutrientes y la consecuente disminución de la velocidad de crecimiento bacteriano. A partir de los resultados obtenidos, se estableció que el tiempo óptimo de incubación del preinóculo es de 5 horas. Dado que a este tiempo se encuentra la mayor concentración de células viables en el inicio de la fase estacionaria.

Teniendo en cuenta que el escalamiento del cultivo se realizaría a volumen de 300mL para el estudio de crecimiento y a 200 mL para la obtención de ADN, empleando un inóculo de 1:20 (entre 10.0 a 15.0 mL). Se comparó el crecimiento del microorganismo en 20 mL de medio contra 50 mL inoculados con una colonia (Figura 4-25). Durante el proceso de optimización se observó que hay diferencia en el tiempo de crecimiento del microorganismo al cambiar el volumen del medio. Al disminuir el volumen en un 60% la diferencia en tiempo para alcanzar una OD de aproximadamente tres unidades, es de alrededor de 20 a 30 minutos.

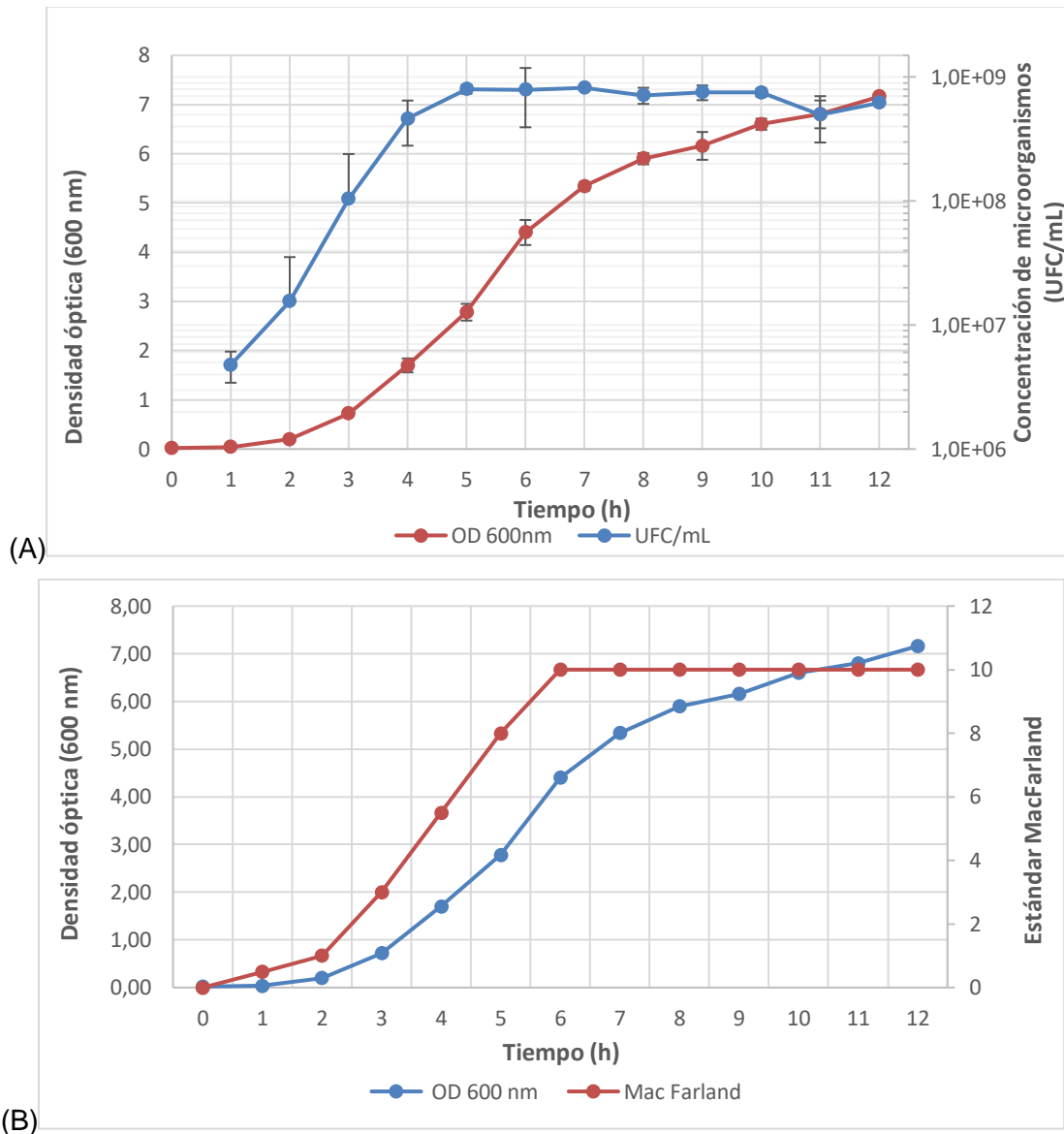


Figura 4-24: Crecimiento de *E. coli* O157:H7 en preinóculo de 50 mL.

Crecimiento de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC® 700728 en 50 ml de medio ECB+n inoculado con una colonia aislada. Crecimiento en función del tiempo en unidades de UFC/ml (A) Densidad óptica (OD) (AyB) y estándar de Mac Farland (B).

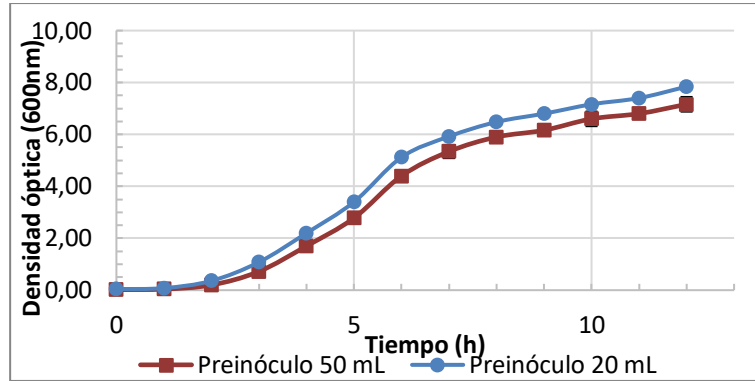


Figura 4-25: Crecimiento de *E. coli* O157:H7 en diferentes volúmenes de preinóculo.

Crecimiento de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC en 50mL (rojo) y 20 mL (azul) de medio ECB+n inoculado con una colonia.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se ajustó el cultivo a una OD de 2 unidades medido a 600 nm o una turbidez equivalente al estándar de Mac Farland 6, estableciendo tiempos aproximados de control, en lugar de estandarizar según el tiempo de cultivo para hacer el escalamiento, debido a que factores como pequeñas variaciones en la cantidad y temperatura del inóculo pueden afectar el crecimiento del microorganismo.

4.2.3 Caracterización del cultivo masivo

Tras obtener una colonia aislada de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC 700728 en medio TSA, se inocularon 20 mL de medio ECB+n y se incubaron a 37.0 ± 2.0 °C a 150 rpm por 4 horas hasta alcanzar una OD de 2.01 y una concentración de 1.18×10^9 UFC/mL. Se tomaron 15 mL del preinóculo para escalar el cultivo a 300 mL.

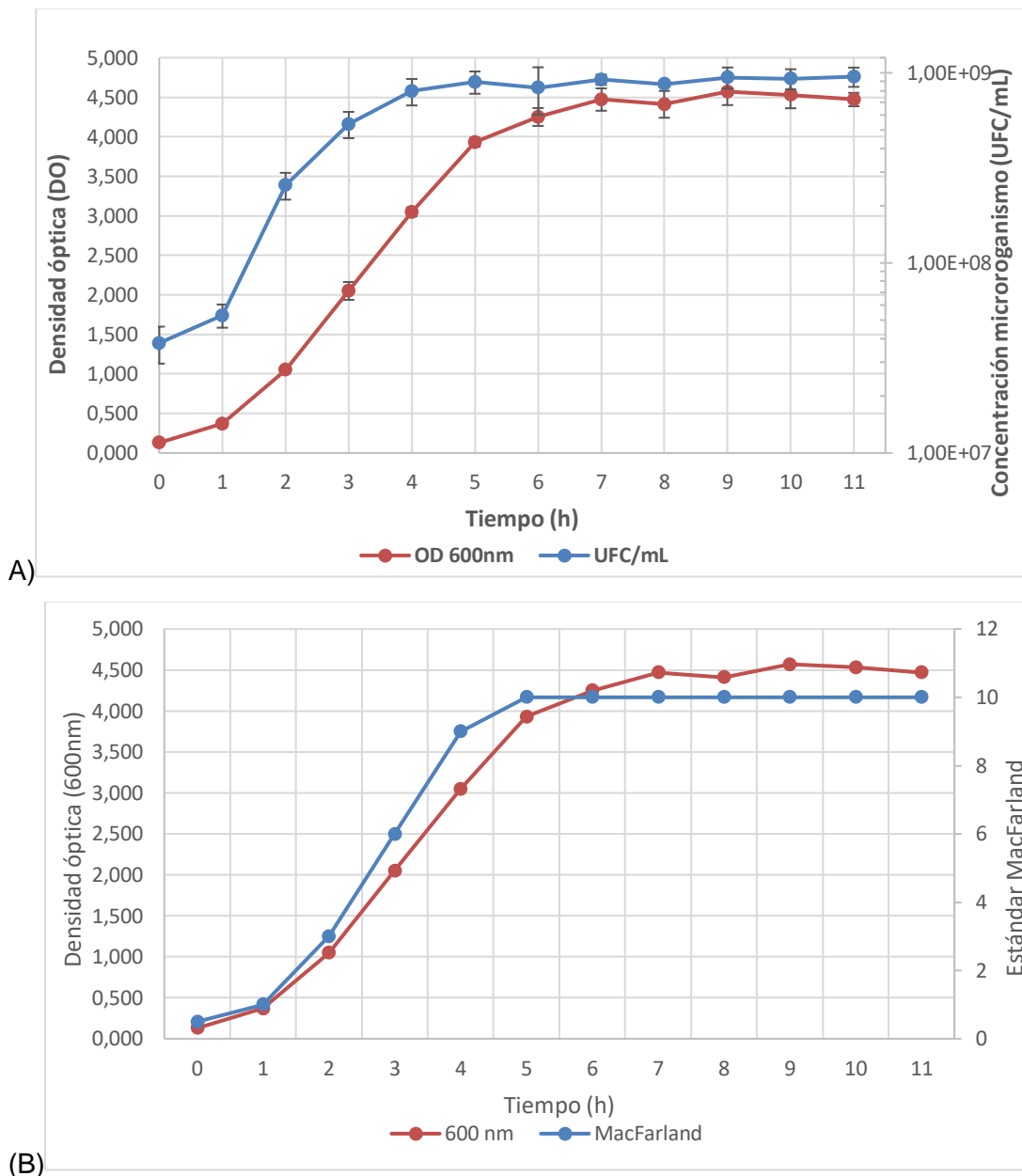


Figura 4-26: Crecimiento de *E. coli* O157:H7 en 300 mL de medio ECB+n

Crecimiento de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC® 700728 en 300 ml de medio ECB+n inoculado en proporción 1:20. Crecimiento en función del tiempo en unidades de UFC/ml (A) densidad óptica (DO) (AyB) y estándar de MacFarland (B)

A partir de los resultados obtenidos de DO se observó que el cultivo aparentemente tiende a alcanzar la fase estacionaria después de las 7 horas, mientras que al tener en cuenta la concentración de células viables (UFC/mL) y los estándares de MacFarland, se observó que el cultivo alcanzó la fase estacionaria a las 5 horas (Figura 4-26). Como el objetivo fue obtener

la mejor calidad de ADN para producción piloto de un candidato a material de referencia, se realizó la extracción de ADN a una muestra obtenida cada hora (Figura 4-27). A las 5 horas de crecimiento se obtiene la mayor concentración de ADN obtenida a partir de 1mL (132.7 ± 24.0 ng/ μ L).

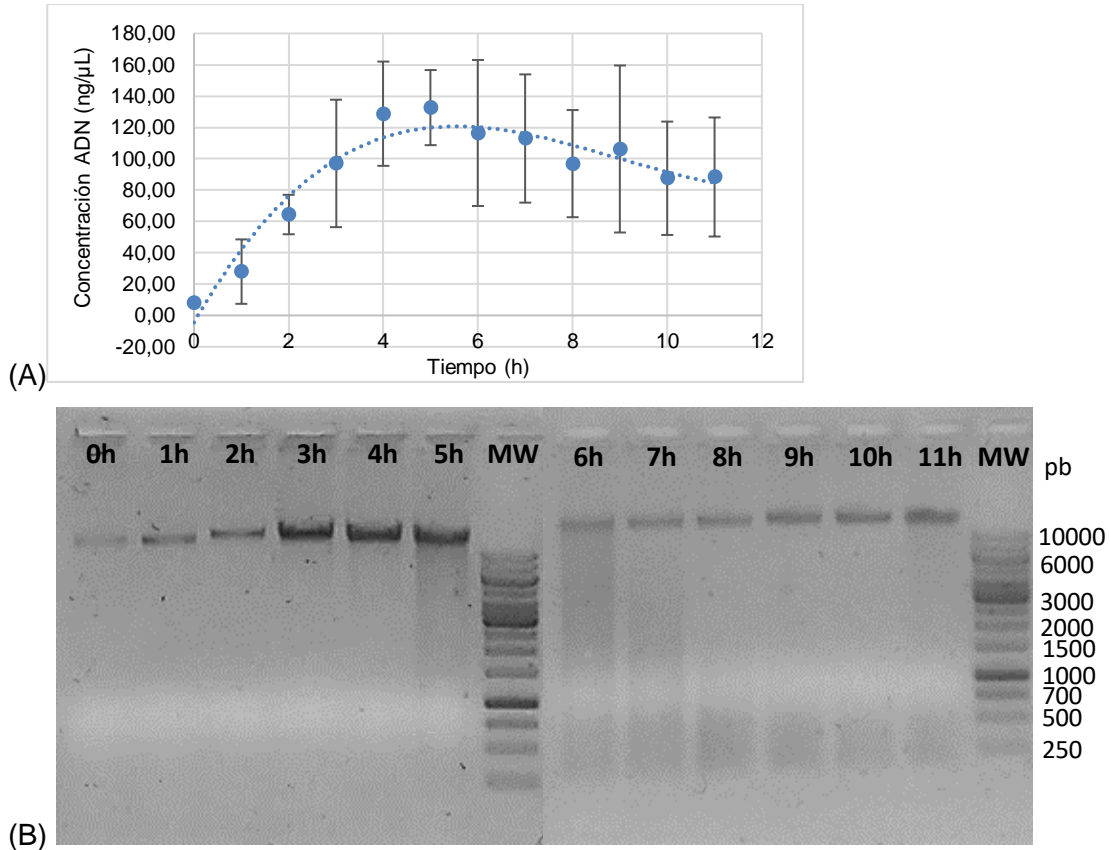


Figura 4-27: Concentración y calidad de ADN *E. coli* O157:H7 en función del tiempo

Cambio de concentración de ADN en ng/ μ L durante crecimiento de *E. coli* O157:H7 ATCC® 700728 en cultivo masivo (A). Cultivo de 300 mL de medio ECB+n inoculados con 15 mL de preinóculo, incubación a $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ y 150 rpm. Gel de electroforesis de agarosa 1% corrido a 100 V por 35 min. Muestras de ADN obtenidas a partir de 1 mL de muestra cada hora. Marcador de peso GenerRuler™ 1kb Ladder de Thermo Scientific (B).

Los resultados indican que después de que el cultivo alcanza la fase estacionaria, la cantidad de ADN obtenido disminuye. Al tener en cuenta la integridad del ADN se observó una banda de alto peso molecular (5 Mpb), a partir de las 5 horas se presentó una banda difusa bajo la banda de alto peso molecular, además empezó a aparecer la banda relacionada con RNA (<500 pb). Teniendo en cuenta lo anterior, se estableció que el momento adecuado para obtener la mayor concentración de ADN con la mejor calidad, es cuando el cultivo alcanza

una OD de 3 unidades, equivalente a un estándar de MacFarland 9, tras 4 horas después de realizar un inóculo 1:20 del cultivo.

4.2.4 Extracción de ADN

Se realizó el escalamiento de dos cultivos independientes a 200 y 300 mL. Para esto, se obtuvieron colonias aisladas en TSA con las que se inocularon 2 cultivos de 20 mL de medio ECB+n, incubados a 37.0 ± 2.0 °C a 150 rpm por aproximadamente 5 horas hasta alcanzar una OD de 2,16 y una concentración de $1,10 \times 10^9$ UFC/mL. Se realizó un inóculo 1:20 a cada uno de los cultivos y se incubaron a 37.0 ± 2.0 °C a 150 rpm por 4 horas, posteriormente se realizó la extracción de ADN de cada cultivo.

Tabla 4-14: Rendimiento de extracción de ADN a partir de cultivos de *E. coli* O157:H7

Volumen de cultivo	OD (600 nm)	Estándar Mac Farland	UFC/mL	Pellet húmedo (g)	ADN (ng/μL)	Abs 260/280	Abs 260/230
200 mL	2.76	6	9.37×10^8	1.14 ± 0.10	2937.0 ± 2.1	1.92	2.04
300 mL	2.68	6	9.23×10^8	1.38 ± 0.10	3782.0 ± 0.7	1.93	2.02

Los rendimientos de extracción a partir de los cultivos con diferentes volúmenes, se presentan en la Tabla 4-14. Se evidencia que la cantidad de ADN obtenido es proporcional al volumen del medio empleado, además se obtiene ADN sin presencia de proteínas o contaminantes provenientes de la extracción. La integridad del ADN analizada electroforéticamente (Figura 4-28) se presentan bandas definidas de alto peso molecular y bandas <500 pb en ambos cultivos, que corresponden al ADN genómico y RNA respectivamente, lo que evidencia que se debe aumentar la concentración y el tiempo de digestión con RNAsa.

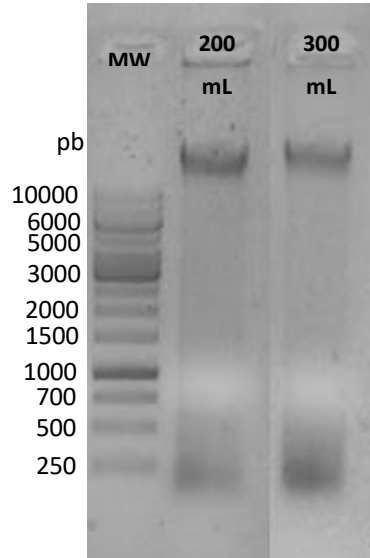


Figura 4-28: Integridad de ADN de *E. coli* O157:H7

Electroforesis en gel de agarosa al 1% separada a 80V por 45 min. ADN obtenido a partir de cultivos de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC® 700728. Marcador de peso molecular GeneRuler® 1Kb (carril 1) y ADN extraído a partir de 200 mL (carril 2) y 300 mL (carril 3).

4.2.5 Obtención de ADN para candidato a material de referencia

Para obtener el ADN se partió de un criovial de *E. coli* O157:H7 derivado de ATCC® 35150. Se obtuvo una colonia aislada en TSA con la cual se inoculó 20 mL de medio ECB+n, se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm por aproximadamente 4 horas hasta alcanzar una turbidez similar al estándar 7 de la escala de Mac Farland y una concentración de $1,08 \times 10^9$ UFC/mL.

Se realizó el escalamiento del cultivo a 200 mL con un inóculo 1:20 y se incubó a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm por aproximadamente 4 horas, el cual alcanzó una turbidez similar al estándar 10 de Mac Farland con una concentración de $1,10 \times 10^9$ UFC/mL. Durante el proceso de cultivo la cepa derivada de ATCC 35150 presentó un color blancuzco similar a la leche, lo que afectó la comparación de la turbidez del cultivo con la escala de Mac Farland.

A partir de los 200 mL de cultivo se obtuvo un pellet con masa húmeda de $0,730 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ del cual se extrajo el ADN. Tras obtener el ADN se evaluaron los parámetros de pureza por espectrofotometría, integridad por electroforesis en gel de agarosa y presencia de inhibidores por qPCR.

4.2.5.1 Evaluación de calidad

La solución stock de ADN genómico de *E. coli* O157:H7 se cuantificó por espectrofotometría midiendo una dilución 1/10 del ADN a 260 nm, estimando una concentración de 3728.2 ± 13.7 ng/ μ L con una relación A260/280 de 2.07 y A260/230 de 2.13. Aunque la relación A260/280 indica que no hay contaminación con proteínas, hay presencia de RNA, dado que para ADN puro la relación es más cercana a 1.8 que a 2.0 [189]. La relación A260/230 es un indicador de ausencia de contaminantes que absorban a 230nm como EDTA, fenol o carbohidratos. En la Figura 4-29 se presenta el espectro de Absorción del ADN obtenido.

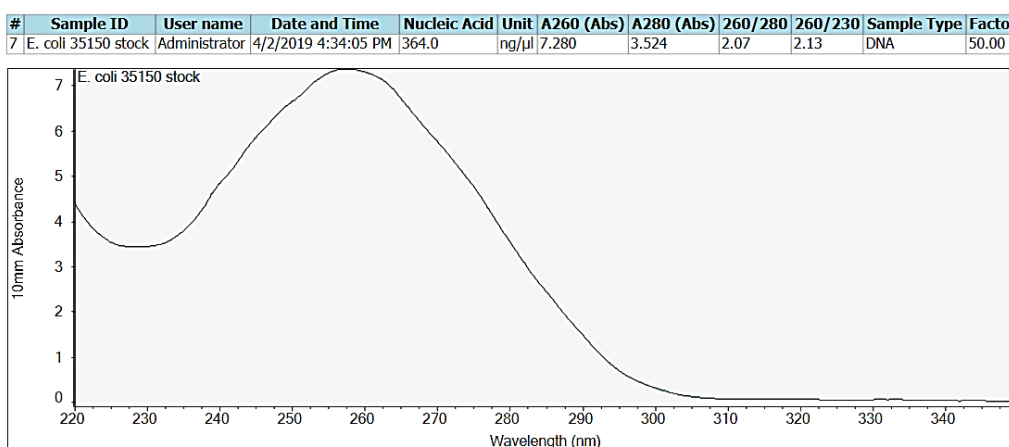


Figura 4-29. Espectro UV-VIS de ADN de *E. coli* O157:H7

Absorción entre 220 y 350 nm. Dilución 1/10 de ADN obtenido a partir de cultivo de 200 mL de *E. coli* O157:H7 derivada de ATCC® 35150 (287 ng/ μ L).

En la Figura 4-30 se presentan los resultados de la evaluación de la integridad del ADN genómico obtenido por electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 V, 45 minutos). El carril 2 corresponde a aproximadamente 2700 ng, donde se observa una banda de alto peso molecular sin degradación, sin embargo, hay dos bandas adicionales una entre 2500 y 3000 pb y otra inferior a 250 pb correspondiente probablemente a RNA. El carril 3 que contiene 287 ng se observa cómo se mantiene la banda de ADN genómico y las bandas de RNA están ausentes. Lo anterior da indicios de que en la electroforesis de agarosa se pueden visualizar fragmentos presentes en pequeñas concentraciones al colocar más de 1000 ng de ADN.

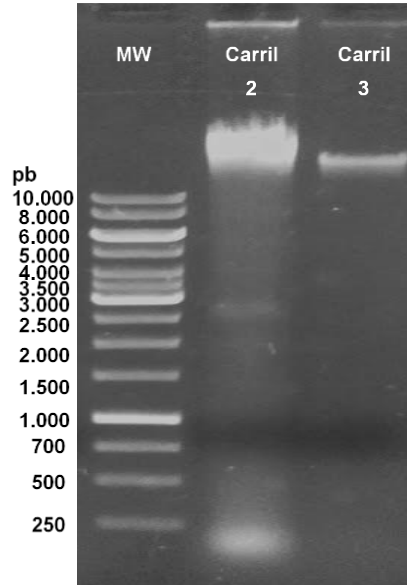


Figura 4-30: Electroforesis de ADN *E. coli* O157:H7.

Electroforesis de agarosa 1% corrida a 80V por 90 min. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler® 1Kb, carril 2: 2700 ng de ADN, carril 3: 287 ng ADN.

Al ADN obtenido se le realizó la evaluación de presencia de inhibidores y se estimó la concentración en copias/ μ L mediante 7 diluciones gravimétricas en buffer TE 1X a partir del ADN obtenido. En la Tabla 4-15 se presentan las diluciones preparadas. Para evaluar la presencia de inhibidores en la PCR, se realizó la amplificación por qPCR de los genes *uidA - lacY*, *eaeA - rfbE*, *stx1 - stx2* en modo dúplex y *Z3276* en modo simplex, usando los últimos seis niveles de concentración preparados a partir del stock de ADN. La Tabla 4-16 presenta los resultados obtenidos en cuanto a la eficiencia de amplificación. De acuerdo con las eficiencias obtenidas para todos los genes evaluados se puede concluir que no hay inhibidores presentes que puedan afectar la reacción de amplificación de las secuencias de interés.

Tabla 4-15. Diluciones de ADN stock de *E. coli* O157:H7 derivado de ATCC® 35150

Código	Dilución
M500	9,42E-02
M50	9,17E-03
M5	8,91E-04
M5E-1	8,54E-05
M5E-2	8,24E-06
M5E-3	8,12E-07
M5E-4	7,97E-08

Tabla 4-16. Eficiencias de amplificación en ADN *E. coli* O157:H7

Gen	Eficiencia (%)	Linealidad (R ²)
<i>uidA</i>	95.8	0.999
<i>lacY</i>	97.7	0.995
<i>eaeA</i>	99.3	0.990
<i>rfbE</i>	99.3	0.991
<i>Stx1</i>	108.8	0.885
<i>Stx2</i>	97.8	0.987
Z3276	101.4	0.994

4.2.5.2 Cuantificación por PCR

La concentración del stock de ADN (copias/ μ L) se evaluó amplificando el gen Z3276 en modo simplex por ddPCR en tres diluciones gravimétricas del stock (M5, M5E-01, M5E-02, ng/ μ L). A partir de los resultados se obtuvo una concentración estimada de 1.02×10^8 copias/ μ L (Figura 4-31). Los resultados obtenidos en la evaluación de la calidad de ADN permitieron determinar que éste cumple con las características esperadas, por lo cual se continuó con el proceso de preparación y caracterización del candidato a material.

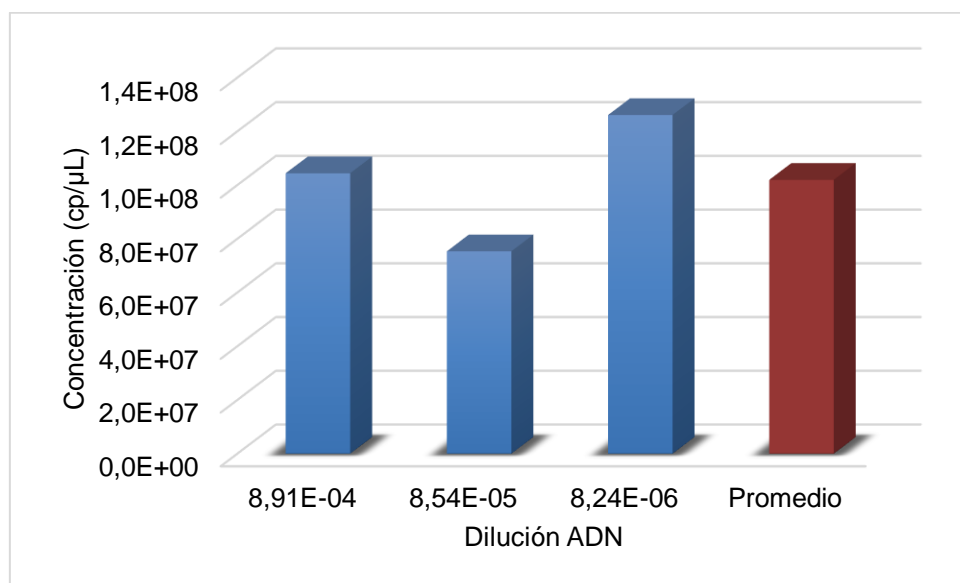


Figura 4-31. Estimación concentración Stock ADN por ddPCR

Las barras representan la concentración promedio en número de copias/ μ L del ADN de *E. coli* O157:H7 (rojo), estimada a partir de las diluciones gravimétricas medidas (azul).

Para la obtención de ADN de calidad adecuada para la producción de MR se buscó utilizar un método sencillo que permitiera la extracción de ADN con alta eficiencia a partir de cultivos masivos de microorganismo (>50 mL), empleando la menor cantidad de contaminantes. A partir de los resultados obtenidos se evidencia que el método es adecuado para dicho propósito. A pesar de que el ADN extraído tenía pequeñas cantidades de RNA, este no tiene ningún efecto en el MR a preparar, dado que se requiere diluir varias veces para llegar a la concentración objetivo. Además, durante la preparación piloto del MR se adiciona RNA de levadura como estabilizante en MR [190].

4.3 Producción candidato a material de referencia

Partiendo del ADN extraído de la cepa *E. coli* O157:H7 ATCC® 35150 de concentración 3728.2 ± 13.7 ng/ μ L y 1.02×10^8 copias/ μ L, se prepararon 2 lotes codificados como 190401-10P y 190402-08P en buffer TE 1X con RNA total de levadura (40 ng/ μ L) como estabilizante, obteniendo 80 unidades de 500 μ L por lote. De cada uno se evaluó la homogeneidad y estabilidad a corto plazo por 3 meses a -20°C y 4°C en un estudio isócrono con -80°C como temperatura de referencia. La cuantificación en número de copias/ μ L se realizó con los genes *Z3276* y *rfbE* en modo simplex, dado que estos son específicos para el ADN empleado.

4.3.1 Preparación lotes piloto

Según los resultados de estudios previos, el nivel de concentración entre 200.000 y 100.000 presentó la menor incertidumbre asociada y mayor estabilidad bajo las condiciones de almacenamiento que otros niveles, además, a partir de esta concentración se pueden preparar diluciones para construir curvas de calibración en qPCR [190], por lo que se estableció preparar dos niveles de concentración nominal de 100.000 y 100 copias.

A partir de la concentración promedio del ADN stock, se prepararon por dilución gravimétrica los niveles de concentración para el piloto. En la Tabla 4-17 se presentan los códigos asignados a cada uno de los lotes preparados. Para la preparación de los lotes, se prepararon diluciones intermedias del orden de 1 mL de volumen. Las soluciones intermedias preparadas en tubos de 1.5 mL se homogenizaron por inversión y las soluciones preparadas en tubos Falcón de 50 mL, correspondientes a los niveles del piloto, se homogenizaron con agitador orbital por 2 horas a temperatura ambiente.

Tabla 4-17: Códigos asignados a los lotes del piloto de *E. coli* O157:H7

Concentración nominal (copias/ μ L)	Lote	Código
100.000	190402-08P	INM 015-2
100	190401-10P	INM 015-1

4.3.1.1 Etiquetado y envasado

La etiqueta de los MR debe ser resistente para mantenerse adherida y legible durante el tiempo de vigencia del material y contener la información suficiente para su identificación [191], por lo que la etiqueta para el material se imprimió en vinilo adhesivo resistente a solventes y todos los tubos empleados se etiquetaron previo al envasado en crioviales de polipropileno de 1,2 mL adicionando 500 μ l de solución. Del lote 190401-10P se obtuvieron 77 unidades, y del lote 190402-08P se obtuvieron 79 unidades. Durante los procesos de caracterización del material se encontraba firmemente adherida a los crioviales, se mantuvo legible y no presentó cambios en ninguna de las temperaturas de almacenamiento; demostrando así ser adecuada para el material (Figura 4-32)



Figura 4-32: Diseño de etiqueta de los lotes del material preparado

4.3.2 Determinación de cantidad mínima de muestra

Se seleccionaron aleatoriamente los viales 53 del lote L190401-10P y 63 del lote L190402-08P con el fin de determinar la cantidad mínima de muestra que se debe analizar de cada lote, garantizando la homogeneidad e incertidumbre del material. De cada uno se tomaron tres alícuotas independientes medidas por triplicado, para evaluar cuatro volúmenes. La variación de los datos obtenidos se graficó para cada volumen de alícuota en cada lote. Se estableció como límite la variación del método por repetibilidad de 8 copias/ μ L y 3345 copias/ μ L para los niveles de 170 copias/ μ L (lote 190401-10P) y 1700 copias/ μ L (lote 190402-08P) respectivamente.

Se observó que el volumen mínimo de muestra que puede emplearse para realizar la estimación de la concentración en número de copias en ambos lotes es de 2 μL (Figura 4-33). Sin embargo, para el lote de baja concentración se estableció un volumen mínimo de 4 μL , con el fin de disminuir el aporte a la incertidumbre por el modelo matemático asociado a este nivel de concentración.

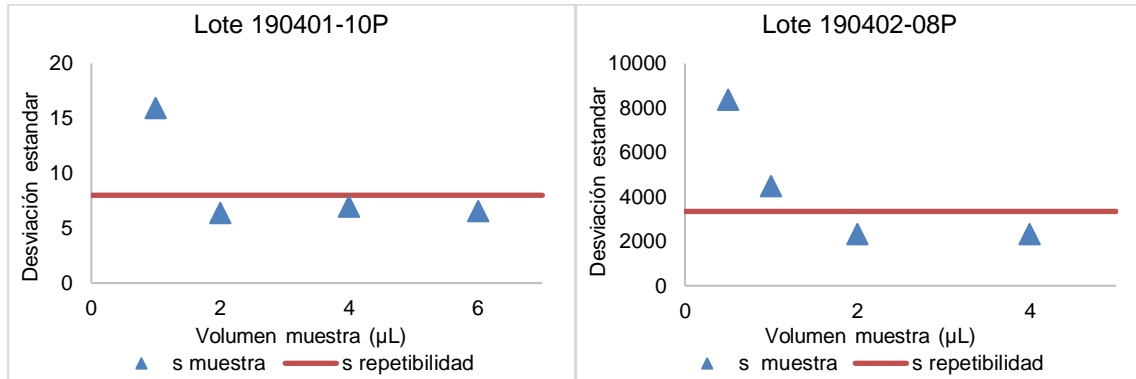


Figura 4-33: Volumen mínimo de muestra para cuantificación

Variación de medición en función de volumen de alícuota para lotes de piloto de *E. coli* O157:H7

4.3.3 Estudio de homogeneidad

La homogeneidad entre y dentro de los viales se evaluó estableciendo una incertidumbre objetivo por homogeneidad del 4.0% para el lote 190402-10P y 3.0% para el lote 190402-08P, basados en datos internos del laboratorio obtenidos a partir de un estudio con ADN de *Salmonella* [190].

4.3.3.1 Homogeneidad entre viales

La Tabla 4-18 presenta la relación de las unidades seleccionadas para el estudio de homogeneidad. En el caso del lote de baja concentración (190401-10P) la medición se hizo empleando seis réplicas, con el fin de combinar las particiones de dos réplicas para disminuir la incertidumbre asociada al modelo (en particular a la asociada a la distribución de Poisson). Sin embargo, para efectos del estudio de homogeneidad las seis réplicas se trabajaron de manera independiente.

Tabla 4-18. Unidades seleccionadas para el estudio de homogeneidad

Lote	Unidades seleccionadas							
Lote 190401-10P	9	18	27	36	48	57	66	75
Lote 190402-08P	11	20	29	38	47	56	65	74

Para identificar tendencia de los datos de acuerdo con el orden de llenado, se realizó un análisis de regresión (Figura 4-34), de acuerdo con los resultados obtenidos (pendiente igual a cero y coeficiente de correlación no significativo) se concluyó que no hay tendencia en los datos, garantizando la homogeneidad del material producido.

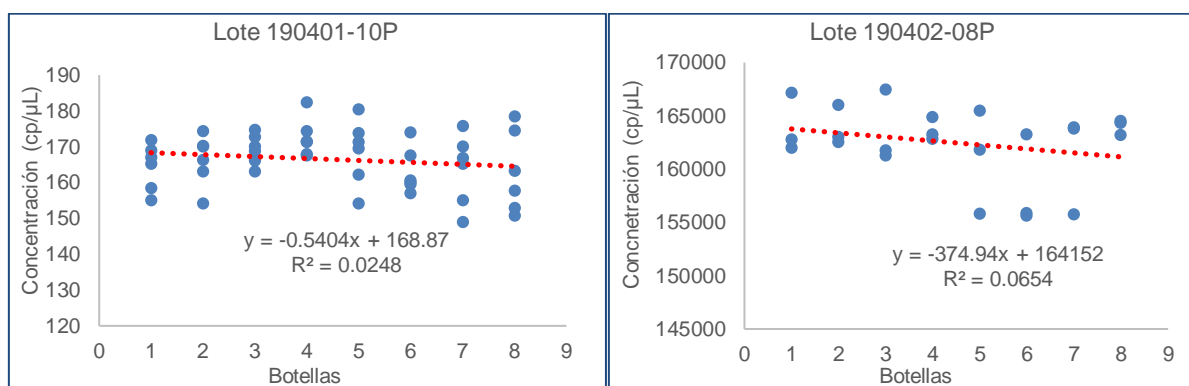


Figura 4-34: Estudio de homogeneidad entre botellas.

Concentración en copias/μL en función de número de vial tomado periódicamente. La línea punteada indica la tendencia de los datos (No significativa).

A partir del análisis de varianza de un factor de los resultados obtenidos (Tabla E-1 en anexo E) se determinó la incertidumbre por homogeneidad para cada uno de los lotes de acuerdo con la ecuación 4.4.

$$u_{hom} = \sqrt{\frac{2(SCE - SCD)}{n}} \quad \text{Ecuación 4-7}$$

Donde SCE es la suma de cuadrados entre muestras, SCD es la suma de cuadrados del error (en las muestras) y n el número de réplicas. La incertidumbre estándar obtenida por homogeneidad fue de 1.83 (1.1%) para el lote 190401-10P y 806.02 (0.5%) para el lote 190402-08P. En ambos casos, el valor obtenido es menor al establecido como objetivo, por lo cual cada lote se considera homogéneo.

4.3.3.1 Homogeneidad dentro de viales

La homogeneidad dentro de viales se evaluó con el fin de determinar si la concentración de los lotes del piloto se mantiene al hacer submuestreo, debido a que la presentación del material permite el uso repetido. Se seleccionaron aleatoriamente los viales 53 del lote L190401-10P y 63 del lote L190402-08P, con las concentraciones obtenidas para cada muestra (Figura 4-35) se evaluó la presencia de una tendencia entre las alícuotas tomadas haciendo un análisis de regresión y de varianza. Se determinó que no hay diferencias significativas entre las alícuotas. Por lo tanto, se asume que la solución al interior de los viales es homogénea para ambos lotes.

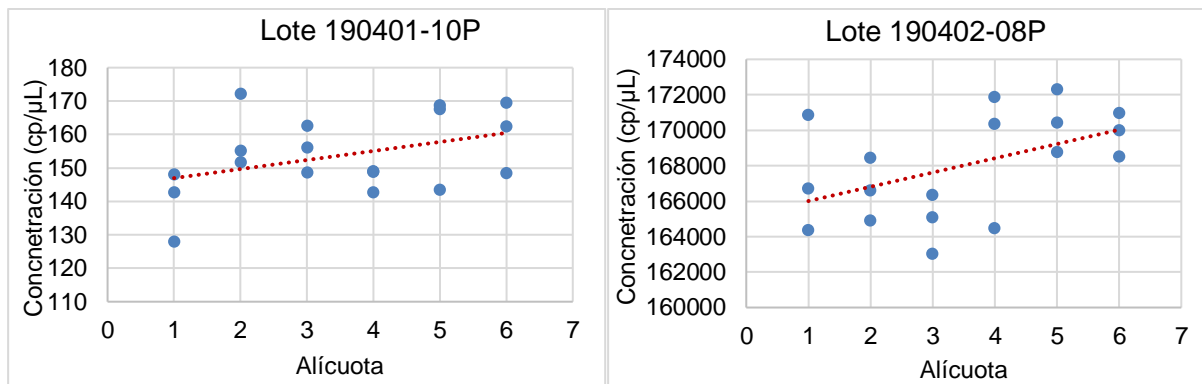


Figura 4-35: Estudio de homogeneidad intrabotellas.

Concentración en copias/μL en función de número de alícuota para Lote 190401-10P y Lote 190402-08P. La línea punteada indica la tendencia de los datos (No significativa de acuerdo al análisis de regresión).

4.3.4 Estabilidad a corto plazo

Los MR deben ser lo suficientemente estables de tal forma que se pueda confiar en los valores dentro del periodo de validez certificado [163]. Para la evaluación de la estabilidad a corto plazo del material se seleccionaron aleatoriamente 8 muestras de cada lote (Tabla 4-19) de cada una de las temperaturas de estudio. El valor de referencia de cada lote se estimó como se describe en asignación de valor y estimación de incertidumbre (4.3.1). La incertidumbre se calculó incluyendo los componentes asociados al sesgo, la caracterización y la homogeneidad con el objetivo de definir unos límites de control para evaluar la estabilidad del material.

Tabla 4-19: Unidades seleccionadas para el estudio de estabilidad a corto plazo.

Lote	Temperatura	Semanas							
		2		4		8		12	
190401-10P	4°C	26	69	31	13	12	49	01	15
	-20°C	34	19	70	53	05	78	25	58
190402-08P	4°C	43	52	63	08	22	64	21	19
	-20°C	06	78	54	48	04	01	32	09

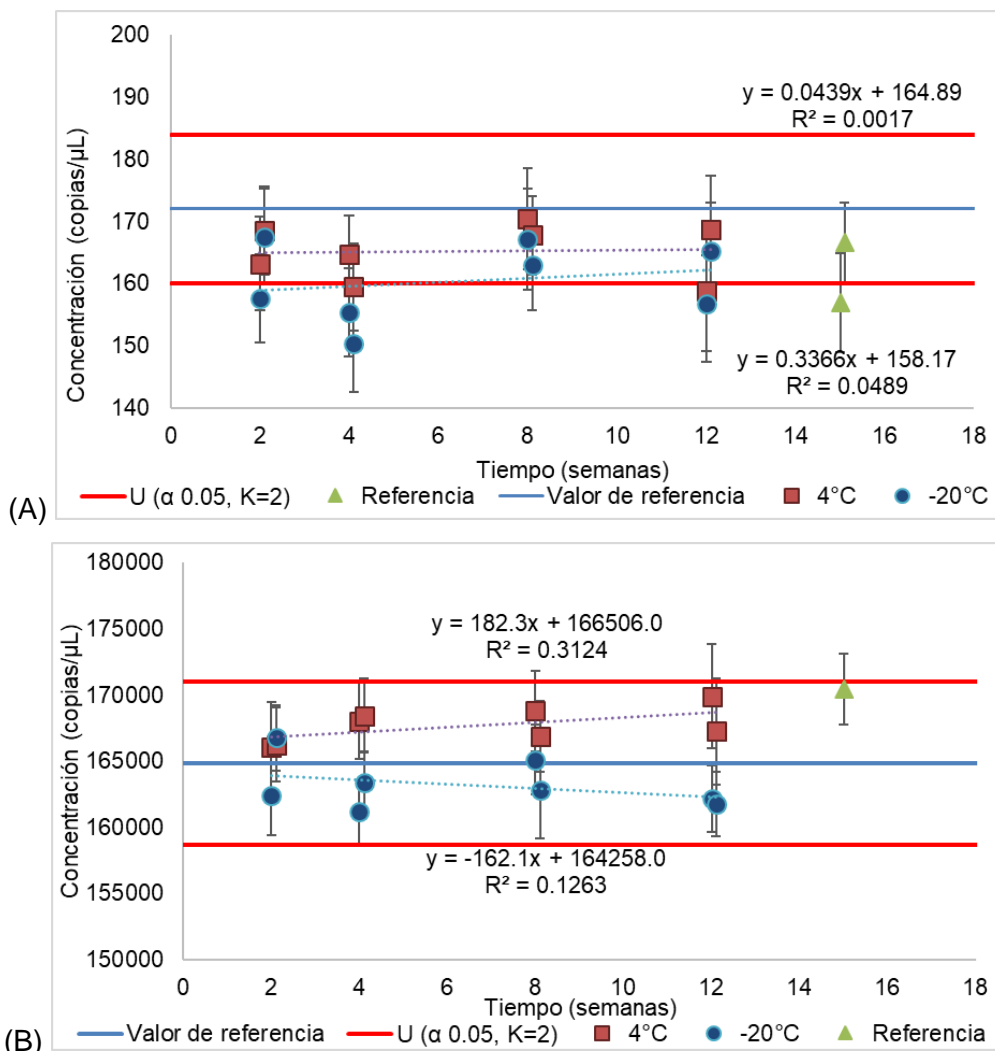


Figura 4-36: Estabilidad a corto plazo de lotes del piloto de *E. coli* O157:H7

Datos de cuantificación para los lotes (A) 190401-10P y (B)190401-08P. Los límites superior e inferior ($U_{\alpha 0.05; K=2}$) representan la incertidumbre expandida con un nivel de confianza del 95%. Las barras de error representan la desviación estándar de cada medida por triplicado. Las ecuaciones representan la tendencia para cada una de las temperaturas evaluadas (no significativa).

A partir de los resultados de cuantificación (Figura 4-36), se observó que las muestras del lote de alta concentración (L190401-08P) se encuentran cerca al valor de referencia dentro de los valores de referencia establecidos. Mientras que las muestras del lote de baja (L190402-10P) concentración se encuentran entre el valor de referencia y el límite inferior.

Para el lote de alta concentración se observó que las muestras almacenadas a 4°C aparentemente presentan un aumento de la concentración en función del tiempo, mientras que en las almacenadas a -20°C disminuye la concentración en función del tiempo. En el caso del lote de baja concentración, aunque no se presenta una tendencia en el tiempo en ninguna de las temperaturas evaluadas, aparentemente las muestras almacenadas a 4°C presentan un valor más cercano al de referencia. Adicionalmente se observa que las muestras empleadas como referencia (almacenadas a -80°C) tiene el mismo comportamiento de las muestras del estudio de estabilidad.

El análisis de regresión a cada temperatura permitió establecer que no hay una tendencia en los datos de concentración durante el tiempo (medida a través de la pendiente) en ninguno de los dos lotes. Por lo cual se puede concluir que los materiales son estables para el periodo de estudio, sin embargo, en el caso del lote de baja concentración la tendencia de los datos se encuentra por fuera de los límites de confianza establecidos en la asignación de valor. El aporte a la incertidumbre por estabilidad (a corto plazo) u_{est} , se calculó a partir de los datos de regresión (Tabla 4-22). El aporte de incertidumbre por estabilidad para cada lote a cada temperatura se presenta en la Tabla 4-20.

Tabla 4-20: Incertidumbre por estabilidad para los lotes del piloto

Lote	Temperatura almacenamiento			
	4 °C		-20 °C	
	u_{est}	u_{rel} (%)	u_{est}	u_{rel} (%)
190401-10P	5.24	3.0%	7.27	4.2%
190402-08P	1319	0.8%	2086	1.3%

Se observó que en el aporte de incertidumbre por la estabilidad del material a los tres meses es inferior al 5% para ambos lotes, además la incertidumbre disminuye al aumentar la concentración del ADN. Aunque se esperaba mayor estabilidad del material a -20°C, se presentó mayor dispersión de los datos en ambos lotes con respecto a la presentada a 4°C. Según los resultados la temperatura más adecuada para el transporte de ADN en solución de *E. coli* O157:H7 es a 4°C.

4.3.1 Asignación del valor y estimación de incertidumbre

Tras demostrar la homogeneidad de los lotes preparados se procedió a estimar un valor de referencia para cada uno, por dPCR empleando los genes *Z3276* y *rfbE*. La Tabla 4-21 presenta la relación de las muestras seleccionadas para la asignación del valor de referencia de los lotes producidos.

Tabla 4-21: Muestras seleccionadas para establecer el valor de referencia

Lote	Unidades seleccionadas								
	Día 1			Día 2			Día 3		
190401-10P	24	51	59	16	67	76	08	32	40
190402-08P	26	42	66	10	50	58	18	34	75

La asignación de valor para cada uno de los lotes se hizo siguiendo el modelo descrito en la ecuación 4-8, donde se asume que éste se encuentra definido en términos de la caracterización del material, de su homogeneidad, así como su estabilidad, en este caso la de corto plazo:

$$X_{MR} = y_{caract} + \delta_{hom} + \delta_{ecp} \quad \text{Ecuación 4-8}$$

Donde: X_{MR} es el valor de la propiedad, y_{caract} es el valor obtenido en la caracterización, δ_{hom} es el error asociado a la homogeneidad, δ_{ecp} es el error asociado a la estabilidad a corto plazo. Usualmente los términos de error asociados a la homogeneidad y estabilidad son cero, pero no sus incertidumbres. El valor de caracterización y_{caract} corresponde al promedio de los resultados de medición entre los genes evaluados (*Z3276* y *rfbE*) (ecuación 4-9)

$$y_{caract} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_i}{n} \quad \text{Ecuación 4-9}$$

Donde \bar{x}_i representa el gran promedio obtenido para cada gen de acuerdo con el modelo descrito en la figura 3-2 (Ecuación 4-10)

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_j \sum_k^l x_{jk}}{n} \quad \text{Ecuación 4-10}$$

Donde n representa el número de días y l el número de réplicas. Los datos obtenidos en la caracterización de los lotes, se presentan en Anexo E: Datos producción piloto

La incertidumbre del valor asignado para cada uno de los lotes se hizo siguiendo la ecuación 4-11 con base en el modelo de asignación:

$$u(X_{MR}) = \sqrt{u_{caract}^2 + u_{hom}^2 + u_{ecp}^2} \quad \text{Ecuación 4-11}$$

La Tabla 4-22 relaciona las ecuaciones empleadas para la estimación de incertidumbre del valor asignado para cada lote.

Tabla 4-22: Estimación incertidumbre candidato a material de referencia.

Componentes asociados a la caracterización	$u(\bar{x}_{jk}) = C_m * \sqrt{\left(\frac{u_\lambda}{\lambda}\right)^2 + \left(\frac{u_d}{d}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2}$	Incertidumbre para cada medición $u(\bar{x}_{jk})$
	$u(\bar{x}_i) \sqrt{\sum u_{x_{jk}}^2}$	Incertidumbre para cada gen $u(\bar{x}_i)$
	$u(y_{caract}) = \sqrt{\sum u_{\bar{x}_i}^2}$	Incertidumbre de caracterización $u(y_{caract})$
	$u(sesgo) = \frac{\bar{x}_{Z3276} + \bar{x}_{rfbE}}{\sqrt{12}}$	Incertidumbre por sesgo $u(sesgo)$
	$u_{hom} = \sqrt{\frac{(SCF - SCE)}{3}}$	Incertidumbre por homogeneidad u_{hom}
	$u_{ecp} = s(b) * t$	Incertidumbre estabilidad a corto plazo u_{ecp}

C_m = Concentración de la muestra, d = Dilución de la muestra, V = Volumen de gotas, λ =número de copias por partición, $s(b)$ = Desviación estándar de la pendiente de la tendencia, t = tiempo de evaluación de estabilidad.

La incertidumbre por sesgo se generó como una contribución por la combinación de los valores obtenidos para cada uno de los genes, donde se asumió una distribución rectangular. En la Tabla 4-21 se presenta un resumen de los valores de referencia para los lotes en estudio con su incertidumbre asociada. Al estimar la concentración se observó que aparentemente hay diferencia entre los valores reportados por cada gen (aproximadamente 4%), debida principalmente a la variabilidad del método y a las eficiencias de la amplificación de cada gen, sin embargo, estas no son significativas cuando se tiene en cuenta las incertidumbres asociadas al valor obtenido (Figura 4-37).

Tabla 4-23. Valor asignado e incertidumbre para los lotes evaluados

Lote	Gen Z3276		Gen rfbE		Fuentes incertidumbre			
	Valor	u _{Z3276}	Valor	u _{rfbE}	U _{sesgo}	U _{carac.}	U _{homog.}	U _{estab.}
L190402-08P	161117	3975	168610	3858	2163	5539	1778	2086
L190401-10P	168	8	175	8	2	11	7	7
Asignación de valor de referencia								
Lote	Valor asignado	u	u relativa (%)	k	U	U relativa (%)		
L190402-08P	164864	6548	3.97	2	13096	7.9		
L190401-10P	172	15	8.80	2	30	17.6		

U= Incertidumbre expandida, u=incertidumbre combinada estándar

En ambos lotes se presentó una concentración mayor a la concentración nominal, debido posiblemente a la forma en que se prepararon las diluciones. A pesar que se hicieron diluciones gravimétricas se prepararon varias diluciones intermedias empleando volúmenes pequeños, y que fueron posiblemente fuente de error que afectaron alcanzar la concentración objetivo. A partir de esto, se recomienda partir de una solución de ADN de menor concentración y minimizar las diluciones empleadas para llegar a la concentración objetivo.

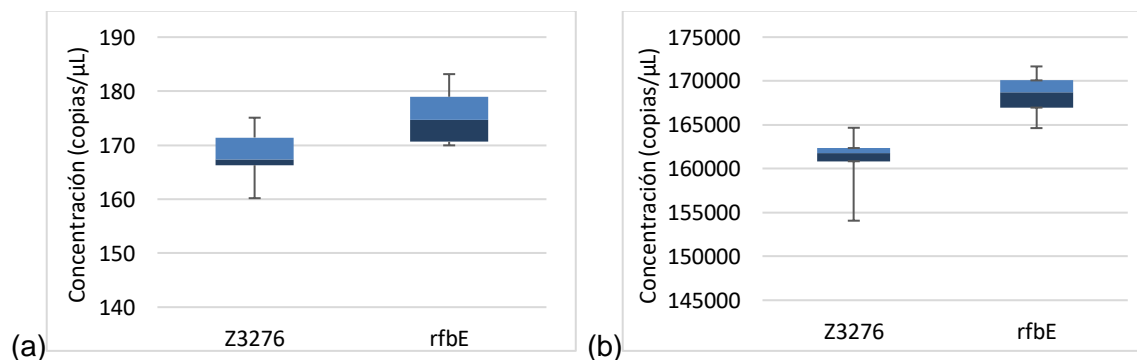


Figura 4-37: Concentración estimada para cada lote

Diagramas de cajas y bigotes para respuesta de genes Z3276 y *rfbE* en los lotes L190401-10P (a) y L190402-08P (b).

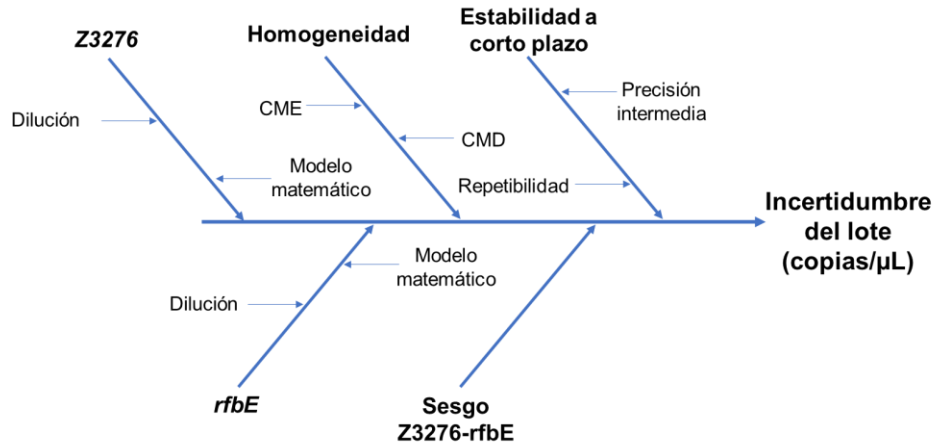


Figura 4-38: Principales fuentes de incertidumbre en lotes

En las mediciones por PCR digital se han identificado varias fuentes que aportan al valor de la incertidumbre del resultado obtenido (Figura 4-38) [151]. En la Figura 4-39 se presentan los aportes de cada una de las fuentes identificadas a la incertidumbre estándar combinada para los lotes evaluados. Se observa como en ambos lotes el mayor aporte es debido a la caracterización. El aporte de incertidumbre debido a la homogeneidad y estabilidad tienden a disminuir al aumentar la concentración de ADN, mientras que el aporte por el sesgo disminuye.

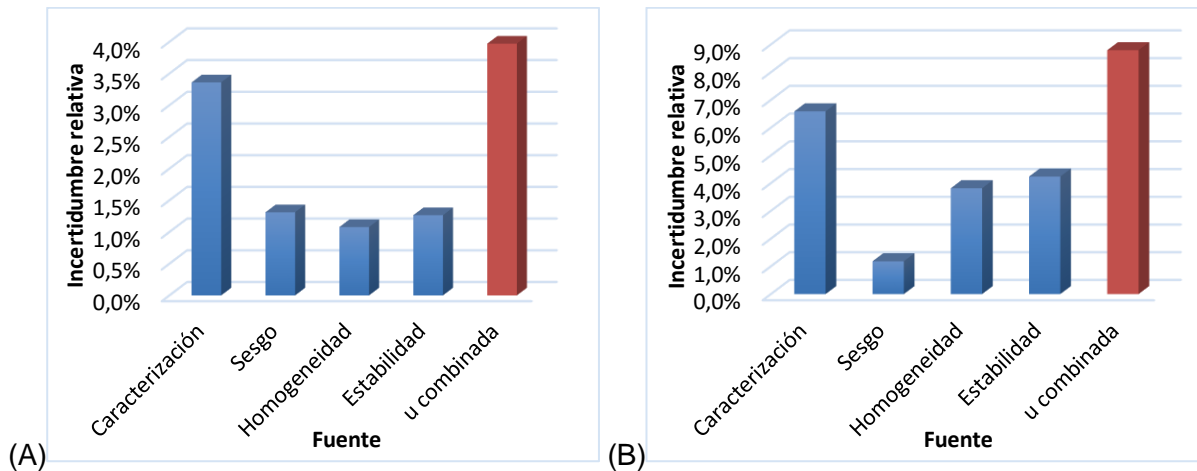


Figura 4-39. Aporte incertidumbre para los lotes evaluados.

Fuentes que aportan incertidumbre a los resultados de cuantificación obtenidos por ddPCR en los lotes 190402-08P (A) y 190401-10P (B). Las barras azules indican el aporte de incertidumbre por fuente, las barras rojas indican la incertidumbre combinada de las fuentes.

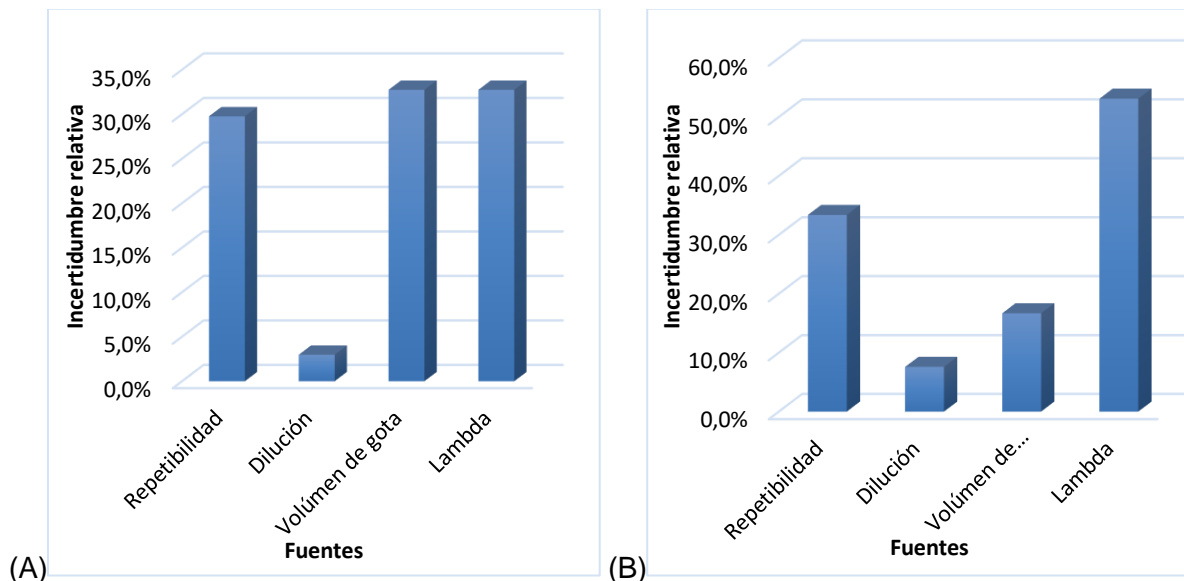


Figura 4-40. Fuentes incertidumbre asociadas a la caracterización.

Aporte de incertidumbre en la caracterización para los lotes 190402-08P (A) y 190401-10P (B).

Incertidumbres relativas con respecto al aporte total de la caracterización.

La incertidumbre asociada a la caracterización de cada uno de los lotes depende del modelo matemático y de la precisión medida como repetibilidad (Tabla 4-22). En la Figura 4-40 se presenta el desglose de los diferentes aportes, donde se puede observar que lambda (λ , copias por gota) es el elemento que más pesa en la incertidumbre total, seguido de la repetibilidad. Adicionalmente, el volumen de la gota y la dilución tienen un aporte diferente entre los lotes que es dependiente de la concentración.

La producción piloto del candidato a MR ha permitido determinar los puntos importantes durante el proceso para garantizar la idoneidad del material. El proceso de evaluación de calidad y estimación de la concentración del ADN de partida, así como la preparación son puntos claves para garantizar idoneidad producido, dado que errores en estos puntos pueden contribuir a no obtener los niveles de concentración deseados, poca homogeneidad del material, o afectar su estabilidad. Al evaluar el efecto de la diferencia en la respuesta entre los genes (sesgo) en el valor asignado al material se observó que es poco significativa, además en estudios en los que realizan asignación de valor empleando varios genes, se observó un comportamiento similar [114]. Varios estudios como la estabilidad a largo plazo y la conmutabilidad se deben continuar evaluando con el objetivo de demostrar la idoneidad del material producido para su certificación.

Aunque en algunos países se han desarrollado MRC de *E. coli* O157 o relacionados, estos son certificados en identidad [17] o se encuentran en proceso de certificación [186]. El candidato a MR desarrollado en este trabajo, ofrece varias ventajas frente a otros en el mercado. Al ser de ADN genómico contiene varios de los genes blanco que emplean los métodos para la detección no solo de *E. coli* O157:H7 sino otros serotipos de este género, esto podría contribuir a la comparabilidad de los resultados obtenidos. Una vez el material se encuentre certificado, podría usarse para hacer cuantificación de microorganismos en las muestras mediante curvas de calibración, además se podría emplear para la validación de varios métodos que detecten serotipos de *E. coli*. Finalmente, podría emplearse como control de calidad en los laboratorios de ensayo que realicen la detección de este microorganismo y otros de la misma especie, así como ítem para evaluar el desempeño de medición de los laboratorios que emplean métodos por qPCR.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se desarrolló y validó un método por PCR digital en modo gotas para la detección y cuantificación de ADN genómico de *E. coli* O157:H7, empleando como dianas de identificación fragmentos de los genes *uidA*, *eaeA*, *rfbE*, *stx1*, *stx2*, *lacY* y *Z3276*. Los fragmentos de amplificación mostraron selectividad para la detección de diferentes serotipos relacionados con *E. coli*, así como, la identificación y cuantificación de *E. coli* O157:H7.

Los resultados de la validación permitieron establecer que el método es adecuado para estimar la concentración de ADN genómico en el intervalo de 8 cp/μL y 8000 cp/μL, con una precisión entre 5% y 10%, una incertidumbre relativa entre 1.6 % y 9.0% y un límite de detección de 0.3 copias/μL en la mezcla de PCR.

Se optimizó el procedimiento de cultivo microbiológico de *E. coli* O157:H7 y se realizó la extracción a nivel preparativo para la obtención de ADN genómico por el método CTAB. El procedimiento permitió obtener un stock de ADN concentración de 3728.2 ± 13.7 ng/μL libre de inhibidores de PCR, adecuado para la preparación del candidato a material de referencia.

Se realizó el piloto para la producción de un candidato a material de referencia de ADN genómico de *E. coli* O157:H7 derivado de ATCC 35150. Se prepararon con dos niveles con valores asignados de 168864 ± 13096 copias/μL y 172 ± 30 copias/μL ($U=2$, 95% nivel de confianza), que cumplieron con el criterio de homogeneidad. En el estudio de asignación de valor se emplearon los genes *Z3276* y *rfbE* porque además de ser específicos de *E. coli* O157:H7, presentaron el mejor desempeño durante la validación del método de medición.

De acuerdo con el estudio de estabilidad el material demostró mantener el valor de la propiedad durante 12 semanas. Se corroboró que los dos niveles del material son estables a 4°C y -20°C, por lo cual el material podría ser transportado a cualquiera de estas temperaturas.

Todos los resultados presentados evidencian que los niveles de concentración del material producido cumplen con los criterios de homogeneidad y estabilidad a corto plazo establecidos en la guía ISO 35:2017.

Las principales fuentes de incertidumbre identificadas en la producción del candidato a material de referencia fueron la caracterización, la homogeneidad del material, la estabilidad a corto plazo y el sesgo entre las respuestas de los genes seleccionados. Para ambos lotes el componente con mayor aporte es el de la caracterización, en donde el aporte debido al modelo matemático representa cerca del 60%.

5.1 Perspectivas

Las secuencias empleadas para la detección de *E. coli* O157:H7 podrían ser empleadas para desarrollar métodos en modo múltiplex por PCR en tiempo real, para hacer la clasificación y/o serotipificación de ADN de *E. coli*.

El candidato a material de referencia desarrollado en el presente estudio podría emplearse como herramienta de aseguramiento de la calidad en validación o verificación de métodos, control de calidad, ítem en ensayos de aptitud o como calibrante en las mediciones realizadas por qPCR para la detección de *E. coli* y serotipos de ECHE, Además, podría establecer la trazabilidad metrológica para los ensayos comerciales.

5.2 Recomendaciones

Se debe continuar evaluando la estabilidad del material a largo plazo bajo las condiciones de almacenamiento seleccionadas, para determinar el tiempo en el cual el valor de la propiedad se mantiene.

En las futuras preparaciones de materiales de referencia a nivel de ADN genómico, se recomienda partir de una solución de ADN de menor concentración y minimizar las diluciones empleadas para llegar a la concentración objetivo.

Anexo A: Cepario y extracción de ADN

A.1 Cepario BBMM

Para el mantenimiento de las cepas adquiridas para el estudio de selectividad, se elaboró un cepario, en la tabla A-1 se presentan la información de las cepas incluidas.

Tabla A-1: Cepario del grupo de investigación BBMM

Código	Nombre Microorganismo	Derivado de	Pase	Medio de cultivo	Número de crioviales
E.ES.C-01	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	N	LB	50
E.SH.B-01	<i>Shigella boydii</i>	ATCC® 9207	6°	LB	50
E.SH.S-01	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC® 9290	6°	LB	50
E.SP.A-01	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923	6°	LB	50
E.BC.C-01	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC® 10876	6°	LB	50
E.PR.M-01	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC® 12453	6°	LB	50
E.ES.C-02	<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739	6°	LB	50
E.ES.C-03	<i>Escherichia coli</i>	NCTC® 10538	6°	LB	50
E.EN.F-01	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 14506	6°	BHI	50
E.ES.C-04	<i>Escherichia coli</i>	NA	NA	LB	50
E.CI.F-01	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC® 43864	6°	TSA	50
E.YE.E-01	<i>Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica</i>	ATCC® 23715	6°	TSA	50
E.EN.A-01	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC® 13048	6°	TSA	20
E.PR.V-01	<i>Proteus Vulgaris</i>	ATCC® 33420	6°	TSA	20
E.SP.A-02	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 6538	6°	TSA	20
E.VB.P-01	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC® 17802	6°	TSA	20
E.KL.P-01	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	ATCC® 13882	5°	TSA	20
E.ES.C-05	<i>Escherichia coli O104:H4</i>	ATCC® BAA-2326™	5°	TSA	50
E.ES.C-06	<i>Escherichia coli O145:NM</i>	CDC 99-3311	5°	TSA	50
E.ES.C-07	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ATCC® 35150™	5°	TSA	50
E.ES.C-08	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	ATCC® 700728™	5°	TSA	50

Cada cepa se reconstituyó en medio nutritivo según recomendaciones del fabricante, inoculando 50 mL con un escobillón e incubando a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 12-18 horas. Luego, se prepararon 50 crioviales, adicionando 150 μL de glicerol 50% estéril y 350 μL de medio crecido, los cuales se almacenaron en ultracongelador (-80°C).

Se evaluó el crecimiento y las características de las colonias para cada cepa inoculando con el escobillón los medios TSA, ECA y SMAC, con el fin de hacer el seguimiento de los cultivos en cada pase durante el proceso, los cuales se incubaron a $37.0^{\circ}\text{C} \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 12-24h.

A.2 Escala de McFarland

Dado que las cepas *E. coli* STEC son patógenas, el seguimiento de crecimiento se hizo por comparación con escala de turbidez, con el objetivo de minimizar el riesgo por contaminación. Para esto, se construyó una escala de McFarland usando cloruro de bario di hidratado 0,048M ($\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y ácido sulfúrico 0,018M (H_2SO_4). (Ver tabla A-2)

Tabla A-2: Volúmenes de reactivos usados para preparación de la escala McFarland

Estándar	$\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,048M	H_2SO_4 0,018M	Abs 600 nm	Abs 625 nm
Blanco	0	50,00 mL	0,00	0,00
0,5	0,25 mL	49,75 mL	0,21	0,20
1	0,50 mL	49,50 mL	0,38	0,37
2	1,00 mL	49,00 mL	0,75	0,73
3	1,50 mL	48,50 mL	1,09	1,07
4	2,00 mL	48,00 mL	1,43	1,40
5	2,50 mL	47,50 mL	1,73	1,70
6	3,00 mL	47,00 mL	2,01	1,99
7	3,50 mL	46,50 mL	2,19	2,19
8	4,00 mL	46,00 mL	2,56	2,40
9	4,50 mL	45,50 mL	2,62	2,54
10	5,00 mL	45,00 mL	2,63	2,55

A.3 Extracción de ADN método CTAB-NaCl a pequeña escala

Para extraer ADN a partir de 1 mL a 2 mL de cultivo se procedió a separar la biomasa del medio de cultivo mediante centrifugación a 8000 rpm en centrífuga Heraeus™ Megafuge™ 16 R por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se hizo un lavado con 1 mL de PBS 1X y se volvió a centrifugar a 8000 rpm por 10 min a 4°C. Una vez lavado el pellet, se realizó la lisis celular adicionando 2,5 mL de Buffer TE 1X para resuspender el microorganismo, luego se adicionaron 2,5 mL de buffer de lisis CTAB 2X (CTAB 8%, EDTA 40 mM, Tris-HCl 200 mM, NaCl 2.8 M y LiCl 6%) y 3 µL de proteinasa K 20 mg/mL. La mezcla se homogenizó por inversión varias veces y se incubó a 63 °C ± 1°C por 1 hora.

Para separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares, se adicionaron 600 µL de cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó la muestra y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa (~500 µL) se transfirió a un nuevo tubo (#2). Para descartar posibles residuos de RNA, se adicionaron 2 µL de RNAsa 20 mg/mL y se incubó a 37.0 ± 1.0°C por 1 hora homogenizando frecuentemente. Luego, la solución se dejó atemperar y se adicionaron 20 µL de cloruro de litio 10 %. Sobre la mezcla se volvió a hacer una extracción con 600 µL de cloroformo/Alcohol isoamílico 1:24 y se centrifugó a 13.000 rpm por 15 min a 4°C, con el fin de separar de nuevo las fases. Se obtuvieron aproximadamente 500 µL de fase acuosa que se transfirió a un nuevo tubo.

Para precipitar el ADN se adicionaron 200 µL de acetato de amonio 10 M y 500 µL de isopropanol frío, se homogenizaron e incubaron a -20°C por 18 horas. El tubo se centrifugó a 13000 rpm por 20 min a 4°C y el sobrenadante se descartó. El pellet obtenido se lavó 2 veces por adición de 500 µL etanol al 70% y centrifugación a 13.000 rpm por 20 min a 4°C. El pellet de ADN se dejó secar en cabina de extracción por aproximadamente 2 horas. El ADN obtenido se resuspendió en 100 µL de buffer TE 1X estéril. Finalmente, se determinó la calidad de ADN obtenido por espectrofotometría, electroforesis y qPCR.

A.4 Extracción de ADN método CTAB-NaCl a gran escala

Para extraer ADN a partir de 200 a 300 mL de cultivo se procedió a separar la biomasa del medio de cultivo mediante centrifugación a 5000 rpm en centrífuga Sorvall Lynx 4000 con rotor basculante Bioflex HC por 30 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se hizo un lavado con 200 mL de PBS 1X y se volvió a centrifugar a 5000 rpm por 30 min a 4°C. Luego se añadieron 20 mL de PBS, se resuspendió el pellet para transferirlo a un tubo de polipropileno fondo redondo con tapa (Ref: 31190050) y se completó el volumen hasta el cuello del tubo (Capacidad aproximada 37 ml). El tubo se centrifugó a 9000 rpm (14300xg) por 20 min y 4°C en rotor TH13. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo del pellet bacteriano.

Una vez lavado el pellet, se procedió a hacer la lisis celular adicionando 7,5 mL de Buffer TE 1X para resuspender el microorganismo, luego se adicionaron 7,5 mL de buffer de lisis CTAB 2X (CTAB 8%, EDTA 40 mM, Tris-HCl 200 mM, NaCl 2.8 M y LiCl 6%) y 250 µL de proteinasa K 20 mg/mL. El tubo se homogenizó por inversión varias veces y se incubó a 63 °C ± 1°C por 1 hora.

Para separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares, se adicionaron cloroformo/alcohol isoamílico 1:24 hasta el cuello del tubo (~22 mL), se homogenizó la muestra y se centrifugó a 12000 rpm (25400xg) por 15 min a 4°C en el rotor TH13. Se observó adecuada separación de fases con una interfaz blanca compacta de aproximadamente 5 mm de espesor, la fase acuosa (~12,5 mL) se transfirió a un tubo nuevo (#2). Al tubo con la fase orgánica se le adicionaron 3 mL de buffer TE 1X y 3 mL de cloroformo/alcohol isoamílico 1:24, se centrifugó de nuevo a 12000 rpm y se recuperaron 1.5 mL más de fase acuosa, que se adicionaron al tubo (#2). Para descartar posibles residuos de RNA, se adicionaron 100 µL de RNAsa 20 mg/mL (143 µg/mL), se incubó a 37 °C ± 1°C por 1 hora homogenizando frecuentemente y luego se adicionaron 2 mL de cloruro de litio 10% (0.295 M). A la mezcla, posteriormente, se le adicionaron cloroformo/alcohol isoamílico 1:24 hasta el cuello del tubo (~20 mL) y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 min a 4°C, con el fin de separar de nuevo las fases. Se obtuvieron aproximadamente 16 mL de fase acuosa que fue transferida a un tubo nuevo.

Para precipitar el ADN se adicionaron 4 mL de acetato de amonio 10 M y 18 mL de isopropanol, luego el tubo se incubó a -20°C por un periodo de 18 horas. El tubo se

centrifugó a 12000 rpm (25400 x g) por 20 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó 2 veces por adición de 20 mL etanol al 70% y centrifugación a 12.000 rpm por 20 min a 4°C. El pellet de ADN se dejó secar en cabina de extracción por aproximadamente 4 horas. El ADN obtenido se resuspendió en 1,0 mL de buffer TE 1X estéril. Finalmente, se determinó la calidad de ADN obtenido por espectrofotometría, electroforesis y qPCR.

Anexo B: Análisis de secuencias de primers

Tabla B-1: Análisis de primers de literatura

Gen	Tipo	Secuencia	^a Temperatura de anillamiento (°C)	^b Contenido GC (%)	^c Estructura secundaria (Tm, ΔG)	^d Autodímeros (pb, ΔG)	^e Heterodímeros	^f Tamaño amplicon (pb)	^g Amplifica en	Referencias
eae	Primer	CCCGAATTCGGCACAAG CATAAGC	67,8	54	1(50,-3,52) 2(39,-1,77)	1(10,-21,87) 2(2,-3,67)	1(5,-8,61) 2(3,-6,68)	881	E. coli(0) E. Albertii (0,93%) Shigella boydii (0,99%) Citrobacter rodentium (0,85%)	[192]
	Primer	CCCGATCCGTCTCGCC AGTATTCG	70,6	64	1(39,4;-1,22) 2(30,9;-0,85)	1(8;-17,99) 2(4;-9,75)				
eaeA	Primer	GACCCGGCACAAGCATA AGC	65,6	60	1(48,3;-1,62) 2(38,3;-0,7)	1(4;-9,75) 2(2;-314)	1(3;-5,09) 2(2;-3,14)	384	E. coli (0) E. Albertii(4e-142, 91%) Shigella boydii (0,99%)	[193]
	Primer	CCACCTGCAGCAACAAG AGG	65,2	60	1(32,6;-0,59)	1(6;-10,24) 2(3;-5,09)				
eae	Primer	AGGCTTCGTCACAGTTG	59,1	53	1(7,9;0,84) 2(1,1;0,94)	1(2;-3,61) 2(2;-3,14)	1(2;-3,61) 2(2;-3,07)	570	E. coli(0) Shigella boydii(0) Citrobacter rodentium (99%,0,91%)	[194]
	Primer	CCATCGTCACCAGAGGA	59,9	59	1(37,4;-1,11) 2(34,9;-0,52)	1(2;-3,61) 2(2;-3,07)				
eae	Primer	CATTGATCAGGATTTTTTCTGGTGATA	61,9	35	1(40,8;-1,24) 2(35,9;-0,87)	1(6;-5,6) 2(4;-5)	1(4;-5,46) 2(5;-8,32)	102	E. coli(2e-44) Shigella boydii(2e-44) E. Albertii (2e-44) Citrobacter Rodentium(2e-29,91%)	[179]
	Primer	CTCATGCGGAAATAGCC GTTA	62,5	48	1(51,2;-2,54) 2(49,9;-1,89)	1(3;-6,68) 2(4;-5,38)				
	Sonda	ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	70,1	50	1(35,8;-1,31)	1(5;-5,72) 2(-3,61)				
six1	Primer	TGCAGATAAATCGCCATT CG	60,9	45	1(30,2;-0,7) 2(35,3;-0,6)	1(4;-7,05) 2(-3,61)	1(3;-3,55) 2(4;-8,16)	123	Shiguella sonnei(7e-56) E. coli(7e-56) Shiguella Flexnerii(6e-56) Shigella Dysenteriae(6e-56)	[195]
	Primer	AAGCTTCAGCTGTCACA GTAACAAA	65,1	40	1(58,5;-2,3)	1(6;-10,24) 2(6;-10,23)				
	Sonda	FAM-ACCTCACTGACGCGATCTGTGGCAAGA- TAMRA	72	56	1(63,6;-6,12) 2(63,8;-4,64) 3(49,7;-4,41)	1(4;-4,89) 2(2;-3,61)				
six1	Primer	GAAGAGTCCGTGGGATT ACG	55	55	1(34,3;-0,78) 2(31,1;-0,51)	1(3;-4,95) 2(3;-4,64)	1(4;-4,38)	130	Pega en Subunidad A	[196]
	Primer	AGCGATGCAGCTATTAATAA	49,2	35	1(38,4;-0,91) 2(28,6;-19,4)	1(8;-9,72) 2(4;-7,05)			Pega en Subunidad B	
six1	Primer	TGTAAGTGGAAAGGTGG AGTATAC	53,9	41,7	1(39,9;-1) 2(30,9;-0,33)	1(6;-6,08) 2(3;-2,94)	1(3;-3,52)	210	Pega en subunidad B	[197]
	Primer	GCTATTCTGAGTCAACG AAAAATAAC	52,7	34,6	1(11,2;0,96)				No pega en ninguno	
six1	Primer	ATAAATCGCCATTTCGTTG ACTAC	61,3	39	1(39,3;-1,02) 2(31;-0,34)	1(2;-3,61)	1(4;-6,9) 2(2;-3,61)	180	Shiguella sonnei(2e-87) E. coli(2e-87) Shiguella Flexnerii(2e-87) Shiguella Dysenteriae(2e-87)	[193]
	Primer	AGAACGCCCACTGAGAT CATC	63,8	52	1(17,8;0,39) 2(15,7;0,54)	1(4;-4,62) 2(2;3,61)				

Gen	Tipo	Secuencia	^a Temperatura de anillamiento (°C)	^a Contenido GC (%)	^a Estructura secundaria (Tm, ΔG)	^a Autodímeros (pb, ΔG)	^a Heterodímeros	^b Tamaño amplicon (pb)	^c Amplifica en	Referencias
stx1	Primer	GCAGATAAATCGCCATT CG	59	47	1(35,3;-0,6) 2(25,0)	1(2;-3,61) 2(3;-3,42)	1(4;-7,13) 2(5;-9,81)	160	Shiguelia sonnei(3e-76) E. coli(3e-76) Shiguelia Dysenteriae(2e-76) Shiguelia Flexneri(2e-76)	[198]
	Primer	TGTTGTACGAAATCCCCT CTG	61,8	48	1(1,9;1,2) 2(4,1;1,38)	1(4;-3,65) 2(2;-3,61)	1(4;-4,77)			
	Sonda	CY5- AGAGCGATGTTACGGTT TGTTACTG-IABKFQ	64,9	44	1(45,6;-1,44) 2(32;-0,67)	1(2;-3,61)				
stx1	Primer	TTTGTACTGTGACAGCT GAAGCTTACG	67,2	41	1(58,9;-1,83) 2(31,7;-0,93)	1(6;-10,24) 2(4;-6,34)	1(4;-5,47) 2(4;-5,13)	131	Shiguelia sonnei(3e-60) E. coli(3e-60) Shiguelia Flexneri(2e-60) Shiguelia Dysenteriae(2e-60)	[87]
	Primer	CCCCAGTTCAATGTAAG ATCAACATC	63,7	42	1(36,3;-0,89) 2(26,1;-0,1)	1(4;-4,77) 2(4;-4,62)	1(6;-8,18)			
	Sonda	Fluo- CTGGATGATCTCAGTGG GCGTTCTTATGTAA- BHQ1	68,7	45	1(27,5;-0,18) 2(26,7;-0,14)	1(4;-4,62) 2(2;-3,61)				
stx2	Primer	CATGACAACGGACAGCA GTTA	62,5	48	1(39,6;-0,36) 2(29;-0,26)	1(4;-5,38) 2(2;-3,61)	1(3;-5,09) 2(3;-5,09)	148	E. coli(9e-70) Salmonella Enterica(1e-69) Shiguelia Boydii(4e-68)	[198]
	Primer	TCTGGATGCATCTCTGG TCA	62,7	50	1(27,9;-0,21) 2(23,5;0,1)	1(8;-13,15) 2(2;-1,95)	1(5;-8,52)			
	Sonda	FAM- AATGCAAATCAGTCGCA CTCAC-IABKFQ	63,5	43	1(29,3;-0,12) 2(25,7;-0,05)	1(4;-7,05) 2(2;-3,61)				
stx2	Primer	GGCACTGTCTGAAACTG CTCC	65	57	1(37,8;-1,15) 2(33,1;-0,96)	1(3;-5,09) 2(2;-3,14)	1(5;-6,84) 2(3;-6,21)	255	E. coli (7e-129) Shiguelia Boydii (3e-117) Salmonella Enterica (47% 6e-54)	[193]
	Primer	TCGCCAGTTATCTGACAT TCTG	62,1	45	1(48,9;-2,15)	1(2;-3,61) 2(3;-3,55)				
stx2	Primer	GTTTTCTCTCGGTATCCT ATTCCG	54,9	42	1(40,7;-28,7) 2(30,9;-29,6)	1(3;-6,68) 2(2;-3,61)	1(2;-3,07)	484	No pega en ninguna secuencia Unión en secuencia stx2 subunidad A	[197]
	Primer	GATGCATCTCTGGTCATT GTATTAC	54,9	40	1(18,7;-20,3) 2(14,9;-18,4)	1(8;-13,15) 2(3;-3,43)				
stx2	Primer	TTAACACACCCACCG GGCAGT	71,6	61	1(55,8;-2,24) 2(38,9;-1,38)	1(4;-9,75) 2(3;-6,14)	1(4;-6,37)	349	E. coli (0) Shiguelia Boydii (2e-139,93%) Salmonella Enterica (55%, 3e-93,99%)	[199]
	Primer	GCTCTGGATGCATCTCT GGT	63,7	55	1(28,5;-0,24) 2(27,9;-0,21)	1(8;-13,15) 2(2;-3,14)				
stx2	Primer	CACTGTCTGAAACTGCT CCTGTTT						78	No pega en ninguna secuencia Unión parcial en secuencia stx2 subunidad A No pega en ninguna secuencia	[186]
	Primer	TGCTGATTCTCCCCAG TTC								
	Sonda	FAM- CGGTGCTTCTCTGACATT CAATGGCA- TAMRA								
stx2	Primer	TTTGCACTGTCACAGCA GAAGCCTTACG	69,6	48	1(50,7;-2,31)	1(4;-4,89) 2(2;-3,61)	1(5;-6,47) 2(5;-8,29)	128	E. coli (1e-58) Shiguelia Boydii (5e-57,99%) Salmonella Enterica (2e-50,96%)	[87]
	Primer	CCCCAGTTCAGAGTGAG GTCCACGTC	70,4	62	1(41,3;-1,44)	1(4;-6,3) 2(3;-3,53)	1(6;-8,65)			
	Sonda	Red640- CGTCAGGCACTGTCTGA AACTGCTCC-BHQ2	70,8	56	1(67,5;-2,63) 2(51,9;-1,95)	1(4;-5,13) 2(4;-5,09)				
rfb	Primer	CGGACATCCATGTGATA TGG	60	50	1(51,8;-2,47) 2(47,6;-1,58)	1(4;-6,5) 2(4;-5,38)	1(4;-4,77)	259	E. coli(4e-131) Rikertsiales Alfa proteobacterium	Paton AW and Paton JC (1998)
	Primer	TTGCCTATGTACAGCTAA TCC	59,6	43	1(30,7;-0,42)	1(6;-7,55) 2(4;-6,34)				
rfb	Primer	GTGTCCATTATACGGAC ATCCATG	63,3	44	1(53,1;-3,22) 2(55,1;-3,01)	1(5;-7,94) 2(4;-5,38)	1(4;-5,38)			[197]

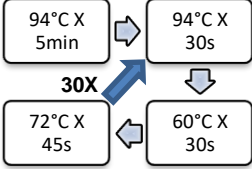
Gen	Tipo	Secuencia	^a Temperatura de anillamiento (°C)	^b Contenido GC (%)	^c Estructura secundaria (Tm, ΔG)	^d Autodimeros (pb, ΔG)	^e Heterodimeros	^f Tamaño amplicon (pb)	^g Amplifica en	Referencias
	Primer	CCTATAACGTCATGCCAA TATTGCC	63,8	44	1(25,3;-0,02)	1(8;-11,71) 2(4;-6,3)			E. coli(2e-149) Rikertsiales Alfa proteobacterium	
rfbE	Primer	TTTCACACTTATTGGATG GTCTCAA	62,9	36	1(29,6;-0,3) 2(27,5;-0,18)	1(3;-3,9) 2(-1,95)	1(4;-5,13) 2(4;-5,99)	88	E. coli (1e-36)	[87]
	Primer	CGATGAGTTTATCTGCAA GGTGAT	63	42	1(28,3;-0,23) 2(28,9;-0,19)	1(4;-7,05) 2(2;-3,61)	1(5;-8,27)			
	Sonda	TYE665-AGGACCGCAGAGGAAAG AGAGGAATTAAGG-IabRQSp	69,8	50	1(53,5;-1,88)	1(4;-5,36) 2(4;-4,85)				
rfb	Primer	GAGCCACCCCCATTTTC G	62,8	61		1(2;-3,61) 2(2;-3,14)	1(3;-3,43)	66	E coli (1e-24)	[200]
	Primer	GTTCTATGTCTACTAACAG ACATTTGCC	63,9	41	1(53,7;-3,24)	1(5;-6,35) 2(3;-3,3)				
rfb	Primer	GGATGACAAATATCTGC GCTGC	63,8	50	1(29,2;-0,34)	1(4;-9,89) 2(4;-3,41)	1(3;-4,64) 2(3;-4,64)	213	E. coli (1e-105)	(Gordillo, Rodríguez, Werning, Bermúdez, & Rodríguez, 2014)
	Primer	GGTGATTCCTTAATTCCT CTCCTTCC	63,1	42	1(32,4;-0,47)	1(4;-5,36) 2(4;-4,85)	1(6;-10,13)			
	Sonda	[HEX]TACAAGTCCACAAG GAAAG[BHQ1]	57	42	1(46,6;-1,14) 2(42,3;.0,95)	1(3;-4,64) 2(2;-1,34)				
uidA	Primer	GCAAGGTGCACGGGAAT ATT	63,1	50	1(44,8;-1,37)	1(6;-9,73) 2(6;-7,8)	1(3;-4,95) 2(3;-5,09)	75	Shiguelia Soneii(2e-29) E. coli(2e-29) Shiguelia boydii(1e-29)	[107]
	Primer	CAGGTGATCGGACGCGT	63,7	65	1(40,4;-1,2)	1(6;-13,05) 2(4;-4,62)	1(3;-6,75)			
	Sonda	(FAM)CGCCACTGGCGGA AGCAACG(TAMRA)	70	70	1(64,2;-3,75) 2(61,5;-2,81)	1(5;-11,77) 2(2;-3,61)				
uidA	Primer	CAACGAACTGAACTGGC AGA	62,5	50	1(47,4;-1,96)	1(2;-3,61) 2(3;-3,55)	1(4;-6,69) 2(3;-6,21)	121	Shiguelia boydii(7e-55) Escherichia coli (8e-55)	[201]
	Primer	CATTACGCTGCGATGGAT	59,8	50	1(40,6;-0,94)	1(3;-6,75) 2(2;-3,61)	1(3;-6,75)			
	Sonda	CCC GCCGGGAATGGTGA TTAC	66,8	62	1(61,6;-3,08)	1(4;-9,75)				
uidA	Primer	GTGTGATATCTACCCGC TTCGC	64,4	55	1(19,4;0,29)	1(6;-7,06)	1(3;-6,68) 2(3;-6,68)	83	Shigella boydii(5e-34) Escherichia coli (6e-34)	[202]
	Primer	AGAACGGTTTGTGGTTA ATCAGGA	56,5	42	1(20,7;0,15)	1(4;-4,85) 2(2;-3,61)	1(3;-6,68)			
	Sonda	FAMb-TCGGCATCCGGTCAGTG GCAGT-TAMRAc	65,4	64	1(43;-1,51)	1(4;-9,75) 2(3;-6,68)				
lacY	Primer	ACCAGACCCAGCACCAG ATAAG	60,3	55	N/A	1(2;-3,14) 2(2;-1,47)	1(2;-3,14)	463	Shigella boydii(0) E coli spp(0) Shiguelia dysenteriae(0)	[177]
	Primer	GCACCTACGATGTTTTG ACCA	57,2	45	1(21,6;-19,6) 2(10,8;-20,2)	1(2;-3,61) 2(2;-3,14)				
lacY	Primer	CTACCGGTGAACAGGGT ACG	58,8	60	1(36,9;-24,7) 2(28,9;-28,4)	1(6;-12,43) 2(4;-5,37)	1(2;-3,61)	289	Shigella boydii(1e-147) E coli spp(1e-147) Shiguelia dysenteriae(1e-147)	[176]
	Primer	GTCGCTGAAAAACGCAC TTC	56,6	50	1(24,2;-22,8) 2(20,3;-17,6)	1(2;-3,61)				
lacY	Primer	TGCTGGCTGGCACTATT ATG	56	50	1(43,1;-1,45) 2(44;-1,25)	1(3;-5,09) 2(2;-3,14)	1(3;-5,09) 2(3;-5,09)	153	Shigella sonnei(1E-72) Escherichia coli (1E-72)	Diseñados
	Primer	GCACCTCAAAGTGGCTG GTA	55	50	1(20,8;0,26) 2(16,8;0,33)	1(2;-3,14)	1(3;-5,09)			
	Sonda	[FAM] CCG TTC CTG CTG GTG GGC TGC TT [BHQ1]	68	65	1(48,9;-1,68) 2(39,6;-1,06)	1(2;-3,61)				

Gen	Tipo	Secuencia	^a Temperatura de anillamiento (°C)	^a Contenido GC (%)	^a Estructura secundaria (Tm, ΔG)	^a Autodímeros (pb, ΔG)	^a Heterodímeros	^b Tamaño amplicon (pb)	^c Amplifica en	Referencias
Z3276	Primer	TATTCCGCGATGCTTGT TTT	54.9	38	1(20.3; -19)	1(4; -10.36) 2(2; -3.61)	1(4; -9.82) 2(3; -6.75)	228	E. coli O157:H7 (3e-114)	[14]
	Primer	ATTATCTCACCAGCAAAC TGCGCG	60.9	50	1(55.5; -33.6)	1(4; -6.62) 2(2; -3.61)	1(4; -9.82)			
	Sonda	FAM-CCCGCAAATCTTTCCMG BNFQ	54.5	56	1(-8.6; -10.1)	1(3; -3.89) 2(2; -3.61)				
Z3276	Primer	GCACTAAAAGCTTGGAG CAGTTC	58.1	48	1(45.2; -25.4) 2(42.3; -25)	1(6; -10.23) 2(3; -4.74)	1(3; -4.74) 2(3; -3.14)	178	E. coli O121:H19 O157:H7 O103:H2 O26:H11	[178]
	Primer	AACAATGGGTCAGCGGT AAGGCTA	61.8	50	1(41.2; -18.4) 2(28.6; -27.4)	1(3; -4.74) 2(2; -3.61)	1(4; -5.99)			
	Sonda	FAM-CGTTGGCGAGGACC-MGBNFQ	55.4	71	1(36.6; -17.2)	1(2; -3.61)				
Z3276	Primer	CGGCGAACAGTAAGGAA G	54.9	56	1(6.9; -14.6)	1(2; -3.61)	1(3; -6.21)	313	E. coli O157:H7 (6e-162)	Amplificación isotérmica
	Primer	ACTGGCCATGACTGGTA T	55.1	50	1(38.5; -28.8) 2(31.9; -21.7)	1(6; -13.19) 2(4; -5.38)				
Z3276	Primer	AACAAGCATCGCGGAAT ATGG	57.4	48	1(22.6; -27.4) 2(11.8; -13.5)	1(4; -10.36) 2(4; -3.91)	1(5; -9.8) 2(3; -5.02)	216	E. coli O157:H7 (1e-107)	Diseñados
	Primer	TTCGGCCAACGGCGATC ATGAAACTCCTGGTTTAT CTG	67.8	50	1(43.2; -51.4) 2(42.6; -52.2)	1(4; -9.28) 2(6; -8.53)				
Z3276	Primer	CAAACCTACACCATTAT CTGT	53.9	41	1(18.5; -22.1) 2(17.3; -20.1)	1(3; -3.3) 2(2; -1.95)	1(4; -6.5)	112	E. coli O157:H7 (3e-50)	Diseñados
	Primer	GCGGCGACATCATTATG GA	57	53	1(33.8; -28.6)	1(2; -3.61)				
Z3276	Primer	CTGGCGGGGATACATT TAC	56	55	1(-0.5, 1.39) 2(-3, 1.49)	1(2, -3.61) 2(2, -3.14)	1(4, -7.71) 2(3, -6.14)	126	E. coli O157:H7 (7e-58)	Diseñados
	Primer	TCCCTGATTTCTGAGCTG GA	57.2	50	1(20.6; -19.8) 2(15.3; -16.5)	1(4; -6.34) 2(3; -4.64)	1(5; -8.2)			
	Sonda	ACGGTGTTCAGGCTTA CAGGTCGT	64	50	1(24.2, 0.04) 2(24.5, 0.08)	1(3; -4.95) 2(2; -3.61)				
Z3276	Primer	TTGAAGTTGGGCTTTTG GT	56.9	45	1(38.7; -23.3) 2(29.4; -16)	1(4; -9.28) 2(3; -3.54)	1(3; -6.21)	108	E. coli O157:H7 (5e-48)	Diseñados
	Primer	GTAATACTGCCTGCGCA TTG	55.9	50	1(36.8; -22) 2(34.2; -21.6)	1(6; -13.8) 2(3; -5.09)				
Z3276	Primer	CGGGGATACATTTACG CTT	56.5	50	1(4.8; -14.8)	1(2; -3.61)	1(3; -4.75) 2(3; -4.95)	115	E. coli O157:H7 (8e-52)	Diseñados
	Primer	TTTCTGAGCTGGAACAA GGC	57.1	50	1(27.3; -12.8) 2(22.9; -12.4)	1(4; -6.34)	2(4; -5.24)			
	Sonda	ACGGTGTTCAGGCTTA CAGGTCGT	64	50	1(24.2, 0.04) 2(24.5, 0.08)	1(3, -4.95) 2(2, -3.61)				

Análisis de secuencias empleando ^aIDT OligoAnalyzer Tool, ^bSnapGene Viewer y ^cBLAST

Tabla B-2: Condiciones de amplificación reportadas para obtener fragmentos de genes de interés

Gen	[Primers]	[Sonda]	Cant. plantilla	Vol total	Ciclo PCR	Ref.
eaeA	600 nM	200 nM	2 µL	20 µL	<p>50°C X 2min → 95°C X 10min 95°C X 15s ← 60°C X 1min 30X</p>	[179]
uidA	250 nM (0,5 µL)	125 nM	5 µL	20 µL	<p>95°C X 15min → 95°C X 30s → 52°C X 40s 86°C X 60s ← 72°C X 60s 20°C/s 40X</p>	[107]
stx1	500 nM (1 µL)	200 nM	2 µL	20 µL	<p>95°C X 10min → 95°C X 10s → 55°C X 5s 40°C X 30s ← 72°C X 15s 20°C/s (0,4°C/s) 40X</p>	[87]
stx2	500 nM (1 µL)	200 nM	2 µL	20 µL	<p>95°C X 10min → 95°C X 10s → 55°C X 5s 40°C X 30s ← 72°C X 15s 20°C/s (0,4°C/s) 40X</p>	[87]
rfbE	500 nM (1 µL)	200 nM	2 µL	20 µL	<p>95°C X 10min → 95°C X 10s 40°C X 30s ← 60°C X 30s 20°C/s 40X (10°C/s)</p>	[87]
lacY	200 nM (0,5 µL)	----	2,5 µL	25 µL	<p>94°C X 90s → 94°C X 30s 72°C X 30s ← 58°C X 25s 30X</p>	[177]

Gen	[Primers]	[Sonda]	Cant. plantilla	Vol total	Ciclo PCR	Ref.
	150 nM	----	100 ng	25 μ L	 <p>The diagram illustrates a PCR cycle. It starts with a 94°C X 5min step. This is followed by 30 cycles of three steps: 94°C X 30s, 60°C X 30s, and 72°C X 45s. The steps are connected by arrows in a clockwise cycle, with a large blue arrow labeled '30X' indicating the repetition of the cycle.</p>	[176]

C.1. Análisis simplex-dúplex

Se calculó el promedio y desviación estándar de las réplicas de datos en modo simplex y en modo dúplex para cada gen. Usando la ecuación C-1 se halló el t-calculado para cada pareja de datos, y con la ecuación C-2 se calculó los grados de libertad para estimar el t-crítico en una t de dos colas.

$$t_{cal} = \frac{(X_{prom1} - X_{prom2})}{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)} \quad \text{Ecuación (C-0-1)}$$

$$gl = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}\right)} \quad \text{Ecuación (C-0-2)}$$

Donde X_{prom1} es el promedio de ciclos de amplificación para el gen en modo simplex y X_{prom2} para el modo dúplex, s_1 corresponde a la desviación estándar para cada gen en modo simplex y s_2 para el modo dúplex, gl es el número de grados de libertad, n_1 corresponde al número de datos de cada gen en modo simplex y n_2 al modo dúplex.

Tabla C-2: Prueba t-student parejas apareadas combinaciones con gen *uidA*

Dúplex <i>uidA-lacY</i>							
<i>uidA</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia	<i>lacY</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia
1		23,721	-23,721	1	23,099	22,779	0,320
2	23,508	23,867	-0,359	2	22,693	22,900	-0,208
3	23,594	23,701	-0,107	3	23,045	22,717	0,328
	2,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	23,551	23,763	Promedio		22,946	22,799	Promedio
	0,061	0,090	Desvesta		0,221	0,093	Desvesta
GL	2,931	Tcal	-3,124	GL	2,689	Tcal	1,061
		Tcrit	3,182			Tcrit	3,182
Dúplex <i>uidA-eaeA</i>							
<i>uidA</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia	<i>eaeA</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	0,000	23,330	-23,330	1	23,436	23,172	0,264
2	23,508	23,830	-0,322	2	23,185	23,353	-0,168
3	23,594	23,877	-0,283	3	23,331	23,180	0,151
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	15,701	23,679	Promedio		23,317	23,235	Promedio
	13,597	0,303	Desvesta		0,126	0,102	Desvesta
GL	2,002	Tcal	-1,016	GL	3,843	Tcal	0,880
		Tcrit	3,182			Tcrit	2,776
Dúplex <i>uidA-stx1</i>							
<i>uidA</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia	<i>stx1</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	0,000	23,642	-23,642	1	21,215	23,399	-2,184
2	23,508	23,663	-0,155	2	23,948	23,668	0,280
3	23,594	23,556	0,038	3	23,921	23,409	0,512
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	15,701	23,621	Promedio		23,028	23,492	Promedio
	13,597	0,057	Desvesta		1,570	0,153	Desvesta
GL	2,000	Tcal	-1,009	GL	2,038	Tcal	-0,510
		Tcrit	3,182			Tcrit	3,182
Dúplex <i>uidA-Z3276</i>							
<i>uidA</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia	<i>Z3276</i>	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	0,000	23,861	-23,861	1	23,217	22,992	0,225
2	23,508	23,824	-0,316	2	23,209	22,815	0,394
3	23,594	24,957	-1,362	3	23,110	22,865	0,245
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	15,701	24,214	Promedio		23,179	22,891	Promedio
	13,597	0,643	Desvesta		0,060	0,091	Desvesta
GL	2,009	Tcal	-1,083	GL	3,445	Tcal	4,571
		Tcrit	3,182			Tcrit	2,776

Tabla C-3: Prueba t-student parejas apareadas combinaciones con gen *rfbE*

Dúplex rfbE-lacY								
rfbE	Simplex	Dúplex	Diferencia		lacY	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,198	23,132	0,066		1	23,099	23,005	0,094
2	22,895	23,383	-0,487		2	22,693	23,092	-0,400
3	23,069	23,043	0,025		3	23,045	22,915	0,131
	3,000	3,000	n (Datos)			3,000	3,000	n (Datos)
	23,054	23,186	Promedio			22,946	23,004	Promedio
	0,152	0,176	Desvesta			0,221	0,089	Desvesta
GL	3,917	Tcal	-0,985		GL	2,631	Tcal	-0,424
		Tcrit	2,776				Tcrit	3,182
Dúplex rfbE-eaeA								
rfbE	Simplex	Dúplex	Diferencia		eaeA	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,198	22,949	0,249		1	23,436	23,151	0,285
2	22,895	23,006	-0,110		2	23,185	23,133	0,052
3	23,069	23,064	0,004		3	23,331	23,132	0,199
	3,000	3,000	n (Datos)			3,000	3,000	n (Datos)
	23,054	23,006	Promedio			23,317	23,139	Promedio
	0,152	0,058	Desvesta			0,126	0,011	Desvesta
GL	2,565	Tcal	0,509		GL	2,028	Tcal	2,451
		Tcrit	3,182				Tcrit	3,182
Dúplex rfbE-stx1								
rfbE	Simplex	Dúplex	Diferencia		stx1	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,198	22,910	0,288		1	21,215	23,113	-1,898
2	22,895	23,214	-0,318		2	23,948	23,663	0,285
3	23,069	22,832	0,237		3	23,921	23,306	0,615
	3,000	3,000	n (Datos)			3,000	3,000	n (Datos)
	23,054	22,985	Promedio			23,028	23,361	Promedio
	0,152	0,202	Desvesta			1,570	0,279	Desvesta
GL	3,715	Tcal	0,473		GL	2,126	Tcal	-0,361
		Tcrit	2,776				Tcrit	3,182
Dúplex rfbE-Z3276								
rfbE	Simplex	Dúplex	Diferencia		Z3276	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,198	23,444	-0,246		1	23,217	22,942	0,275
2	22,895	23,356	-0,460		2	23,209	23,148	0,061
3	23,069	23,007	0,062		3	23,110	22,837	0,273
	3,000	3,000	n (Datos)			3,000	3,000	n (Datos)
	23,054	23,269	Promedio			23,179	22,976	Promedio
	0,152	0,231	Desvesta			0,060	0,158	Desvesta
GL	3,455	Tcal	-1,345		GL	2,558	Tcal	2,078
		Tcrit	2,776				Tcrit	3,182

Tabla C-4: Prueba t-student parejas apareadas combinaciones con gen *stx2*

Dúplex <i>stx2-lacY</i>							
stx2	Simplex	Dúplex	Diferencia	lacY	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,282	23,494	-0,212	1	23,099	22,821	0,279
2	23,349	23,398	-0,049	2	22,693	22,674	0,019
3	23,321	23,434	-0,113	3	23,045	22,861	0,185
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	23,317	23,442	Promedio		22,946	22,785	Promedio
	0,034	0,048	Desvesta		0,221	0,099	Desvesta
GL	3,566	Tcal	-3,668	GL	2,767	Tcal	1,152
		Tcrit	2,776			Tcrit	3,182
Dúplex <i>stx2-eaeA</i>							
stx2	Simplex	Dúplex	Diferencia	eaeA	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,282	23,321	-0,039	1	23,436	23,214	0,222
2	23,349	23,287	0,062	2	23,185	23,204	-0,018
3	23,321	23,197	0,124	3	23,331	23,133	0,198
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	23,317	23,268	Promedio		23,317	23,184	Promedio
	0,034	0,064	Desvesta		0,126	0,044	Desvesta
GL	3,017	Tcal	1,174	GL	2,485	Tcal	1,739
		Tcrit	2,776			Tcrit	3,182
Dúplex <i>stx2-stx1</i>							
stx2	Simplex	Dúplex	Diferencia	stx1	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,282	23,242	0,040	1	21,215	23,410	-2,195
2	23,349	23,131	0,218	2	23,948	23,271	0,678
3	23,321	23,130	0,192	3	23,921	23,299	0,622
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	23,317	23,168	Promedio		23,028	23,326	Promedio
	0,034	0,065	Desvesta		1,570	0,074	Desvesta
GL	3,007	Tcal	3,569	GL	2,009	Tcal	-0,329
		Tcrit	2,776			Tcrit	3,182
Dúplex <i>stx2-Z3276</i>							
stx2	Simplex	Dúplex	Diferencia	Z3276	Simplex	Dúplex	Diferencia
1	23,282	23,204	0,078	1	23,217	22,666	0,551
2	23,349	23,063	0,286	2	23,209	22,439	0,771
3	23,321	22,887	0,434	3	23,110	22,253	0,857
	3,000	3,000	n (Datos)		3,000	3,000	n (Datos)
	23,317	23,051	Promedio		23,179	22,453	Promedio
	0,034	0,159	Desvesta		0,060	0,207	Desvesta
GL	2,179	Tcal	2,843	GL	2,331	Tcal	5,844
		Tcrit	3,182			Tcrit	3,182

Anexo D: Análisis estadístico

D.1. Prueba t-student para datos emparejados

Para contrastar si n resultados emparejados se extraen de la misma población se calcula el estadístico t usando la ecuación D-1 Donde d_{prom} es el promedio de la diferencia de los datos emparejados, n es en número de parejas y s_d es la desviación estándar de las diferencias. El número de grados de libertad para este estadístico es $n - 1$. [203]

$$t = \frac{d_{prom}}{\sqrt{\frac{n}{s_d}}} \quad \text{Ecuación D-0-1}$$

Tabla D-1: Contraste t-student de cuantificación de muestras con y sin digestión enzimática

uidA	Con EcoRI	Sin EcoRI	Diferencia	lacY	Con EcoRI	Sin EcoRI	Diferencia
1	1320,80	1197,80	123,00	1	1402,96	1276,21	126,75
2	1352,51	1210,38	142,13	2	1385,90	1242,89	143,01
3	1336,66	1224,84	111,81	3	1394,43	1266,35	128,08
		Promedio	125,65			Promedio	132,61
		Desvesta	15,33			Desvesta	9,02
		Tcal	14,1950			Tcal	25,4512
		Tcrit	4,3027			Tcrit	4,3026
eaeA	Con EcoRI	Sin EcoRI	Diferencia	rfbE	Con EcoRI	Sin EcoRI	Diferencia
1	1353,87	1331,77	22,10	1	1350,17	1215,18	135,00
2	1355,16	1330,78	24,39	2	1360,90	1245,32	115,59
3	1354,52	1323,83	30,69	3	1355,54	1271,23	84,30
		Promedio	25,72			Promedio	111,63
		Desvesta	4,45			Desvesta	25,58
		Tcal	10,0195			Tcal	7,5592
		Tcrit	4,3026			Tcrit	4,3027
stx1	Con EcoRI	Sin EcoRI	Diferencia	stx2	Con EcoRI	Sin EcoRI	Diferencia
1	1342,75	1150,59	192,16	1	1487,72	1360,41	127,31
2	1377,70	1234,09	143,61	2	1452,89	1345,27	107,62
3	1360,23	1266,92	93,30	3	1470,31	1423,03	47,28
		Promedio	143,03			Promedio	94,07
		Desvesta	49,43			Desvesta	41,70
		Tcal	5,0114			Tcal	3,9073
		Tcrit	4,3027			Tcrit	4,3027

Tabla D-2: Contraste t-student de cuantificación al aumentar la concentración de primers

uidA	500 nM	800 nM	Diferencia		lacY	500 nM	800 nM	Diferencia
1	1529,92	2017,05	-487,13		1	1903,53	2253,21	-349,68
2	1747,50	1950,46	-202,96		2	2155,86	2186,85	-30,99
3	2481,08	1940,04	541,03		3	2333,37	2161,04	172,33
		Promedio	-49,68				Promedio	-69,44
		Desvesta	530,94				Desvesta	263,12
		Tcal	-0,1621				Tcal	-0,4571
		Tcrit	4,3027				Tcrit	4,3027
eaeA	500 nM	800 nM	Diferencia		rfbE	500 nM	800 nM	Diferencia
1	2460,09	2553,45	-93,36		1	2038,85	2143,49	-104,64
2	2564,47	2563,47	1,01		2	2047,17	2097,42	-50,24
3	2614,68	2618,28	-3,60		3	2249,18	2245,74	3,44
		Promedio	-31,98				Promedio	-50,48
		Desvesta	53,20				Desvesta	54,04
		Tcal	-1,0413				Tcal	-1,6180
		Tcrit	4,3027				Tcrit	4,3027
stx1	500 nM	800 nM	Diferencia		stx2	500 nM	800 nM	Diferencia
1	1960,55	2091,85	-131,30		1	1954,54	2156,62	-202,08
2	2161,14	2084,45	76,69		2	2126,75	2225,72	-98,97
3	2164,31	2133,16	31,15		3	2403,04	2279,69	123,36
		Promedio	-7,82				Promedio	-59,23
		Desvesta	109,34				Desvesta	166,32
		Tcal	-0,1239				Tcal	-0,6168
		Tcrit	4,3027				Tcrit	4,3027
Z3276	500 nM	800 nM	Diferencia					
1	2053,65	2100,75	-47,10					
2	2016,43	2141,25	-124,82					
3	2206,48	2092,50	113,98					
		Promedio	-19,31					
		Desvesta	121,80					
		Tcal	-0,2746					
		Tcrit	4,3027					

D.2. Análisis de regresión

Análisis estadístico de los residuales mediante el análisis de varianza ANOVA y análisis de falta de ajuste (tabla D-3), evalúo el grado en el que la recta se ajusta a los datos. Si el valor de F_{reg} es mayor a F_{crit} , hay linealidad en los datos, además si F_{FA} es inferior a F_{crit} el modelo lineal se ajusta a los datos. Tras el análisis de los datos para todos los genes, se encontró que el modelo de regresión lineal se ajusta a los datos en el intervalo de concentración evaluado para todos los genes.

Tabla D-3: Análisis de varianza ANOVA para regresión

Causa de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	$F_{(0.05, 1, n-2)}$
Regresión	1	$SC_{reg} = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$\frac{SC_{reg}}{GL_{reg}}$	$F_{reg} = \frac{CM_{reg}}{CM_{res}}$
Residual	n-2	$SC_{res} = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SC_{res}}{GL_{res}}$	
Falta de ajuste	k-2	$SC_{FA} = \sum_i^k n_i (\bar{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SC_{FA}}{GL_{FA}}$	$F_{FA} = \frac{CM_{FA}}{CM_{EP}}$
Error	n-k	$SC_{EP} = \sum (y_i - \bar{y}_{ij})^2$	$\frac{SC_{EP}}{GL_{EP}}$	
Total	n-1	$SCT = \sum (y_i - \bar{y})^2$		

y_i = respuesta de cada medida, \hat{y}_i = Respuesta estimada con la ecuación, \bar{y} = Respuesta promedio de todos los niveles, n= número de datos, r= número de réplicas, k= número de niveles

Tabla D-4: Análisis de regresión lineal de equivalencia simplex vs dúplex

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepción gen stx1	-18,3882	19,7114	-0,9329	0,4494	-103,1995	66,4230
Pendiente gen stx1	1,0775	0,0047	227,7385	1,928E-05	1,0572	1,0979
Intercepción gen stx2	-20,7242	27,2115	-0,7616	0,5258	-137,8060	96,3576
Pendiente gen stx2	1,0668	0,0057	187,5529	2,842E-05	1,0423	1,0913

D.3. Estimación de incertidumbre

La estimación de incertidumbre del método de medición se estimó usando un análisis de variación ANOVA a partir de los datos de cuantificación obtenidos en tres días diferentes. Las ecuaciones usadas se presentan en la tabla D-5.

Tabla D-5: Análisis de varianza ANOVA para estimación de incertidumbre

Causa de variación	Grados de libertad (GL)	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios (CM)	$F_{(0.05, 1, n-2)}$
Entre grupos	1	$SCE = \sum \frac{x_i^2}{n} - \frac{X_{prom}^2}{N}$	$CME = \frac{SCE}{GL_E}$	$F = \frac{CME}{CMD}$
Dentro grupos	n-2	$SCD = SCT - SCE$	$CMD = \frac{SCD}{GL_D}$	
Total	n-1	$SCT = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n x_{ij}^2 - \frac{X_{prom}^2}{N}$		

x_i = Promedio de cada nivel, X_{prom} = Promedio de niveles, k = número de muestras, n = número de datos.

Anexo E: Datos producción piloto

Tabla E-1. Análisis de varianza de homogeneidad entre botellas de lotes del piloto

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F _{cal}	P _(0,05)	F _{crit}
Lote 190401-10P						
Entre grupos	501	7	71.6	1.16	0.34	2.25
Dentro de los grupos	2465	40	61.6			
Total	2966	47				
Lote 190402-08P						
Entre grupos	91965676	7	13137953	1.17	0.37	2.66
Dentro de los grupos	179023138	16	11188946			
Total	270988815	23				
Resultados						

Tabla E-2. Resultados caracterización lote 190402-08P con Z3276

Día	Muestra	Resultado por días					Resultado total	
		Valor	u comb.	u rel	Promedio	u comb. Día	Promedio	u comb
1	190401-08P-26	133250	2203	1,7%	161795	1806	161117	3975
	190401-08P-42	161762	2619	1,6%				
	190401-08P-66	161827	2486	1,5%				
2	190401-08P-10	162900	2894	1,8%	162945	1775		
	190401-08P-50	164668	2462	1,5%				
	190401-08P-58	161266	2288	1,4%				
3	190401-08P-18	154070	2568	1,7%	158613	2777		
	190401-08P-34	159595	2354	1,5%				
	190401-08P-75	162174	2415	1,5%				

Tabla E-3: Resultados caracterización lote 190402-08P con *rfbE*

Día	Muestra	Resultado por días					Resultado total	
		Valor	u comb.	u rel	Promedio	u comb. Dia	Promedio	u comb.
1	190401-08P-26	141085	2166	1,5%	169427	2879	168610	3858
	190401-08P-42	171661	2526	1,5%				
	190401-08P-66	167194	2610	1,6%				
2	190401-08P-10	169707	2522	1,5%	170103	1526		
	190401-08P-50	171153	2450	1,4%				
	190401-08P-58	169449	2463	1,5%				
3	190401-08P-18	164628	2404	1,5%	166299	1702		
	190401-08P-34	159595	2354	1,5%				
	190401-08P-75	162174	2415	1,5%				

Tabla E-4: Resultados caracterización lote 190401-10P con Z3276

Día	Muestra	Resultado por días					Resultado total	
		Valor	u comb.	u rel	Promedio	u comb. Dia	Promedio	u comb.
1	190401-10P-24	160,18	6,52	4,1%	164	4	168	8
	190401-10P-51	163,79	6,29	3,8%				
	190401-10P-59	167,05	6,29	3,8%				
2	190401-10P-16	170,29	6,44	3,8%	169	4		
	190401-10P-67	171,42	6,55	3,8%				
	190401-10P-76	166,29	6,25	3,8%				
3	190401-10P-08	167,32	6,48	3,9%	171	4		
	190401-10P-32	171,96	6,44	3,7%				
	190401-10P-40	175,08	6,41	3,7%				

Tabla E-5: Resultados caracterización lote 190401-10P con *rfbE*

Día	Muestra	Resultado por días					Resultado total	
		Valor	u comb.	u rel	Promedio	u comb. Dia	Promedio	u comb.
1	190401-10P-24	177	6,44	3,6%	177	4	175	8
	190401-10P-51	181	6,74	3,7%				
	190401-10P-59	175	7,81	4,5%				
2	190401-10P-16	183	7,24	4,0%	177	6		
	190401-10P-67	170	6,32	3,7%				
	190401-10P-76	179	6,63	3,7%				
3	190401-10P-08	171	6,82	4,0%	171	4		
	190401-10P-32	171	6,46	3,8%				
	190401-10P-40	172	6,67	3,9%				

Bibliografía

- [1] Food & Drugs Administration (FDA), “Qué es una enfermedad transmitida por los alimentos.” [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/people-risk-foodborne-illness/que-es-una-enfermedad-transmitida-por-los-alimentos>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [2] Organización Mundial de la Salud (OMS), “Enfermedades de transmisión alimentaria,” 2016.
- [3] World health organization, “Foodborne Disease Burden.” [Online]. Available: https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G36/PROD/EXT/FoodborneDiseaseBurden. [Accessed: 12-Jan-2020].
- [4] S. E. Majowicz *et al.*, “Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis.,” *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 11, no. 6, pp. 447–55, 2014.
- [5] W. Gossman, A. Wasey, and P. Salen, *Escherichia Coli (E. Coli 0157: H7)*. 2019.
- [6] B. Devleeschauwer, S. M. Pires, I. Young, A. Gill, and S. E. Majowicz, “Associating sporadic, foodborne illness caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* with specific foods: A systematic review and meta-analysis of case-control studies,” *Epidemiol. Infect.*, vol. 147, 2019.
- [7] S. Wang *et al.*, “Food safety trends: from globalization of whole genome sequencing to application of new tools to prevent foodborne diseases,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 57, pp. 188–198, 2016.
- [8] D. Y. C. Fung, “Rapid methods and automation in microbiology: A review,” *Irish J. Agric. Food Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 301–307, 2000.
- [9] M. Ricchi *et al.*, “Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods,” *Front. Microbiol.*, vol. 8, no. JUN, pp. 1–15, 2017.
- [10] G. A. M. Tarr *et al.*, “Performance of commercial tests for molecular detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): A systematic review and meta-analysis protocol,” *BMJ Open*, vol. 9, no. 3, pp. 1–6, 2019.
- [11] A. Garrido, M.-J. Chapela, B. Román, P. Fajardo, J. M. Vieites, and A. G. Cabado, “In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 164, no. 1,

- pp. 92–98, 2013.
- [12] J. Cloke *et al.*, “Validation of the thermo scientific SureTect *Escherichia coli* O157:H7 real-time PCR assay for raw beef and produce matrixes,” *J. AOAC Int.*, vol. 98, no. 5, pp. 1301–1314, 2015.
- [13] I. Son, R. Binet, A. Maounounen-Laasri, A. Lin, T. S. Hammack, and J. A. Kase, “Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR,” *Food Microbiol.*, vol. 40, 2014.
- [14] B. Li, H. Liu, and W. Wang, “Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*,” pp. 1–13, 2017.
- [15] V. Barwick and S. Wood, “Achieving metrological traceability in chemical and bioanalytical measurement,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, no. 6, pp. 785–799, 2010.
- [16] L. Wang *et al.*, “Development of a Reference Standard of *Escherichia coli* DNA for Residual DNA Determination in China,” vol. 8, no. 9, pp. 1–6, 2013.
- [17] P. Van Iwaarden *et al.*, “Certification of a Reference Material of Purified Genomic DNA from *Escherichia Coli* O157 Certified Reference Material IRMM-449,” 2006.
- [18] A. S. Devonshire, R. Elasarapu, and C. A. Foy, “Applicability of RNA standards for evaluating RT-qPCR assays and platforms,” *BMC Genomics*, vol. 12, p. 10, Feb. 2011.
- [19] American Type Culture Collection (ATCC), “Certified Reference Materials (CRMs).” [Online]. Available: https://www.atcc.org/en/Standards/Standards_Programs/Certified_Reference_Materials_CRMs.aspx. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [20] P. Corbisier *et al.*, “CCQM-K86/P113.1: Relative quantification of genomic DNA fragments extracted from a biological tissue,” *Metrologia*, vol. 49, no. 1A, pp. 08002–08002, 2012.
- [21] S. Bhat and K. R. Emslie, “Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials,” *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 10, pp. 47–49, 2016.
- [22] Proexport, “Programa de transformación productiva,” *El periódico las oportunidades*, pp. 1–24, 2012.
- [23] G. G. Moy and Y. Motarjemi, *Public Health Measures: International Standards and Harmonization of Food Safety Legislation BT - Encyclopedia of Food Safety*, vol. 4. Elsevier Ltd., 2014.
- [24] INS (Instituto Nacional de Salud), “Protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos,” Bogotá D.C., 2011.
- [25] Ministerio de Salud y Protección Social, *Resolución 4393 de 1991*. Colombia, 1991, p. 3.
- [26] INVIMA, “Parametros microbiologicos de alimentos.” 2011. .
- [27] Ministerio de Seguridad en Alimentos y Fármacos, “Food Code Corea Article 5.”
- [28] C. U. Europea, *Reglamento (CE) n o 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de*

- 2005 , relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE), vol. 48. 2005, pp. 1–33.
- [29] INVIMA, “Portafolio de servicios,” 2015.
- [30] W. H. Organization, “Estimaciones de la OMS sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria,” *World Heal. Organ.*, vol. 14, p. 2, 2015.
- [31] Jaime Alberto Guerrero, “Enfermedades Transmitidas por alimentos. PROTOCOLO DE VIGILANCIA EN SALUD PUBLICA,” *Inst. Nac. Salud*, pp. 3–4, 2016.
- [32] Instituto Nacional de Salud (INS), *BES Semana epidemiológica 52 23 al 29 de Diciembre de 2018*. 2018.
- [33] Organización Mundial de la Salud (OMS), “Riesgos microbiológicos.” [Online]. Available: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/microbiological-risks/es/. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [34] A. H. Havelaar *et al.*, “World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010.”
- [35] J. B. Kaper, J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley, “Pathogenic Escherichia coli,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 123–140, 2004.
- [36] FAO, “Escherichia coli,” *Bol. enfermedades Transfront. los Anim.*, p. 39, 2011.
- [37] Foodborne disease burden epidemiology reference group, *WHO estimates of the Global Burden of Foodborne Disease*. 2015.
- [38] Y. Puig Peña, V. Leyva Castillo, N. Apórtela López, N. Campos González, Y. Frerer Marquez, and P. Soto Rodriguez, “Serogrupos y resistencia antimicrobiana de cepas de escherichia coli aisladas en alimentos procedentes de brotes de enfermedades diarreicas,” *Rev. Cuba. Aliment. y Nutr.*, vol. 2, pp. 161–172, 2014.
- [39] F. Molina, E. López-acedo, R. Tabla, I. Roa, A. Gómez, and J. E. Rebollo, “Improved detection of Escherichia coli and coliform bacteria by multiplex PCR,” ???, pp. 1–9, 2015.
- [40] J. Y. L. J. W. Y. and C. J. Hovde, “A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157,” *J Microbiol Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 5–14, 2013.
- [41] C. Farrokh *et al.*, “Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 162, no. 2, pp. 190–212, 2013.
- [42] ISO, *ISO 16649 Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive Escherichia coli*. 2001.
- [43] ISO, “ISO 16649-2 Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase-positive Escherichia coli Part 2,” 2001.
- [44] A. Camacho, M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano, and O. Velázquez, “Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico,” p. 9, 2009.

-
- [45] N. Da Silva, M. H. Taniwaki, V. C. Junqueira, N. Silveira, M. da Silda do Nascimento, and R. Romeiro Gomes, *Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual*. 2013.
- [46] ISO, *ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Escherichia coli 0157*, no. 1. 2001.
- [47] International Organization for Standardization (ISO), "ISO 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 determi." [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/53328.html>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [48] C. A. Baker, P. M. Rubinelli, S. H. Park, F. Carbonero, and S. C. Ricke, "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies," *Food Control*, vol. 59. p. 12, 2016.
- [49] S. Henson and R. Loader, "Barriers to agricultural exports from developing countries: The role of sanitary and phytosanitary requirements," *World Dev.*, vol. 29, no. 1, pp. 85–102, 2001.
- [50] European Comission, "RASFF - Food and Feed Safety Alerts - European Commission." [Online]. Available: http://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en. [Accessed: 25-Apr-2017].
- [51] L. E. Forero, "Regulación SPS de Alimentos para exportación a los Estados Unidos," 2013.
- [52] European comisión, "RASFF Portal," 2020. [Online]. Available: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [53] Ministerio de Salud y protección Social, "Resolucion 3929 de 2013 Requerimientos microbiológicos jugos." 2013.
- [54] M. Mangal, S. Bansal, S. K. Sharma, and R. K. Gupta, "Molecular Detection of Foodborne Pathogens: A Rapid and Accurate Answer to Food Safety," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 9, pp. 1568–1584, Jul. 2016.
- [55] T. Kuchta *et al.*, "A decade with nucleic acid-based microbiological methods in safety control of foods," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 263–271, 2014.
- [56] ISO, "ISO 4833-1 Horizontal method for the enumeration of microorganism," vol. 44, no. 0, 2013.
- [57] P. K. Mandal, A. K. Biswas, K. Choi, and U. K. Pal, "Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview," *American Journal of Food Technology*, vol. 6, no. 2. pp. 87–102, 2011.
- [58] G. Bou, A. Fernández-Olmos, C. García, J. A. Sáez-Nieto, and S. Valdezate, "Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*,

- vol. 29, no. 8, pp. 601–608, 2011.
- [59] G. López-Campos, J. V. Martínez-Suárez, M. Aguado-Urda, and V. López-Alonso, “Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens,” *Food, Heal. Nutr.*, pp. 13–33, 2012.
- [60] J. W.-F. Law, N.-S. Ab Mutalib, K.-G. Chan, and L.-H. Lee, “Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. January, p. 770, 2015.
- [61] R. L. Bell, K. G. Jarvis, A. R. Ottesen, M. A. Mcfarland, and E. W. Brown, “Recent and emerging innovations in Salmonella detection: A food and environmental perspective,” *Microb. Biotechnol.*, vol. 9, no. 3, pp. 279–292, 2016.
- [62] S. Bonetta *et al.*, “Detection of pathogenic *Campylobacter*, *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in wastewater by PCR assay,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 23, no. 15, pp. 15302–15309, 2016.
- [63] N. González-Escalona, E. W. Brown, and G. Zhang, “Development and evaluation of a multiplex real-time PCR (qPCR) assay targeting *ttr*RSBCA locus and *invA* gene for accurate detection of *Salmonella* spp. in fresh produce and eggs,” *Food Res. Int.*, vol. 48, no. 1, pp. 202–208, 2012.
- [64] A. Rohde *et al.*, “Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 62, pp. 113–118, 2017.
- [65] Z. P. Guan, Y. Jiang, F. Gao, L. Zhang, G. H. Zhou, and Z. J. Guan, “Rapid and simultaneous analysis of five foodborne pathogenic bacteria using multiplex PCR,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 237, no. 4, pp. 627–637, 2013.
- [66] M. Varshney, L. Yang, X.-L. Su, and Y. Li, “Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef,” *J. Food Prot.*, vol. 68, no. 9, pp. 1804–11, 2005.
- [67] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, “An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 2, pp. 232–254, 2010.
- [68] M. Pohanka, P. Skládal, and O. Pavliš, “Label-Free Piezoelectric Immunosensor for Rapid Assay of *Escherichia coli*,” *J. Immunoass. Immunochem.*, vol. 29, no. 1, pp. 70–79, 2007.
- [69] M. Vaz-Velho, G. Duarte, and P. Gibbs, “Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 40, no. 2, pp. 147–151, 2000.
- [70] D. Emerson, L. Agulto, H. Liu, and L. Liu, “Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics,” *Bioscience*, vol. 58, no. 10, p. 925, 2008.

- [71] T. C. Chiu, "Recent advances in bacteria identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using nanomaterials as affinity probes," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 7266–7280, 2014.
- [72] P.-E. Fournier, M. Drancourt, P. Colson, J.-M. Rolain, B. La Scola, and D. Raoult, "Modern clinical microbiology: new challenges and solutions," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 11, no. 8, pp. 574–585, 2013.
- [73] N. T. Salihah, M. M. Hossain, H. Lubis, and M. U. Ahmed, "Trends and advances in food analysis by real-time polymerase chain reaction," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 53, no. 5, pp. 2196–2209, 2016.
- [74] INVIMA, "Portafolio de servicios INVIMA," pp. 1–7, 2018.
- [75] T. González Flores and R. A. Rojas Herrera, "Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: Prevención y diagnóstico," *Salud Publica Mex.*, vol. 47, no. 5, pp. 388–390, 2005.
- [76] M. T. Rahman, M. S. Uddin, R. Sultana, A. Moue, and M. Setu, "Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review," *Anwer Khan Mod. Med. Coll. J.*, vol. 4, no. 1, pp. 30–36, 2013.
- [77] H. Ringuet *et al.*, "hsp65 Sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 3, pp. 852–857, 1999.
- [78] G. W. Payne, P. Vandamme, S. H. Morgan, J. J. Lipuma, and T. Coenye, "Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 71, no. 7, pp. 3917–3927, 2005.
- [79] L. Dong, Y. Meng, Z. Sui, J. Wang, L. Wu, and B. Fu, "Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material.," *Sci. Rep.*, vol. 5, 2015.
- [80] S. Dhanasekaran, T. M. Doherty, and J. Kenneth, "Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification," *J. Immunol. Methods*, vol. 354, no. 1–2, pp. 34–39, 2010.
- [81] S. Bhat and K. R. Emslie, "Digital polymerase chain reaction for characterization of DNA reference materials," *Biomol. Detect. Quantif.*, pp. 3–5, 2016.
- [82] L. Tamay de Dios, C. Ibarra, and C. Velasquillo, "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real," *Learn. Discip. ICLS 2010 Conf. Proc. - 9th Int. Conf. Learn. Sci.*, vol. 12, pp. 70–78, 2013.
- [83] M. Arya, I. S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H. R. H. Patel, "Basic principles of real-time quantitative PCR," *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 5, no. 2, pp. 209–219, 2005.
- [84] Y. Li, X. Zhou, and D. Ye, "Molecular beacons: An optimal multifunctional biological probe," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 373, no. 4, pp. 457–461, 2008.
- [85] E. Omiccioli, G. Amagliani, G. Brandi, and M. Magnani, "A new platform for Real-Time PCR

- detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk," *Food Microbiol.*, vol. 26, no. 6, pp. 615–622, 2009.
- [86] S. H. Liming and A. A. Bhagwat, "Application of a molecular beacon - Real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 95, no. 2, pp. 177–187, 2004.
- [87] S. Perelle, F. Dilasser, J. Grout, and P. Fach, "Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases," *Mol. Cell. Probes*, vol. 18, no. 3, pp. 185–192, 2004.
- [88] L. W. Noll *et al.*, "A Four-Plex Real-Time PCR Assay, Based on *rfb E*, *stx 1*, *stx 2*, and *eae* Genes, for the Detection and Quantification of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157 in Cattle Feces," *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 12, no. 9, pp. 787–794, 2015.
- [89] G. A. Leotta *et al.*, "Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga," *Rev. Argent. Microbiol.*, vol. 37, no. 1, pp. 1–10, 2005.
- [90] B. Vogelstein and K. W. Kinzler, "Digital PCR," *Genetics*, vol. 96, no. August, p. 92369241, 1999.
- [91] A. A. Morley, "Digital PCR: A brief history," *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–2, 2014.
- [92] J. F. Huggett, J. A. Garson, and A. S. Whale, "Digital PCR and Its Potential Application to Microbiology," *Mol. Microbiol. Diagnostic Princ. ans Pract.*, pp. 49–57, 2016.
- [93] M. Wang *et al.*, "Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 266, 2018.
- [94] J. F. Huggett, S. Cowen, and C. A. Foy, "Considerations for Digital PCR as an Accurate Molecular Diagnostic Tool," vol. 1, no. 61, pp. 79–88, 2015.
- [95] B. Verhaegen, K. De Reu, L. De Zutter, K. Verstraete, M. Heyndrickx, and E. Van Coillie, "Comparison of droplet digital PCR and qPCR for the quantification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine feces," *Toxins (Basel)*, vol. 8, no. 5, pp. 1–11, 2016.
- [96] R. Sanders, D. J. Mason, C. A. Foy, and J. F. Huggett, "Evaluation of Digital PCR for Absolute RNA Quantification," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, pp. 1–9, 2013.
- [97] D. G. Burke *et al.*, "Digital polymerase chain reaction measured pUC19 marker as calibrant for HPLC measurement of DNA quantity," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 3, pp. 1657–1664, 2013.
- [98] R. Sanders, J. F. Huggett, C. A. Bushell, S. Cowen, D. J. Scott, and C. A. Foy, "Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 17, pp. 6474–6484, 2011.

- [99] S. Bhat, N. Curach, T. Mostyn, G. S. Bains, K. R. Griffiths, and K. R. Emslie, "Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 17, pp. 7185–7192, 2010.
- [100] Biomerieux, "Métodos Rápidos para el Métodos Rápidos para el control Microbiológico de Alimentos," pp. 1–54, 2011.
- [101] G. Pohl and M. Shih le, "Principle and applications of digital PCR," *Expert Rev Mol Diagn*, vol. 4, no. 1, pp. 41–47, 2004.
- [102] M. Boyer and J. Combrisson, "Analytical opportunities of quantitative polymerase chain reaction in dairy microbiology," *Int. Dairy J.*, vol. 30, no. 1, pp. 45–52, 2013.
- [103] G. Agustí, M. Fittipaldi, and F. Codony, "Optimization of a Viability PCR Method for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Samples," *Curr. Microbiol.*, vol. 75, no. 6, pp. 779–785, 2018.
- [104] S. Broeders *et al.*, "Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 115–126, 2014.
- [105] J. F. Huggett, S. Cowen, and C. A. Foy, "Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool," *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 79–88, 2015.
- [106] P. Truchado, M. I. Gil, T. Kostic, and A. Allende, "Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production," *Food Control*, vol. 62, pp. 150–156, 2016.
- [107] E. T. Gensberg, M. Polt, M. Konrad-k, P. Kinner, A. Sessitsch, and T. Kostic, "Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality," *Water Res.*, vol. 67, no. 0, pp. 367–376, 2014.
- [108] B. Li, Z. Hu, and C. a Elkins, "Detection of live *Escherichia coli* O157:H7 cells by PMA-qPCR," *J. Vis. Exp.*, no. 84, p. e50967, 2014.
- [109] M. Chapela, A. Garrido-Maestu, and A. G. Cabado, "Detection of foodborne pathogens by qPCR: A practical approach for food industry applications," *Cogent Food Agric.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–19, 2015.
- [110] J. Pavšič *et al.*, "Inter-laboratory assessment of different digital PCR platforms for quantification of human cytomegalovirus DNA," *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017.
- [111] H. J. He, J. L. Almeida, S. P. Lund, C. R. Steffen, S. Choquette, and K. D. Cole, "Development of NIST standard reference material 2373: Genomic DNA standards for HER2 measurements," *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 8, pp. 1–8, 2016.
- [112] C. Floren, I. Wiedemann, B. Brenig, E. Schütz, and J. Beck, "Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR)," *Food Chem.*, vol. 173, pp. 1054–1058, 2015.
- [113] M. Milavec, K. Gruden, and Z. Jana, "Quantitative Analysis of Food and Feed Samples with

- Droplet Digital PCR," *PLoS One*, vol. 8, no. 5, 2013.
- [114] H. White *et al.*, "A certified plasmid reference material for the standardisation of BCR-ABL1 mRNA quantification by real-time quantitative PCR," *Leukemia*, vol. 29, no. 2, pp. 369–376, 2015.
- [115] C. M. Hindson *et al.*, "Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR," *Nat. Methods*, vol. 10, no. 10, pp. 1003–1005, 2013.
- [116] M. C. Kline, E. L. Romsos, and D. L. Duewer, "Evaluating Digital PCR for the Quantification of Human Genomic DNA: Accessible Amplifiable Targets," *Anal. Chem.*, p. acs.analchem.5b03692, 2016.
- [117] J. Pavšič, J. Žel, and M. Milavec, "Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 1, pp. 67–75, 2016.
- [118] L. Gerdes, A. Iwobi, U. Busch, and S. Pecoraro, "Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms," *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 7, pp. 9–20, 2016.
- [119] M. Sivaganesan, M. Varma, S. Siefiring, and R. Haugland, "Quantification of plasmid DNA standards for U.S. EPA fecal indicator bacteria qPCR methods by droplet digital PCR analysis," *J. Microbiol. Methods*, vol. 152, pp. 135–142, Sep. 2018.
- [120] D. L. Duewer, M. C. Kline, E. L. Romsos, and B. Toman, "Evaluating droplet digital PCR for the quantification of human genomic DNA: converting copies per nanoliter to nanograms nuclear DNA per microliter," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 12, 2018.
- [121] J. F. Huggett *et al.*, "The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments.," *Clin. Chem.*, vol. 59, no. 6, pp. 892–902, Jun. 2013.
- [122] T. Soejima, J. I. Minami, T. Yaeshima, and K. Iwatsuki, "An advanced PCR method for the specific detection of viable total coliform bacteria in pasteurized milk," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 95, no. 2, pp. 485–497, 2012.
- [123] A. Rompré, P. Servais, J. Baudart, M. R. De-Roubin, and P. Laurent, "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches," *J. Microbiol. Methods*, vol. 49, no. 1, pp. 31–54, 2002.
- [124] Adria Developpement, "Validation of alternative analytical methods Application in food microbiology Summary report EN ISO 16140 validation study of the DuPont™ BAX □ detection of *Salmonella* spp in meat products , egg," 2015.
- [125] M. L. Camaró-Sala, R. Martínez-García, P. Olmos-Martínez, V. Catalá-Cuenca, M. D. Ocete-Mochón, and C. Gimeno-Cardona, "Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos," *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. Monogr.*, vol. 33, no. 7, pp. e31–e36, 2015.

- [126] AFNOR, "E.coli O157 methods." [Online]. Available: <https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/e-coli-o157/>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [127] AOAC, "Official Methods of Analysis." [Online]. Available: <http://www.eoma.aoac.org/>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [128] AFNOR, "Validation of alternative analytical methods Application in food microbiology Molecular Detection Assay E. coli O157 (including H7) for the detection of *Escherichia coli* O157 (including H7) in raw beef meat, raw dairy products, raw fruits & vegetables," 2016.
- [129] ISHA, "NF VALIDATION 16140 TM AFNOR CERTIFICATION VALIDATION OF THE METHOD ADIAFOOD *Escherichia coli* O157 : H7 method (single well) For the detection of *Escherichia coli* O157 : H7 SUMMARY REPORT - SEPTEMBER 2015 – V1 Expert laboratory : ISHA 25 avenue de la Ré," 2015.
- [130] Adria Developpement, "Rapport de synthèse Reconduction de la validation EN ISO 16140 de la méthode Bax® E. coli O157:H7 MP," 2012.
- [131] Adria Developpement, "Validation study according to the EN ISO 16140 standard Summary report EN ISO 16140 validation of the DuPont™ BAX® Real-Time PCR Assay for E. coli O157 : H7 method in raw beef meats and raw vegetables," 2014.
- [132] AFNOR, "Validation of alternative analytical methods Application in food microbiology validation study of the GeneDisc® method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7-Detection of *Escherichia coli* O157:H7," 2017.
- [133] Adria Developpement, "Rapport de synthèse Validation EN ISO 16140 de la méthode Méthode iQ-Check *Escherichia coli* O157:H7," 2012.
- [134] Adria Developpement, "Summary report EN ISO 16140 validation study of the MicroSEQ® *Escherichia coli* O157 : H7 method for the detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in raw beef meats and raw vegetables," 2015.
- [135] S. Pillet *et al.*, "Comparative Evaluation of Six Commercialized Multiplex PCR Kits for the Diagnosis of Respiratory Infections," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, 2013.
- [136] P.-Y. Cheung, C. W. Chan, W. Wong, T. L. Cheung, and K. M. Kam, "Evaluation of two real-time polymerase chain reaction pathogen detection kits for *Salmonella* spp. in food," *Letts. Appl. Microbiol.*, vol. 39, no. 6, pp. 509–515, Dec. 2004.
- [137] EURACHEM, "La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos." 2016, p. 66, 2016.
- [138] JCGM (Comité Conjunto para las Guías en Metrología), *Vocabulario Internacional de Metrología*. 2008.
- [139] International Organization for Standardization, *ISO 17511 IN vitro diagnostic medical devices- Measurement of quantities in biological samples - Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials*, vol. 2005. 2006.
- [140] M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, "Harmonized guidelines for single-laboratory

- validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)," *Int. Union Pure Appl. Chem.*, vol. 74, no. 5, pp. 835–855, 2002.
- [141] S. L. R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, L. A. Konopelko, and A. V. Garmash, "EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 58, no. 2. European Federation of National Associations of Analytical Laboratories, p. 191, 2003.
- [142] BIPM, *International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. 2012.
- [143] EURACHEM and B. King, "The selection and use of reference materials," 2002.
- [144] "ISO/Guide 33:2015(en), Reference materials — Good practice in using reference materials." [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:33:ed-3:v1:en>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [145] W. R. Wolf, "History of reference materials for food and nutrition metrology: As represented in the series of BERM symposia," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 2, pp. 413–421, 2010.
- [146] Societa Italiana di Fisica, *Metrology: from Physics Fundamentals to Quality of Life*. 2017.
- [147] NIST, "Standard Reference Materials." [Online]. Available: <https://www.nist.gov/srm>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [148] "Certified Reference Materials catalogue of the JRC." [Online]. Available: <https://crm.jrc.ec.europa.eu/>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [149] WHO (World Health Organization), "WHO | International reference materials." [Online]. Available: https://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/en/. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [150] BIPM, "Database of higher-order reference materials, measurement methods/procedures and services." [Online]. Available: <https://www.bipm.org/jctlm/>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [151] L. Deprez *et al.*, "Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material," *Biomol. Detect. Quantif.*, vol. 9, pp. 29–39, 2016.
- [152] P. Van Iwaarden *et al.*, "Certification of a Reference Material of Purified Genomic DNA from Escherichia Coli O157 Certified Reference Material IRMM-449," vol. 157, no. Ed1 933.
- [153] J. R. C. JRC, *Certification of Reference Materials of Maize Seed Powder containing Genetically Modified MON 810 Maize Certified Reference Materials ERM® -BF413k*.
- [154] P. Corbisier, "CERTIFICATION REPORT A set of three plasmid DNA calibration solutions bearing a porcine-specific DNA fragment A set of three plasmid DNA calibration solutions bearing a porcine-specific DNA fragment," 2015.
- [155] P. Corbisier *et al.*, "DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 7,

- pp. 1831–1840, 2015.
- [156] Zeptomatrix Corporation, “*Escherichia coli* O157:H7; EDL933, Genomic DNA,” 2014, p. 801622.
- [157] International Organization for Standardization (ISO), “ISO/Guide 30:2015(en), Reference materials — Selected terms and definitions.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:30:ed-3:v1:en>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [158] W. A. Schmid and R. J. Lazos Martínez, “Guide to estimate the measurement uncertainty,” *Natl. Cent. Metrol. Mex.*, p. 27, 2000.
- [159] T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. Lamberty, H. G. Schimmel, A. M. H. Van Der Veen, and L. Siekmann, “Estimating the uncertainty of stability for matrix CRMs,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 370, no. 2–3, pp. 183–188, 2001.
- [160] A. M. H. Van Der Veen, T. P. J. Linsinger, H. Schimmel, A. Lamberty, and J. Pauwels, “Uncertainty calculations in the certification of reference materials 4. Characterisation and certification,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 6, no. 7, pp. 290–294, 2001.
- [161] I. O. for S. ISO, “ISO 17034:2016(es), Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:17034:ed-1:v1:es>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [162] World Health Organization, “Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards,” *WHO Tech. Rep. Ser.* 932, vol. 2, no. 932, pp. 73–131, 2006.
- [163] International Organization for Standardization (ISO), “ISO - ISO Guide 35:2017 - Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability.” [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/60281.html>. [Accessed: 13-Jan-2020].
- [164] E. D. F. Guimarães, E. C. P. Do Rego, H. C. M. Cunha, J. M. Rodrigues, J. D. F. Villar, and V. S. Da Cunha, “Homogeneity study for certification of a candidate reference material for polycyclic aromatic hydrocarbons,” *19th IMEKO World Congr. 2009*, vol. 4, pp. 2377–2381, 2009.
- [165] T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. M. H. Van Der Veen, H. Schimmel, and A. Lamberty, “Homogeneity and stability of reference materials,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 6, no. 1, pp. 20–25, Jan. 2001.
- [166] T. P. J. Linsinger, J. Pauwels, A. M. H. Van Der Veen, H. Schimmel, and A. Lamberty, “Homogeneity and stability of reference materials,” *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 6, no. 1, pp. 20–25, 2001.
- [167] A. Lamberty, H. Schimmel, and J. Pauwels, “The study of the stability of reference materials by isochronous measurements,” in *Fresenius’ Journal of Analytical Chemistry*, 1998, vol. 360, no. 3–4, pp. 359–361.

- [168] ISO Guide 35, "Reference materials -- General and statistical principles for certification." International Organization for Standardization. Geneva, Suiza, 2006.
- [169] A. B. Košir *et al.*, "Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 28, pp. 6689–6697, 2017.
- [170] J. F. Huggett *et al.*, "The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments," *Clin. Chem.*, vol. 59, no. 6, pp. 892–902, 2013.
- [171] K. Andersen and J. Merry, "Reference Materials," vol. 18, no. 6, pp. 376–383, 1999.
- [172] E. Theres, M. Polt, M. Konrad-k, P. Kinner, A. Sessitsch, and T. Kosti, "Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality," vol. 7, no. 0, pp. 367–376, 2014.
- [173] E. M. Nielsen and M. T. Andersen, "Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli by Automated 5' Nuclease PCR Assay Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli by Automated 5J Nuclease PCR Assay," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 7, pp. 2884–2893, 2003.
- [174] I. O. for S. ISO, "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," 2012. [Online]. Available: <https://www.iso.org/standard/53328.html>. [Accessed: 21-Mar-2019].
- [175] Integrated DNA technologies, "How do I use the OligoAnalyzer tool to analyze possible hairpins and dimers formed by my oligo?" [Online]. Available: <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>. [Accessed: 24-Sep-2019].
- [176] S. Das Mitrai *et al.*, "Duplex PCR for specific detection of Escherichia coli and its differentiation from other Enterobacteriaceae," *Indian J. Anim. Sci.*, vol. 85, no. 8, pp. 16–19, 2015.
- [177] K. Horakova, H. Mlejnkova, and P. Mlejnek, "Specific detection of Escherichia coli isolated from water samples using polymerase chain reaction targeting four genes: Cytochrome bd complex, lactose permease, ??-d-glucuronidase, and ??-d-galactosidase," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 105, no. 4, pp. 970–976, 2008.
- [178] B. Li and J. Chen, "Real-Time PCR Methodology for Selective Detection of Viable Escherichia coli O157 : H7 Cells by Targeting Z3276 as a Genetic," vol. 78, no. 15, pp. 5297–5304, 2012.
- [179] E. M. Nielsen and M. T. Andersen, "Detection and Characterization of Verocytotoxin-Producing Escherichia coli by Automated 5' Nuclease PCR Assay Detection and

- Characterization of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* by Automated 5J Nuclease PCR Assay," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 7, pp. 2884–2893, 2003.
- [180] E. Barbau-Piednoir, S. Bertrand, J. Mahillon, N. H. Roosens, and N. Botteldoorn, "SYBR®Green qPCR *Salmonella* detection system allowing discrimination at the genus, species and subspecies levels," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 22, pp. 9811–9824, 2013.
- [181] BIORAD, "Real-time PCR: Applications Guide," *Bio-Rad Lab.*, pp. 2–84, 2006.
- [182] V. K. Singh, R. Govindarajan, S. Naik, and A. Kumar, "The effect of hairpin structure on PCR amplification efficiency.," *Mol Biol Today*, vol. 1, no. 3, pp. 67–9, 2000.
- [183] A. Ud-Din and S. Wahid, "Relationship among *Shigella* spp. And enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation," *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 1131–1138, 2014.
- [184] Bio-Rad, "Droplet Digital™ PCR Applications guide."
- [185] Promega, "Assembly of Restriction Enzyme Digestions," 2007.
- [186] W. Liang *et al.*, "Quantification of plasmid DNA reference materials for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* based on UV, HR-ICP-MS and digital PCR," *Chem. Cent. J.*, vol. 10, no. 1, p. 55, 2016.
- [187] R. T. Hayden *et al.*, "Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 2, pp. 540–546, 2013.
- [188] M. E. Hunter, R. M. Dorazio, J. S. S. Butterfield, G. Meigs-Friend, L. G. Nico, and J. A. Ferrante, "Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence???absence surveys of environmental DNA," *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 17, no. 2, pp. 221–229, 2017.
- [189] Thermo Scientific, "T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers."
- [190] C. Villamil, "Desarrollo de herramientas de aseguramiento metrológico para la identificación y cuantificación de *Salmonella* spp. por métodos basados en PCR," Universidad Nacional de Colombia, 2019.
- [191] "ISO/Guide 31:2015(en), Reference materials — Contents of certificates, labels and accompanying documentation." [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:31:ed-3:v1:en>. [Accessed: 14-Jan-2020].
- [192] G. M.M., E. P., L. V., L. M. M., S. L. L., and A. M. L., "[Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in children from poor neighborhoods in Corrientes, Argentina]," *Rev. Cubana Med. Trop.*, vol. 62, no. 1, pp. 42–47, 2010.
- [193] A. Paton and J. Paton, "Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex Enterohemorrhagic E . coli hlyA , rfb O111 , and Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx

- 1 , stx 2 , eae,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 2, pp. 598–602, 1998.
- [194] B. China, V. Pirson, and J. Mainil, “Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 62, no. 9, pp. 3462–3465, 1996.
- [195] W. Liang *et al.*, “Quantification of plasmid DNA reference materials for Shiga toxin - producing *Escherichia coli* based on UV , HR - ICP - MS and digital PCR,” pp. 1–10, 2016.
- [196] D. R. Pollard, W. M. Johnson, H. Lior, S. D. Tyler, and K. R. Rozee, “Erratum: Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction (J. Clin. Microbiol., Volume 28, No. 3, P. 542),” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 6, p. 1491, 1990.
- [197] Y. Hu, Q. Zhang, and J. C. Meitzler, “Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157 : H7 in bovine faeces by a multiplex PCR,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 87, pp. 867–876, 1999.
- [198] V. Brusa, L. Galli, L. H. Linares, E. E. Ortega, J. P. Lirón, and G. A. Leotta, “Development and validation of two SYBR green PCR assays and a multiplex real-time PCR for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 119, pp. 10–17, 2015.
- [199] K. A. Ziebell, S. C. Read, R. P. Johnson, and C. L. Gyles, “Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins,” *Res. Microbiol.*, vol. 153, no. 5, pp. 289–300, 2002.
- [200] R. Gordillo, A. Rodríguez, M. L. Werning, E. Bermúdez, and M. Rodríguez, “Quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 in meat products by duplex real-time PCR assays.,” *Meat Sci.*, vol. 96, no. 2, pp. 964–970, 2014.
- [201] E. C. Chern, S. Siefring, J. Paar, M. Doolittle, and R. A. Haugland, “Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 52, no. 3, pp. 298–306, 2011.
- [202] E. Frahm and U. Obst, “Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus spp.* and *Escherichia coli* in water samples,” vol. 52, pp. 123–131, 2003.
- [203] J. N. Miller and J. C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4a edición. 2002.