



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POSTGRADO DE BIOTECNOLOGÍA DE MICROORGANISMOS**

www.bdigital.ula.ve

**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN INMUNOSENSOR PARA LA
DETECCIÓN DE *Escherichia coli*.**

Autor: Lcda. Nathaly A. Hernández P.

Tutor: Prof. Dr. Pedro Matheus

Mérida, Junio 2014

C.C.Reconocimiento



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POSTGRADO DE BIOTECNOLOGÍA DE MICROORGANISMOS**

www.bdigital.ula.ve

**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN INMUNOSENSOR PARA LA
DETECCIÓN DE *Escherichia coli*.**

**Memoria que presenta la Licenciada
NATHALY ANDREINA HERNÁNDEZ PIMENTEL
Para optar al grado de
Magister Scientiae en Biotecnología de Microorganismos**

**TUTOR:
Prof. Dr. Pedro Matheus**

Mérida, Junio 2014

C.C.Reconocimiento

*Ante todo agradezco a Dios, todo poderoso,
que permitió el desarrollo y la culminación de este proyecto
y me mantuvo a su lado, de su mano, empujándome a culminar esta meta.*

*A mi familia, abuelos, padres, tíos y primos
que siempre me han apoyado durante toda mi vida.
Doy cada día gracias por ser parte de esta hermosa familia
y haber nacido en ese hermoso hogar. Los Amo.*

*A mis padres, José y Ketty, por ser el eje de toda mi vida,
por no dejarme abandonar mis sueños,
por impulsarme en cada paso de mi existencia.*

*Simplemente son los Ángeles que Dios me dio para hacerme cada día feliz.
Son mi orgullo. Dios los bendiga y les dé mucha salud y vida. Los Amo.*

*A mis queridos hermanos, Oscar Alejandro y José Alberto,
por darme ejemplo de constancia y perseverancia, los amo y admiro muchísimo.*

*A mi novio, Ly, gracias por estar a mi lado en las buenas y en las malas,
darme esa perseverancia, regañarme para no abandonar
y poder culminar esta meta. Te amo demasiado.*

*A mis amigas, Euly, Ari, Fanny y Racely, quienes emprendieron junto a mi este camino y
que hoy en día todavía nos apoyamos unas a otras para culminar esta meta.*

A todos aquellos que de una u otra forma me apoyaron en la realización de esta meta.

AGRADECIMIENTO.

A mi ilustre y amada Universidad de Los Andes, por abrirme otra vez las puertas para poder formarme profesionalmente y personalmente. Simplemente un universo de posibilidades esta detrás de sus puertas.

A mi tutor, Prof. Dr. Pedro Matheus, muchas gracias por enseñarme a emprender cada día hacia la excelencia, por depositar su confianza en mí y por ser la guía en la incursión de este nuevo mundo, la electroquímica. Aprendí de usted, que solo se necesitan ideas, innovación y preparación. Muchas gracias por sus amplios conocimientos y su gran amistad.

A la profesora Yudith de Andueza, por ser ejemplo de formación y emprendimiento, y por su entera disposición y su gran apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A todos los integrantes del Laboratorio de Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, por su entera disposición al facilitar los equipos necesarios para la realización de esta tesis.

Al Postgrado de Biotecnología de Microorganismos por abrirme las puertas y darme el apoyo para poder continuar mi formación profesional.

A todas aquellas personas o instituciones que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este Trabajo de Grado.

A todos mil gracias...

DISEÑO Y PREPARACIÓN DE UN INMUNOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE *Escherichia coli*.

Autor: Lcda. Nathaly A. Hernández Pimentel.

Tutor: Prof. Dr. Pedro Matheus

Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias.

Postgrado de Biotecnología de Microorganismos. Mérida. Venezuela.

RESUMEN

La *Escherichia coli* ha sido asociada a grandes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, originando políticas de detección, control y prevención basadas en estrategias de vigilancia epidemiológica y en la implementación de técnicas rápidas, sensibles y específicas. En este trabajo se realizó la detección de *Escherichia coli* mediante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico, donde se ha elegido como material transductor un electrodo de hilo de oro con 99,99% de pureza. Adicionalmente, se utilizó como electrodo auxiliar o contraelectrodo un hilo de platino y un electrodo de referencia Ag/AgCl. En este trabajo se planteó la inmovilización del biorreceptor inmunológico (anticuerpos monoclonales específicos contra *E. coli* O 25:(K 11), O 78:(K 80), O 103:(K -), O 118:(K -), O 124:(K 72), O 145:(K -), O 157:(K -), O 164:(K -).) mediante la formación de monocapas autoensambladas de tioles sobre la superficie de oro. Se realizó la formación de la monocapa autoensamblada de tiourea sobre la superficie limpia del electrodo de oro, mediante un proceso de quimisorción oxidativa. Una vez formada la monocapa, al incubar el electrodo modificado (Au/TOU) en la solución buffer de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ a pH ligeramente ácido (6,20), los grupos amino terminales de la tiourea permitieron la unión del anticuerpo a través de los grupos COO^- del mismo, por simple atracción electrostática. Posteriormente, al agregar a la solución la cepa de *Escherichia coli*, ésta se unió al anticuerpo Anti-*E. coli*, por un proceso de afinidad específico de antígeno-anticuerpo. Los resultados obtenidos permitieron estudiar un método para la inmovilización de moléculas biológicas en superficies de oro modificadas. La inmovilización de los anticuerpos Anti-*E. coli* sobre la superficie de los electrodos de oro modificados mostro una buena efectividad para la unión, inmovilización y detección de *Escherichia coli*. **Palabras claves:** Biosensor, *Escherichia coli* y antígeno-anticuerpo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
I.-INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.HISTORIA.....	3
1.2.- ALIMENTOS Y SALUD PÚBLICA.....	4
1.3.- ESCHERICHIA COLI.....	8
1.3.1.-ESTRUCTURA DE ESCHERICHIA COLI.....	9
1.3.2.- Características Bioquímicas de <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.3.- Hábitat de <i>Escherichia coli</i>	14
1.3.4.- Estructura Antigénica de <i>Escherichia coli</i>	15
1.3.5.- Cepas de <i>Escherichia coli</i>	16
1.3.5.1.- <i>Escherichia coli enterotoxigena</i> (ETEC).....	16
1.3.5.2.- <i>Escherichia coli enteropatogena</i> (EPEC).....	17
1.3.5.3.- <i>Escherichia coli enteroinvasiva</i> (EIEC).....	18
1.3.5.4.- <i>Escherichia coli enteroagregativa</i> (EaggEC).....	18
1.3.5.5.- <i>Escherichia coli enteroadherente</i> (EAEC).....	19
1.3.5.6.- <i>Escherichia coli enterohemorrágica</i> (EHEC).....	19
1.3.6.- <i>Escherichia coli serotipo O157:H7</i>	21
1.3.6.1.- Síndromes ocasionados por <i>E. coli</i> serotipo O157:H7.....	24
1.3.6.2.-Síndrome Hemolítico Urémico (SHU).....	24
1.3.7.-Importancia de la Identificación de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en la Vigilancia Microbiológica de los Alimentos.....	27
1.4.-METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS.....	29
1.4.1.- Muestreo.....	29
1.4.2.- Transporte y Conservación de las Muestras.....	30
1.4.3.- Métodos Microbiológicos.....	31
1.4.4.- Métodos Moleculares para de la Detección de <i>E. coli</i>	34
1.5.- BIOSENSORES.....	37
1.5.1.- Características de los Biosensores.....	39
1.5.2.- Clasificación de los Biosensores.....	41
1.5.2.1.- Tipo de Interacción.....	42
1.5.2.1.1.-Interacción con Sensores Biocatalíticos.....	42
1.5.2.1.2.- Interacción con Sensores de Bioafinidad.....	42
1.5.2.2.- Detección de la Interacción.....	43
1.5.2.3.-Elemento de reconocimiento.....	43
1.5.2.3.1.-Enzimas.....	43
1.5.2.3.2.- Orgánulo, Tejido o Célula completa.....	43
1.5.2.3.3.- Anticuerpos.....	44
1.5.2.3.4.- Ácidos nucleicos.....	44
1.5.2.3.5.- PIM, PNA, Aptámero.....	45
1.5.2.4.-Sistema de Transducción.....	45
1.6.- TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN.....	51
1.6.1.-Monocapas Autoensambladas.....	53

1.7.- INMUNOSENSORES.....	54
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	60
III.- OBJETIVOS.....	61
3.1.-OBJETIVO GENERAL.	61
3.2.-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	61
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
4.1.-MICROORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO.....	62
4.2.-DISEÑO Y PREPARACIÓN DEL INMUNOSENSOR PARA LA DETECCIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	62
4.2.1.-Selección y Preparación del Transductor.	62
4.2.1.1.- Preparación de los Electrodo de oro.	63
4.2.2.-Selección del Biorreceptor Inmunológico.....	64
4.2.3.-Inmovilización del Biorreceptor inmunológico en la superficie del transductor.	64
4.2.3.1.-- Formación de monocapa de tioles (SAMs).....	65
4.2.3.2.- Inmovilización de los anticuerpos contra <i>Escherichia coli</i>	66
4.2.4-Transducción del evento de Bioreconocimiento.....	66
4.3.-MATERIALES.....	68
V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
5.1.- Preparación y Caracterización Electroquímica de los Electrodo de Oro.....	70
5.1.1.- Optimización del tiempo de burbujeo de N ₂	71
5.1.2.- Optimización de Velocidades de Barrido.....	72
5.1.3.- Afinidad de los electrodo de hilo de oro por los Anticuerpos anti - <i>E.coli</i>	74
5.1.4.- Afinidad de los electrodo de hilo de oro por <i>Escherichia coli</i>	74
5.1.5.- Afinidad de los electrodo de hilo de oro por el Anticuerpo anti- <i>E.coli</i> y la adición posterior de <i>Escherichia coli</i>	77
5.1.6.- Afinidad de los electrodo de hilo de oro por <i>Escherichia coli</i> y la adición posterior del Anticuerpo anti- <i>E.coli</i>	78
5.2.- Formación de monocapa de tioles (SAMs).....	80
5.2.1.- Modificación de la superficie de oro con Monocapas Autoensambladas de Tioles.	80
5.2.2.- Modificación de la superficie de oro con Monocapas Autoensambladas de Tioles y anticuerpos anti- <i>E.coli</i>	81
5.2.3.- Voltametrías cíclicas en solución de NaH ₂ PO ₄ /KCl 0, 1 M de electrodo de oro modificados con tiourea/anticuerpo.	83
5.2.4.- Voltametrías de pulso diferencial en solución de NaH ₂ PO ₄ /KCl 0, 1 M en electrodo de oro modificados con tiourea/Anticuerpo a diferentes valores de pH.	90
5.2.4.1.- Voltametrías de pulso diferencial a pH ligeramente Ácido.	90
5.2.4.1.2.- Estabilidad de la unión Anticuerpo-Antígeno al electrodo modificado a pH ligeramente Ácido.....	92
5.2.4.2.- Voltametrías de Pulso Diferencial a pH Neutro.	93
5.2.4.2.1- Estabilidad de la unión Anticuerpo-Antígeno al electrodo modificado a pH Neutro.....	96
5.2.4.3.- Voltametrías de Pulso Diferencial a pH ligeramente Alcalino.	97
5.2.4.3.1- Estabilidad de la unión Anticuerpo-Antígeno al electrodo modificado a pH Alcalino.	99
5.2.5.- Variaciones de la Intensidad de Corriente a diferentes pH.	100
5.2.6.- Estabilidad de la Inmovilización del Inmunocomplejo a diferentes pH.	101
5.2.7.- Relación entre la Intensidad de Corriente y la concentración de <i>Escherichia coli</i> a pH 6,02.....	102
5.2.8.- Mecanismo de Inmovilización del Inmunocomplejo.	103
5.3.- Aplicaciones del Biosensor (Au/TOU/Ac).....	104
5.3.1- Especificidad de la Unión Anticuerpo-Antígeno.....	106
VI. CONCLUSIONES.....	108
VII.- BIBLIOHEMEROGRAFIA.....	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos epidemiológicos sobre las enfermedades transmitidas por alimentos y sus principales agentes etiológicos.....	6
Tabla 2. Principales áreas de aplicación de los biosensores dentro del campo agroalimentario.....	39
Tabla 3. Criterios de Clasificación de los Biosensores.....	41
Tabla 4. Técnicas de inmovilización más comunes en la fabricación de biosensores.....	52
Tabla 5. Biosensores para la detección de Patógenos de origen bacteriano.....	58

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Célula Bacteriana.....	11
Figura 2. Estructura de Peptidoglicano de <i>Escherichia coli</i>	12
Figura 3. Estructura Antigénica de <i>Escherichia coli</i>	15
Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	36
Figura 5. Función triangular potencial-tiempo.....	47
Figura 6. Respuesta de la Voltametría Cíclica.....	49
Figura 7. Señal de excitación en pulsos de potencial en función del tiempo.....	50
Figura 8. Respuesta electroquímica de la Voltametría de Pulso Diferencial.....	51
Figura 9. Estructura general de un anticuerpo.....	55
Figura 10. Esquema de Preparación de la Superficie de Oro.....	63
Figura 11. Formación de una monocapa de tiourea. (SAM/TOU).....	65
Figura 12. Inmovilización de los anticuerpos contra <i>Escherichia coli</i>	66
Figura 13. Esquema metodológico para la fabricación de un Inmunosensor para la detección de <i>Escherichia coli</i>	67
Figura 14. Voltamograma cíclico en H ₂ SO ₄ M de un electrodo de hilo de oro. Ventana de potencial +0,4 a +1,4 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N ₂	70
Figura 15. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) sin burbujeo de N ₂ , (b) 10 min.de burbujeo de N ₂ , (c) 15 min.de burbujeo de N ₂ y (d)	

20 min.de burbujeo de N₂. Ventana de potencial – 1,0 a +1,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s.....71

Figura 16. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) 20 mV/s., (b) 50 mV/s. y (c) 100 mV/s. Ventana de potencial desde – 1,0 hasta +1,0 V vs Ag/AgCl. Atmósfera de N₂.....72

Figura 17. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio, (b) oro limpio más 200 µL de Anticuerpo, (c) oro limpio más 500 µL de Anticuerpo y (d) oro limpio más 1000 µL de Anticuerpo. Ventana de potencial – 1,0 a +1,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N₂.....74

Figura 18. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio, (b) oro limpio mas *Escherichia coli* ($6,95 \times 10^{-4}$ g/mL), (c) oro limpio más *Escherichia coli* ($14,6 \times 10^{-4}$ g/mL), y (d) oro limpio más *Escherichia coli* ($22,1 \times 10^{-4}$ g/mL). Ventana de potencial desde -1,25 hasta 0,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N₂.....75

Figura 19. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M en ventana de potencial desde -1,0 a 1,0 V. vs Ag/AgCl. Para (a) voltamograma de oro limpio, (b) oro limpio agregando 1 mL de disolución de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) oro limpio agregando 2 mL de disolución de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL) y (d) oro limpio agregando 3 mL de disolución de *E. coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N₂.....76

Figura 20. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio con 1000 µL de anticuerpo, (b) oro limpio con 1000 µL de anticuerpo agregando 1mL de disolución de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) oro limpio con 1000 µL de anticuerpo agregando 2 mL de disolución de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) oro limpio con 1000 µL de anticuerpo agregando 3mL de disolución de *E. coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), y (e) oro limpio con 1000 µL de anticuerpo agregando 4mL de disolución de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) Ventana de potencial – 1,0 a +1,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N₂.....78

Figura 21. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (b) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 200 μ L de anticuerpo, (c) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 400 μ L de anticuerpo y (d) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 600 μ L de anticuerpo. Ventana de potencial $-1,0$ a $+1,0$ V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_279

Figura 22. Voltamograma cíclico de desorción en KOH 0,5 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea (Au/TOU). (a) primer barrido, (b) cuarto barrido. Velocidad de barrido 100mV/s. Atmósfera de N_281

Figura 23. Voltamograma cíclico en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro/ tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/Ac 1 hora, c) Au/TOU/Ac 2 horas, y d) Au/TOU/Ac 4 horas. Ventana de potencial desde $-1,2$ a $0,0$ V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 50 mV/s. Atmósfera de N_282

Figura 24. Protocolo A.....83

Figura 25. Protocolo B.....84

Figura 26. Protocolo C.....85

Figura 27. Protocolo A. Voltamograma cíclico en NaH_2PO_4 / KCl 0,1 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ NaH_2PO_4 /KCl/Ac durante 1 hora, c) Au/TOU/ NaH_2PO_4 /KCl/Ac durante 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), d) Au/TOU/ NaH_2PO_4 /KCl/Ac durante 1 hora agregando 2 mL de *E.coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), y e) Au/TOU/ NaH_2PO_4 /KCl/Ac durante 1 hora agregando 3mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde $+0,136$ a $+0,936$ V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_287

Figura 28. Protocolo B. Voltamograma cíclico en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora, c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora agregando 2 mL de *E.coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), y e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora agregando 4 mL de *E.coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde + 0,153 a + 0,953 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_288

Figura 29. Protocolo C. Voltamograma cíclico en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 1 hora mas Ac. 1 hora, c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 1 hora mas Ac 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL) y d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 1 hora mas Ac 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde + 0,048 a + 1,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_289

Figura 30. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,20. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL), y (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5 mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_291

Figura 31. Mecanismo a pH ligeramente ácido.....92

Figura 32. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,20. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (Primer barrido), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (segundo barrido) (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5$

$\times 10^9$ UFC/mL) (tercer barrido) y (g) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (cuarto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_293

Figura 33. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 7,00. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) y (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5 mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Ventana de potencial desde - 0,60 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_294

Figura 34. Mecanismo a pH neutro.....95

Figura 35. Mecanismo de inmovilización del inmunocomplejo anticuerpo-antígeno a pH neutro posterior a la saturación con *Escherichia coli*.....95

Figura 36. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 7,00. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (segundo barrido), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (tercer barrido) (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (cuarto barrido) y (g) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (quinto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_296

Figura 37. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 8,04. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL)y (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$

1 hora agregando 5 mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_297

Figura 38. Mecanismo a pH ligeramente alcalino.....98

Figura 39. Mecanismo de inmovilización del inmunocomplejo anticuerpo-antígeno a pH ligeramente Alcalino posterior a la saturación con *Escherichia coli*.....98

Figura 40. Voltametrías de pulso diferencial en NaH_2PO_4/KCl 0,1 M pH 8,04. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora, (c) línea discontinua Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (segundo barrido), (e) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora//5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (tercer barrido) (f) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (cuarto barrido) y (g) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (quinto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_299

Figura 41. Intensidad de Corriente vs pH en un electrodo de Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/1mL de *E.coli*.....100

Figura 42. Intensidad de Corriente vs pH en un electrodo de Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/5 mL de *E.coli*.....101

Figura 43. Intensidad de Corriente vs pH en un electrodo de Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora/5 mL de *E.coli* después de cuatro barridos consecutivos.....102

Figura 44. Intensidad de Corriente vs volumen de *Escherichia coli* en un electrodo de Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora a pH 6,02.....103

Figura 45. Voltametrías de pulso diferencial en NaH_2PO_4/KCl 0,1 M pH 6,20. Para: (a) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora, (b) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora agregando 5mL de Agua de chorro, (c) Au/TOU/ $NaH_2PO_4/KCl/Ac$ 1 hora agregando 10mL de Agua de

chorro d) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 15mL de Agua de chorro. Ventana de potencial desde -0,5 hasta +0,75 V. Atmósfera de N₂.....105

Figura 46. Voltametrías de pulso diferencial en NaH₂PO₄/KCl 0,1 M pH 6,20. Para: (a) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora, (b) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 5mL de Agua de río, (c) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 10mL de Agua de río, d) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 15mL de Agua de río. Ventana de potencial desde -0,5 hasta +0,75 V. Atmósfera de N₂.....106

Figura 47. Voltametrías de pulso diferencial en NaH₂PO₄/KCl 0,1 M pH 6,2. Para: (a) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora, (b) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 1mL de *Klebsiella pneumoneae* (3,0 x10⁸ UFC/mL), (c) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 2mL de *Klebsiella pneumoneae* (6,0 x10⁸ UFC/mL) d) Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora agregando 3mL de *Klebsiella pneumoneae* (9,0 x10⁸ UFC/mL). Ventana de potencial desde -0,5 hasta +0,75 V. Atmósfera de N₂107

www.bdigital.ula.ve

I.-INTRODUCCIÓN

1.1.- Historia

La innovación y el desarrollo de la industria agroalimentaria se basa en dos ejes fundamentales, la seguridad y la calidad de los alimentos. En este ámbito, factores tales como la legislación sobre seguridad alimentaria unida al énfasis en los nuevos sistemas de aseguramiento de la calidad y a la protección del medio ambiente, han desencadenado un crecimiento de la demanda de sistemas de monitorización y control de materias primas, procesos y productos finales (González y col., 2005).

En consecuencia, se ha originado la necesidad de desarrollar e implantar sistemas de control encaminados a aumentar la seguridad y la calidad de los alimentos y a mejorar los sistemas de trazabilidad, los cuales deben priorizar el desarrollo de métodos de detección, análisis y diagnóstico que sean rápidos, de alta sensibilidad y que permitan rastreos automatizados para un amplio espectro de agentes que amenazan la inocuidad de los alimentos (González y col., 2005).

En este aspecto, en 1920, se inició la garantía o aseguramiento de la calidad de los alimentos, inicialmente de la leche y de los productos lácteos y más tarde de otros alimentos. Este inicio, se basó en la aplicación de sistemas que evitaran la ingestión de alimentos con elementos tóxicos (arsénico, mercurio y plomo) y que permitieran controlar su valor nutritivo detectando la adición de materias no nutritivas. Dicho sistema se llevó a cabo mediante el control en el suministro y retiro de alimentos en los puntos de venta. Sin embargo, este sistema falló al aplicarlo en la microbiología de los alimentos, debido a las diferencias entre la química de éstos y la microbiología, y al carácter dinámico de las poblaciones microbianas en los alimentos (Jay, J., 1994).

Por tanto, se deduce que el inicio del análisis químico de los alimentos se remonta a principios del siglo diecinueve, sin embargo, los métodos selectivo-diagnósticos que son necesarios en el control microbiológico de los alimentos, fueron copiados de la microbiología clínica, aproximadamente en 1960 (Jay, J., 1994).

En este aspecto, la Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas de los Alimentos (ICMSF) creada en 1962 en el seno de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología (IAMS), nace como respuesta a la necesidad internacional de establecer criterios adecuados sobre límites microbiológicos para los alimentos, con el fin de la protección de la salud pública y comercialización internacional de estos mismos. Por tanto, el objetivo de ICMSF fue determinar mediante análisis comparativos detallados los métodos más eficaces para la identificación y recuento de bacterias indicadoras y causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS); patologías definidas, en términos generales, como afecciones de aparición esporádica y evolución rápida, generalmente de naturaleza entérica adquiridas por el consumo de alimentos y/o agua contaminada por microorganismos y/o sus metabolitos (Jay, J., 1994).

Estos antecedentes dieron punto de partida a diversos estudios ecológicos realizados a partir de 1970, lo cuales proporcionaron información acerca de la flora microbiana generalmente asociada con las materias primas, el impacto del tratamiento en éstas, la formulación o fabricación del producto y el almacenamiento. Estos datos proporcionados permiten realizar el “Análisis de Riesgos o de Peligros e Identificación y Control de los Puntos Críticos (ARICPC)”, el cual se basa en la predicción de los peligros probables asociados con el producto e identificar los focos posibles de contaminación o crecimiento microbianos, con el fin de adoptar las medidas correctivas apropiadas (Jay, J., 1994).

1.2.- Alimentos y Salud Pública.

A pesar del inicio de los análisis microbiológicos en los años 60 y todos los avances en el control en la industria agroalimentaria de los años 70, los alcances en la prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos no han sido significativos, incluso hasta la actualidad. Esto se debe principalmente, a la falta de atención a la higiene lo que origina la recontaminación de los productos inicialmente seguros, anulando todas las intervenciones previas para fabricar y preparar el consumo de alimentos salubres (Jay, J.,1994).

No obstante, la falta de progreso en la prevención de las enfermedades transmitidas por los alimentos no debe interpretarse en el sentido de que las industrias, las administraciones sanitarias y los organismos internacionales no se hayan esforzado en la tarea común de

conseguir un suministro de alimentos seguros o inocuos. Al respecto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en enero del año 2000, adoptó una resolución sobre la seguridad o inocuidad de los alimentos y su importancia en la salud pública, sin embargo no solo esas medidas son suficientes. Este hecho es corroborado al observar los continuos e importantes brotes de infecciones e intoxicaciones transmitidas por alimentos en la actualidad (Jay, J., 1994).

La incidencia real de las enfermedades de etiología microbiana transmitidas por alimentos se desconoce en gran parte. La principal razón radica en la declaración insuficiente de las enfermedades infecciosas en general y de los brotes y casos transmitidos por alimentos, en particular, a las autoridades de salud pública. En este aspecto, se calcula que solo figuran en las estadísticas oficiales entre 1 y 5% de los casos, mientras que los brotes que afectan únicamente a algunos miembros de la familia y los casos individuales permanecen sin declarar (Jay, J., 1994).

Por consiguiente, la deficiencia en los datos epidemiológicos sobre las enfermedades transmitidas por los alimentos se debe a que pocas veces se identifica el alimento responsable. Este hecho no debe sorprender, debido que a menudo, ni siquiera se tiene en cuenta el papel etiológico de los alimentos. Adicionalmente, cuando se trata de un grupo de pacientes relacionados con el consumo de un determinado alimento, generalmente resulta imposible confirmar esta sospecha, sino quedan restos del alimento que puedan ser analizados o si éste ha sido expuesto a una contaminación probable (alimentos arrojados a la basura), u otras condiciones que hayan modificado considerablemente la estructura de su comunidad microbiana (Jay, J., 1994).

En conclusión, la considerable falta de declaración oficial y la escasez de datos epidemiológicos confiables, han dado origen a una serie de datos falsos sobre los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos que pueden variar considerablemente entre los diferentes países y culturas. Esto no resulta sorprendente debido a que la elección del menú y los hábitos alimenticios varían notablemente en los distintos países (Jay, J., 1994).

A pesar de todas estas dificultades planteadas, se han podido identificar los principales agentes etiológicos relacionados con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. En

la Tabla 1 se presentan algunos datos epidemiológicos sobre las enfermedades transmitidas por alimentos y sus principales agentes etiológicos.

Tabla 1. Datos epidemiológicos sobre las enfermedades transmitidas por alimentos y sus principales agentes etiológicos.

Tipo de Alimento	Microorganismo	Lugar y Año	Referencias
Ganado bovino.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Venezuela, 2007.	Narváez, C. y col., 2009.
Carne picada y hamburguesas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Argentina, 2007.	Roldán, M. y col., 2007
Carne Fresca y Hamburguesas congeladas.	<i>E. coli</i> O157:H7	Argentina, 2003 -2004.	Marzocca, M. y col., 2006
Cremas de leche no pasteurizadas	<i>Salmonella spp.</i> , Bacterias Aerobias Mesófilas, mohos y levaduras.	Venezuela, 2003.	Luigi-Sandoval, T. y col., 2005
Productos cárnicos cocidos (salami, mortadela, jamón y salchicha), crudos (hamburguesa), madurados (salchichón) y otros comercialmente estériles	Aerobios mesófilos, levaduras, mohos , coliformes fecales, <i>Staphylococcus aureus</i> (0,90%), <i>Salmonella sp.</i> (0,51%), <i>Escherichia coli</i> (0,26%), <i>Bacillus cereus</i> (0,26%) y <i>Clostridium perfringens</i>	Venezuela, 1990-2000.	Zea, Z., y col. 2004
Carnes, quesos, fiambres y emparedados, postres, helados y platos calientes.	<i>Salmonella spp</i> (38%), <i>Trichinella spiralis</i> (15%), <i>Escherichia coli</i> (13%) y <i>Staphylococcus aureus</i> (15%)	Argentina, 1993-2001.	Di Pietro, S. y col., 2004.

Continúa.....

Continuación....

Tipo de Alimento	Microorganismo	Lugar y Año	Autores
Leche no pasteurizada, pollo.	<i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella spp.</i>	Costa Rica, 2003.	Reuben, A. y col., 2003
Platos calientes, Queso de cabra, pescados, carne de aves, mayonesa, salsas, cecinas, mariscos, carne de cerdo, carne de bovino, quesos en general.	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. coli</i> enterohemorrágico, <i>E. coli</i> enteropatógeno, <i>Trichinella spiralis</i> , <i>Blastocystis hominis</i>	Chile, 1999-2000.	Valeria, J. y col., 2002.
Vegetales crudos y cocidos, carnes de res y cerdo, aves, pescados y postres	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (15%)	Venezuela, 2000.	Curtis, M. y col., 2000
Pescado	Coliformes fecales (CF) y <i>E. coli</i> .	Venezuela 1994 – 1995.	Villalobos, L. y col., 2000.
Salsas, huevos, mayonesas, carne y charcuteria.	<i>Salmonella enteritidis</i>	Brasil, 1993 – 1997.	Peresi, J. y col., 1998.
Pescado, Cerdo, Aves, Res, Dulces de Crema, Agua.	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonellas</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Shigellas</i> , <i>E. histolytica</i>	Cuba, 1980 – 1994.	Rodríguez, M. y col., 1996.

En concordancia con los datos epidemiológicos descritos anteriormente, entre los principales y mas frecuentes agentes etiológicos se encuentran los de origen bacteriano, donde se destacan por su frecuencia las diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Staphylococcus aureus*, entre otros (Vidal, M. y col., 2002).

1.3.- *Escherichia coli*

La Organización Mundial de la Salud ha identificado a la *Escherichia coli*, como el mayor microorganismo de interés por su gran capacidad como patógeno y supervivencia bajo condiciones adversas, razones por lo que se ha establecido un programa continuo de vigilancia sanitaria, específicamente en enfermedades transmitidas por alimentos. *Escherichia coli* es una bacteria de la flora habitual del intestino y representa uno de los microorganismos mas importantes en el humano, debido a que agrupa una gran variedad de cepas que causan padecimientos extraintestinales e intrainestinales (Gutiérrez, M., 2005 ; Koneman, E. y col., 1992).

El descubrimiento de *Escherichia coli* se remonta al año de 1885, cuando Theodore Escherich, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919, Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli*. La mayoría de las cepas de esta especie son habitantes normales del intestino, aunque, a finales del siglo pasado, se comenzó a sospechar que algunas de estas cepas eran patógenas entéricas, particularmente en niños (Donnenberg, M., 2002; Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

Para 1950, se comprobó esta hipótesis y en el año 1988 estas cepas enteropatógenas se agruparon en el denominado grupo *Escherichia coli enterovirulento* (EVEC), que no solo afectaba a bebés y niños de corta edad, sino que también los adultos padecían con frecuencia síndromes diarreicos originados por estas cepas. *Escherichia coli* es la especie de enterobacterias más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran todos los tejidos y órganos (Donnenberg, M., 2002; Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

De acuerdo a su morfología, *Escherichia coli* es un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia*, dentro de este género existen diversas especies entre ellas *E. coli*, *E. hermanni*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. blattae*. Sin embargo, *Escherichia coli*, es la de mayor significancia clínica. Esta bacteria se caracteriza por ser Gram negativa, oxidasa negativa, cilíndrica con 1,1 a 1,5 μm de diámetro y 2,0 a 6,0 μm de largo, la cual en diversas tinciones se dispone de forma aislada o en parejas (Blanco, J. y col., 2002)

1.3.1.-Estructura de *Escherichia coli*

Todos los serogrupos de *Escherichia coli* son bacterias Gram negativas, reconocidas así por no adquirir el colorante cristal violeta de la tinción de Gram y colorearse en un tono rojo o rosado intenso. La coloración que adoptan estas bacterias se debe a características en su morfología. Las bacterias gram positivas y gram negativas poseen estructuras internas similares, en líneas generales, una célula bacteriana internamente está constituida por ADN cromosómico, ARNm, ribosomas, proteínas y metabolitos. El ADN cromosómico o cromosoma bacteriano consiste en una única molécula circular de doble cadena que se encuentra libremente ubicada en una región nuclear o nucleoide, es decir, no posee una membrana nuclear y no está contenido en un núcleo definido, por tanto carece de histonas para mantener la conformación del ADN y no forma nucleosomas, característica que las diferencia de las células eucariotas (Gutiérrez, M., 2005).

La ausencia de la membrana nuclear, característica principal de las células procariotas, simplifica los mecanismos de síntesis de proteínas, debido a que los procesos de transcripción y transducción del ADN están acoplados, es decir, el ADN es transcrito a ARNm, el cual se fija a los ribosomas (organelos encargados de transducción del ARNm a proteínas, con una subunidad 30S y otra de 50S), dando origen a la formación de proteínas, al mismo tiempo que se transcribe el ARNm aún unido al ADN cromosómico. El citoplasma de *E. coli* contiene aproximadamente 15.000 ribosomas y cientos de copias de las diferentes enzimas necesarias para realizar sus procesos metabólicos (Gutiérrez, M., 2005; Laguna, J. y col., 2002).

Dentro de la célula bacteriana, además del ADN en el nucleoide, pueden encontrarse unas estructuras formadas por ADN extracromosómico de forma circular, llamados plásmidos.

Los plasmidos son fragmentos de ADN que parecen no ser esenciales a la vida celular, aunque le confieren a la bacteria resistencia a algunos antibióticos y han resultado de gran utilidad para la investigación y manipulación genética (Gutiérrez, M., 2005).

Otra de las estructuras resaltantes de la célula bacteriana es su membrana plasmática o citoplasmática, cuya composición aproximada es 50% de proteínas y 50% de lípidos. Esta consiste en una estructura de doble capa lipídica que proporciona forma, transporte y producción de energía a la célula bacteriana. En el caso de los procariotas, la respiración celular necesaria para la producción de ATP, es realizada a nivel de la membrana citoplasmática. De igual forma, la captación de nutrientes y metabolitos y la liberación de iones o sustancias de excreción se realiza a través de esta estructura (Gutiérrez, M., 2005; Laguna, J. y col., 2002).

En relación a los constituyentes externos de la célula bacteriana, la pared celular es la principal estructura que diferencia a las bacterias gram positivas de las gram negativas. Las paredes celulares de las células gram negativas, como *E. coli*, son estructural y químicamente más complejas que las de las células gram positivas. Una pared gram negativa esta constituida por dos capas externas a la membrana citoplasmática. Una primera capa conformada por peptidoglicano (carbohidratos ligados con aminoácidos), que representa entre el 5 y el 10% del peso de la pared celular, y se encuentra inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática dentro de una zona denominada espacio periplásmico (Universidad Nacional del Nordeste., 2008; Gutiérrez, M., 2005) En la figura 1 se observa la estructura de una célula bacteriana.

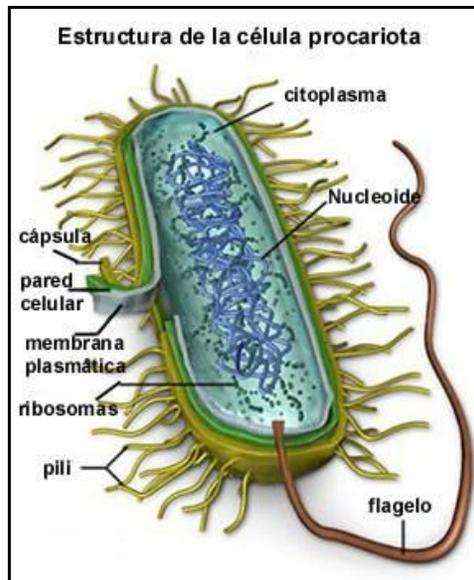


Figura 1. Estructura de la Célula Bacteriana.

Fuente: <http://www.bioapuntes.cl/apuntes/images/celprocariota.jpeg>

El peptidoglicano es una malla rígida formada por polisacáridos unidos mediante péptidos. El polisacárido de la capa peptidoglicano está conformado por repetición de disacáridos de N- acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. El N-acetilmurámico se encuentra fijado a un tetrapéptido, que se caracteriza por contener aminoácidos en forma D y L, donde los dos primeros aminoácidos van unidos al ácido N-acetilmurámico y pueden variar dependiendo de la especie del microorganismo. En la tercera posición se encuentran aminoácidos tipo diamino, que son esenciales para el entrecruzamiento de la cadena de peptidoglicano, entre éstos pueden nombrarse la lisina, el ácido diaminopimélico y el ácido diaminobutírico. El entrecruzamiento con el péptido se forma entre la amina libre del aminoácido tipo diamino que se encuentra en la tercera posición y la D- alanina que se encuentra en la cuarta posición de otra cadena. El peptidoglicano en las bacterias gram negativas conforma una sola capa, y su rigidez esta determinada por el número de entrecruzamientos y la longitud de éstos (Murray, P., 2002). En la figura 2 se observa la estructura de un peptidoglicano de *Escherichia coli*.

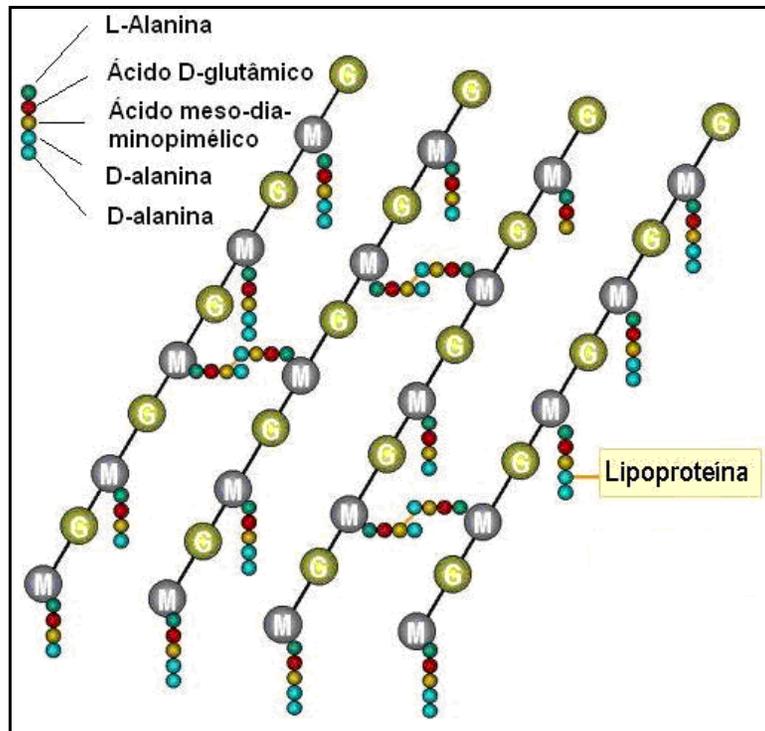


Figura 2. Estructura de Peptidoglicano de *Escherichia coli*

Fuente: <http://www.google.com/imgres?imgurl=http://pathmicro.med.sc.edu>

Inmediatamente, a la capa de peptidoglicano se encuentra la membrana externa, esta es una estructura que le proporciona forma a la célula bacteriana y constituye una barrera impermeable de moléculas de gran tamaño y moléculas hidrófobas. Esta estructura es característica de las bacterias gram negativas, y les ofrece protección frente a condiciones adversas como la acción de enzimas líticas (lisozimas), la resistencia a pH bajos, evidenciada en especies de Enterobacterias que resisten el pH gástrico y la evasión de mecanismos inmunológicos del huésped (Murray, P., 2002).

La membrana externa es una conformación asimétrica de bicapas lipídicas, esta estructura está constituida por dos zonas. La zona interna está formada por fosfolípidos que se encuentran normalmente en todas las membranas bacterianas. Sin embargo, la zona externa, le proporciona a la membrana externa una singularidad, debido a que está conformada en su mayoría por una molécula anfipática denominada lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. El lipopolisacárido se caracteriza por poseer terminaciones hidrofóbicas e hidrofílicas, de allí

su carácter anfipático, que le permite ser un potente estimulador de las respuestas inmunológicas del huésped (Murray, P., 2002).

Además del LPS de las bacterias gram negativas, existen una serie de proteínas que conforman la membrana externa de estas bacterias, entre éstas se encuentran las porinas, proteínas que permiten la difusión de moléculas hidrofílicas de menos de 700 Da de peso y antibióticos hidrofílicos de pequeño tamaño, sin embargo, estas proteínas impiden el paso de antibióticos hidrofóbicos, antibióticos de gran tamaño y lisozimas que afecten la célula bacteriana. Adicionalmente, existen otras proteínas constituyentes de la membrana externa que actúan como proteínas estructurales o moléculas receptoras para ligandos y bacteriófagos (Murray, P., 2002; Laguna, J. y col., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

Adicionalmente, la membrana externa se encuentra unida entre los fosfatos de las moléculas de lipopolisacáridos mediante enlaces catiónicos divalentes (Mg^{+2} y Ca^{+2}) y mediante interacciones hidrófobas entre las proteínas y el lipopolisacárido. Todas estas interacciones le producen a la membrana características como rigidez y fuerza. Sin embargo, la acción de algunos antibióticos (polimixina) y la quelación con ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) mediante la eliminación de los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} puede ocasionar la ruptura de la membrana, lo cual debilita a la célula bacteriana y favorece la penetración de agentes bactericidas (antibióticos y enzimas líticas) (Murray, P., 2002; Laguna, J. y col., 2002).

1.3.2.- Características Bioquímicas de *Escherichia coli*.

En cuanto a las características bioquímicas que distinguen *E. coli* de las demás especies del género *Escherichia* se pueden mencionar su capacidad de producción de indol, reacción negativa para el citrato de Simmons, producción de lisina descarboxilasa, y fermentación de glucosa, lactosa y D-manitol, características y pruebas claves que se utilizan como métodos para su identificación microbiológica en el laboratorio (Scheutz y col., 2005)

1.3.3.- Hábitat de *Escherichia coli*.

En relación a su hábitat, *E. coli* es una de las especie predominantes de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastro-intestinal de los animales de sangre caliente y se elimina por las heces al exterior. Por tanto, debido a su presencia regular en el intestino y en las heces, *E. coli* es utilizada como indicador de contaminación fecal en los alimentos y el agua, en los cuales es capaz de sobrevivir sólo algunos días, lo cual indica contaminación reciente (Todar y col., 2008; Blanco y col., 2002).

En el ser humano, el intestino es colonizado por *Escherichia coli* en las primeras 40 horas después del nacimiento, debido a la ingestión de la bacteria mediante agua y/o alimentos u obtenida directamente de otros individuos en contacto con el recién-nacido. Una vez dentro del organismo, la bacteria se adhiere al moco que recubre el intestino grueso, se establece y persiste indefinidamente. En general, la mayoría de las cepas intestinales de *E. coli* no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores que lo protegen de la invasión por microorganismos patógenos (Todar y col., 2008; Prescott y col., 2002)

La interacción entre el microorganismo y el hospedador, permite clasificar las cepas de *E. coli* como comensales avirulentos, patógenos oportunistas o patógenos altamente especializados. Las cepas patógenas de *E. coli* a su vez son frecuentemente clasificadas en patotipos de acuerdo con el tipo de enfermedad que causan y el conjunto de factores de virulencia que poseen (Sousa y col., 2006)

Algunas cepas son capaces de causar enfermedades entéricas y diversos tipos de infecciones extraintestinales en humanos y animales. Diversos autores han reportado a *Escherichia coli* como involucrada en sepsis gram negativa, bacteremias o septicemias, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares, shock inducido por endotoxinas, infecciones de tracto urinario, neumonía en pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos, meningitis en neonatos, gastroenteritis y otras patologías (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col.,1992).

1.3.4.- Estructura Antigénica de *Escherichia coli*

Los diversos patotipos de *E. coli* tienden a ser grupos clonales de cepas que son caracterizados por compartir determinados tipos de antígenos. En cuanto a la estructura antigénica de *E. coli*, existen cuatro antígenos: el antígeno H (flagelar), el antígeno K (capsular), el antígeno O constituido por el lipopolisacárido (LPS) (somático) y el antígeno F (fimbrias/pili). De estos antígenos existen múltiples variantes, que sirven para identificar las diferentes cepas mediante su definición antigénica. En la actualidad, se conocen 167 antígenos O, 103 antígenos K, 75 antígenos H y alrededor de 12 antígenos F (Kaper y col., 2004)

Los patotipos a su vez se pueden clasificar en serogrupos y serotipos. Siendo los serogrupos, un conjunto de cepas que comparten una variedad antigénica teniendo en cuenta sólo los antígenos O (lipopolisacáridos); y por otro lado los serotipos, un conjunto de cepas definidas por la combinación de los antígenos O (lipopolisacáridos) y H (antígeno flagelar) y en ocasiones por el antígeno capsular o K (Kaper y col., 2004) En la figura 3 se muestra la estructura antigénica de *Escherichia coli*.

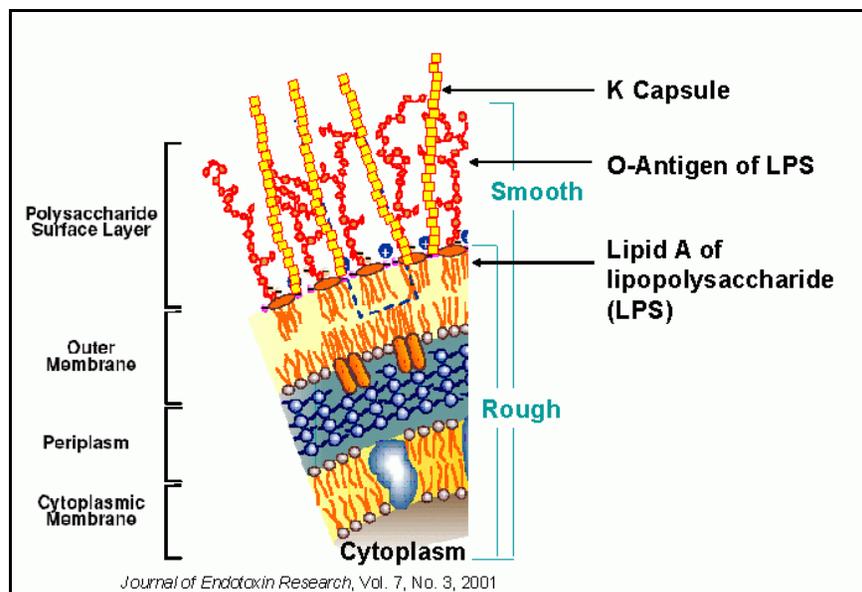


Figura 3. Estructura Antigénica de *Escherichia coli*

Fuente: Journal of Endotoxin Research., 2001.

1.3.5.- Cepas de *Escherichia coli*

En relación a enfermedades como las enteritis, gastroenteritis, diarrea, disenteria, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, se ha reportado que *E. coli* provoca en seres humanos alrededor de 630 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 775.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil de países en desarrollo. Adicionalmente, en los últimos 20 años, se han logrado identificar 40 serotipos de *E. coli enterovirulentos*, sin embargo, sólo seis serotipos se consideran causantes de síndromes diarreicos en el hombre o agentes causales de estas patologías. Entre estas cepas se encuentran: *E. coli enterotoxígena* (ETEC), *E. coli enteropatógena* (EPEC), *E. coli enteroinvasiva* (EIEC), *E. coli enteroagregativa* (EaggEC), *E. coli enteroadherente* (EAEC) y *E. coli enterohemorrágica* (EHEC); cada una de estas cepas produce síndromes clínicos distintos utilizando mecanismos de patogenicidad diferentes (Murray, P., 2002; Blanco y col., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

1.3.5.1.-*Escherichia coli enterotoxígena* (ETEC).

La enfermedad producida por *E. coli enterotoxígena* (ETEC) se encuentra con mayor frecuencia en los países en desarrollo, en niños pequeños o en viajeros que van a estas zonas. Su transmisión no ocurre persona a persona. Estas infecciones se adquieren fundamentalmente a través del consumo de alimentos, principalmente productos lácteos y ensaladas o agua contaminada con restos fecales. Su patogénesis se basa en que las cepas enterotoxígenas (ETEC) forman enterotoxinas termolábiles (TL-I, TL-II) y enterotoxinas termoestables (TEa y TEb). Mientras que la TL-II no se asocia con la enfermedad en humanos, TL-I es funcional en patología humana y estructuralmente similar a la toxina colérica. Esta toxina está conformada por una subunidad A y por cinco subunidades B idénticas. Las subunidades B se unen al mismo receptor que la toxina colérica (gangliósidos GM1) y a otras glicoproteínas de su superficie en las células epiteliales de intestino delgado (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

Una vez que las bacterias están unidas a los enterocitos ocurre la endocitosis, y la subunidad A de TL-I, ubicada dentro de las células, se transloca a través de la membrana de la vacuola. La subunidad A tiene actividad ADP (adenosin bifosfato), ribosiltransferasa e

interacciona con una proteína de membrana (Gs) que regula la adenilatociclasa. El resultado de esta interacción es un aumento de adenosin monofosfato cíclico (AMPc), con un incremento de la secreción de cloro y una disminución de la absorción de cloro y de sodio. Adicionalmente, la exposición a la toxina estimula también la secreción de prostaglandinas y la producción de citocinas inflamatorias, lo que se manifiesta como una diarrea acuosa con una gran pérdida de líquidos (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

De igual forma, TEa es una toxina termoestable pequeña y monomérica que se une a la guanilato ciclasa, produciendo un aumento de los niveles de guanosina monofosfato cíclico y la posterior hipersecreción de líquidos. La producción de todas estas toxinas está mediada por plásmidos y originan una diarrea secretora o también llamada diarrea de viajero que ocurre tras un periodo de incubación de 1 a 2 días, y dura de 3 a 4 días. Los síntomas similares a los del cólera pero más leves, se caracterizan por espasmos abdominales, náuseas, diarrea acuosa y fiebre de bajo grado. No se observan cambios histológicos de la mucosa intestinal ni inflamación, y en lactantes, ETEC a veces causa una enfermedad conocida como “cólera infantil”. Posteriormente, los pacientes se convierten en portadores y eliminan el microorganismo con las heces después de desaparecer la sintomatología (Murray, P., 2002; Jay, J., 1994; Koneman, E. y col., 1992).

1.3.5.2-*Escherichia coli enteropatógena* (EPEC).

Las cepas enteropatógenas de *E.coli* son la principal causa de diarrea infantil en países pobres, principalmente en lactantes. La infección causada por estas cepas en niños mayores y en adultos es poco frecuente, presumiblemente debido al desarrollo de una inmunidad protectora. El origen de las cepas EPEC son los portadores humanos sintomáticos o asintomáticos. La enfermedad producida por *E.coli enteropatógena* generalmente se adquiere de forma exógena a través de la ingestión de alimentos contaminados. Sin embargo, puede ser adquirida de forma endógena debido a una alteración de la flora microbiana normal del paciente (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

E.coli enteropatógena son cepas en general no productoras de toxinas y no invasivas. Su mecanismo de patogenicidad se caracteriza por la adhesión bacteriana a las células epiteliales del intestino delgado (Murray, P., 2002; Jay, J., 1994; Koneman, E. y col., 1992).

La enfermedad por *E. coli enteropatogena* se caracteriza por fiebre, malestar, vómitos y diarrea, con una cantidad importante de moco, pero no con mucha sangre. Adicionalmente, se observan reacciones inflamatorias y cambios epiteliales degenerativos en cortes de tejidos del epitelio intestinal (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

1.3.5.3.- *Escherichia coli enteroinvasiva* (EIEC).

Las cepas enteroinvasivas de *E. coli*, denominadas así por su capacidad de invadir las células epiteliales del colon, son capaces de producir una enfermedad similar a la causada por especies de *Shigella*. Casi todos los brotes por estas cepas tienen su origen en los alimentos y en menor frecuencia en el agua. Sin embargo, la transmisión puede ocurrir de igual forma por contacto directo, de persona a persona, debido a que el hombre es el principal reservorio (Jay, J., 1994).

Las cepas enteroinvasivas de *E. coli* constituyen un grupo serológico característico conformado por 11 serotipos, siendo el más frecuente el O124. Igual que otras cepas de *E. coli*, éstas pueden ser adquiridas de forma exógena y endógena. Sin embargo, su patogenia se caracteriza por invasión y destrucción del epitelio del colon. Este proceso de destrucción celular con infiltración inflamatoria produce inicialmente una diarrea acuosa y puede progresar a una ulceración colónica (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

La enfermedad causada por las cepas enteroinvasivas se caracteriza por diarrea acuosa que puede evolucionar a la forma disentérica de la enfermedad, con fiebre, espasmos abdominales, sangre y leucocitos en las heces (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

1.3.5.4.-*Escherichia coli enteroagregativa* (EaggEC).

Las cepas de *E. coli enteroagregativa* se han visto implicadas en casos de diarrea acuosa, persistente y con deshidratación, especialmente en los niños de países en desarrollo. Estas cepas bacterianas se caracterizan por su autoaglutinación en forma de “ladrillos apilados”, proceso mediado por unas fimbrias formadoras de heces llamadas fimbrias de adherencia-agregación I y II transportadas por un plásmido (AAF/I y AAF/II) (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

La patogenia de estas cepas se basa en estimular la secreción de moco, que atrapa las bacterias en una biopelícula que recubre al intestino delgado, lo que origina un acortamiento de las microvellosidades, infiltración mononuclear y hemorragia. La enfermedad producida por *E. coli enteroagregativa* se caracteriza por diarrea acuosa, vómitos, deshidratación y con menor frecuencia dolor abdominal (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

1.3.5.5.-*Escherichia coli enteroadherente* (EAEC).

Las cepas de *Escherichia coli enteroadherente* o también denominadas *difuso adherentes* se han reconocido por su adherencia característica en cultivos celulares. Las cepas estudiadas presentan un patrón característico de adherencia a la superficie de las células Hep-2 y Caco-2 originando protuberancias parecidas a dedos, en las que las células del microorganismo se encajan o insertan. Por tanto, *E. coli enteroadherente* es una cepa adherente a las células Hep-2 o Hela, que no produce toxinas termolábiles, termoestables o verotoxinas y no son invasivas independientemente de los serogrupos. No se conoce con precisión su patogenicidad, pero se ha observado que estas cepas poseen fimbrias que son responsables de la adherencia y cuya presencia viene codificada por genes cromosómicos y un plásmido (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

Adicionalmente, estas cepas estimulan el alargamiento de las microvellosidades intestinales, lo cual origina la enfermedad causada por *E. coli enteroadherente*, que se caracteriza por una diarrea acuosa que se observa principalmente en niños de 1 a 5 años (Jay, J., 1994; Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

1.3.5.6.-*Escherichia coli enterohemorrágica* (EHEC).

La importancia clínica de EHEC no se conoció hasta 1982, cuando estas cepas se asociaron a dos condiciones de etiología previamente desconocida como la colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico (SHU). En la actualidad, se conoce que EHEC además de estar asociada a estas dos patologías puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea y púrpura trombocitopénica trombótica (Murray, P., 2002; Rivas, M y col., 1998; Koneman, E. y col., 1992).

Según la epidemiología, las cepas de EHEC causan con más frecuencia enfermedad en los países desarrollados, particularmente en los meses cálidos y en niños menores de 5 años. Se estima que en Estados Unidos estas bacterias producen más de 100.000 infecciones y casi 100 muertes al año, siendo necesaria la ingestión de menos de 100 bacilos para originar la patología. La mayoría de los casos de esta enfermedad se han atribuido al consumo de carne de vaca u otros productos cárnicos poco cocinados, agua, leche sin pasteurizar, vegetales sin cocinar, frutas y zumos de frutas (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

Se conocen mas de 50 serotipos de *Escherichia coli enterohemorrágica*, dentro de este grupo existen ciertos serotipos productores de toxinas Shiga, los cuales constituyen las llamadas *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC), entre estos los serotipos 026:H11; 0103:H2; 0111:NM; 0113:H21; 0145:NM, destacándose la *E. coli serotipo* O157:H7 como el principal representante del grupo debido a su especial virulencia, la cual se ve reflejada por el elevado número de afectados en cada uno de los brotes reportados; este aspecto es evidenciado en diversos estudios. En Argentina, Meichtri y col. en el 2004 evaluaron la presencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en terneros de un frigorífico, obteniendo que el 38,5% de estas cepas eran serotipos no-O157 y el 0,5% de O157:H7 (Meichtri, L., 2004; Margall, N. y col., 1997).

En Venezuela para el año 2007, se realizó un estudio en 100 muestras de queso telita proveniente de los estados Aragua, Bolívar, Guárico y Miranda, donde se observó que el 100% de las muestras tenían presencia de *E. coli*, obteniendo que sólo dos cepas aisladas de las muestras de queso telita del estado Bolívar eran *E. coli* O157:H7 (Villalobos, L. y col., 2008).

Así mismo, en el mundo y especialmente en nuestro país, se ha observado en los últimos años el aumento en la incidencia de infecciones por este patógeno, debido a cambios en la producción, procesamiento y distribución de alimentos, en los hábitos de consumo, y en la utilización de métodos más sensibles de detección. En el caso específico de *E. coli* O157:H7, ha sido de gran relevancia su estudio e identificación debido a sus características bioquímicas distintivas que facilitan su detección, caracterización y a la importancia en la comprensión de su patogenia (Meichtri, L., 2004).

1.3.6.-*Escherichia coli* serotipo O157:H7.

La *Escherichia coli* serotipo O157:H7 es el principal representante del grupo de *E. coli* enterohemorrágica productor de toxinas Shiga, esto se debe a que históricamente ha representado en muchas partes del mundo el serotipo prevalente en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y es uno de los más estudiados en una gran variedad de productos alimenticios (Chinen, I., 2007).

En relación a la epidemiología de este patógeno, a comienzos de 1993, ocurrió en varios estados de Washington una de las mayores epidemias por envenenamiento alimentario. En total se confirmaron 582 casos de enfermedad por *E. coli* O157:H7 que originaron 171 pacientes hospitalizados, 41 casos de Síndrome Hemolítico Urémico y 4 muertes, todas derivadas de la ingestión de hamburguesas de una cadena de restaurantes de comida rápida. En el 2005, en Estados Unidos se estimó que las infecciones por *E. coli* O157:H7 fueron responsables de al menos 20.000 casos de enfermedad y 250 muertes por año (Chinen, I., 2007).

En el caso de América Latina, Argentina es el país más afectado, donde el Síndrome Urémico Hemolítico originado por *E. coli* O157: H7 es considerado endémico, estimándose 400 casos anuales por las Unidades Hospitalarias de Nefrología y más de 7000 casos notificados desde 1965. En la actualidad, la tasa anual de incidencia de SHU en este país es de 13,9 por cada 100.000 niños menores de 5 años. De igual forma, en países como Uruguay se estiman entre 10 y 15 casos por año, obteniendo una tasa de incidencia de 4 a 5 por cada 100.000 niños menores de 5 años (Varela, G. y col., 2008; Chinen, I., 2007).

En Venezuela, la incidencia de casos de patologías ocasionadas por *E. coli* O157: H7 no ha sido muy estudiada. Estudios realizados en muestras bacteriológicas de carne molida y chorizos del mercado municipal de Cumaná, Edo. Sucre entre febrero de 1997 y marzo de 1998, mostraron un 3,15% de contaminación por *E. coli* O157:H7 productoras de toxina termoestable (Villalobos, L. y col., 2008).

A nivel mundial, el ganado bovino es reconocido como el reservorio primario de *E. coli* O157:H7. Según los estudios epidemiológicos, la mayoría de los casos relacionados con este

microorganismo en los Estados Unidos están asociados al consumo de carne, donde *E. coli* O157:H7 está presente en un 1 a 2,5% de las muestras de carne vacuna y de ave. De igual forma en Europa, los principales brotes han surgido del consumo de carne picada y hamburguesas de carne de vacuno. En relación a este aspecto, en un estudio realizado en heces de ganado bovino de doble propósito del municipio Miranda, Edo. Zulia, Venezuela, se halló que el 1,94% del ganado estudiado presentaba infección por *E. coli* O157:H7. Por otro lado, en nuestro país existen otras investigaciones que determinan que no sólo la carne de bovino es el alimento predominantemente contaminado por esta bacteria. En una investigación realizada en comedores de empresas privadas se encontró una elevada contaminación por *E. coli*, en vegetales crudos (76,2%), vegetales cocidos (15,2%), carnes de res y cerdo (15,9%), aves (16,7%), pescados (11,8%), postres (27,3%), equipos y utensilios (57,9%) y en superficies y ambientes 53,6% (Narváez, C. y col., 2009; Villalobos, L. y col., 2008; Murray, P., 2002; Curtis, M. y col., 2000; Jay, J., 1994; Koneman, E. y col., 1992).

Adicionalmente, en la literatura se han descrito múltiples brotes asociados a la ingestión de carne picada poco cocida, lácteos y jugos de frutas sin pasteurizar, verduras, consumo de agua contaminada en ámbitos recreacionales, fuentes de contaminación cruzada por manipuladores, equipamiento y utensilios. Así mismo, la transmisión persona a persona también se ha documentado y se demostró la existencia de portadores asintomáticos entre 1 y 36 días (Villalobos, L. y col., 2008; Curtis, M. y col., 2000).

Uno de los aspectos más relevantes de la epidemiología de *E. coli* O157:H7 es la dosis infectiva, debido a que sólo se necesitan alrededor de 10 células bacterianas para causar colonización e infección. Con respecto a este punto, algunas investigaciones determinan que son necesarias al menos 2 células bacterianas por cada 25 g. de alimento para causar la infección, esto sin que la bacteria se haya multiplicado sino simplemente sobrevivido al proceso de preparación del alimento (Rubaglio, E., 2007).

Una vez que la cepa de *E. coli* O157:H7 llega a un alimento y se logra adaptar a las condiciones del mismo, puede ser introducida al organismo humano mediante la ingesta de la dosis infectiva adecuada. Este hecho, origina una serie de patologías que van desde la

aparición brusca de colitis hemorrágica caracterizada por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre, fiebre y postración general, hasta otros síndromes más graves como púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica y síndrome urémico hemolítico (Rojas, T. y col., 2006).

La aparición de los síndromes ocasionados por las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 se debe a un importante número de factores de virulencia, entre los cuales se encuentra la producción de dos potentes toxinas conocidas como toxinas del tipo Shiga, por su relación con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1; estas toxinas también son conocidas como verotoxinas por sus efectos citopáticos sobre las células VERO. Las toxinas Shiga tipo I o tipo II, clasificadas de esta forma de acuerdo a sus particularidades antigénicas, a su vez poseen diferentes subtipos basados también en sutiles diferencias antigénicas que hablan de la complejidad estructural de dichas toxinas (Rojas, T. y col., 2006).

Por otra parte, recientemente investigadores informaron que algunas cepas de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga producen una nueva toxina, denominada citotoxina subtilasa (Sub AB), la cual está relacionada estructuralmente y funcionalmente con la serina proteasa de la familia de la subtilasa, presente en *Bacillus anthracis*. Así mismo, otros estudios demuestran que Sub AB es capaz de producir mayor citotoxicidad que Stx-II en células Vero e inducir cambios patológicos semejantes al SHU (Ibarra, C., 2008).

1.3.6.1.- Síndromes ocasionados por *E. coli* serotipo O157:H7

Adicionalmente, se ha descrito que *Escherichia coli* O157: H7 puede mimetizar desórdenes no infecciosos como apendicitis, diverticulosis, colitis isquémica y ulcerativa, así como también colitis infecciosas causadas por *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolítica* o *Entamoeba histolytica* (Rivas, M. y col., 1998).

Uno de los principales síndromes ocasionados por *Escherichia coli* O157: H7, es la colitis hemorrágica conocida también como colitis isquémica, caracterizada por calambres abdominales y diarrea acuosa, seguida por descarga hemorrágica que se asemeja al sangrado del tracto intestinal inferior, sin presencia de fiebre significativa ni células inflamatorias en la materia fecal. Generalmente, esta patología no ocasiona la muerte del paciente. La infección por *E. coli* O157:H7 puede complicarse con el Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), la cual es epidemiológicamente importante debido a que puede evolucionar y culminar con la muerte del paciente (Rivas, M. y col., 1998).

1.3.6.2.-Síndrome Hemolítico Urémico (SHU)

El Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), descrito por primera vez en 1955, es una patología caracterizada por una triada de hechos que involucran daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. Otras investigaciones han descrito la afectación de otros parénquimas como el sistema nervioso central, intestino, páncreas, etc. En su forma más común, este síndrome es precedido por enfermedad diarreica que luego se vuelve sangrante y se asemeja a una colitis hemorrágica. Por tanto, el SHU es una complicación que generalmente se presenta en la población infantil, adultos y ancianos, pero principalmente se ha reportado en lactantes y niños en la primera infancia. En líneas generales, las manifestaciones más comunes del SHU son palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial y cambios neurológicos, como letargia o convulsiones (Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

El síndrome hemolítico urémico se desarrolla inicialmente con un período de incubación de 3 a 4 días que da lugar a una diarrea no sanguinolenta con dolor abdominal y presencia de

vómitos en el 50% de los pacientes. Posterior a este período, la enfermedad puede progresar a una diarrea sanguinolenta con dolor abdominal grave. La resolución total de los síntomas en este síndrome ocurren generalmente entre los 4 y los 9 días en la mayoría de los pacientes que no reciben tratamiento, originando la muerte en un 3 a 5% de los pacientes con SHU o la presencia de secuelas graves como insuficiencia renal, hipertensión y manifestaciones del Sistema Nervioso Central hasta en un 30% de los pacientes (Ibarra, C., 2008; Murray, P., 2002; Koneman, E. y col., 1992).

Según datos epidemiológicos, el SHU constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica. Adicionalmente, es identificado como responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Al inicio de la enfermedad, el 60% de los pacientes supera la fase aguda y se recupera sin secuelas después de dos o tres semanas de hospitalización. Un 5% de los niños desarrolla una insuficiencia renal crónica que, en pocos años, requiere procedimientos de hemodiálisis permanente o trasplante renal. Sin embargo, el 30% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria que pueden durar décadas (Ibarra, C., 2008).

El SHU se origina debido a la acción de los mecanismos de patogénesis de *E. coli enterohemorrágica*, los cuales se basan principalmente en la expresión de toxinas. Si bien estas infecciones están asociadas a Stx-I, Stx-II o a ambas, la producción de Stx-II aumenta el riesgo de SHU. Las Stx-II a nivel intestinal producen una inhibición significativa del transporte de agua a través de la mucosa colónica humana y una destrucción importante de la superficie intestinal. De igual forma, se produce una infiltración de neutrófilos, motivo por el cual, frecuentemente se encuentran leucocitos en materia fecal en los casos de SHU. La migración de neutrófilos hacia la luz intestinal puede promover el pasaje de la toxina a través de la barrera intestinal originando su acción en tejidos extraintestinales (Rivas, M. y col., 1998).

En el riñón la toxina Shiga inicia directamente las lesiones, produciendo tumefacción de las células endoteliales glomerulares, desprendimiento de la membrana basal y subsecuente depósito de trombos plaquetarios y fibrina en la microvasculatura renal, además ejerce acción directa sobre las células epiteliales tubulares renales originando la insuficiencia renal

aguda que desarrolla la enfermedad, donde el aumento en orina de N-acetil glucosaminidasa y β -microglobulina, señalados como marcadores específicos de la función tubular, aporta evidencias de daño tubular renal en la fase aguda (Ibarra, C., 2008).

Otro de los órganos afectados por la toxina Shiga es el cerebro, en autopsias de niños fallecidos por SHU se ha reportado la observación de trombos en la microvasculatura, edema endotelial e infartos en cerebro, que sugirieren que el episodio inicial de la encefalopatía asociado al SHU es la lesión endotelial. De igual forma, numerosas investigaciones describen un daño selectivo de neuronas en las capas profundas de la corteza cerebelosa y cerebral, cerebro medio y médula espinal donde la toxina se detectó en la pared de los vasos sanguíneos de las zonas involucradas. Estos estudios concluyen que la toxina Stx-II atraviesa la barrera hematoencefálica y se ha hallado en células perivasculares del cerebro, lo que sugiere que la toxina produce un daño directo en las células del parénquima del Sistema Nervioso Central (Ibarra, C., 2008).

En resumen, las infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 pueden ser asintomáticas, comenzando con una diarrea acuosa que progresa a diarrea sanguinolenta al cabo de 1-2 días de infección, colitis hemorrágica (CH), púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y, en algunos casos, el desarrollo del síndrome hemolítico urémico. Desde el descubrimiento de estas patologías hasta el presente no hay un modo de predecir cómo se desencadenará el SHU. Sin embargo, una vez establecida la enfermedad, no existe un tratamiento específico que pueda impedir la progresión del daño que causa la toxina Stx en los diferentes órganos blanco. Por tal razón, el mejor modo de prevención del SHU es impedir la infección primaria por *Escherichia coli* O157:H7 (Ibarra, C., 2008).

Existen diversas estrategias para antagonizar los factores de virulencia de *Escherichia coli* O157:H7, entre éstas el uso de probióticos conocidos por su capacidad inhibitoria de patógenos entéricos, fármacos inhibidores de la síntesis de proteínas y anticuerpos neutralizantes para que las bacterias no colonicen el colon humano (Ibarra, C., 2008).

Adicionalmente, existen otras estrategias destinadas a neutralizar la toxina para impedir que atraviese la barrera intestinal o se fije a los órganos blanco. En concordancia con estas estrategias, se realiza un estudio multicéntrico controlado en niños con SHU, donde se

ensaya la administración oral de un análogo del receptor Gb3 con capacidad de unir la toxina Stx (Synsorb-Pk), sin embargo, aun no arroja resultados concluyentes y diferentes laboratorios de investigación continúan sus estudios para encontrar análogos del receptor Gb3 que puedan, efectivamente, tener una actividad protectora *in vivo*. De igual forma, hace unos años también se demostró que preparados vacunales génicos y proteicos que codifican toxoides de Stx pueden inducir protección contra la acción de la toxina en ratas y conejos, pero estos ensayos aún se encuentran en su fase experimental (Ibarra, C., 2008).

Finalmente, se ha demostrado la desaparición del daño tisular producido por Stx en un modelo de ratón genoprivo para la síntesis del Gb3, lo cual aporta evidencias en favor de que una inhibición de la síntesis de los receptores Gb3 en los órganos blanco de niños afectados por SHU, podría ser una intervención farmacológica efectiva para protegerlos de la acción de la toxina (Ibarra, C., 2008).

1.3.7.-Importancia de la Identificación de *Escherichia coli* O157:H7 en la Vigilancia Microbiológica de los Alimentos.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo, por lo cual, es necesario mantener una vigilancia epidemiológica de éstas y aplicar medidas oportunas que permitan su control y prevención. Para lograr la aplicación de estas medidas se requiere del conocimiento de la distribución y ocurrencia de los factores de riesgo de los agentes patógenos prevalentes y de los principales alimentos involucrados (Di Pietro, S. y col., 2004; Rodríguez, M. y col., 1996).

En relación a *E. coli*, se ha demostrado que este patógeno proviene del tracto intestinal del hombre y de animales de sangre caliente. La presencia de esta bacteria en un determinado alimento indica contaminación fecal, por tanto *E. coli* es considerado el microorganismo marcador de elección en la comprobación o vigilancia de los alimentos y de platos tratados mediante calor, bien sea por encontrarse insuficientemente cocidos o que se les hayan añadido condimentos de última hora no tratados con calor, entre los que se incluyen el queso rallado, salami, hortalizas frescas, etc. Al hallar un alimento contaminado con *E. coli* se puede concluir que sufrió contaminación fecal y que el consumidor podría estar expuesto de igual forma a otros patógenos entéricos (Jay, J., 1994).

De igual forma, específicamente la *Escherichia coli* O157:H7 ha sido asociada históricamente con grandes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, este es el serotipo de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga prevalente en muchas partes del mundo y uno de los más estudiados en alimentos. El consumo de leche cruda, inadecuadamente pasteurizada o contaminada después del proceso térmico, crema de leche y de quesos elaborados con leche cruda ha sido asociado con brotes severos de enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7. Otros alimentos también han sido identificados como vehículo de este patógeno entre estos: la carne, salami, yogurt, jugo de manzana no pasteurizado, melón, papas, brotes de rábanos y brotes de alfalfa (Jay, J., 1994).

Adicionalmente, la infección secundaria es común y ha ocurrido en casas de familia, hospitales, geriátricos, unidades de cuidados diarios y particularmente jardines maternales, este factor refleja la baja dosis infectiva que es necesaria para instalarse la patología (Chinen, I., 2007).

A nivel mundial, las políticas de control y prevención del SHU se basan en estrategias de vigilancia epidemiológica, políticas destinadas al control de la industria de la carne y estrategias de prevención que apuntan a la educación de la población, por tanto, la determinación de estas bacterias en diversos alimentos, mediante la implementación de técnicas sensibles es esencial para la evaluación epidemiológica de las patologías provocadas por una posible infección y su impacto en la salud pública (Reuben, A. y col., 2003).

1.4.-Metodología para el Análisis de Alimentos.

El análisis de los alimentos es necesario para verificar las buenas prácticas de fabricación y distribución de los productos alimenticios. A nivel mundial, la prueba de calidad microbiológica, solicitada por el comercio internacional de alimentos, se basa principalmente en el análisis de muestras, apoyada por la inspección metódica de las instalaciones y equipos de la empresa alimenticia (Jay, J., 1994).

No existen normas oficiales, reproducibles, sensibles y sencillas para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos. Sin embargo, están en desarrollo varios métodos microbiológicos, moleculares y electroquímicos con el fin de satisfacer esta necesidad de diagnóstico (Tesone, S., 2007; Jay, J., 1994).

Es importante mencionar que todo análisis de alimentos debe tener una marcha analítica que involucre desde la recolección de la muestra, su transporte y conservación, hasta la aplicación de las técnicas analíticas necesarias para la identificación de los microorganismos en estudio. Por tanto, a continuación se plantea en forma resumida la marcha analítica de las principales técnicas de análisis de los alimentos (Tesone, S., 2007).

1.4.1.- Muestreo.

Los resultados del análisis de un producto alimentario son tan buenos como el método de muestreo que se lleva a cabo. La muestra perfecta sería el 100% del material que se va a analizar, sin embargo, es inadecuado, de manera que se necesitan métodos para obtener una alícuota representativa del sistema como un todo (Cochran, W., 1982).

El muestreo se puede realizar por azar, submuestras y estratificación. El muestreo **por azar** se basa principalmente en la recolección de un número representativo de la remesa o lote del alimento a estudiar, lo cual se lleva a cabo mediante la asignación de números a todos los sacos, cajas, cajones o envases y posteriormente retirar las unidades a muestrear en un orden aleatorio, obteniendo porciones estadísticamente representativas. El tamaño de las porciones retiradas depende del grado de estratificación microbiana existente en el producto (Jay, J., 1994).

El muestreo **por submuestras** se basa en la extracción de porciones provenientes de sitios seleccionados al azar en el envase. Estas porciones deben tener un tamaño aproximadamente cinco veces mayor que la que se tiene que examinar, debido a que posteriormente debe ser reducida hasta el tamaño necesario mediante el denominado método de disminución por cuadrantes (utilizado solo en muestras sólidas). En el caso de que los alimentos han sido preenvasados por el fabricante, no es necesaria la reducción del material, un solo paquete por caja es una muestra satisfactoria, a no ser que los paquetes tengan un peso mayor a 250 gramos. En el caso de alimentos líquidos para obtener la muestra se extrae el material después de agitar cuidadosamente los recipientes (Jay, J., 1994).

Por último, el muestreo **por estratificación** también denominado muestreo por distribución irregular de la colonización se refiere a que la población microbiana en los alimentos frecuentemente es esporádica, heterogénea y localizada. Por tanto, se deben tomar en consideración el número y tamaño de las muestras, las medidas apropiadas para evitar la contaminación ambiental, la extracción e introducción de las muestras en los envases adecuados y la multiplicación o la muerte microbiana durante el transporte de las mismas, con el fin de hallar los microorganismos contaminantes y elegir el estrato mas adecuado (Jay, J., 1994; Cochran, W., 1982).

1.4.2.- Transporte y Conservación de las Muestras.

Las condiciones de conservación y transporte de las muestras deben ser elegidas de forma sistemática antes del análisis, debido a que en ningún caso se debe permitir el crecimiento microbiano, ni causar la muerte de parte de la población microbiana. En el primer caso, el crecimiento microbiano indicaría una mala, errónea y falsa impresión del alimento. Por el contrario, en el segundo caso, la muerte microbiana, sugeriría que el alimento se encontraba en un mejor estado que el real. Por consiguiente, la colocación de las muestras a temperaturas cercanas a 0°C durante 24 horas, es la medida de conservación más aceptada para evitar el cambio en la población microbiana desde el momento del muestreo hasta la realización del análisis (Jay, J., 1994).

1.4.3.- Métodos Microbiológicos.

En cuanto a los métodos microbiológicos, la falta de una tradición analítica minuciosa, ha dado lugar a una gran variedad de técnicas. Sin embargo, antes de realizar cualquier análisis microbiológico de un alimento se debe considerar la finalidad, las características del producto o alimento, el microorganismo objetivo y la sensibilidad del método a utilizar (Tesone, S., 2007; Jay, J., 1994).

En relación a la finalidad del análisis se debe especificar si se desea investigar la inocuidad del alimento o si es una investigación ecológica o tecnológica. De igual forma, dentro de las características del producto se debe considerar si el alimento es crudo, si se ha tratado para asegurar su inocuidad, si ha sido obtenido por un proceso de fermentación o si posee alguna propiedad antimicrobiana (pH, concentración de nitritos, etc) (Jay, J., 1994).

Otro aspecto importante en el análisis de alimentos es el microorganismo objetivo debido a que se deben separar microorganismos semejantes o afines pero no idénticos. Adicionalmente, se encuentra la sensibilidad del método, la cual dependerá de las concentraciones del microorganismo objetivo y variará si se encuentran por debajo de $10^{-2}/g$ y por encima de $10^2/g$, permitiendo la selección de diferentes métodos de análisis con el fin de lograr la mejor sensibilidad (Jay, J., 1994).

Por otra parte, en el análisis microbiológico de alimentos se debe considerar la necesidad de métodos muy selectivos debido a que los microorganismos buscados en las muestras, rara vez se encuentran en un cultivo puro, tal como sucede en las muestras clínicas. Los alimentos en buen estado están colonizados escasamente, lo que exige la utilización de métodos que permitan la determinación de niveles de UFC (unidades formadoras de colonias) del orden de $10^{-2}/g$. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos de interés clínico o patógeno se hallan presentes en una proporción muy baja en comparación a la flora microbiana total del alimento (~ 1 en 10^7 de la población microbiana viable total de un alimento, también llamada flora de fondo o flora acompañante). Esta proporción representa un factor determinante en la selección del método o técnica de cultivo, y exige el manejo de inhibidores selectivos de la flora acompañante que disminuyan la población microbiana

interferente. De igual forma, pueden ser utilizados medios diagnósticos o diferenciales del microorganismo de interés, los cuales puedan diferenciar los microorganismos objetivos de la flora de fondo en base a un actividad metabólica específica y medios selectivos, que estimulan el crecimiento más rápido de una especie o grupo de microorganismos de manera que pueda competir con ventaja frente a otras especies en ausencia de inhibidores (Jay, J., 1994).

Por otro lado, existe una serie de factores que pueden ocasionar daños en la población microbiana (calor, bajo pH, baja temperatura, etc); tales poblaciones afectadas deben ser incluidas en los procedimientos de recuentos y pruebas de presencia-ausencia con el fin de evitar resultados erróneamente tranquilizadores y no reproducibles. Por esta razón, las técnicas selectivas de recuento deben incluir tratamientos de reparación de las células dañadas antes de que se utilicen medios de enriquecimiento o de aislamiento selectivo (Jay, J., 1994).

Uno de los parámetros más importantes es la selección de los procedimientos de recuento microbiano. En el caso de la microbiología de los alimentos las principales técnicas utilizadas son el recuento de colonias (RC), la determinación del número más probable (NMP) y las pruebas de presencia-ausencia (P-A). Los recuentos de colonias generalmente muestran un coeficiente de variación entre 5 y 20%, esto se debe a la gran variabilidad de los microorganismos originada por el hecho de que tanto las células aisladas como las cadenas cortas de células y los agregados de microorganismos, dan origen a una sola unidad formadora de colonias. Por otra parte, los límites de confianza del número más probable (NMP) son aun mayores en comparación con el recuento de colonias y a su vez son superados por las pruebas de presencia-ausencia (P-A) (Jay, J., 1994).

Es de considerar que todas las técnicas y métodos a seleccionar en la identificación de un determinado microorganismo van a depender principalmente del tipo de alimento y microorganismo de interés. En cuanto a *Escherichia coli* O157:H7 en la actualidad existe una gran variedad de técnicas microbiológicas recomendadas para su detección en alimentos; en relación a este aspecto, múltiples instituciones han sugerido protocolos a seguir en la búsqueda de este patógeno; entre estas se encuentran:

- Standard Methods for the Examination of Dairy Products (APHA, 1992).
- Environmental Protection Agency of EE.UU.
- Food Safety Inspection Service, Departamento de Agricultura de los EE.UU.
- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (1992).
- International Commission of Microbiological Specification of Foods (ICMSF).
- Association of Official Analytical Chemist International (AOAC).
- Bacteriological Analytical. (AOAC, 1992).
- American Association of Cereal Chemists (AACC).
- Organización Internacional de Normalización (ISO).

De igual forma numerosas investigaciones presentan diversos métodos de identificación de *Escherichia coli* O157:H7 basados en ensayos bioquímicos, serológicos, reacciones de latex, etc. En relación a este aspecto, Parr y col. en 1936 propusieron las pruebas IMViC para la identificación de *E. coli*, las cuales se basaban en la Producción de Indol, Reacción de Voges-Proskauer, Reacción de Rojo de Metilo, Utilización de Citrato y Producción de Gas a partir de Lactosa (Jay, J., 1994).

Posteriormente, Mushin y Ashburner en 1962 implementaron una versión modernizada de IMViC hasta ahora denominada IMVEC, donde E representa la prueba de termotolerancia de Eijman o ensayo de temperatura elevada. En la década de los 80, las técnicas microbiológicas para la identificación de *E. coli* presentaron pocas variaciones, básicamente los cambios consistieron en nuevos medios de cultivo y la adición de pruebas bioquímicas confirmatorias. En los años 90 surgen otros métodos para el recuento selectivo de colonias de *E. coli*, entre ellos, aquellos que contenían un sustrato fluorógeno para el ensayo de la β -glucoronidasa y los basados en la glutamato descarboxilasa (Jay, J., 1994). En el 2002, el Bacteriological Analytical Manual introduce un método mediante la incorporación de 4-methylumbelliferyl- beta- D- glucoronide (MUG) en Agar Rojo Neutro que permite la detección de *E. coli* de entre otras colonias coliformes a través de la detección de la actividad beta-glucoronidasa. *E. coli* produce la enzima beta-glucoronidasa la cual hidroliza el MUG produciendo un compuesto fluorogénico detectable con luz UV a 366 nm. (Bacteriological Analytical, 2002).

Otros estudios muestran el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 mediante la utilización de agar MacConkey sorbitol o agar Mac Conkey con suplemento de 4 metil umbeliferil β D glucurónico (MUG) 0,2 g/L, su posterior evaluación bioquímica (pruebas TSI, urea, oxidasa, catalasa, IMVIc, lisina descarboxilasa y API 20E) y la confirmación serológica por aglutinación en látex con antisueros monoclonales específicos para el antígeno O157 (Reuben, A. y col., 2003).

La identificación definitiva de *Escherichia coli* O157:H7, mediante métodos microbiológicos se realiza principalmente por la utilización de antisueros específicos para sus determinantes antigénicos. Este aspecto se ha evidenciado en múltiples investigaciones donde las muestras fueron analizadas usando técnicas bacteriológicas convencionales, bioquímicas y serológicas, y posteriormente probadas con monovalentes somáticos O157 y H7, y pruebas de aglutinación con látex para O157 (Narváez, C.y col., 2009; Reuben, A. y col., 2003; Villalobos, L. y col., 2000).

La aplicación de los antisueros también se ha utilizado en técnicas como la separación inmunomagnética, donde con partículas sensibilizadas con anticuerpos anti-O157 se separan las células bacterianas y se logra una muestra inmunocentrada, que posteriormente es sembrada, probada bioquímicamente y serotipificada con antisueros específicos para O157 y H7 (Otero, E., 2007).

En conclusión, existen numerosas técnicas microbiológicas recomendadas para la detección de *Escherichia coli* O157:H7, sin embargo, la mayoría convergen en el diagnóstico diferencial mediante la utilización de los antisueros específicos para detectar antígenos O y H (Montiel, F. y col., 2000).

1.4.4.- Métodos Moleculares para de la Detección de *E. coli*.

Mullis en 1983 inició los métodos moleculares desarrollando una técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) correspondiente a un proceso de amplificación enzimática *in vitro* del material genético de agentes infecciosos. En la actualidad, la PCR es el método más frecuente para amplificar ácidos nucleicos basado en la repetición de un proceso de tres etapas: 1.- Desnaturalización del ADN de doble hebra (dADN) en ADN de

hebra simple (sADN), 2.- Hibridación de “primers” (pequeños fragmentos de ADN complementarios a la secuencia de interés) y 3.- Extensión enzimática de los primers (Montiel, F. y col., 2000).

Una vez que los primers se han unido con el ADN desnaturalizado, los segmentos de hebra simple actúan como moldes para la reacción de extensión. Los nucleótidos (A, T, C y G) presentes en la reacción, se unen enzimáticamente para formar secuencias de ADN copia. Este procedimiento se repite por varios ciclos, en el segundo ciclo tanto el ADN original como el ADN copia pasan a ser moldes para las próximas reacciones. Por tanto, cada ciclo de PCR aumenta al doble la cantidad de ADN específico, estando una amplificación típica constituida por 30 a 40 ciclos y originando un aumento aproximado de 10^6 veces del ADN molde presente en una muestra clínica (Montiel, F. y col., 2000). En la figura 4 se observa la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El desarrollo de procesos automatizados ha facilitado la introducción de la técnica de PCR al diagnóstico de laboratorio con un aumento creciente de sus aplicaciones, originando así, el desarrollo de numerosos ensayos sensibles y específicos para la detección de patógenos de importancia microbiológica. El mecanismo por el cual la reacción de polimerasa en cadena genera un aumento exponencial de ADN molde es teóricamente un concepto simple. Sin embargo, requiere la optimización de múltiples parámetros químicos como la concentración de reactivos inorgánicos, de enzimas, de primers y del molde de ADN, o la optimización de parámetros físicos como la temperatura, el número de ciclos, la transferencia de calor entre el termociclador y en el tubo de reacción. Cada una de estas variables debe ser correctamente manejada con el fin de obtener un ensayo diagnóstico eficiente, sensible y específico (Montiel, F. y col., 2000).

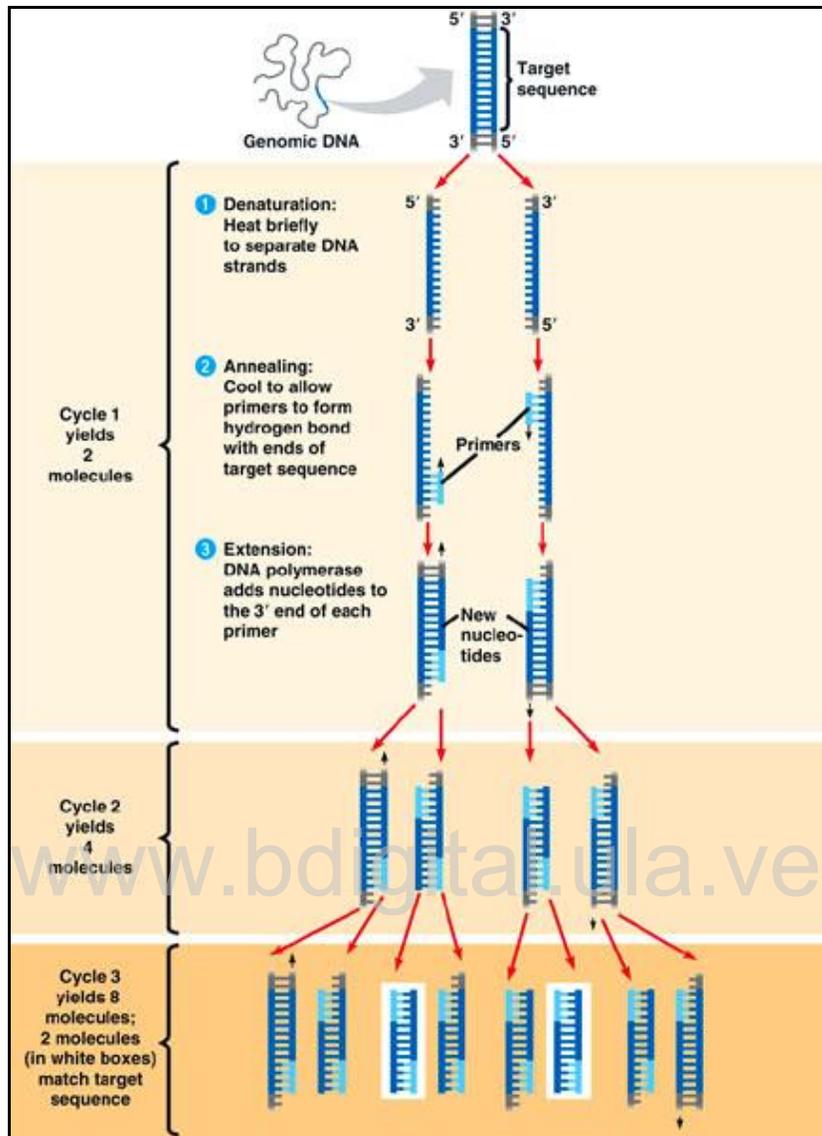


Figura 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Fuente: <http://scienceblogs.com>

Hoy en día, los métodos moleculares han sido ampliamente utilizados en la detección de *Escherichia coli* O157:H7, se han realizado ensayos de PCR Múltiplex independientes, basados en la detección de los genes que definen el serotipo O157:H7 (*rfbE* y *fliC*) y en la detección de los genes que codifican los factores de patogenicidad más importantes en *E. coli* O157:H7 (*stx1*, *stx2* y *eaeA*) (Treviño, R., 2009).

De igual forma, estas técnicas han sido utilizadas para la identificación de cepas productoras de toxinas Shiga. Diversos estudios utilizan PCR de tamizaje para determinar si cada colonia es o no productora de citotoxinas (Stxs), utilizando tamizaje para el gen *stx* y PCR múltiple para los genes *stx1* y *stx2* (Varela, G. y col., 2008; Carreño, M., 2002). En contraste, otras investigaciones caracterizan las cepas genótipicamente para la detección de los genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *eaeA* y EHEC-*hlyA*, por PCR e hibridación con sondas genéticas (Roldán, M. y col., 2007; Marzocca, M. y col., 2006; Gómez, D y col., 2005).

1.5.- Biosensores.

La búsqueda de programas de calidad y seguridad alimentaria que recojan la necesidad de implementar sistemas de control encaminados a mejorar los sistemas de trazabilidad, es uno de los objetivos más importantes de las empresas agroalimentarias, colocando como prioridad, el desarrollo de métodos de detección, análisis y diagnóstico que sean rápidos, de alta sensibilidad y bajo costo que permitan rastreos automatizados para un amplio espectro de agentes que amenazan la inocuidad de los alimentos (Matheus, P., 2003).

En relación a este aspecto, la tecnología de los biosensores ha experimentado un notable avance en los últimos años, específicamente en las áreas de la biomedicina, medioambiental, y agroalimentaria, debido a que representa una importante herramienta de análisis para la detección de microorganismos y otros analitos que afectan la inocuidad de los alimentos (Matheus, P., 2003).

Los biosensores se definen como dispositivos analíticos en los que se integra un elemento biológico (ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula) o biomimético (PIMs, aptámeros, PNAs), capaz de reconocer un analito e interactuar específicamente con él. Adicionalmente, se integra un elemento transductor, capaz de interpretar la reacción de reconocimiento biológico que produce el receptor (interacción analito-sensor) y transformarla en una señal fisicoquímica, procesable, cuantificable y almacenable (Wang, L., 2008).

El primer biosensor fue un analizador de glucosa desarrollado por Clark y Lyons en 1962, el cual se denominó “enzyme electrode”, pero fue en 1977 cuando se desarrolló el primer dispositivo utilizando microorganismos vivos inmovilizados en la superficie de un electrodo sensible a amonio, utilizado para la detección el aminoácido arginina. Este dispositivo fue denominado sensor bio-selectivo. No obstante, se le denominó posteriormente “biosensor”, término utilizado para designar la unión entre un material biológico y un transductor físico. A partir de ese momento se ha incrementado el diseño y las aplicaciones de los biosensores en distintos campos, principalmente en el campo del diagnóstico clínico (con un gran éxito en los biosensores para glucosa) y más recientemente en los campos medioambiental, agroalimentario, químico, farmacéutico y militar (Matheus, P., 2003).

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. Como resultado de esta unión se produce la variación de una o varias propiedades físicoquímicas (pH, transferencia de electrones, calor, cambio de potencial o de masa, variación de las propiedades ópticas, etc) que detecta el transductor. Este sistema transforma la respuesta del elemento de reconocimiento en una señal eléctrica indicativa de la presencia del analito, la cual es proporcional a la concentración de éste en la muestra (Valeria, J. y col., 2002).

Particularmente, en el campo agroalimentario, los biosensores se han utilizado en el análisis de la composición de los alimentos, en la seguridad alimentaria (detección de compuestos contaminantes, alérgenos, antinutrientes, toxinas y microorganismos patógenos) y en el control de procesos en línea de las industrias agroalimentarias (González y col., 2005). En la tabla 2 se presentan las principales áreas de aplicación de los biosensores dentro del campo agroalimentario.

Tabla 2. Principales áreas de aplicación de los biosensores dentro del campo agroalimentario.

Seguridad Alimentaria	Calidad Alimentaria
<p>1. Compuesto xenobióticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aditivos • Fármacos • Plaguicidas y fertilizantes • Contaminantes (dioxinas, metales pesados) 	<p>1. Composición del alimento</p> <ul style="list-style-type: none"> • Azúcares • Aminoácidos • Alcoholes • Ácidos orgánicos • Colesterol
<p>2. Biotoxinas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Toxinas bacterianas • Micotoxinas • Toxinas marinas 	<p>2. Vida útil</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polifenoles y ácidos grasos (enranciamiento) • Azúcares y ácidos orgánicos (madurez) • Aminas biógenas (índice de frescura)
<p>3. Microorganismos patógenos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Virus • Bacterias • Protozoos 	<p>3. Compuestos aromáticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alifina (ajo y cebolla).

Fuente: González y col., 2005.

1.5.1.- Características de los Biosensores.

Las técnicas de análisis de laboratorio más habituales, ya sea de sustancias químicas o biológicas, suelen ser laboriosas, consumen mucho tiempo y en la mayoría de las ocasiones requieren personal especializado para su manejo. En este particular, los biosensores aportan una alternativa frente a los métodos clásicos, debido a que proporcionan una respuesta rápida y en tiempo real, factores esenciales en la industria agroalimentaria, la cual necesita controlar de manera confiable su materia prima y productos. Frente a las técnicas convencionales, los biosensores ofrecen la posibilidad de obtener medidas directas,

continuas, de forma rápida, con alta sensibilidad, selectividad y especificidad (Wang, L., 2008; Zacco, E., 2006).

Adicionalmente, estos dispositivos proporcionan la capacidad de realizar multi-análisis, en muchos casos sin necesidad del pre-tratamiento de la muestra o la separación del componente de interés. De igual forma, estos dispositivos ofrecen ventajas de portabilidad y pequeño tamaño, lo que significa que la cantidad de muestra para realizar un análisis es relativamente baja, factor importante si se trata de análisis de sangre, ADN o si la muestra es costosa o difícil de conseguir (Wang, L., 2008).

Asimismo, los biosensores deben tener un tiempo de vida largo que no obligue al empleo del dispositivo sólo en un corto período de tiempo ni a sustituciones frecuentes del mismo, principalmente si está integrado en la línea de producción de una industria. Este aspecto depende principalmente de la estabilidad química, física y mecánica del elemento de reconocimiento, el cual condicionará la duración del biosensor, lo que representa una gran dificultad debido a que los componentes biológicos por su naturaleza cuentan con una vida media limitada. Sin embargo, las moléculas biomiméticas, utilizadas en la nueva tecnología de biosensores no presentan este inconveniente (Matheus, P., 2003).

En el desarrollo de nuevos sistemas de detección, un aspecto a considerar es el tiempo de análisis, muy importante en la industria farmacéutica y alimenticia, donde es crucial el retirar materias primas o productos contaminados y/o deteriorados, interviniendo así un proceso industrial con el fin de corregir algún parámetro antes del uso o venta del producto. En relación a este hecho, muchos biosensores consumen pocos minutos en cuantificar el compuesto de interés y no precisan un período de espera largo hasta el siguiente análisis, lo que permite tomar las medidas oportunas y necesarias para garantizar la calidad e inocuidad de un determinado producto (Wang, L., 2008; Matheus, P., 2003).

En la actualidad, existe una amplia variedad de biosensores y no todos poseen cada una de las características antes mencionadas. No obstante, la combinación de varias de ellas podría situar a estos dispositivos en una posición ventajosa frente a las técnicas de análisis convencionales (cromatografía, espectrometría, cultivo microbiológico, etc), permitiendo su

aplicación en tiempo real en la monitorización de procesos industriales (Wang, L., 2008; Matheus, P., 2003).

1.5.2.- Clasificación de los Biosensores.

Los biosensores pueden clasificarse en función del tipo de interacción que se establece entre el elemento de reconocimiento y el analito, el método utilizado para detectar dicha interacción, la naturaleza del elemento de reconocimiento, o del sistema de transducción. Existen múltiples elementos de reconocimiento y sistemas de transducción, sin embargo, la elección del material biológico/biomimético (elemento de reconocimiento) depende de las características del compuesto o microorganismo a analizar. De igual forma, la escogencia del sistema transductor está condicionada por el tipo de elemento de reconocimiento elegido y el analito, debido a que éstos determinarán cual será la variación en las propiedades físico-químicas que ocurra como consecuencia de su interacción (Matheus, P., 2003). En la tabla 3 se presentan los criterios de clasificación de los biosensores.

Tabla 3. Criterios de Clasificación de los Biosensores.

Tipo de interacción	Detección de la interacción	Elemento de reconocimiento	Sistema de transducción
<ul style="list-style-type: none"> • Biocatalítica • Bioafinidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Directa • Indirecta. 	<ul style="list-style-type: none"> • Enzima • Orgánulo, tejido o célula • Anticuerpo • Ácidos nucleicos • PIM, PNA, aptámero 	<ul style="list-style-type: none"> • Electroquímico • Óptico • Piezoeléctrico • Termométrico • Nanomecánico

Fuente: González y col., 2005.

1.5.2.1.- Tipo de Interacción.

1.5.2.1.1.-Interacción con Sensores Biocatalíticos.

Los sensores biocatalíticos son los biosensores mejor conocidos y los más aplicados. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos que favorecen que ocurra una reacción química en la cual a partir de uno o varios sustratos se forman uno o varios productos, sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser utilizado de nuevo. Estos biocatalizadores pueden ser sistemas que contienen enzimas o sistemas multienzimáticos aislados, orgánulos celulares, células completas, tejidos animales o vegetales en los que estos sistemas se encuentran en su medio natural. Este tipo de dispositivos pueden utilizarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, mediante la detección de la desaparición de algún co-sustrato conocido, distinto de aquel que se quiere detectar o bien por la aparición de algún producto conocido (Wang, L., 2008; González, V. y col., 2005; Matheus, P., 2003).

1.5.2.1.2.- Interacción con Sensores de Bioafinidad.

Estos dispositivos se basan en la interacción del analito de interés con el elemento de reconocimiento, sin transformación catalítica. Esta interacción origina un complejo analito-receptor sin originar el consumo de sustratos ni generación de productos, por lo cual suele utilizarse un marcaje del receptor o bien de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor (González, V. y col., 2005; Matheus, P., 2003).

Los sensores de bioafinidad son considerados muy útiles en la detección de material genético de microorganismos patógenos o de cualquier tipo de sustancias que puedan causar una respuesta inmune, permitiendo el uso de técnicas inmunológicas en la fabricación de los denominados *inmunosensores*. Entre los distintos tipos de receptores de bioafinidad se pueden encontrar anticuerpos, lectinas, receptores, células completas, ácidos nucleicos, polímeros de impresión molecular (PIMs), aptámeros y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) (González, V. y col., 2005; Matheus, P., 2003).

1.5.2.2.- Detección de la Interacción.

En algunos sensores de bioafinidad se utiliza un sistema de *detección indirecta*, donde una enzima acoplada origina una reacción biocatalítica complementaria que es la que se detecta por el sistema de transducción. El inconveniente principal de este tipo de sistema es que se requieren pasos posteriores de lavado y separación del exceso de moléculas marcadas y la adición de sustratos para que ocurra la reacción que cataliza la enzima que se usa como marcaje. También es posible el uso de un sistema de *detección directa*, que permita medir la interacción entre el receptor y el analito basándose en los cambios que se producen en la masa de la superficie, en las propiedades de la luz, etc. (Wang, L., 2008; González, V. y col., 2005; Matheus, P., 2003)

1.5.2.3.-Elemento de reconocimiento.

1.5.2.3.1.-Enzimas.

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos. En una reacción enzimática se produce una unión del sustrato en una región concreta de la enzima denominada centro activo, que comprende un sitio de unión y un sitio catalítico. Una vez formados los productos, la enzima se recupera pudiendo comenzar un nuevo ciclo de reacción. La estabilidad de las enzimas es un factor limitante para el tiempo de vida de un biosensor de tipo enzimático y se utilizan distintas técnicas para aumentarla, como estabilización química y/o inmovilización (González y col., 2005).

1.5.2.3.2.- Orgánulo, Tejido o Célula completa.

Algunos orgánulos celulares son utilizados en el desarrollo de biosensores, debido a que contienen determinados sistemas enzimáticos completos, tal es el caso de los cloroplastos, membranas tilacoides o mitocondrias. De igual forma, existen determinados tejidos vegetales que debido a su función fisiológica en el organismo son una fuente de determinadas enzimas o sistemas enzimáticos que pueden ser utilizados en la detección de diversos analitos (González y col., 2005).

En algunos casos, se utiliza como elemento biológico de reconocimiento una célula completa, que posee múltiples sistemas multienzimáticos en su medio natural. Pueden ser células bacterianas, fúngicas, protozoos o células procedentes de organismos superiores que pueden ser viables o no viables. De igual forma, se pueden utilizar células modificadas genéticamente que expresen enzimas determinadas que no se expresen normalmente o que posean una actividad catalítica mayor (González y col., 2005).

1.5.2.3.3.- Anticuerpos.

Un anticuerpo es una proteína que se une de manera selectiva a una molécula complementaria denominada antígeno (analito). La mayor parte de los biosensores de bioafinidad se basan en reacciones de unión de antígenos a anticuerpos específicos. Existen anticuerpos policlonales y monoclonales. Los policlonales son poblaciones diversas y complejas de anticuerpos que reconocen diferentes regiones del antígeno, mientras que los anticuerpos monoclonales son moléculas idénticas que poseen la misma especificidad. Los anticuerpos policlonales poseen mayor sensibilidad y menor especificidad que los monoclonales, de modo que en función de qué característica se quiera potenciar se elegirán unos u otros. En resumen, la especificidad y afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo determinan la selectividad y la sensibilidad del inmunosensor así como la posibilidad de regeneración (González y col., 2005).

1.5.2.3.4.- Ácidos nucleicos

Los biosensores para el análisis de ADN se basan en el proceso de hibridación, que es la unión de una cadena de ADN con su cadena complementaria. Estos dispositivos, también conocidos como “gene chips” se usan para el reconocimiento y cuantificación de ADNs diana en muestras de interés. La hibridación puede hacerse en disolución o en soportes sólidos y una vez que se ha realizado se utilizan marcajes específicos que se unen a las secuencias hibridadas, como marcajes fluorescentes o enzimáticos. Este tipo de elementos de reconocimiento pueden utilizarse para la detección de organismos modificados genéticamente y microorganismos patógenos (González y col., 2005).

1.5.2.3.5.- PIM, PNA, Aptámero

Los polímeros de impresión molecular o PIM son matrices sintetizadas artificialmente que presentan la capacidad de reconocer e interaccionar de forma específica con determinados compuestos. Los PIM son materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo) (González y col., 2005).

Los ácidos nucleicos peptídicos o PNA (por sus siglas en inglés) son otro tipo de moléculas sintéticas o biomiméticas semejantes al ADN-ARN. Están conformados por un esqueleto de monómeros (N-2-aminoetilglicina) unidos por enlaces peptídicos con bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas. Diferenciándose de los ácidos nucleicos, los PNA no contienen pentosas ni grupos fosfato, factor que representa la principal ventaja de estas moléculas frente a sus análogos naturales debido a su gran afinidad para establecer enlaces con cadenas de ADN y a la falta de repulsión electrostática entre ellas que hace que dichos enlaces sean más fuertes que los existentes entre dos hebras de ADN. Este elemento de reconocimiento se ha utilizado en la detección de microorganismos patógenos junto a transductores ópticos de tipo SPR (González y col., 2005).

Por último, los aptámeros son secuencias de oligonucleóticos (ADN o ARN) de cadena sencilla sintetizada artificialmente, capaz de reconocer diversas moléculas diana con una afinidad y especificidad elevadas. Estas moléculas biomiméticas se asemejan a los anticuerpos, debido a que se pliegan en el espacio y adquieren una conformación con determinadas regiones a las que puede unirse el analito (González y col., 2005).

1.5.2.4.-Sistema de Transducción

El sistema de transducción o transductor es el elemento que convierte las variaciones de las propiedades físicas o químicas, que se producen por la interacción entre el elemento de reconocimiento y el analito, en una señal que puede ser amplificada, almacenada y registrada. En líneas generales los biosensores que han sido diseñados para detectar microorganismos patógenos en alimentos, están combinados con transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, termométricos y nanomecánicos. Sin embargo, la

elección del sistema transductor depende de la naturaleza de la interacción entre el elemento de reconocimiento y la especie de interés (González y col., 2005).

En relación a los biosensores, uno de los transductores más utilizados son los electroquímicos. Estos dispositivos transforman la señal que se produce por la interacción entre el sistema de reconocimiento y el analito en una señal eléctrica, que brinda información analítica cuantitativa o semicuantitativa específica. Existen cuatro tipos de técnicas electroquímicas: conductimétricas, potenciométricas, amperométricas e impedimétricas, estas se diferencian en función de la detección de cambios en la conductividad, en el potencial, en una corriente generada o en la impedancia, respectivamente (González y col., 2005).

Entre las técnicas electroquímicas amperométricas se destacan las voltamétricas. Estas técnicas consisten en la aplicación de un potencial eléctrico a un electrodo, denominado electrodo de trabajo, el cual se encuentra sumergido en una disolución que contiene una especie electroactiva (analito). La intensidad eléctrica que circula por este electrodo es medida en función del potencial aplicado y de la concentración de la especie electroactiva presente. La respuesta en corriente depende del proceso electroquímico, de las condiciones hidrodinámicas y del potencial aplicado (Vásquez, M., 2007; Pavoni, S. y col., 2006; González y col., 2005). Existen diferentes técnicas voltamétricas que se diferencian básicamente en función del potencial que se le aplica al electrodo de trabajo, entre éstas se pueden mencionar:

- ❖ Voltametría de Barrido lineal
- ❖ Voltametría cíclica
- ❖ Voltametría de pulso normal
- ❖ Voltametría de pulso diferencial
- ❖ Voltametría de onda cuadrada

En esta investigación se utilizaron la voltametría cíclica y la voltametría de pulso diferencial, por lo tanto se dará una breve información sobre ambas técnicas. La voltametría cíclica se puede definir como una técnica electroquímica caracterizada por la aplicación de un barrido de potencial repetitivo al electrodo de trabajo, tanto en el sentido directo como en el inverso,

es decir realizando lo que se denomina barrido de potencial en forma de diente de sierra. Este barrido de potencial se inicia en un valor inicial (E_1) hasta un valor final o de corte (E_2), y al llegar a éste, el sentido del barrido se invierte (Vásquez, M., 2007; Pavoni, S. y col., 2006). En las figuras 5 y 6 se muestran la función de diente de sierra potencial-tiempo y la respuesta de la voltametría cíclica, respectivamente.

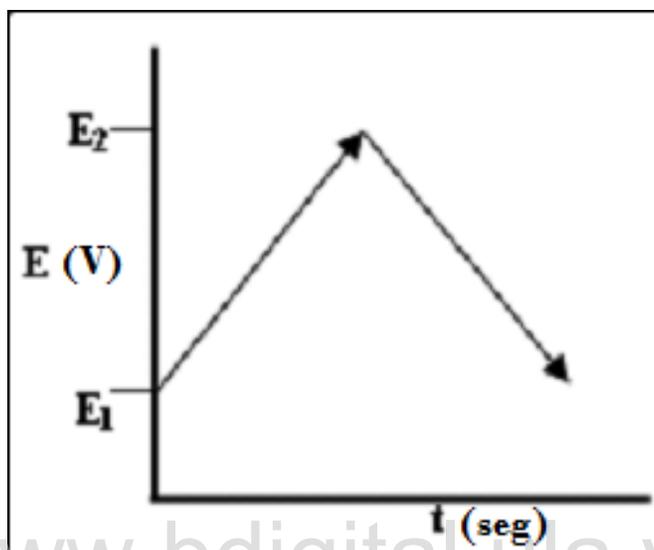


Figura 5. Función en forma de diente de sierra potencial-tiempo

Fuente: Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935.

El potencial aplicado al electrodo de trabajo varía entre dos valores, cuyo rango se denomina ventana de potencial, dicho proceso puede repetirse por varios ciclos, por lo cual se denomina a esta técnica voltametría cíclica. Estos ciclos se realizan a una determinada velocidad de barrido, establecida de igual forma que la ventana de potencial, de acuerdo al sistema electroquímico en estudio (Márquez, O., 2012).

En los ciclos, el barrido de potencial puede ser iniciado en cualquier sentido (anódico o catódico). Considerando que el barrido se inicia en el sentido anódico (reacción de oxidación), al alcanzar el valor adecuado de potencial para que comience la reacción de oxidación (potencial de pico anódico (E_{p_a})), la corriente aumenta notablemente hasta alcanzar un valor máximo (corriente de pico anódico (I_{p_a})). Posteriormente, la especie que

reacciona es consumida en la superficie del electrodo lo que ocasiona una caída en la corriente de oxidación a medida que se aumenta el potencial (Vásquez, M., 2007; Pavoni, S. y col., 2006).

De igual forma, una vez que se alcanza el valor de potencial anódico y posteriormente el potencial final (**E_f**), el barrido de potencial es invertido y se obtiene una disminución de corriente catódica (corriente de pico catódico (**I_{pc}**)) (reacción de reducción) a un valor determinado de potencial denominado potencial de pico catódico (**E_{pc}**). Este ciclo finaliza a un valor de potencial que coincide con el potencial inicial (**E₁**). Las corrientes obtenidas en los puntos máximos, llamadas corriente de pico anódico (**I_{pa}**) y corriente de pico catódico (**I_{pc}**), son dos valores importantes para el análisis del proceso de óxido reducción de la especie (Vásquez, M., 2007).

No obstante, en la voltametría cíclica no siempre se generan picos sino que puede evidenciarse ondas. En este particular, el potencial de media onda (**E_{p/2}**) es un parametro importante correspondiente a un valor de potencial, al cual la corriente es igual a la mitad de la corriente de pico ($I_{p/2} = \frac{1}{2} I_p$). Puede ser determinado un potencial de media onda tanto anódico como catódico. Este parametro nos permite definir la forma de un pico voltametrico mediante la diferencia entre el potencial de pico (**E_p**) y el potencial de media onda (**E_{p/2}**), ayudando a determinar la reversibilidad o irreversibilidad de un proceso electroquímico. (Márquez, O., 2012; Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935). En la figura 6 se muestra la respuesta de un voltamograma cíclico.

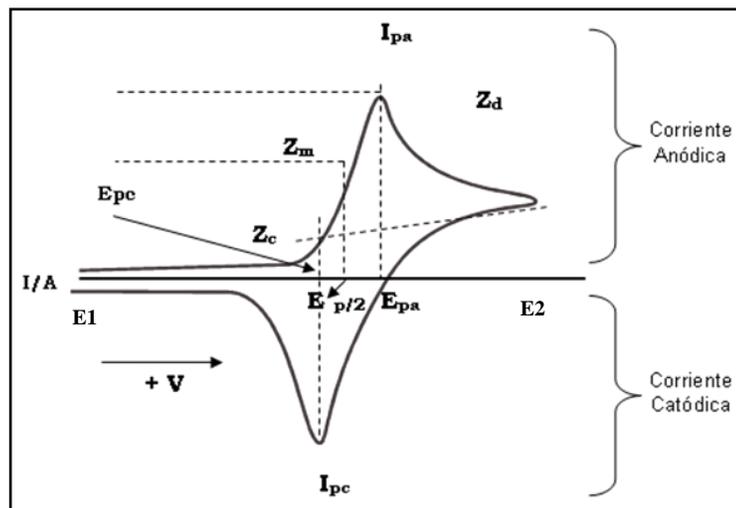


Figura 6. Respuesta de la Voltametría Cíclica.

Fuente: Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935.

Entre las ventajas que ofrece la voltametría cíclica se encuentran la posibilidad de caracterizar el sistema electroquímico, estimar el potencial redox de dicho sistema, proporcionar información acerca de la velocidad de transferencia electrónica entre el electrodo y el analito, estudiar la estabilidad del analito en sus diferentes estados de oxidación y resaltar las características del electrodo de trabajo (Matheus, P., 2009; Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935).

La Voltametría de Pulso Diferencial es una técnica basada en aplicar al electrodo de trabajo una señal de excitación que consiste en un tren de pulsos de forma escalonada en el que el potencial inicial que se aplica varía gradualmente con el tiempo. Inicialmente, se aplica un potencial base de tal magnitud que no ocurra reacción faradaica. A partir de este valor inicial se incrementa la amplitud del pulso en valores iguales de ΔE . El potencial de base o inicial aumenta gradualmente en intervalos entre 10 y 100 mV, ajustando la duración de cada pulso entre 5 y 100 ms., con intervalos entre pulsos de 2 a 4 segundos. Como consecuencia se superponen pequeños pulsos de potencial a la rampa lineal de potencial (Figura 7). Posteriormente, la corriente que se registra es producto de la sustracción de la segunda

corriente menos la primera, graficando esta diferencia en función del potencial aplicado (Figura 8) (Menolasina, S., 2004).

El uso de pulsos escalonados minimiza los efectos de la corriente de carga capacitiva y mejora la relación señal-ruido, mejorando a su vez el límite de detección. Cuando ambos potenciales (los potenciales antes y después del pulso), están lejos del potencial formal del analito en solución, la corriente farádica será la misma. Sin embargo, cuando al menos uno de esos potenciales se encuentra en la porción de crecimiento de la corriente de onda voltamperométrica, se medirá una corriente farádica significativa (Menolasina, S., 2004; Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935).

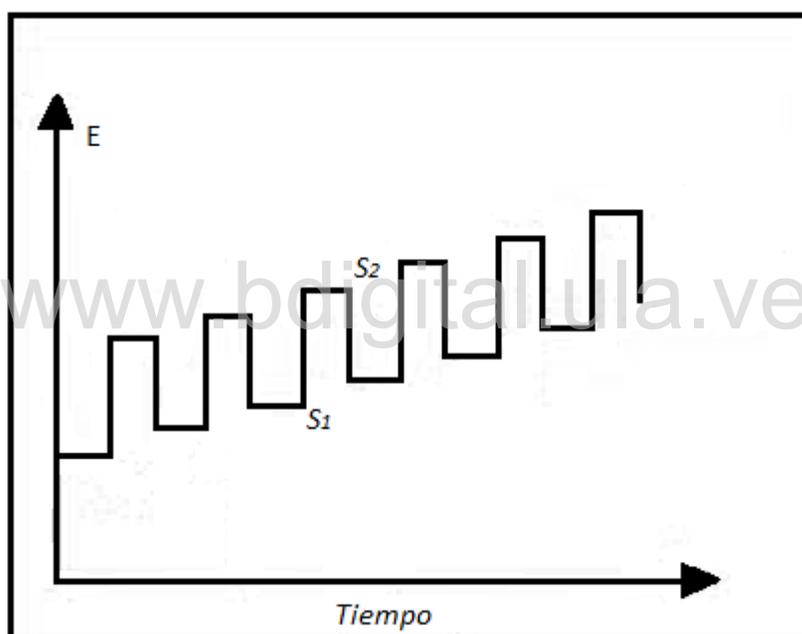


Figura 7. Señal de excitación en pulsos de potencial en función del tiempo.

Fuente: Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935.

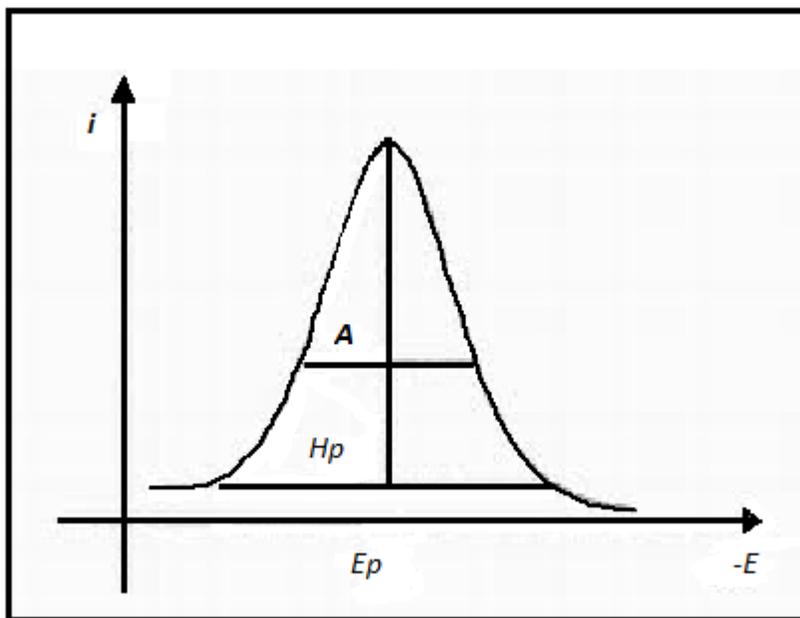


Figura 8. Respuesta electroquímica de la Voltametría de Pulso Diferencial.

Fuente: Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935.

www.bdigital.ula.ve

1.6.- Técnicas de Inmovilización.

Una etapa fundamental en la construcción de un biosensor es la inmovilización del elemento de reconocimiento sobre una membrana o matriz, que a su vez se fija a la superficie del transductor. En este aspecto, se ha diseñado una serie de técnicas de inmovilización físicas y químicas con el fin de lograr la inmovilización apropiada del componente biológico (elemento de reconocimiento) y a su vez la detección adecuada del analito. Es por ello que la técnica de inmovilización elegida debe ser específica y controlada. La elección de uno u otro procedimiento de inmovilización depende de la naturaleza del elemento biológico, el tipo de transductor, las propiedades físico-químicas del analito y las condiciones de trabajo del biosensor (Matheus, P., 2003). En la tabla 4 se presentan las técnicas de inmovilización más comunes utilizadas en la fabricación de biosensores.

Tabla 4. Técnicas de inmovilización más comunes en la fabricación de biosensores.

Técnica de Inmovilización	Descripción	Matriz	Ventajas	Inconvenientes
Adsorción (Física)	Unión del elemento de reconocimiento a la matriz mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals.	<ul style="list-style-type: none"> • Celulosa. • Gel de sílice. • Colágeno. • Hidroxiapatita • Acetato. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sencilla. • Bajo costo. • Matriz regenerable. • Sin modificaciones en Elemento de Reconocimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Unión débil. • Pérdida de elemento de reconocimiento por condiciones extremas. • Control estricto del proceso.
Atrapamiento en Geles o Fibras (Física)	Retención física del Elemento de reconocimiento en las cavidades interiores de la matriz.	<ul style="list-style-type: none"> • Geles: agar, nylon, almidón, poliacrilamida. • Matrices electródicas compositas rígidas: grafito-teflón o grafito-resina epoxi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sencilla. • Bajo costo. • Se necesita poca cantidad de Elemento de reconocimiento. • Sin modificaciones en Elemento de reconocimiento. • Proximidad entre elemento de reconocimiento y el transductor 	<ul style="list-style-type: none"> • Unión débil. • Control estricto de la polimerización de la matriz. • No regenerable.
Entrecruzamiento (Química)	Uniones irreversibles entre los elementos de reconocimiento, mediante reactivos funcionales.	Reactivos: <ul style="list-style-type: none"> • Glutaraldehído • Hexametilendi-isocianato. • 2,4dinitrobenzoceno. 	<ul style="list-style-type: none"> • Costo moderado. • Estable en condiciones extremas. • Mínima pérdida del Elemento de Reconocimiento. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento con sustancias químicas tóxicas. • No regenerable.
Unión covalente (Química)	Uniones covalentes del elemento de reconocimiento con grupos químicos activados de la matriz o directamente del transductor.		<ul style="list-style-type: none"> • Manipulación sencilla. • Estable en condiciones extremas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración del elemento de Reconocimiento (centro activo en enzimas). • Inadecuado para elementos de Reconocimiento muy sensibles (pH,temperatura) • No regenerable. • Tratamiento con sustancias tóxicas. • Costo elevado.
Afinidad por Reconocimiento Específico (Química)	Inmoviliza biomoléculas mediante afinidad	<ul style="list-style-type: none"> • Avidina • Proteína A y G 		<ul style="list-style-type: none"> • Orientación de las biomoléculas.

Nota: En ciertos procedimientos de inmovilización de enzimas ocurre un proceso de adsorción (Física) seguido por un entrecruzamiento (Química).

Fuente: Matheus, P., 2009.

Adicionalmente, un elemento muy importante en el desarrollo de un biosensor es la integración del elemento de reconocimiento al electrodo con el fin de conseguir una comunicación óptima entre ambos componentes. Algunos métodos como atrapamiento en hidrogeles generados in situ, adsorción mediante interacciones hidrófobas o iónicas, etc., son de difícil control, poco reproducibles y no aseguran una orientación adecuada del elemento de bioconocimiento con respecto a la superficie del electrodo. Sin embargo, “un método de inmovilización ideal debería dar lugar a un recubrimiento controlado de biomoléculas unidas específicamente, reversiblemente y en determinadas circunstancias orientadas a voluntad” (Matheus, P., 2007; Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935).

La reversibilidad de la unión del elemento de reconocimiento al transductor permite la sustitución de moléculas inactivas por otras nuevas activas; la especificidad, permite la inmovilización selectiva de una molécula determinada entre las presentes en una mezcla compleja evitando las purificaciones previas; y la inmovilización orientada, elimina los impedimentos estéricos para la accesibilidad del analito, exponiendo el sitio de unión del mismo (Matheus, P., 2007; Nicholson, R. y col., 1964; Randles, J., 1952; Kolthoff, I., 1935).

1.6.1.-Monocapas Autoensambladas

Las monocapas autoensambladas son entramados moleculares formados espontáneamente por inmersión de una superficie apropiada en una disolución de una molécula anfifílica que se quimisorbe sobre el sustrato (Matheus, P., 2003).

Los átomos de azufre coordinan fuertemente con el oro, debido a un proceso de quimisorción oxidativa en el que tiene lugar la adición del enlace S-H a la superficie del oro, lo cual origina la eliminación reductiva de hidrógeno (Matheus, P., 2003), según la siguiente reacción:



Las monocapas autoensambladas de tioles (SAM) generadas por simple inmersión de oro limpio en una disolución de un tiol adecuado han sido utilizadas para la inmovilización de

elementos de reconocimiento biológicos. En este aspecto esta metodología ilustra la versatilidad de las monocapas autoensambladas funcionalizadas en unión a la ingeniería genética de proteínas, como plataforma para el diseño de arquitecturas supramoleculares funcionales. Además, investigaciones previas han demostrado que estas monocapas son muy apropiadas para la realización de estudios electroquímicos, dada su buena estabilidad y permeabilidad a iones y moléculas de disolvente. Por tanto, este tipo de estrategia de inmovilización será utilizada en este trabajo (Matheus, P., 2008; Grigorenko, V., 1999).

1.7.- Inmunosensores.

Los inmunosensores o biosensores inmunológicos son sensores químicos con una especie inmunológica como elemento de reconocimiento. Estos dispositivos son capaces de dar una señal analítica a partir de la formación del complejo inmunológico (unión antígeno-anticuerpo), por tanto, la especificidad y afinidad de esta interacción determinan la selectividad y la sensibilidad del inmunosensor así como la posibilidad de su regeneración (Zacco, E., 2006).

Los componentes del complejo inmunológico, fundamento de los inmunosensores, son el antígeno y el anticuerpo. Los antígenos son agentes externos (virus, bacterias, parásitos, etc.) que generan la activación del sistema inmunológico y consecuentemente la formación de anticuerpos que inhiban o neutralicen la acción del antígeno en el organismo (Zacco, E., 2006).

Los anticuerpos o inmunoglobulinas, elementos de reconocimiento utilizados en inmunosensores, son glicoproteínas cuyo peso molecular aproximado es de 150 kD. Existen cinco tipos de inmunoglobulinas: IgA, IgE, IgM, IgD e IgG. Las inmunoglobulinas G y M son las más utilizadas en inmunoensayos. La estructura básica de los anticuerpos o inmunoglobulinas consiste en cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, unidas entre si por puentes disulfuro (Zacco, E., 2006).

En esta estructura proteica se distinguen regiones variables denominadas Fracciones o Fragmentos Variables (Fab). Estos fragmentos corresponden al extremo N-terminal de las dos cadenas pesadas y de las dos cadenas ligeras. Estas regiones varían de acuerdo al tipo de

inmunoglobulinas y están caracterizadas por estar ubicadas hacia el extremo amino terminal de la proteína donde se ubican los centros de unión al antígeno (Zacco, E., 2006).

De igual forma, existen regiones relativamente constantes en todas las inmunoglobulinas, las cuales son denominadas Fracciones o Fragmentos constantes (Fc). Estas se caracterizan por estar ubicadas en el extremo carboxílico de la proteína, ser específicas de cada especie y estar constituidas por la región constante de las dos cadenas pesadas. De estas regiones dependen ciertas funciones de las inmunoglobulinas como la fijación al complemento, la unión a macrófagos o en el caso de los inmunosensores, el punto de inmovilización de este elemento de reconocimiento (Zacco, E., 2006).

Entre las fracciones variables y constantes, se encuentra una región denominada Región Bisagra, la cual tiene la propiedad de conferirle al anticuerpo cierta flexibilidad requerida para la unión con el antígeno (Zacco, E., 2006). En la figura 8 se muestra la estructura general de un anticuerpo.

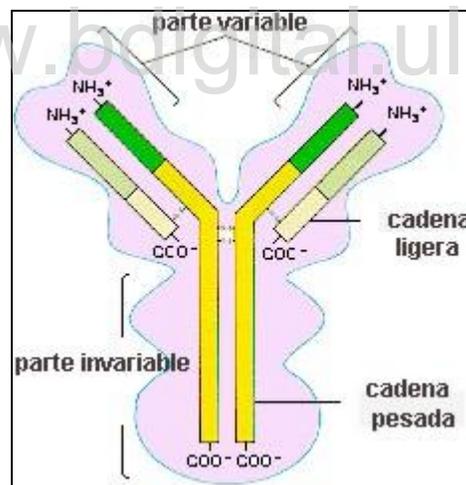


Figura 9. Estructura general de un anticuerpo.

Fuente: Zacco, E., 2006.

La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo por su antígeno correspondiente se basa en las conformaciones de la región variable, debido a que la zona de enlace de un anticuerpo consta de residuos de aminoácidos que interaccionan con la zona complementaria del antígeno. Esta característica hace de los anticuerpos una biomolécula altamente específica,

capaz de diferenciar pequeñas variaciones en la estructura de su antígeno complementario (Zacco, E., 2006).

La afinidad, resultante de las fuerzas de atracción y repulsión entre un anticuerpo y su antígeno correspondiente, se debe a fuerzas no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals, por tanto, pequeños cambios en la estructura del antígeno puede alterar la afinidad de la unión antígeno-anticuerpo (Zacco, E., 2006).

En la actualidad, diversas investigaciones reportan la elaboración de inmunosensores para la detección de *Escherichia coli*, entre éstas, un biosensor de reconocimiento inmunoespecífico con detección de masa ultra-sensible mediante el uso de una microbalanza de cristal de cuarzo (QCM). El fundamento de este dispositivo es la unión de la bacteria con anticuerpos inmovilizados, lo que ocasiona una disminución en la frecuencia de resonancia del sensor, correlacionada con un aumento de la concentración bacteriana (Zhu, P., 2005; Matheus, P., 2003).

Así mismo, existen biosensores que utilizan técnicas inmunológicas tipo sándwich para la captura y detección de *Escherichia coli*; mediante un dispositivo se colocan e inmovilizan anticuerpos en una superficie de un capilar de vidrio, realizando la detección y cuantificación de la bacteria mediante la medición de la fluorescencia emitida desde el capilar. Otras investigaciones, reportan la fabricación de un biosensor conformado por un electrodo de oro funcionalizado con anticuerpos policlonales contra *E. coli* O157:H7. (Zhu, P., 2005; Radke, S., y col. 2005).

De igual forma, algunos autores han utilizado las técnicas electroquímicas e inmunológicas para la detección simultánea de patógenos, tal es el caso, de un dispositivo diseñado para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhimurium*. Este dispositivo se basa en la utilización de un semiconductor de quantum, anticuerpos anti-*E. coli* O157, anti-*Salmonella* y medición de los niveles de fluorescencia. En este ensayo se diferencian las mediciones de fluorescencia de ambas especies, por lo cual este método puede ser utilizado como principio para la detección de múltiples especies bacterianas de manera simultánea (Yang, L. y col., 2006).

En resumen, las ventajas que poseen los inmunosensores frente a las técnicas clásicas de diagnóstico y otros biosensores provienen de la proximidad del material biológico y el transductor, lo cual permite obtener una mayor sensibilidad, generar una señal medible en un menor tiempo de reacción, simplificar el proceso de análisis, intervenir en la posible regeneración del inmunosensor, en la posibilidad de su miniaturización y en su uso en trabajos de campo (Zacco, E., 2006).

Es importante resaltar el auge de una nueva tecnología en los biosensores, basada en métodos moleculares utilizando ADN o ARN para la detección de microorganismos patógenos. Esto consiste en la utilización de un *biochip* electroquímico para la detección de *Escherichia coli* en carne, cuyo principio es la hibridación de ARN-ADN. De igual forma, se han fabricado sensores compuestos por una doble o simple cadena de ADN unida a un electrodo y a determinadas proteínas, con el fin de la detección de múltiples patógenos incluyendo *Escherichia coli*. Existen también biosensores que permiten una detección indirecta de los microorganismos, entre los que se incluye detección mediante marcaje con fluorescencia, detección de metabolitos microbianos, etc. (Heidenreich, B. y col., 2010; Ricci, F. y col., 2009; Matheus, P., 2003). En la tabla 5 se presentan diversos biosensores desarrollados para la detección de patógenos de origen bacteriano.

Tabla 5. Biosensores para la detección de patógenos de origen bacteriano (Velasco, M. y col., 2003; Leonard, P., 2003; Patel, P., 2002; Hall, R., 2002; Ivnitiski, D., y col. 1999).

Sistema de transducción	Elemento de reconocimiento	Microorganismo (Antígeno)
Electroquímico	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli 0157:H7</i> <i>Campylobacter</i> , <i>S. aureus</i>
Light-addressable potentiometric sensor (LAPS)	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli 0157:H7</i> <i>B. subtilis</i> , <i>Y. Pestis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Brucella melitensis</i>
Impedimétrico	-----	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
Piezoeléctrico (QCM)	Anticuerpos, receptores Proteína A	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Yersinia pestis</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>
Piezoeléctrico (SAW)	Anticuerpos	<i>E. coli</i> , <i>Legionella</i> , <i>Salmonella</i>
Nanoelectromecánico	Anticuerpos	<i>E. coli 0157:H7</i>
SPR	Anticuerpos	<i>E. coli 0157:H7</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>B. subtilis</i>
Resonancia de espejos	Anticuerpos	<i>S. Aureus</i>
Bioluminiscencia	-----	<i>Mycobacterium avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>
FIA	Anticuerpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>V cholerae</i> , <i>E. coli</i>
Interferometría óptica	Anticuerpos	<i>Salmonella typhimurium</i>
Fibra óptica	Anticuerpos	<i>E. coli 0157:H7</i> , <i>S. aureus</i>

QCM : Microbalanza de Cristal de Cuarzo; SAW: Onda Acústica de Superficie; SPR: Resonancia de Plasmon Superficial; FIA: Inmunoensayo de Fluorescencia.

Por último, se debe tener en cuenta que los biosensores no suponen una tecnología de sustitución de las técnicas analíticas convencionales, sino que representan alternativas interesantes para demandas concretas. Frente al carácter general de tecnologías convencionales, los biosensores son específicamente diseñados para la detección y/o cuantificación de uno o pocos analitos, como respuesta a problemas concretos, combinando así las diferentes tecnologías implicadas en los elementos de reconocimiento, los sistemas de inmovilización y los sistemas de transducción de señal (Matheus, P., 2003).

www.bdigital.ula.ve

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Escherichia coli* ha sido asociada a grandes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. En los últimos años, se presentó uno de los brotes más importantes a nivel mundial y el más grande en Europa, continente donde se infectaron más de 270 personas con este patógeno, originando diez fallecimientos a causa del Síndrome Hemolítico Urémico (SHU). En este brote, el país más afectado fue Alemania, sin embargo, se presentaron casos aislados en Suecia, Dinamarca, Holanda y Gran Bretaña. La *Escherichia coli* O157:H7 representa el serotipo prevalente en muchas partes del mundo y uno de los más estudiados en alimentos. Se ha comprobado la presencia de este patógeno en diversos productos como leche cruda, crema de leche, quesos elaborados con leche cruda, carnes y aguas de consumo humano siendo asociado a diversas patologías desde diarreas esporádicas, colitis hemorrágica, púrpura trombocitopénica trombótica y síndrome urémico hemolítico (Centro Europeo de Prevención y Control de las Enfermedades., 2011; Reuben, A. y col., 2003; Jay, J., 1994).

Existen políticas de detección, control y prevención de brotes ocasionados por diferentes serotipos de *Escherichia coli*, las cuales se basan en estrategias de vigilancia epidemiológica, políticas destinadas al control de la industria de la carne y lácteos principalmente, e implementación de estrategias de prevención que apuntan a la educación de la población. De igual forma, como estrategia epidemiológica es de gran importancia la determinación de estas bacterias en diversos alimentos, mediante la implementación de técnicas rápidas, sensibles y específicas (Reuben, A. y col., 2003). Por consiguiente, en nuestro trabajo nos planteamos el diseño y la construcción de un inmunosensor electroquímico para la detección de *Escherichia coli* y su aplicación en muestras de aguas de uso humano.

III.- OBJETIVOS

3.1.-Objetivo General.

Diseñar, Construir y Caracterizar un inmunosensor electroquímico para la detección de *Escherichia coli* en muestras de aguas de uso humano.

3.2.-Objetivos Específicos.

1. Examinar la afinidad de las biomoléculas (antígeno y anticuerpo) sobre superficies de electrodos de oro limpias y modificadas con tiourea.
2. Optimizar y caracterizar las monocapas autoensambladas de tioles como mecanismo de inmovilización de anticuerpos.
3. Optimizar los diferentes parámetros físicos y químicos para la utilización de métodos electroquímicos en la detección de *Escherichia coli*.
4. Detectar la presencia de *Escherichia coli* en muestras de aguas (de río y potable).

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.-Microorganismo y Medio de cultivo.

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y medio de cultivo nutritivo. Se sembraron las muestras certificadas por triplicado en el medio de cultivo y se incubaron por 24 horas, para su posterior utilización. Las muestras fueron preparadas en el Laboratorio de Medios de Cultivo de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

4.2.-Diseño y Preparación del Inmunosensor para la Detección de *Escherichia coli*.

En la actualidad, son requeridas técnicas sensibles, rápidas y económicas cuyo resultado sea utilizado como alarma para la detección de algunos microorganismos. La detección inmunológica de bacterias, virus, parásitos y toxinas ha demostrado ser más sensible, específica y reproducible, debido en gran parte a la producción de anticuerpos específicos de manera rápida y económica. En este aspecto, el desarrollo de biosensores, específicamente inmunosensores, ha favorecido la detección de diversos microorganismos en el área alimentaria, bioanalítica y medioambiental (Zacco, E., 2006).

Por consiguiente, el diseño de inmunosensores se ha basado en una serie de pasos que permitan la detección del microorganismo de interés; estos pasos implican:

- La selección y preparación del transductor.
- Selección del Biorreceptor Inmunológico (anticuerpo).
- Inmovilización del Biorreceptor inmunológico en la superficie del transductor.
- Transducción del evento de Bioreconocimiento (unión antígeno-anticuerpo).

4.2.1.-Selección y Preparación del Transductor.

Como principales criterios de selección del transductor electroquímico se consideran aspectos fundamentales como el comportamiento electroquímico del material y su capacidad para inmovilizar el biorreceptor (anticuerpo) preservando su estructura y su función biológica (Zacco, E., 2006).

Para esta investigación seleccionamos como material transductor un electrodo de hilo de oro con 99,99% de pureza, 0,50 mm de diámetro y 15 mm de longitud. Este tipo de material ha sido utilizado ampliamente para inmovilizar inmunocomplejos debido a su gran capacidad de adsorber moléculas que contengan compuestos con azufre, nitrógeno y oxígeno. Adicionalmente, se ha seleccionado como electrodo auxiliar o contraelectrodo un hilo de platino con 99,99% de pureza y un electrodo de referencia Ag/AgCl en solución saturada de KCl 3M (Matheus, P., 2007; Sánchez, J., 2007; Jung, B. y col., 2005; Zhu, P., 2005).

4.2.1.1.- Preparación de los Electrodo de oro.

Para la preparación de las superficies de oro, se realizó una limpieza con diferentes lijas (desde la gris (15 micras y grano 600), azul (9 micras y 1200 grano) hasta la rosa (3 micras y 4000 grano)), se pulió con gamma-alúmina 3 (0,05 micrón) sobre una almohadilla de pulido de metal y seguidamente se lavó con agua de 18 MΩ. Por último, se realizó una limpieza en baño ultrasónico durante 20 m. en medio etanol-H₂O (2:1) y se dejó secar al aire (Sánchez, J., 2007). En la figura 9 se muestra el esquema de preparación de la superficie de oro.

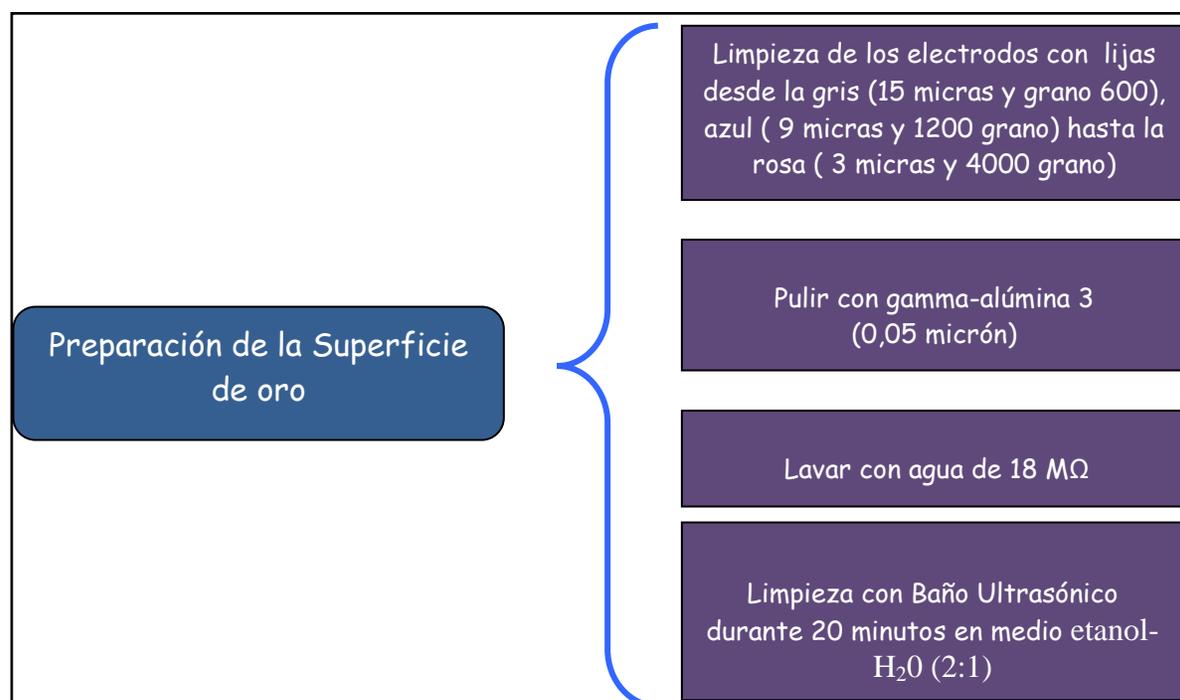


Figura 10. Esquema de Preparación de la Superficie de Oro.

4.2.2.-Selección del Biorreceptor Inmunológico.

El principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre el compuesto o microorganismo de interés y el elemento de reconocimiento. En la práctica, la elección del material biológico o biomimético depende de las características del compuesto a analizar (González y col., 2005).

En este trabajo se planteó la detección de *Escherichia coli* mediante el desarrollo de un inmunosensor electroquímico, donde se ha elegido como elemento de reconocimiento una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos contra *E. coli* O 25:(K 11), O 78:(K 80), O 103:(K -), O 118:(K -), O 124:(K 72), O 145:(K -), O 157:(K -), O 164:(K -) (Enteroclone Anti-coli, Sifin).

4.2.3.-Inmovilización del Biorreceptor inmunológico en la superficie del transductor.

Existen diversas técnicas de inmovilización de elementos de reconocimiento en la preparación de los biosensores (Tabla N° 4, pág. 51), sin embargo, en el caso específico de los inmunosensores es necesaria una inmovilización que oriente adecuadamente al elemento de reconocimiento para realizar su función biológica, lo que garantiza sensibilidad y selectividad en el inmunoensayo y la posterior orientación del antígeno para lograr la reacción de bioreconocimiento (unión antígeno-anticuerpo). Por tanto, la inmovilización debe estar orientada a lograr la mejor interacción específica del tipo ligando-receptor. (Matheus, P., 2007; Zacco, E., 2006).

En este trabajo se planteó la inmovilización del biorreceptor inmunológico (anticuerpo específico contra *E. coli*) mediante la formación de monocapas autoensambladas sobre la superficie de oro. Para formar las monocapas orientadas y ordenadas sobre la superficie del metal, se planteó el uso de compuestos anfifílicos con átomos de azufre en uno de sus extremos y grupos aminos en el otro.

Al unir los átomos de azufre a la superficie de oro, el extremo con los grupos aminos de la molécula anfifílica queda libre para fijar el fragmento constante (Fc) de los anticuerpos conformados por grupos carboxílicos de la proteína. De esta forma, se plantea inmovilizar el

elemento de reconocimiento mediante la preparación de monocapas autoensambladas de tioles sobre superficie de oro. Esta metodología permite exponer al medio, ligandos con afinidad específica (anticuerpos) por un analito particular (antígeno), proporcionando una estructura molecular ordenada bidimensional que se obtiene tras la quimisorción oxidativa de tioles sobre superficies de oro, la cual permitirá la inmovilización de los anticuerpos que interactuarán con la *Escherichia coli* (antígeno) (Matheus, P., 2008; Matheus, P., 2007).

4.2.3.1.-- Formación de monocapa de tioles (SAMs).

Para la formación de las monocapas autoensambladas de tioles se utilizó la tiourea (compuesto tiolado con un átomo de azufre). Una vez que los electrodos de oro fueron limpiados, se sumergieron durante 24 horas en una disolución 5 mM de tiourea preparada en etanol-H₂O (2:1). Posteriormente, se lavaron con una mezcla etanol-H₂O (2:1) durante 5 minutos y se secaron al aire (Figura 11) (Sánchez, J., 2007; Matheus, P., 2003).

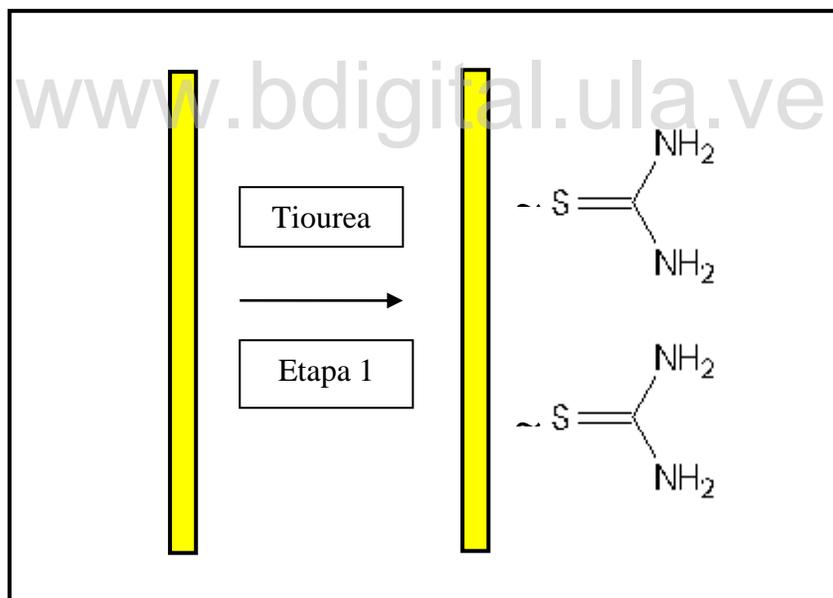


Figura 11. Formación de una monocapa de tiourea. (SAM/TOU).

4.2.3.2.- Inmovilización de los anticuerpos contra *Escherichia coli*.

Para la inmovilización del elemento de bioreconocimiento se incubaron los electrodos de oro modificados con tiourea en disoluciones de anticuerpos contra *Escherichia coli* durante 1 hora, a temperatura ambiente, con el fin de formar una monocapa tiourea – anti *E. coli*. Posteriormente, los electrodos se secaron al aire (Ver Figura 12).

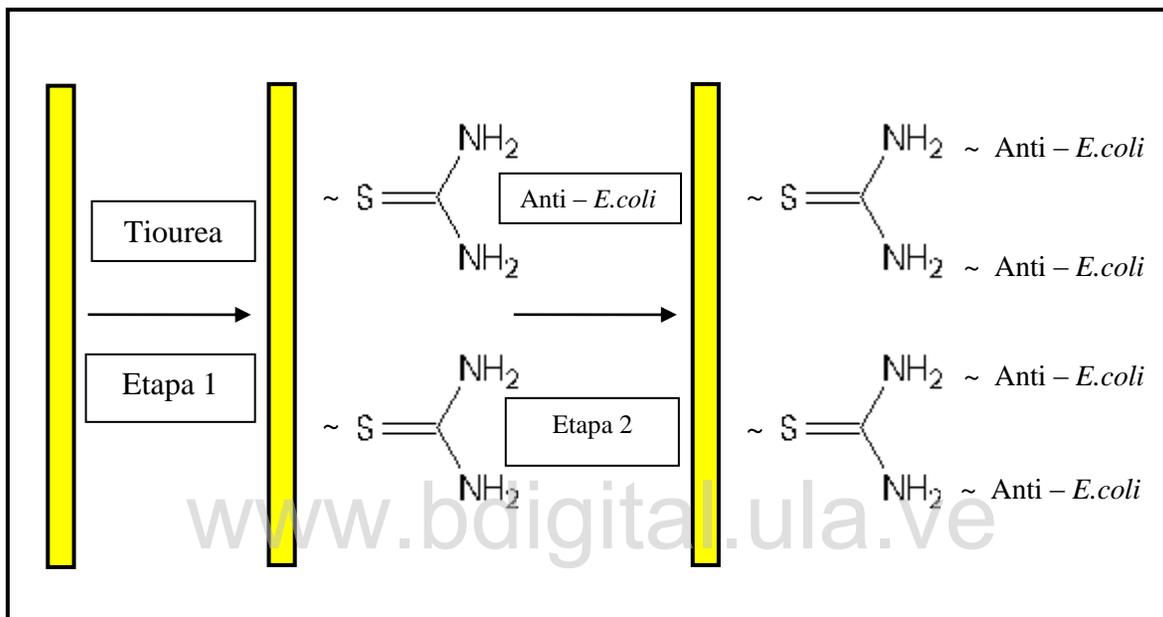


Figura 12. Inmovilización de los anticuerpos contra *Escherichia coli*.

4.2.4-Transducción del evento de Bioreconocimiento.

El sistema de transducción del inmunosensor diseñado en esta tesis, se basó en técnicas amperométricas específicamente las voltametrías. Una vez modificados los electrodos y antes de medir la respuesta de la *Escherichia coli* se optimizaron las condiciones de trabajo con respecto a pH, ventana de potencial, velocidad de barrido y tiempo de burbujeo de nitrógeno.

Luego de la optimización de los parámetros, se realizaron voltametrías cíclicas para comprobar la inmovilización del anti-*E. coli* y la posterior detección de la *Escherichia coli*. En la figura 13 se presenta el esquema metodológico para la fabricación del inmunosensor para la detección de *Escherichia coli*.

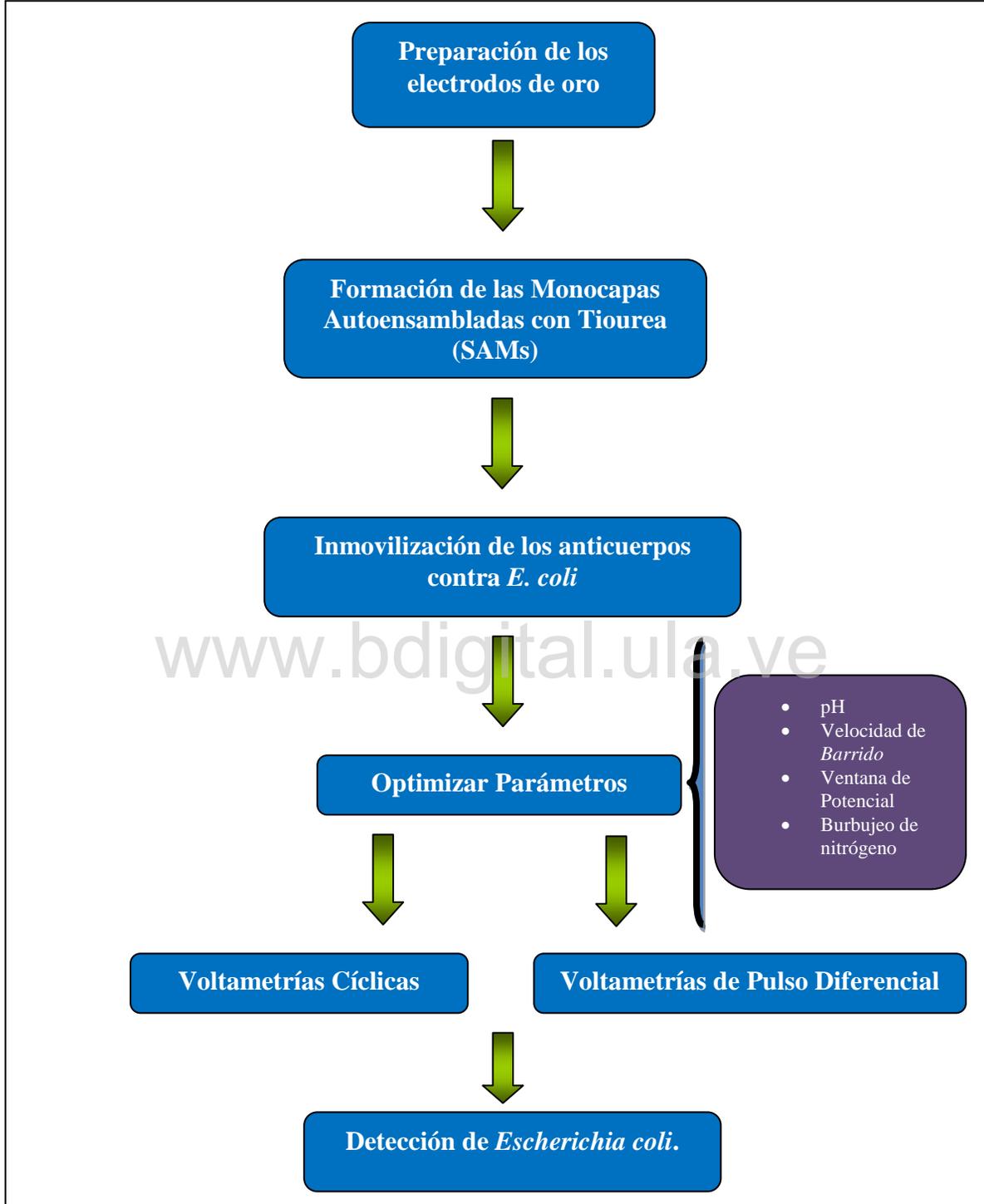


Figura 13. Esquema metodológico en la fabricación de un Inmunosensor para la detección de *Escherichia coli*.

4.3.- Materiales.

- **Celda Electroquímica.**

Se utilizó un celda construida en vidrio que consta de un sólo compartimiento, en donde se ubicaron los diferentes electrodos y la solución electrolítica. Esta celda fue conectada a una bomba de nitrógeno y al potenciostato.

- **Electrodos.**

Se utilizaron tres electrodos:

a.- Electrodo de trabajo: un hilo de oro con 99,99% de pureza, de 0,50 mm de diámetro y una longitud de 15mm.

b.- Electrodo auxiliar (contraelectrodo): electrodo de platino con 99,99% de pureza.

c.- Electrodo de referencia: hilo de plata en solución saturada de KCl 3M.

- **Equipos.**

Se utilizó un potenciostato, el cual es un analizador Autolab conectado a un PC.

- **Reactivos.**

- **Tiourea 5mM.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Merck, 99% de pureza), disolviendo 0,002 g. en 5mL de solución etanol-agua 18 MΩ (2:1).

- **Anticuerpo Anti-Coli.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Enteroclone Anti-coli, Sifin) reconstituyendo el liofilizado en 5mL de agua 18 MΩ.

○ **Soluciones Electrolíticas:**

▪ **Tampón Fosfato 50 mM en KCl 0,1 M.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Sigma, 99,0% de pureza), disolviendo 1,72 g. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1,86 g. de KCl (Anala R, 99,8% de pureza) en 250 mL de agua 18 MΩ.

▪ **Cloruro de Potasio (KCl) 0,1 M.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Anala R, 99,8% de pureza), disolviendo 1,86 g. en 250 mL de agua 18 MΩ.

▪ **Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Sigma Aldrich, 96-98% de pureza) diluyendo 6,9 mL en 250 mL de agua 18 MΩ.

○ **Soluciones reguladoras de pH.**

▪ **Hidróxido de potasio (KOH) 0,1 M.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Merck, 85% de pureza), disolviendo 0,28 g. en 50 mL de agua 18 MΩ.

▪ **Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 M.**

Se preparó a partir del compuesto comercial (Sigma Aldrich, 96-98% de pureza), diluyendo 0,3 mL en 50 mL de agua 18 MΩ.

○ **Otros materiales y reactivos.**

- Gamma alúmina 3 (0,05 micrón)
- Cilindro de nitrógeno.
- Lijas (gris (15 micras y grano 600); azul (9 micras y 1200 grano) y rosa (3 micras y 4000 grano)).
- Almohadillas.

V.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1.- Preparación y Caracterización electroquímica de los electrodos de oro.

La preparación de los electrodos de oro se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 4.2.1.1 (p. 62). La voltametría cíclica en H_2SO_4 0,5 M de un electrodo de hilo de oro se presenta en la figura 14, donde se observan los picos anódico y catódico, del óxido. Estos picos se encuentran próximos a +1,3 V y +0,93 V respectivamente, característicos de una superficie de oro policristalina limpia. A partir del pico de reducción a 0,9 V, se puede cuantificar el área de los electrodos empleados en este trabajo, obteniéndose para los hilos de oro un valor de $0,24 \pm 0,10 \text{ cm}^2$ (Abad, 2002).

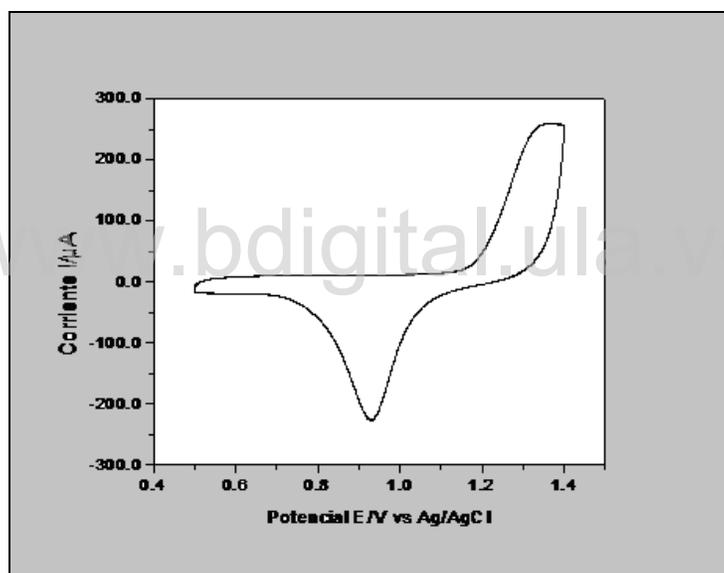


Figura 14. Voltamograma cíclico en H_2SO_4 0,5 M de un electrodo de hilo de oro. Ventana de potencial +0,4 a +1,4 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.1.1.- Optimización del tiempo de burbujeo de N₂.

Con el fin de eliminar cualquier interferencia producto de una atmósfera saturada de O₂, se procedió a optimizar el tiempo de burbujeo de Nitrógeno necesario, para lo cual se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M en una ventana de potencial desde -1,0 hasta + 1,0 V para los electrodos de hilo de oro. En la figura 15 se muestra: (a) sin burbujeo de N₂, (b) 10 min. de burbujeo de N₂, (c) 15 min. de burbujeo de N₂ y (d) 20 min. de burbujeo de N₂.

El tiempo de burbujeo necesario para que la atmósfera en la celda electroquímica alcance la saturación de N₂ fue establecido a los 10 minutos (voltamograma b) debido a que se elimina la interferencia producto de la presencia de O₂ (voltamograma a) y se observa la disminución de las corrientes picos de oxidación y reducción del oro aproximadamente a 0,4 V y 0,2 V respectivamente.

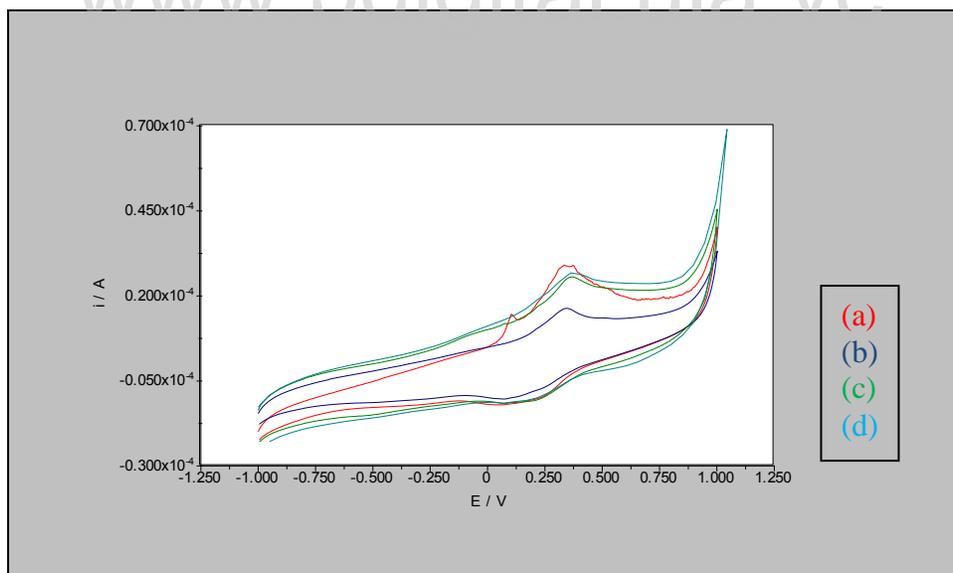


Figura 15. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) sin burbujeo de N₂, (b) 10 min. de burbujeo de N₂, (c) 15 min. de burbujeo de N₂ y (d) 20 min. de burbujeo de N₂. Ventana de potencial - 1,0 a +1,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s.

5.1.2.- Optimización de la Velocidad de Barrido.

Con el objetivo de seleccionar la velocidad de barrido se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M para los electrodos de hilo de oro. Para (a) 20 mV/s., (b) 50 mV/s. y (c) 100 mV/s. en atmósfera de N₂ (Figura 16). A mayores velocidades de barrido se observó mejor definición de las ondas, por lo tanto, seleccionamos como velocidad de barrido 100 mV/s, donde se obtuvo una respuesta voltamétrica bien definida.

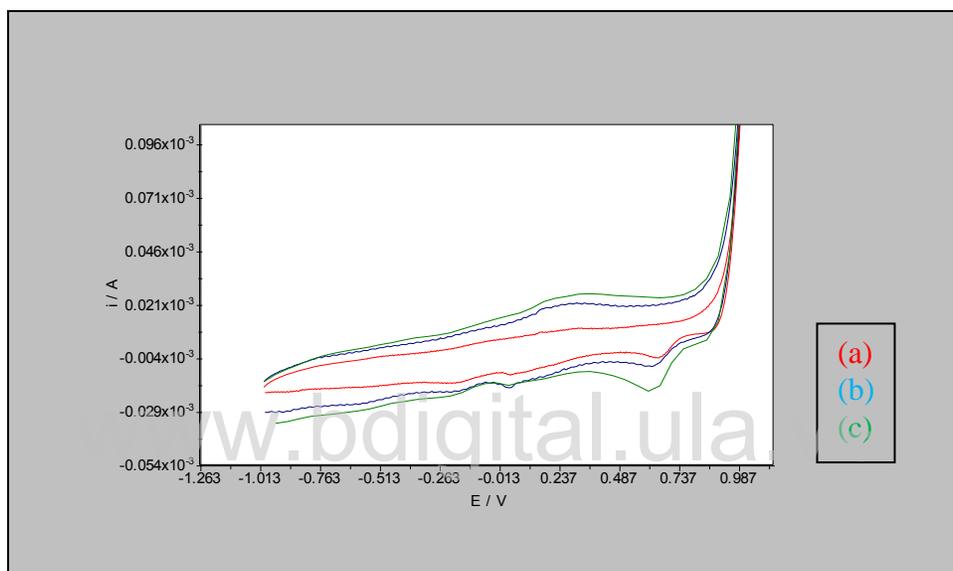


Figura 16. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) 20 mV/s., (b) 50 mV/s. y (c) 100 mV/s. Ventana de potencial desde -1,0 hasta +1,0 V vs Ag/AgCl. Atmósfera de N₂.

5.1.3.- Afinidad de los electrodos de hilo de oro por los Anticuerpos anti - *E.coli*.

Una vez determinado el tiempo de burbujeo de N₂ y la velocidad de barrido, se procedió a analizar la afinidad del oro por las moléculas biológicas en estudio. Como se mencionó en el apartado 4.2.1 (p. 61), los complejos de oro se han utilizado en diversas metodologías para obtener moléculas oro-proteína u oro-ADN, facilitando así la detección y cuantificación de las mismas. Diversos autores realizaron diferentes ensayos de afinidad detectando antígenos o anticuerpos de interés biológico o bien secuencias de ADN determinantes de un patógeno.

En conclusión, cualquier molécula biológica que pueda actuar como antígeno o anticuerpo, puede ser utilizada como analito en estudio (Costa, A. y col., 2005; Annapurna, J. y col., 1998; Coffey, MIN. y col., 1986).

En nuestro caso para comprobar la afinidad del oro en relación al anticuerpo seleccionado contra la *E. coli*, se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M (30 mL) en oro limpio agregando concentraciones determinadas de anticuerpo a la solución electrolítica, donde se pudo observar que a medida que se aumentaba la concentración de anticuerpo, la señal de oxidación del oro aproximadamente a 0,25 V fue disminuyendo como se observa en los voltamogramas (a) oro limpio, (b) oro limpio con 200 μ L de Anticuerpo, (c) oro limpio con 500 μ L de Anticuerpo y (d) oro limpio con 1000 μ L de Anticuerpo (Figura 17). Este fenómeno se evidencia en diversas investigaciones donde los autores reportan que los complejos de oro pueden marcar o unirse a cualquier molécula biológica proteica (antígeno o anticuerpo), principalmente si contiene en su secuencia de aminoácidos grupos tiol o puentes disulfuro. Sin embargo, este factor no es excluyente, ya que los complejos de oro se pueden unir a otros aminoácidos como el grupo imidazol de las histidinas y a los grupos amino o carboxilos, aunque presentando una menor afinidad (Costa, A. y col., 2005; Annapurna, J. y col., 1998; Coffey, MIN. y col., 1986).

Como se describió en el apartado 1.7 (p. 53), los anticuerpos poseen una fracción constante, que representa el punto de inmovilización ideal de este elemento de reconocimiento. De acuerdo a lo observado en la Figura 17, se puede asumir que existe una afinidad entre el electrodo de oro y el anticuerpo contra *E.coli* permitiendo que ocurra la adsorción a la superficie de dicho electrodo, haciendo que éste bloquee al electrodo e impida el flujo de electrones con tanta facilidad, por lo que la corriente de oxidación disminuye a medida que la concentración del anticuerpo aumenta.

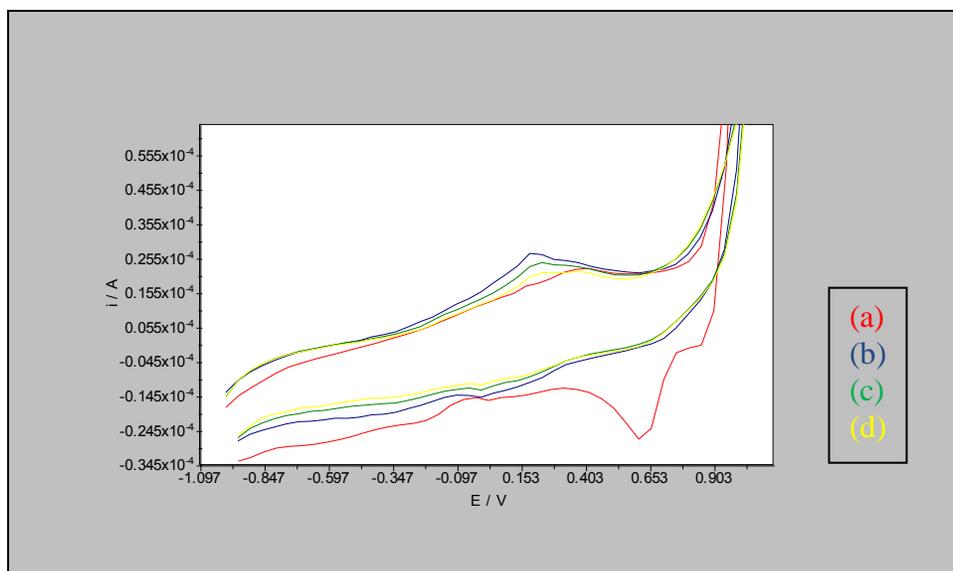


Figura 17. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio, (b) oro limpio con 200 μL de Anticuerpo, (c) oro limpio con 500 μL de Anticuerpo y (d) oro limpio con 1000 μL de Anticuerpo. Ventana de potencial $-1,0$ a $+1,0$ V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

www.bdigital.ula.ve

5.1.4.- Afinidad de los electrodos de hilo de oro por *Escherichia coli*.

De igual forma se evaluó la afinidad del oro con respecto a la *Escherichia coli*, realizando voltametrías cíclicas en oro limpio mientras se agregaban diversas concentraciones de la cepa en estudio (Figura 18). Inicialmente, se pesó la cantidad de cepa agregada y se disolvió directamente en la solución electrolítica de KCl 0,01M, obteniendo que a pesar de aumentar la cantidad de *E. coli* no hubo una diferencia significativa en los voltamogramas (b), (c) y (d). Este fenómeno puede deberse a que al disolver la cepa directamente en la celda de trabajo, utilizando un poco de agitación y el burbujeo de Nitrógeno, no se obtuvo una disolución completa de la cepa, factor importante para la detección electroquímica de una determinada especie. De igual manera, podría atribuirse a que las cantidades de *E. coli* en las voltametrías (b), (c) y (d), sean muy semejantes entre sí y que incluso, se haya alcanzado en todas ellas la máxima solubilidad.

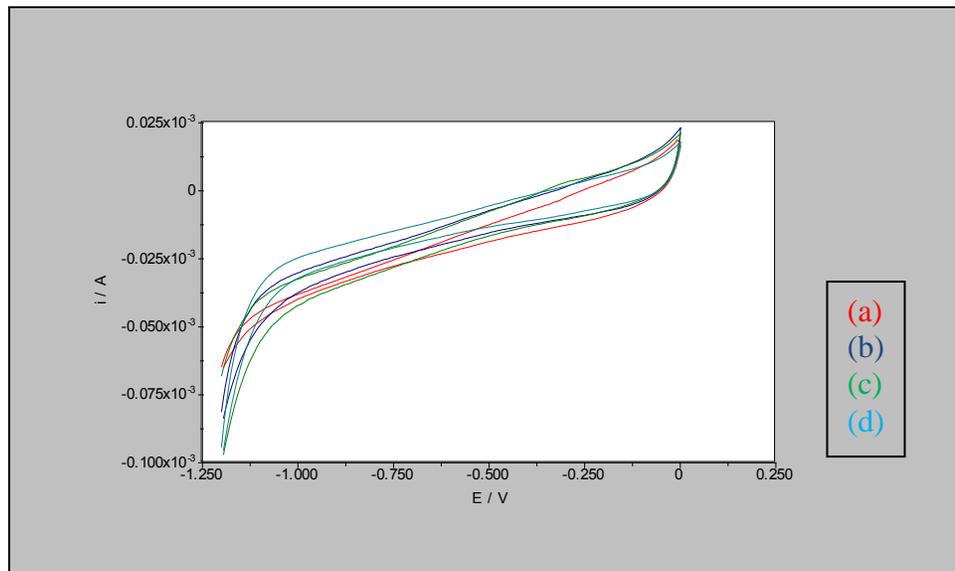


Figura 18. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) Au limpio, (b) Au limpio con *Escherichia coli* ($6,95 \times 10^{-4}$ g/ml), c) Au limpio con *Escherichia coli* ($14,6 \times 10^{-4}$ g/ml), y d) Au limpio con *Escherichia coli* ($22,1 \times 10^{-4}$ g/ml). Ventana de potencial desde -1,20 hasta 0,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N₂.

Con el objetivo de corroborar que la solubilidad puede afectar la detección de la *Escherichia coli*, se procedió a diluir previamente la cepa antes de ser agregada a la disolución electrolítica. Se realizaron voltametrías cíclicas en oro limpio, disolviendo previamente *E.coli* mediante la elaboración de un patron Mac Farland (0,5) en solución electrolítica, que posteriormente fue agregada a 30 mL de solución electrolítica contenidos en la celda electroquímica, obteniendo (a) voltamograma de oro limpio, (b) oro limpio agregando 1 mL de disolución de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) oro limpio agregando 2 mL de disolución de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL) y (d) oro limpio agregando 3 mL de disolución de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), todos ellos obtenidos bajo atmósfera saturada de N₂. Comparando los voltamogramas (b), (c) y (d) de la Figura 19, se puede observar que a medida que aumenta la concentración de *E. coli* hay una reducción de la señal de oxidación del oro, semejante a la observada en la Figura 17 producto de la adsorción del anticuerpo, por lo cual suponemos

que la cepa de *Escherichia coli* disuelta, se adsorbe de igual forma sobre la superficie del electrodo de oro.

Tal como se describió en el apartado 1.3.1 (p. 9), *Escherichia coli* posee una capa de peptidoglicano (carbohidratos ligados con aminoácidos), conformada por repetición de disacáridos de N- acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos mediante péptidos (Figura 2). Por tanto, la interacción que ocurre entre el electrodo de oro y la *Escherichia coli* puede deberse a la presencia de péptidos que puedan contener secuencia de aminoácidos con grupos tiol, puentes disulfuro, grupos imidazol o grupos aminos que interaccionen con la superficie de oro produciendo el fenómeno de adsorción ([Universidad Nacional del Nordeste.](#), 2008; Costa, A. y col., 2005; Gutiérrez, MIN., 2005; Murray, P., 2002; Annapurna, J. y col., 1998; Coffey, MIN.y col., 1986).

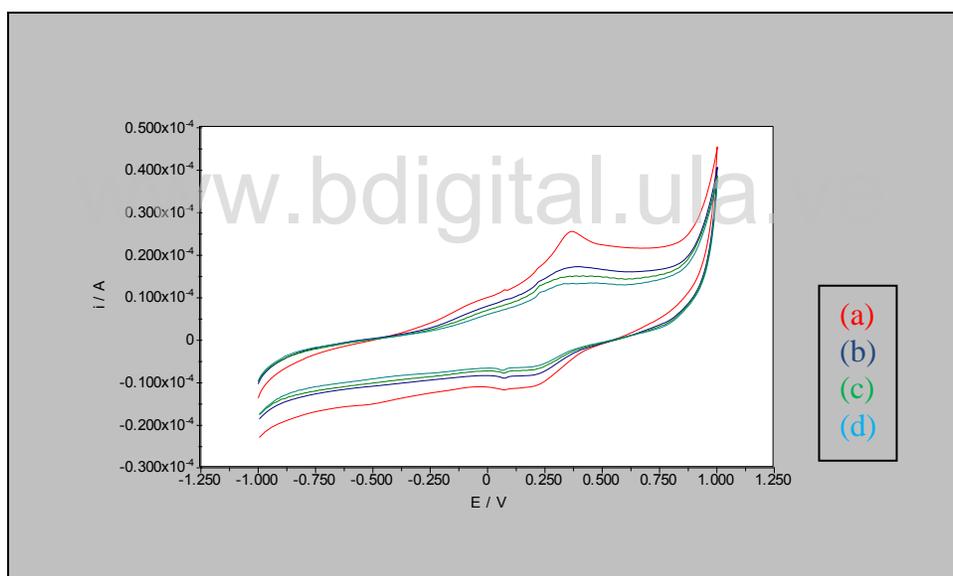


Figura 19. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M en ventana de potencial desde -1,0 a 1,0 V. vs Ag/AgCl. Para (a) voltamograma de oro limpio, (b) oro limpio agregando 1 mL de disolución de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) oro limpio agregando 2 mL de disolución de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL) y (d) oro limpio agregando 3 mL de disolución de *E. coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.1.5.- Afinidad de los electrodos de hilo de oro por el Anticuerpo anti-*E.coli* y la adición posterior de *Escherichia coli*.

Con el fin de comprobar si la adsorción del anticuerpo a la superficie del electrodo de oro sería influenciada por la adición posterior de su antígeno correspondiente (*Escherichia coli*), se realizaron voltametrías cíclicas agregando a la solución electrolítica un volumen constante de anticuerpo y diferentes volúmenes de antígeno, para (a) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo, (b) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 1mL de disolución de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 2 mL de disolución de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 3mL de disolución de *E. coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), y (e) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 4mL de disolución de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) (Figura 20). Al observar los voltamogramas, podemos suponer que al agregar el anticuerpo (1000 μL) ocurrió la adsorción inicial del mismo sobre la superficie del electrodo de oro limpio. Posteriormente, al agregar la cepa en estudio ocurre la formación del inmunocomplejo, es decir, unión antígeno-anticuerpo, disminuyendo la señal eléctrica a 0,25 V y siendo adsorbidos ambos en la superficie del electrodo.

Este fenómeno fue descrito por Keel y colaboradores en el 2010 al observar la interacción del antígeno PSPB (Proteína B Específica de la Preñez) con los anticuerpos coinmovilizados con una enzima sobre la superficie de un electrodo de oro. Al formar grandes complejos antígeno – anticuerpo, estos limitaban el acceso del sustrato específico al sitio activo de la enzima, provocando por tanto una disminución en la señal eléctrica medida producto de una inhibición de la corriente catódica proporcional al aumento de concentración de la proteína (Keel, K., 2010). En nuestro caso, disminuyen ambas corrientes de pico (anódica y catódica).

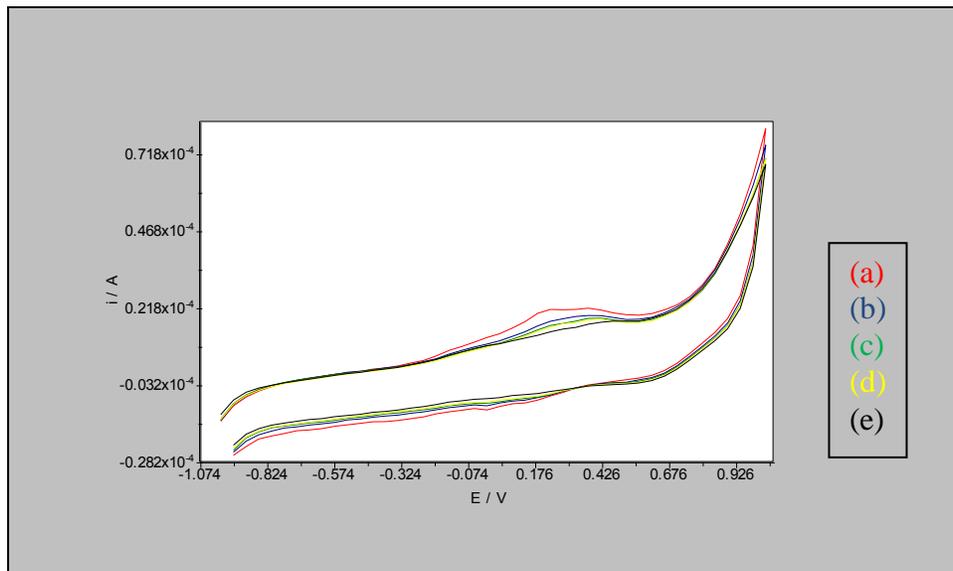


Figura 20. Voltamogramas cíclicos en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo, (b) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 1 mL de disolución de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 2 mL de disolución de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 3 mL de disolución de *E. coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), y (e) oro limpio con 1000 μL de anticuerpo agregando 4 mL de disolución de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) Ventana de potencial $-1,0$ a $+1,0$ V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.1.6.- Afinidad de los electrodos de hilo de oro por *Escherichia coli* y la adición posterior del Anticuerpo anti-*E.coli*.

De acuerdo a lo observado en las figuras 17, 19 y 20, tanto el anticuerpo, la *Escherichia coli* y el inmunocomplejo anticuerpo-antígeno se adsorben sobre la superficie de oro limpio. Con el fin de estudiar la adsorción del inmunocomplejo agregando en primer lugar el antígeno (*Escherichia coli*) y luego el anticuerpo, se realizaron voltametrías cíclicas en oro donde inicialmente se agregaron a la solución electrolítica 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) y posteriormente determinadas cantidades de anticuerpo. Para (a) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (b) oro limpio con 3

mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 200 μ L de anticuerpo, (c) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 400 μ L de anticuerpo y (d) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 600 μ L de anticuerpo (Figura 21), todos ellos obtenidos bajo atmósfera saturada de N_2 . Comparando los voltamogramas obtenidos, se puede observar que no hay diferencia significativa, excepto el desplazamiento de la señal de oxidación hasta aproximadamente 0,38 V (con respecto a la Figura 20). Suponemos que un factor condicionante para que el inmunocomplejo se pueda adsorber a la superficie del electrodo, es que inicialmente se adsorba el anticuerpo y posteriormente se una a éste la *Escherichia coli*.

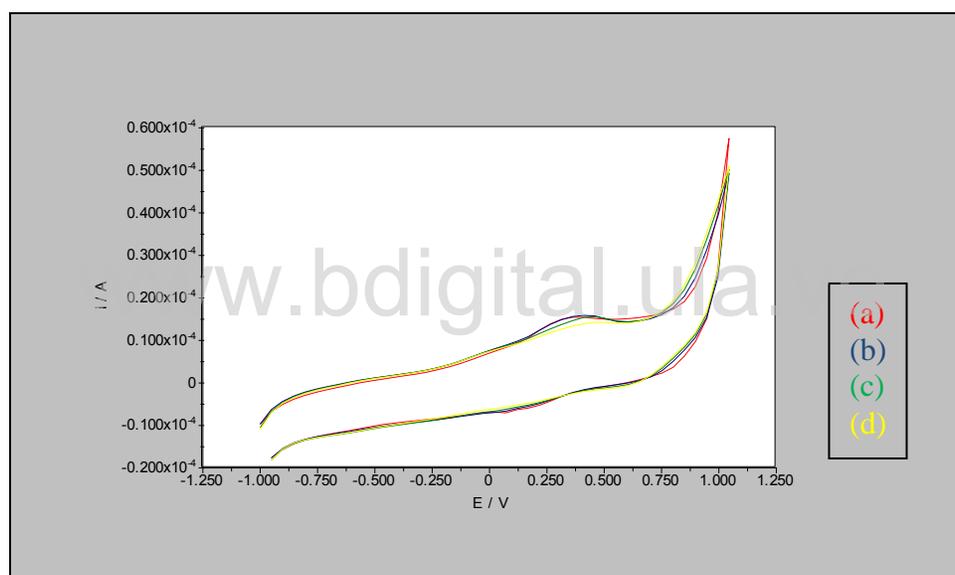


Figura 21. Voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro. Para (a) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (b) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 200 μ L de anticuerpo, (c) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 400 μ L de anticuerpo y (d) oro limpio con 3 mL de disolución de *Escherichia coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) agregando 600 μ L de anticuerpo. Ventana de potencial $-1,0$ a $+1,0$ V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.2.- Formación de monocapa de tioles (SAMs).

Existen problemas de estabilidad que presentan los electrodos modificados químicamente por fisisorción, los cuales pueden resolverse mediante la preparación de monocapas autoensambladas por quimisorción. Como se mencionó en el apartado 1.6.1 (p.52), las monocapas autoensambladas de tioles (SAM) obtenidas por inmersión de oro limpio en una disolución de un tiol han sido utilizadas para inmovilizar elementos de reconocimiento biológico. Con esta metodología se han preparado superficies de oro y de otros materiales, recubiertas con monocapas que exponen al medio ligandos con afinidad específica por un motivo, estos sistemas permiten obtener superficies modificadas altamente ordenadas, compactas y estables (Matheus, P. y col., 2009; Parra, MIN., 2009; Matheus, P. y col., 2008; Ataka, K. y col., 1990).

Con el objetivo de mejorar las respuestas electroquímicas obtenidas y verificar la detección de *Escherichia coli* se procedió a modificar la superficie de los electrodos de hilo de oro mediante el pretratamiento con tioles, obteniendo la formación de una monocapa para la posterior captación del anticuerpo (Apartado 4.2.3.1, p.64).

5.2.1.- Modificación de la superficie de oro con Monocapas Autoensambladas de Tioles.

Para la formación de las monocapas autoensambladas de tioles se utilizó la tiourea como compuesto tiolado. Una vez que los electrodos de oro fueron limpiados, mediante la utilización de diferentes lijas (desde la más gruesa hasta la más fina), se pulieron con gamma-alúmina 3 (0,05 micrón) y seguidamente se lavaron con agua 18 MΩ. Posteriormente, se limpiaron los electrodos de oro en baño ultrasónico durante 20 min. en medio etanol-H₂O (2:1) y se dejaron secar al aire. Por último, se sumergieron durante 24 horas en una disolución 5 mM de tiourea preparada en etanol-H₂O (2:1) (Sanchez, J. y col., 2007).

Con el fin de comprobar la formación de la monocapa de tioles en los electrodos de hilo de oro se realizaron voltametrías cíclicas en KOH 0,5 M en una ventana de potencial desde

-1,25 hasta +1,00 V vs Ag/AgCl bajo corriente de N₂. En la figura 22 se muestra la desorción de la monocapa de tiourea para (a) primer barrido y (b) cuarto barrido.

La aparición de una onda de desorción a potencial de aproximadamente - 0,9 V (desorción reductiva) se tomó como evidencia de la existencia de la monocapa. A partir de la carga correspondiente al pico y asumiendo un valor de un electrón consumido en la reducción de cada átomo de azufre, se estimó un recubrimiento de la superficie por átomo de azufre de $15,7 \times 10^{-10}$ mol.cm² para los electrodos de hilo de oro. Este valor coincide con los datos publicados de recubrimiento de superficies de oro con tioles (Sanchez, J. y col., 2007; Abad, J. y col., 2000).

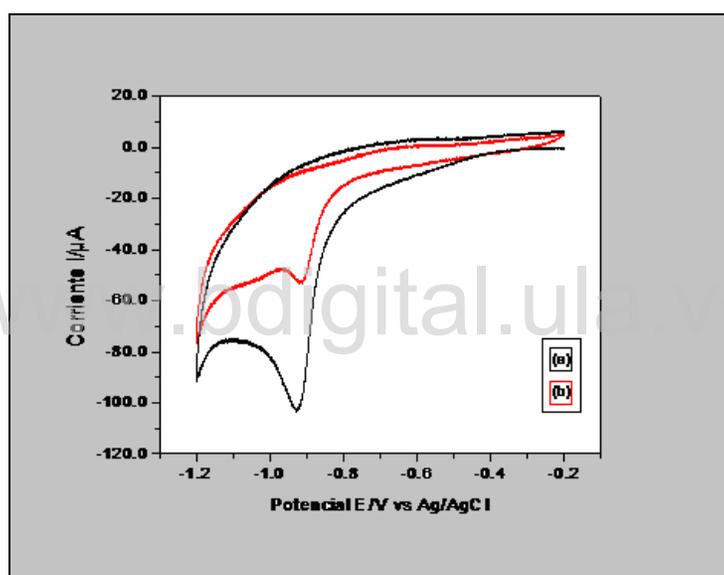


Figura 22. Voltamograma cíclico de desorción en KOH 0,5 M de un electrodo de hilo de oro modificado con tiourea (Au/TOU). (a) primer barrido, (b) cuarto barrido. Velocidad de barrido 100mV/seg. Atmósfera de N₂.

5.2.2.- Modificación de la superficie de oro con Monocapas Autoensambladas de Tioles y anticuerpos anti-*E.coli*.

Posterior a la formación de la monocapa de tiourea se procedió a seleccionar el tiempo de incubación en la solución del anticuerpo, para lo cual se realizaron voltametrías cíclicas en KCl 0,01 M en una ventana de potencial desde - 1,0 a 0,0 V vs Ag/AgCl bajo corriente de

N₂. Donde se puede observar (a) electrodo oro/tiourea (Au/TOU), (b) electrodo de oro/tiourea incubado en anticuerpo durante una hora (Au/TOU/Ac 1 hora), c) electrodo de oro/tiourea incubado en anticuerpo durante dos horas (Au/TOU/Ac 2 horas), y d) electrodo de oro/tiourea incubado en anticuerpo durante cuatro horas (Au/TOU/Ac 4 horas) (ver figura 23).

La inmovilización del anticuerpo generó una pequeña elevación de la corriente en comparación con los valores de corriente obtenidos con el electrodo oro/tiourea (voltamograma a). Este efecto fue observado por Zuzuarregui y colaboradores, en la inmovilización de polimixina B donde se originó un aumento de la corriente respecto a la curva base de oro, lo cual atribuyeron a las cargas presentes en la molécula peptídica (Zuzuarregui, A., 2013). En relación a los voltamogramas (b), (c) y (d) de los electrodos incubados en anticuerpo, no se observaron diferencias significativas, por tanto se seleccionó el tiempo de incubación de una hora, ya que fue el menor tiempo establecido para la inmovilización del anticuerpo (Figura 23).

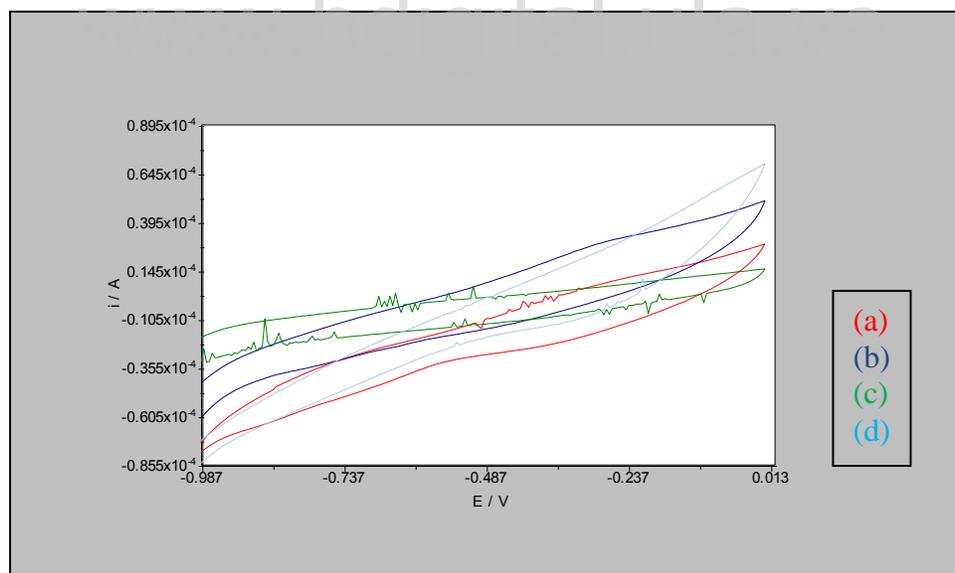


Figura 23. Voltamograma cíclico en KCl 0,01 M de un electrodo de hilo de oro/ tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/Ac 1 hora, c) Au/TOU/Ac 2 horas, y d) Au/TOU/Ac 4 horas. Ventana de potencial desde -1,2 a 0,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 50 mV/s. Atmósfera de N₂.

5.2.3.- Voltametrías cíclicas de electrodos de oro modificados con tiourea/anticuerpo en solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0, 1 M.

Con el objetivo de mejorar las respuestas obtenidas, se diseñaron tres metodologías para los electrodos de hilo de oro modificados con la monocapa autoensamblada de tiourea, utilizando como solución electrolítica $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0, 1 M. Teniendo como referencia el tiempo de incubación del anticuerpo (1 hora) determinado según la figura 23, se desarrollaron tres protocolos de inmovilización del anticuerpo:

- **Protocolo A:** Electrodo de oro/tiourea incubado por una hora en una mezcla de solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0, 1 M (1 mL) y una gota de anticuerpo.

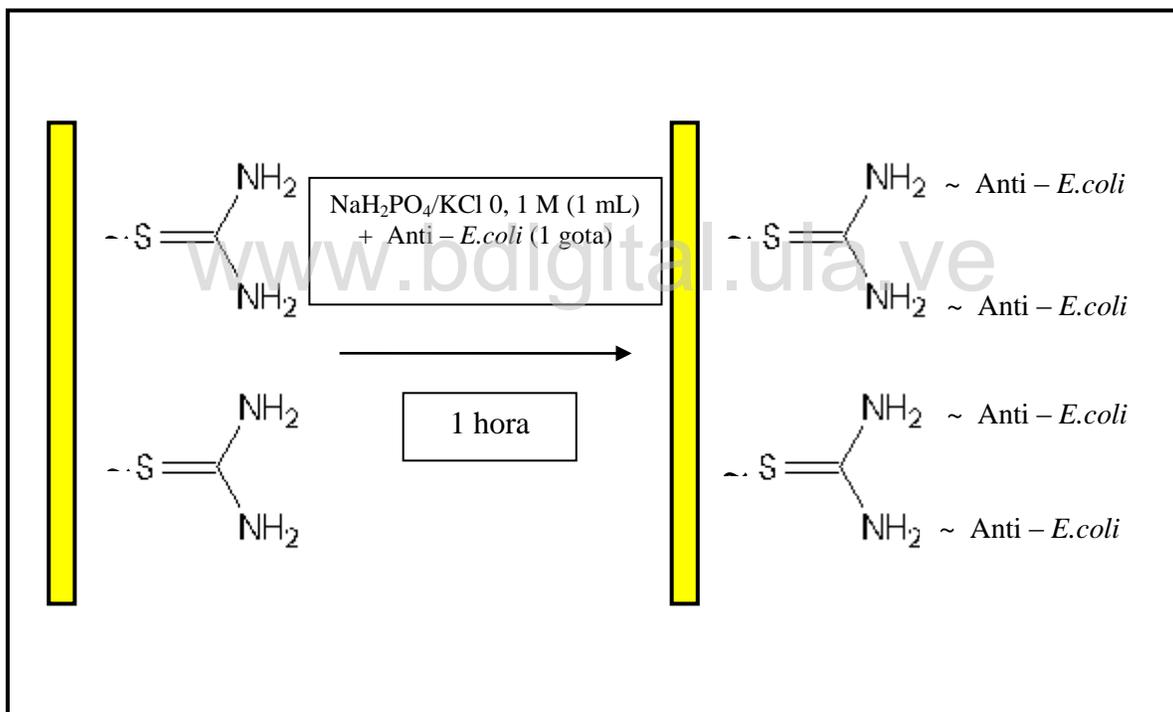


Figura 24. Protocolo A.

- Protocolo B:** Electrodo de oro/tiourea sumergido durante 20 minutos en 1mL de solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0, 1 M en atmósfera saturada de N_2 y posteriormente colocando una gota de anticuerpo sobre la superficie del electrodo dejando secar durante una hora.

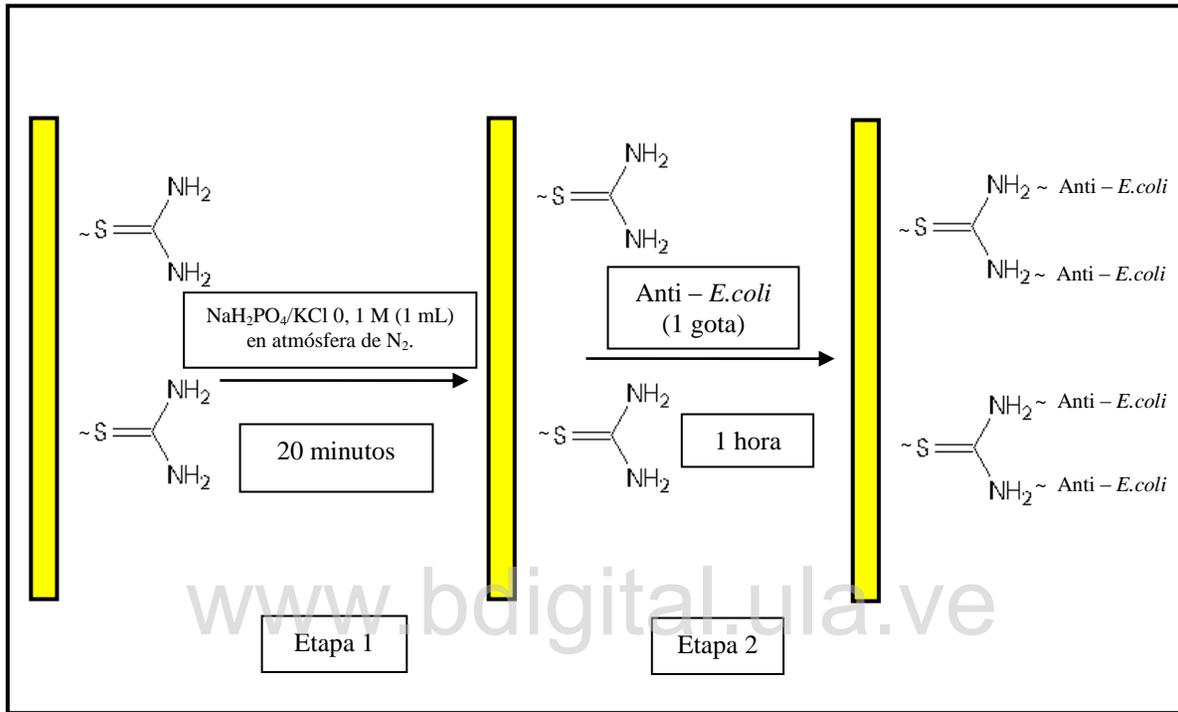


Figura 25. Protocolo B.

- Protocolo C:** Electrodo de oro/tiourea sumergido durante una hora en 1 mL de solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M y posteriormente colocando una gota de anticuerpo sobre la superficie del electrodo dejando secar durante una hora.

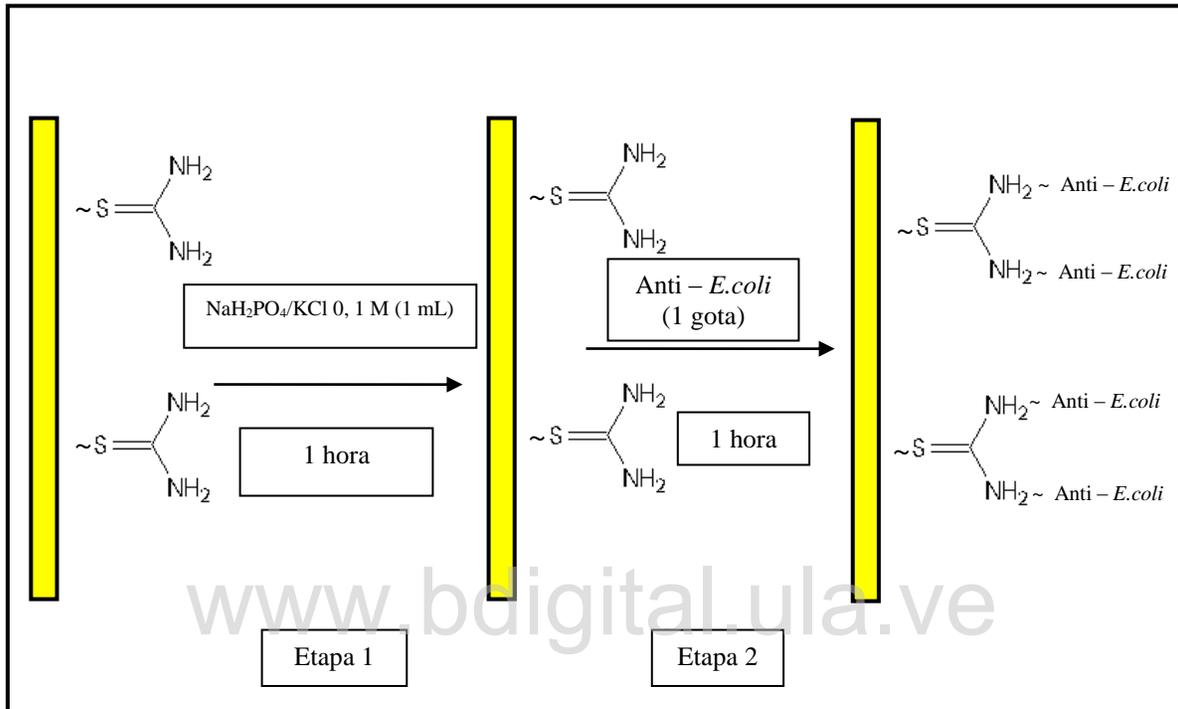


Figura 26. Protocolo C.

Protocolo A:

En relación al protocolo A, se realizaron voltametrías cíclicas del electrodo de oro/tiourea incubado por una hora en una mezcla de solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M y una gota de anticuerpo, agregando posteriormente *Escherichia coli* en concentraciones determinadas Para: (a) electrodo oro/tiourea, (b) oro/tiourea en mezcla $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M/anticuerpo durante 1 hora, c) oro/tiourea en mezcla $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M/anticuerpo durante 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), d) oro/tiourea en mezcla $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M/anticuerpo durante 1 hora agregando 2 mL de *E.coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), y e) oro/tiourea en mezcla $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1M/anticuerpo durante 1 hora agregando 3mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL).

En la figura 27, se puede evidenciar la detección del anticuerpo en el electrodo Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (voltamograma b). De acuerdo a lo observado podemos suponer que al poner en contacto los electrodos de oro/tiourea con el anticuerpo ocurre la detección del mismo en la superficie electrolítica, evidenciándose un aumento de la respuesta electroquímica, es decir, en la corriente del pico de reducción en comparación al electrodo de oro/tiourea (voltamograma a).

Una vez que se agregó el antígeno (*Escherichia coli*) a la solución electrolítica, se pudo evidenciar que la respuesta electroquímica del inmunocomplejo (corriente de pico anódica) fue disminuyendo, a medida que se incrementaba la concentración de la cepa hasta llegar casi a la saturación (voltamogramas c, d y e). Los picos de corrientes catódicas mostraron el mismo comportamiento. Podemos suponer que la inmovilización del anticuerpo en el electrodo de oro/tiourea no es estable y al agregar el antígeno correspondiente, se produce la unión antígeno-anticuerpo y se adsorbe el inmunocomplejo en la superficie del electrodo, evidenciándose una disminución de la respuesta electroquímica ocasionada por el bloqueo del electrodo por parte del anticuerpo inmovilizado, este fenómeno impide el flujo de electrones normal, por lo que la corriente del pico de reducción disminuye en comparación al electrodo de oro/tiourea/anticuerpo (voltamograma b).

Por tanto, es detectado el inmunocomplejo inmovilizado en la superficie del electrodo modificado a medida que se aumenta la concentración de *Escherichia coli* hasta que el anticuerpo llega a saturarse (Figura 27).

Este efecto es reportado en estudios realizados en electrodos de carbón vítreo modificados con Zeolita tipo “A”, donde el material fue sujeto a intercambio catiónico con iones calcio y posteriormente modificado con el surfactante catiónico CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) ó con el surfactante no iónico Tritón X-100 (octilfenoxipolietoxietanol). La presencia de estas películas conllevaron a una disminución en los picos de oxidación-reducción en comparación con la señal obtenida para el electrodo desnudo, efecto producido debido a que material obstruye el libre acceso de la especie electroactiva a la superficie electródica (Molina, A. y col., 2009)

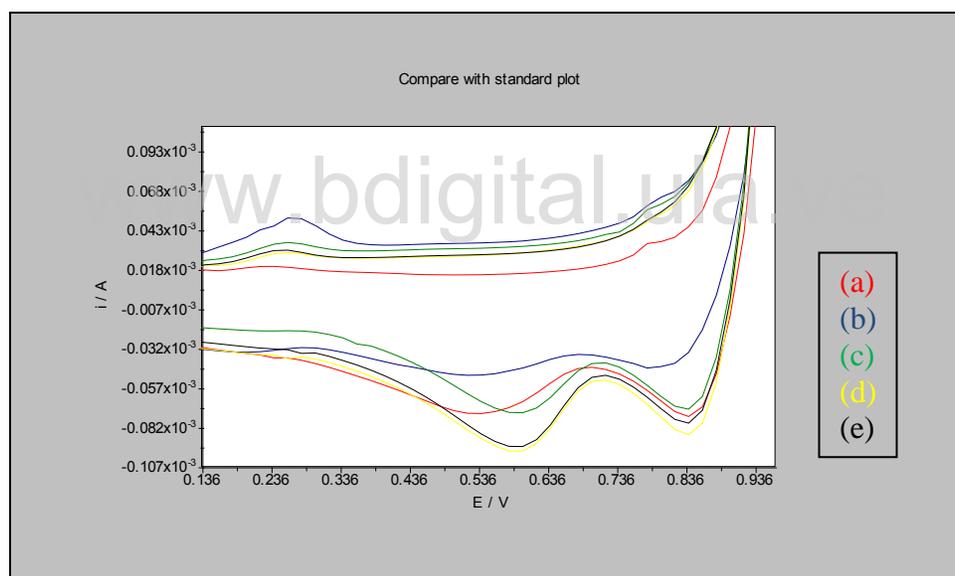


Figura 27. Protocolo A. Voltamograma cíclico en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora, c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora agregando 2 mL de *E.coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), y e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ durante 1 hora agregando 3mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde +0,136 a +0.936 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

Protocolo B:

En cuanto al protocolo B, se procedió a colocar el electrodo de oro/tiourea durante 20 min en la solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M en atmósfera saturada de N_2 , posteriormente se colocó una gota de anticuerpo sobre la superficie del electrodo dejando secar durante una hora. En la figura 28, se puede evidenciar al comparar los voltamogramas, que no existen diferencias significativas entre éstos (voltamograma (a) y (b)), lo que indica que no se efectuó inmovilización del anticuerpo sobre la superficie del electrodo de oro. Esto puede deberse a la pérdida parcial o completa de la monocapa de tiourea producto del burbujeo con nitrógeno. Posteriormente, al agregar la *Escherichia coli* en disolución (voltamogramas c, d y e) se evidencia una respuesta eléctrica posiblemente producto de la unión anticuerpo-antígeno en la disolución electrolítica y no en la superficie del electrodo (Figura 28), lo que quiere decir que no ocurrió la inmovilización del inmunocomplejo.

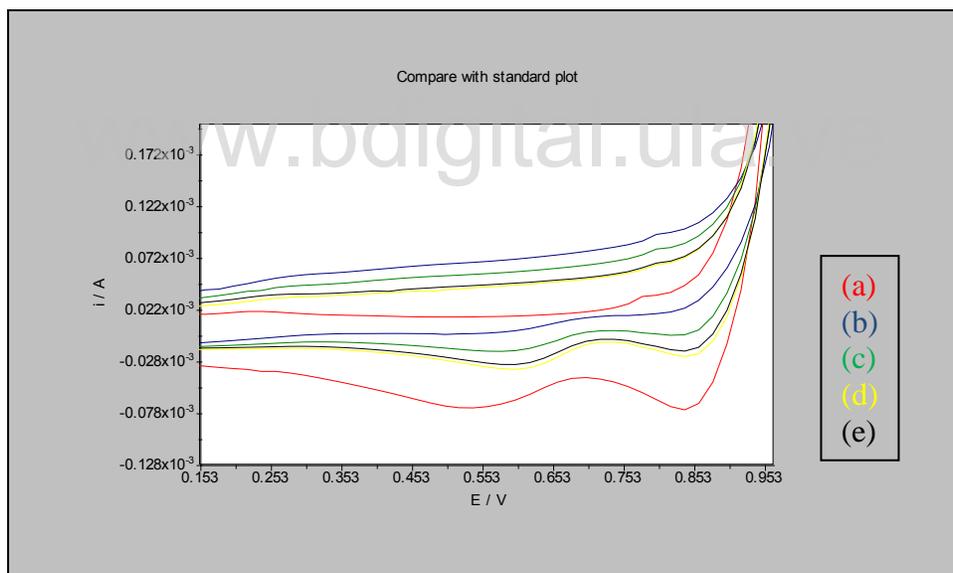


Figura 28. Protocolo B. Voltamograma cíclico en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora, c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora agregando 1 mL de *E. coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora agregando 2 mL de *E. coli* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL), y e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ (1 gota) y secar 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL). Ventana de potencial desde + 0,153 a + 0,953 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

Protocolo C:

Por último en el protocolo C, el electrodo de oro/tiourea fue incubado durante una hora en la solución buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M y posteriormente le fue colocado una gota de anticuerpo sobre la superficie del electrodo dejándolo secar una hora. Al observar la figura 29, se puede evidenciar que no ocurrió la inmovilización del anticuerpo en la superficie del electrodo, suponemos que este hecho ocurrió debido a la pérdida parcial o completa de la monocapa de tiourea al igual que en el protocolo B, sin embargo, en este caso atribuimos la pérdida de la monocapa a la incubación prolongada en la solución buffer, ocurriendo el desprendimiento de ésta, por efecto de disolución. En cuanto a los voltamogramas c y d no se observó diferencia significativa al agregar la *Escherichia coli* (antígeno), por tanto tampoco se evidenció la unión del anticuerpo-antígeno en la disolución (Figura 29).

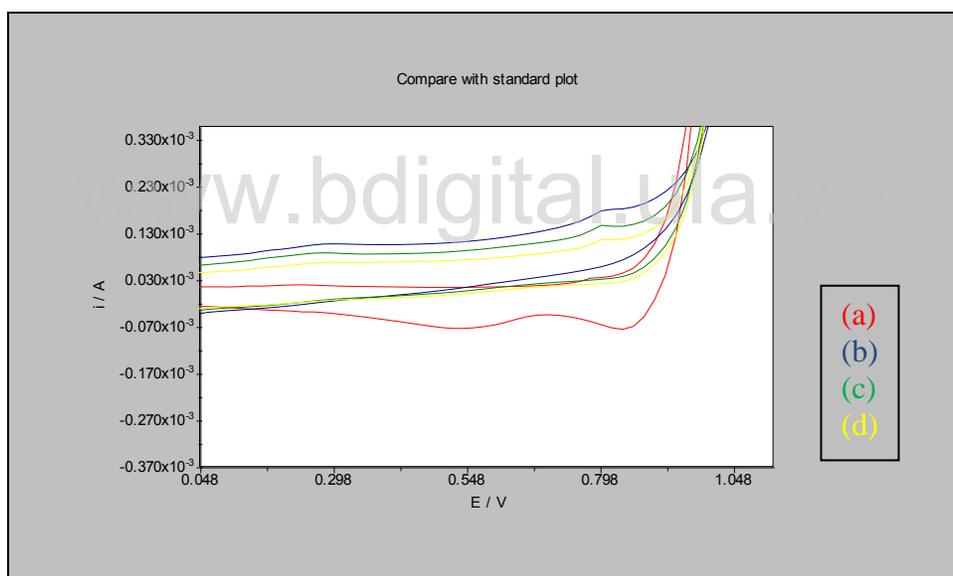


Figura 29. Protocolo C. Voltamograma cíclico en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M de un electrodo de hilo de oro/tiourea. Para (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 1 hora mas Ac. 1 hora, c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 1 hora mas Ac 1 hora agregando 1mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL) y d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 1 hora mas Ac 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde + 0,048 a + 1,0 V vs Ag/AgCl. Velocidad de barrido 100 mV/s. Atmósfera de N_2 .

Algunos autores refieren que ciertos factores afectan la funcionalización adecuada de la superficie del electrodo de oro, por tanto, el péptido a inmovilizar no queda firmemente unido a la superficie y es posible que se desprenda de la misma durante un proceso de lavado prolongado o al aplicar el potencial a los electrodos (Zuzuarregui, A., 2002; Ulman, 1996). En consecuencia, seleccionamos el protocolo A como la metodología más apropiada para mantener la estabilidad de la monocapa y la posterior inmovilización del anticuerpo.

5.2.4.- Voltametrías de pulso diferencial en solución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0, 1 M en electrodos de oro modificados con tiourea/Anticuerpo a diferentes valores de pH.

En concordancia con los experimentos realizados para la inmovilización del anticuerpo en los electrodos de oro/tiourea, donde se seleccionó el protocolo A como el más apropiado para la detección de *Escherichia coli*, es bien conocido que las reacciones de inmovilización o marcaje están determinadas por ciertas condiciones que determinan la estabilidad de las uniones. Algunos autores sugieren que dichas condiciones deben ser semejantes a las fisiológicas en cuanto a temperatura, fuerza iónica y pH, es decir, temperatura de 37°C, fuerza iónica 0,15M y pH 7,5. En base a lo antes expuesto, una vez definido el protocolo de trabajo, se procedió a realizar voltametrías de pulso diferencial a diferentes pH con el fin de mejorar la calidad de la respuesta electroquímica, mejorar la relación señal-ruido y mejorar la sensibilidad del método (Costa, A., 2009).

5.2.4.1.- Voltametrías de pulso diferencial a pH ligeramente Ácido.

En la figura 30, se presentan voltametrías de pulso diferencial realizadas a electrodos de oro/tiourea en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M a pH 6,20 (medio ligeramente ácido) preparados según el protocolo antes descrito (Protocolo A) . En esta figura se observa la respuesta asignada a la inmovilización del anticuerpo (aproximadamente a + 0,33 V) sobre la superficie del electrodo oro/tiourea (voltamograma b) y la disminución de esta respuesta electroquímica a medida que se agrega mayor concentración de *Escherichia coli* (voltamogramas c, d, e y f), asumiendo que la misma es producto de la unión anticuerpo-antígeno adsorbida a la superficie del electrodo de oro modificado.

Este fenómeno fue observado en la elaboración de un biosensor para la detección de preñez bovina, mediante el desarrollo de superficies modificadas oro–anticuerpo anti-PSPB (Proteína B Específica de la Preñez), donde la superficie de oro fue modificada con ácido mercaptoundecanoico (MUA) para luego inmovilizar anticuerpos anti-PSPB y peroxidasa de rábano (HRP). Una vez agregado el antígeno correspondiente, la formación de complejos antígeno–anticuerpo limitaban el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima (peroxidasa), provocando una disminución en la señal eléctrica. Por tanto, el electrodo modificado de oro -anti-PSPB – HRP responde de forma inversamente proporcional a la concentración de PSPB. Esto se observó tanto en las voltametrías cíclicas como en experimentos realizados a potencial constante (Keel, K., 2010).

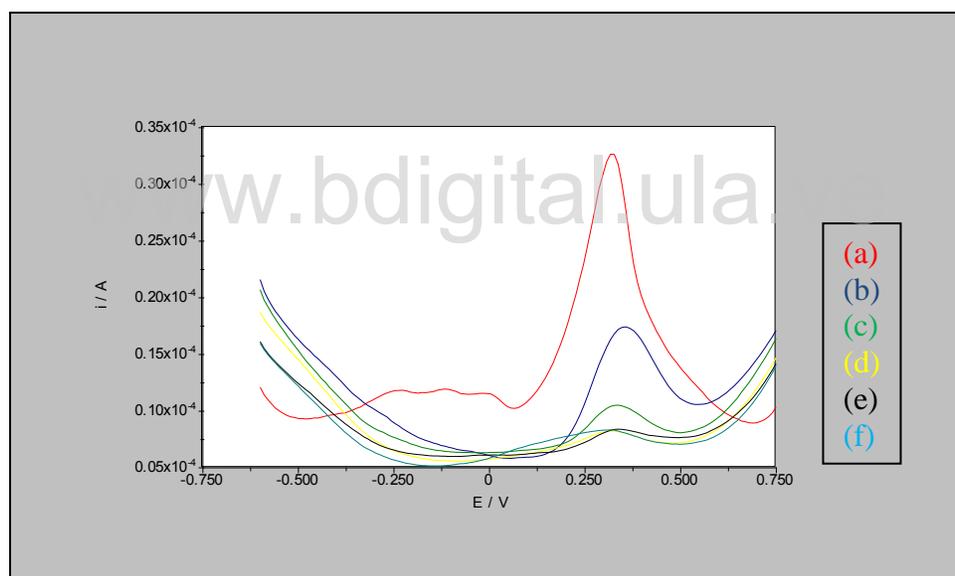
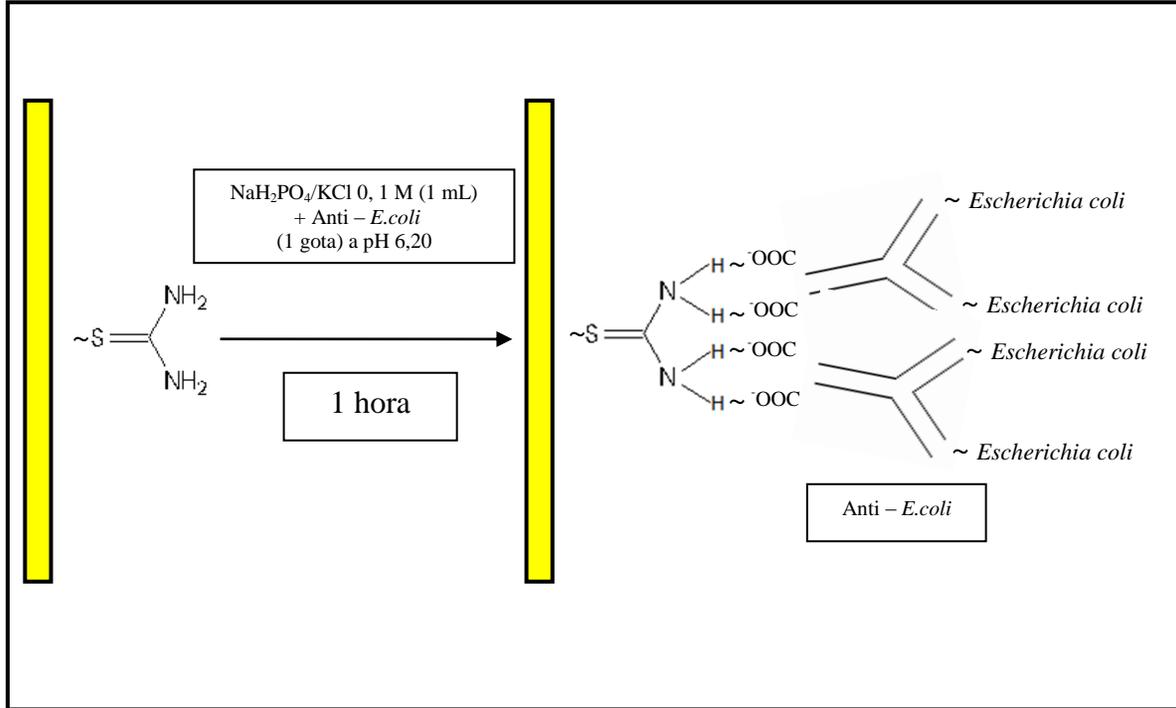


Figura 30. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,20. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1 mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL), y (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5 mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL),. Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_2 .



www.bdigital.ula.ve
Figura 31. Mecanismo a pH ligeramente Ácido.

5.2.4.1.2.- Estabilidad de la unión Anticuerpo-Antígeno al electrodo modificado a pH ligeramente Ácido.

Una vez realizadas las voltametrías agregando hasta 5 mL de antígeno, se procedió a renovar la solución electrolítica (sin concentraciones de *E. coli*), y se realizaron barridos secuenciales al electrodo de oro/tiourea/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ pH 6,20/Ac. 1hora/ 5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), con el fin de corroborar la estabilidad de la unión anticuerpo-antígeno en la superficie del electrodo de oro modificado. Se pudo evidenciar que no hubo diferencia significativa entre los barridos consecutivos (voltamogramas d, e, f y g), ni se observó desprendimiento del inmunocomplejo inmovilizado, por tanto se corroboró la estabilidad de la unión anticuerpo-antígeno en la superficie del electrodo de oro modificado hasta por cuatro barridos consecutivos (Figura 32).

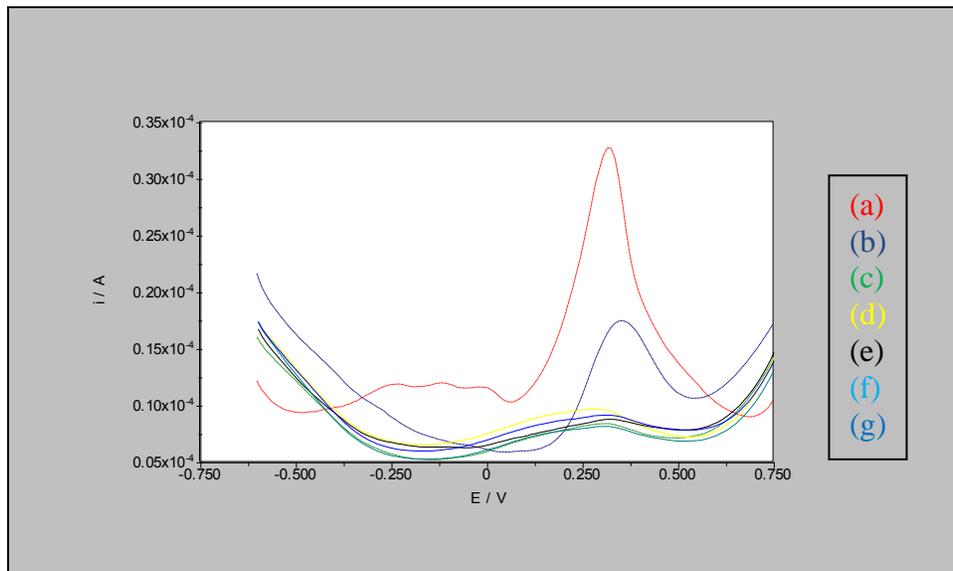


Figura 32. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,20. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (Primer barrido), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (segundo barrido) (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (tercer barrido) y (g) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (cuarto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.2.4.2.- Voltametrías de Pulso Diferencial a pH Neutro.

De igual forma, con el fin de evaluar la inmovilización del anticuerpo a pH neutro se realizaron voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M a pH 7,00. A este pH, el anticuerpo no fue inmovilizado en la superficie del electrodo oro/tiourea (Figura 33, voltamograma b), observándose un aumento de la señal electroquímica que se atribuye a que el anticuerpo no se inmovilizó, sino que su presencia fue detectada en la solución electrolítica. Una vez que se procedió a agregar la *Escherichia coli* (voltamogramas c, d, e y f) se observó una disminución de la corriente de pico a medida que se aumentaba la concentración de ésta, por lo cual se evidencia la detección del inmunocomplejo

(anticuerpo-antígeno) posiblemente inmovilizado en la superficie del electrodo modificado (Mecanismo ver Figura 34 y 35).

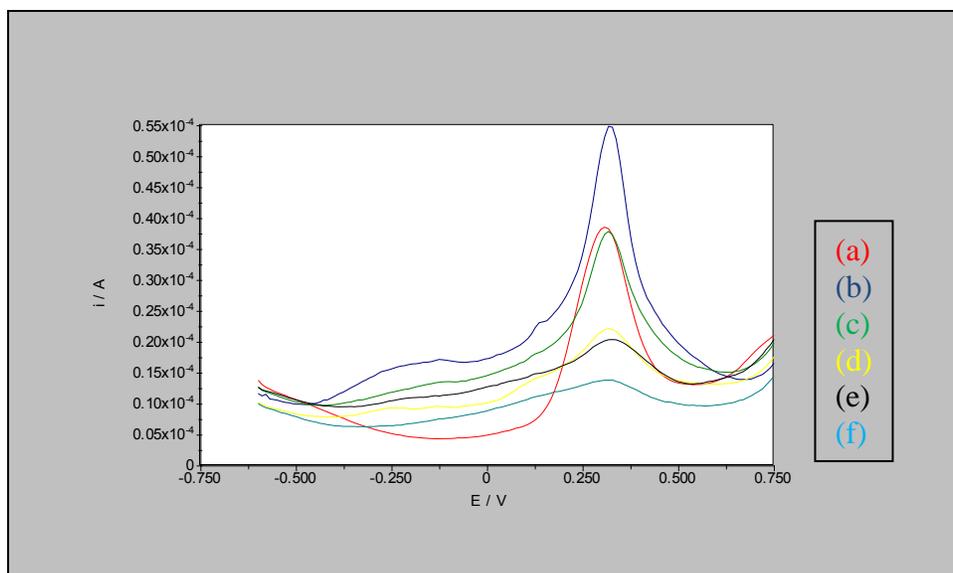


Figura 33. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 7,00. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1 mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) y (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5 mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Ventana de potencial desde - 0,60 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_2 .

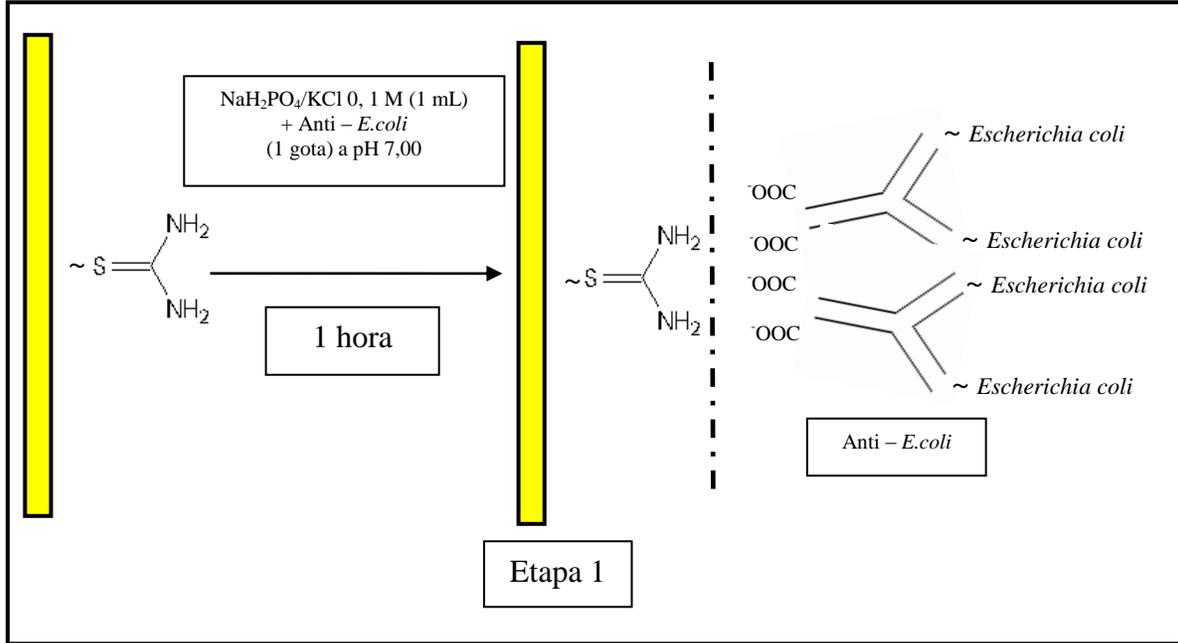


Figura 34. Mecanismo a pH Neutro.

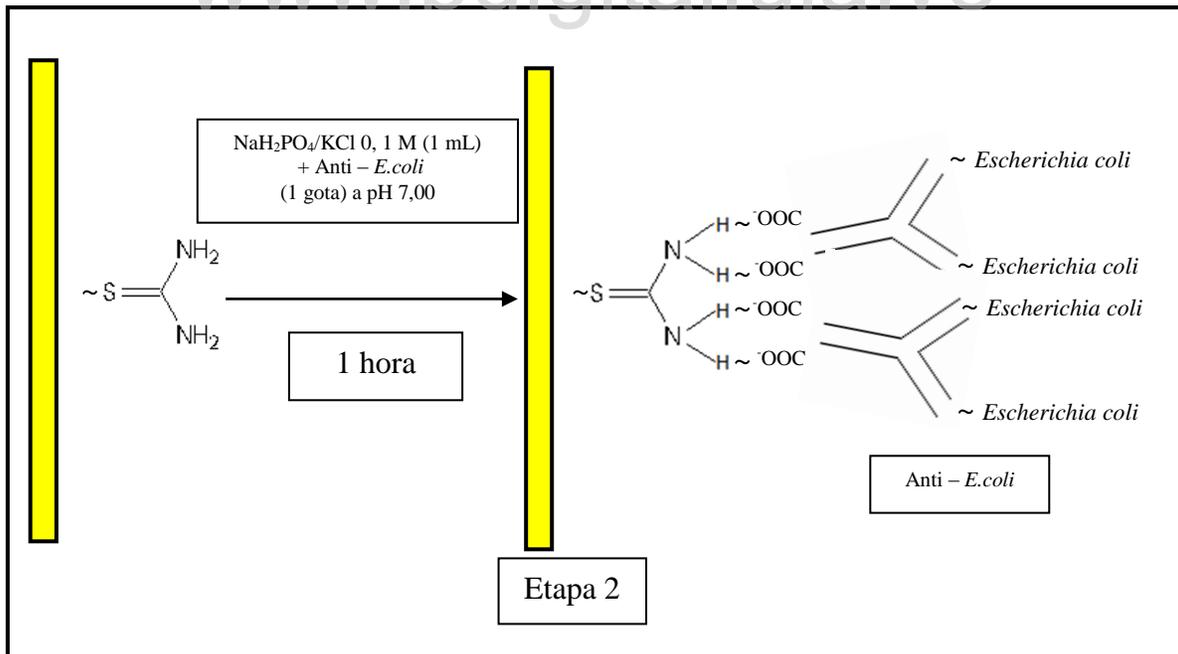


Figura 35. Mecanismo de inmovilización del inmunocomplejo anticuerpo-antígeno a pH Neutro posterior a la saturación con *Escherichia coli*.

5.2.4.2.1- Estabilidad de la unión Anticuerpo-Antígeno al electrodo modificado a pH

Neutro.

Con el objetivo de corroborar la unión del inmunocomplejo a la superficie del electrodo modificado, se realizaron barridos consecutivos en solución electrolítica $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M a pH 7,00 al electrodo de Au/TOU/Ac (1hora)/*E.coli*.(5 mL) ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), observando que a medida que se realizaban los barridos no se evidenciaron cambios significativos (a partir del segundo barrido) en los voltamogramas, por tanto es posible suponer que la unión del inmunocomplejo se mantuvo, y que la unión inmunocomplejo-monocapa es estable (Figura 36).

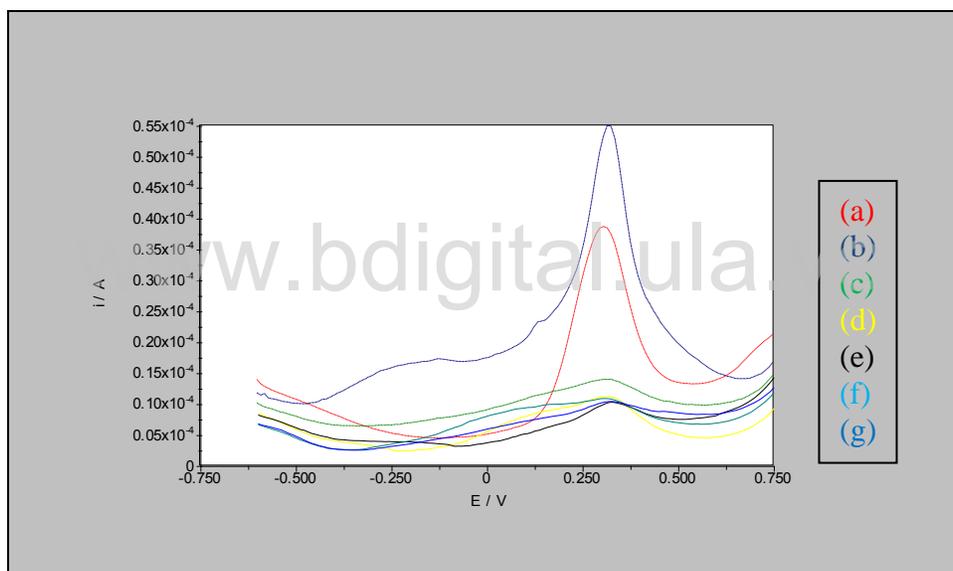


Figura 36. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 7,00. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora, (c) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (segundo barrido), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (tercer barrido) (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (cuarto barrido) y (g) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (quinto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.2.4.3.- Voltametrías de Pulso Diferencial a pH ligeramente Alcalino.

Por ultimo se evaluó el comportamiento del electrodo de oro/tiourea a pH ligeramente alcalino (pH 8,04). En la figura 37 se evidencia que no ocurrió la inmovilización del anticuerpo en la superficie del electrodo (voltamograma b), y que posteriormente al agregar la *Escherichia coli* ocurre la disminución de la respuesta electroquímica a medida que aumenta la concentración de ésta, por lo cual suponemos que la unión anticuerpo-antígeno ocurre en la solución electrolítica (voltamogramas c,d,e y f), observándose una disminución de la corriente de pico. Una vez que el anticuerpo se satura con la *Escherichia coli* (a partir de 5 mL de *Escherichia coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL)) el inmunocomplejo formado se puede inmovilizar en la superficie del electrodo evidenciándose una mayor disminución de la corriente de pico en el voltamograma f.

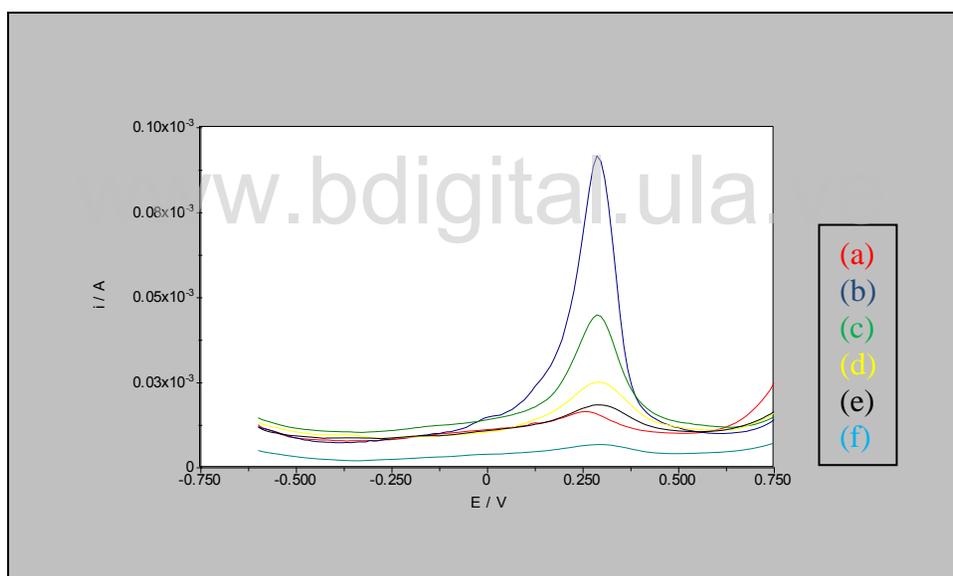


Figura 37. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 8,04. Para: (a) electrodo Au/TOU, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1 mL de *E.coli* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3 mL de *E.coli* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 4 mL de *E. coli* ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL) y (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5 mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_2 .

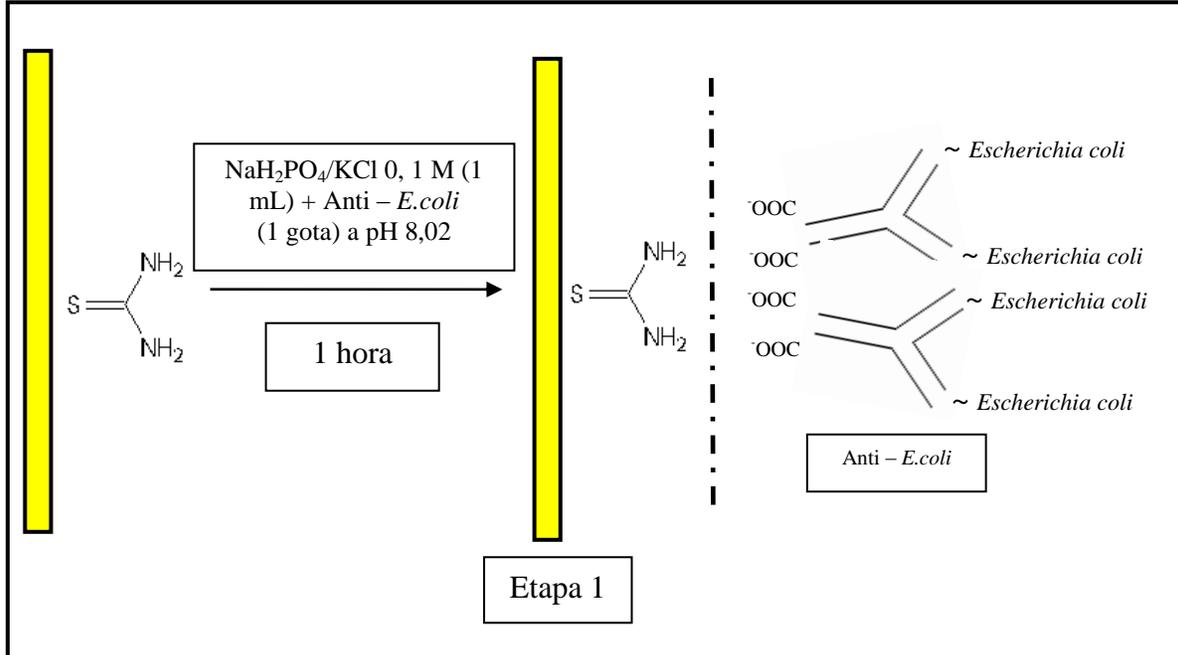


Figura 38. Mecanismo a pH ligeramente Alcalino.

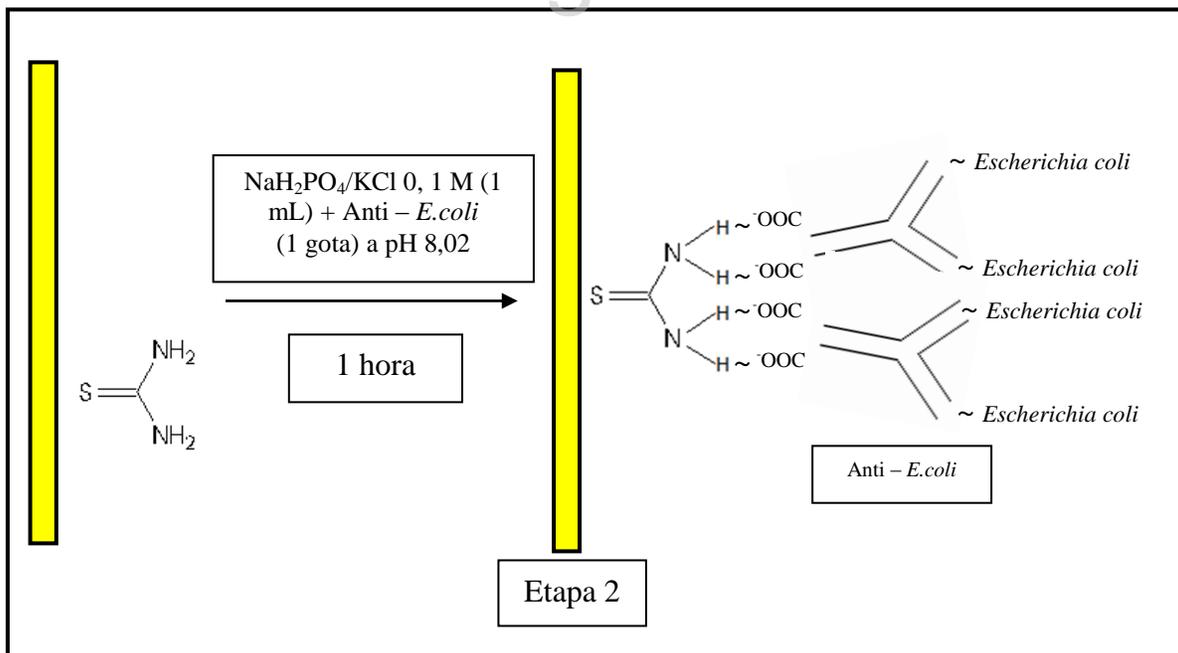


Figura 39. Mecanismo de inmovilización del inmunocomplejo anticuerpo-antígeno a pH ligeramente Alcalino posterior a la saturación con *Escherichia coli*.

5.2.4.3.1- Estabilidad de la unión Anticuerpo-Antígeno al electrodo modificado a pH Alcalino.

Para verificar la unión del inmunocomplejo a la superficie del electrodo modificado, se realizaron barridos consecutivos en solución electrolítica $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M a pH 8,04 al electrodo de Au/TOU/Ac (1hora)/*E.coli*.(5 mL) ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), observando un aumento en los valores de corriente de pico que pueden indicar que el inmunocomplejo va siendo desorbido a medida que se realizan los barridos, hasta alcanzar valores de corriente aproximados al electrodo de oro/tiourea (Figura 40).

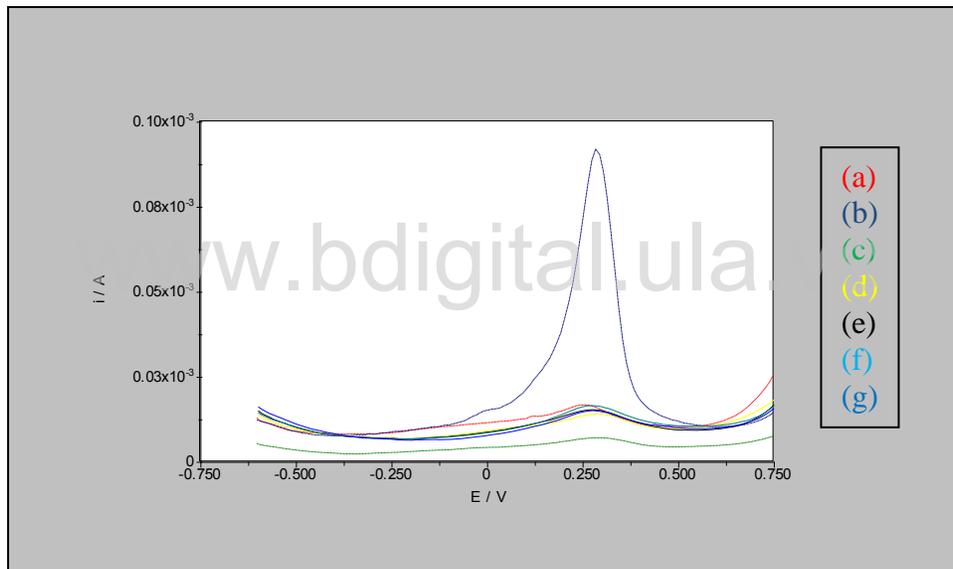


Figura 40. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 8,04. Para: (a) línea discontinua electrodo Au/TOU, (b) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora, (c) línea discontinua Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL), (d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (segundo barrido), (e) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (tercer barrido) (f) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (cuarto barrido) y (g) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1hora/5mL de *E.coli* ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL) (quinto barrido). Ventana de potencial desde -0,6 hasta +0,75 mV/s. Atmósfera de N_2 .

5.2.5.- Variaciones de la Intensidad de Corriente a diferentes pH.

La inmovilización del anticuerpo y su posterior unión a la *Escherichia coli* en la superficie del electrodo de oro modificado, se evidenció por una disminución de la corriente de pico. Al analizar las variaciones de la intensidad de corriente con respecto a los diferentes pH en estudio, se puede evidenciar que a pH 6,20 (ligeramente ácido) cuando se observó una inmovilización del anticuerpo y la posterior detección de la *Escherichia coli* se obtiene el menor valor de intensidad de corriente ($0,11 \times 10^{-4}$ A). Sin embargo, a pH 7,00 y 8,04 no se observó la inmovilización del anticuerpo ni la detección de la *Escherichia coli* obteniendo valores de intensidad de corriente de $0,30 \times 10^{-4}$ A y $0,45 \times 10^{-4}$ A, respectivamente (Figura 41).

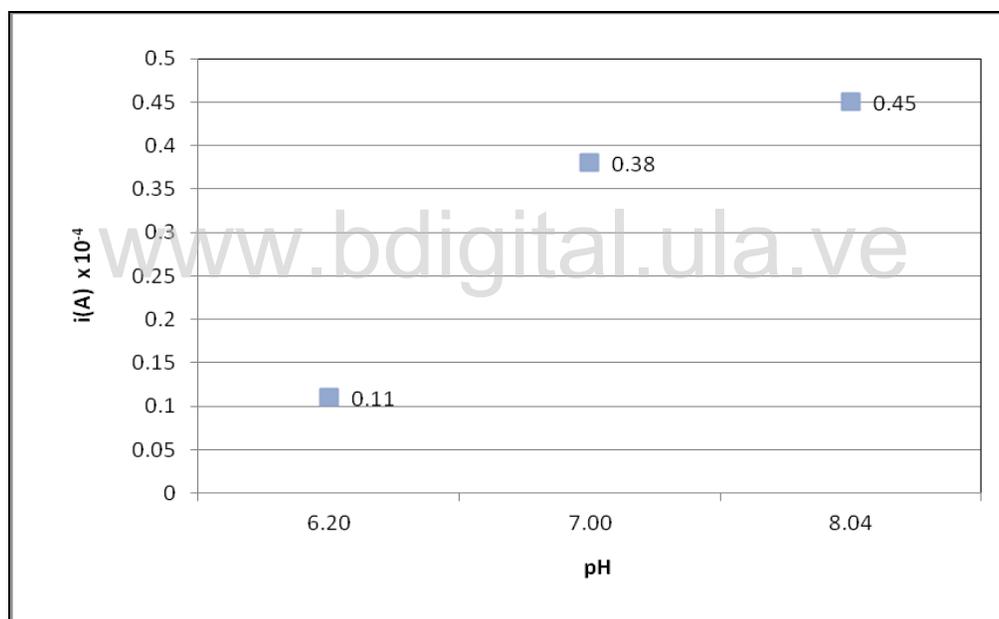


Figura 41. Intensidad de Corriente vs pH en un electrodo de Au/TOU/ NaH_2PO_4 /KCl/Ac 1hora/1mL de *E.coli*.

Una vez que se utilizó mayores volúmenes de *Escherichia coli* se observó la inmovilización del inmunocomplejo a todos los pH en estudio. Suponemos que producto de la saturación del anticuerpo con la *Escherichia coli* se produjo la unión antígeno-anticuerpo y luego su posterior inmovilización en el electrodo de oro modificado, evidenciándose valores de intensidad de corriente similares en los tres pH en estudio (Figura 42).

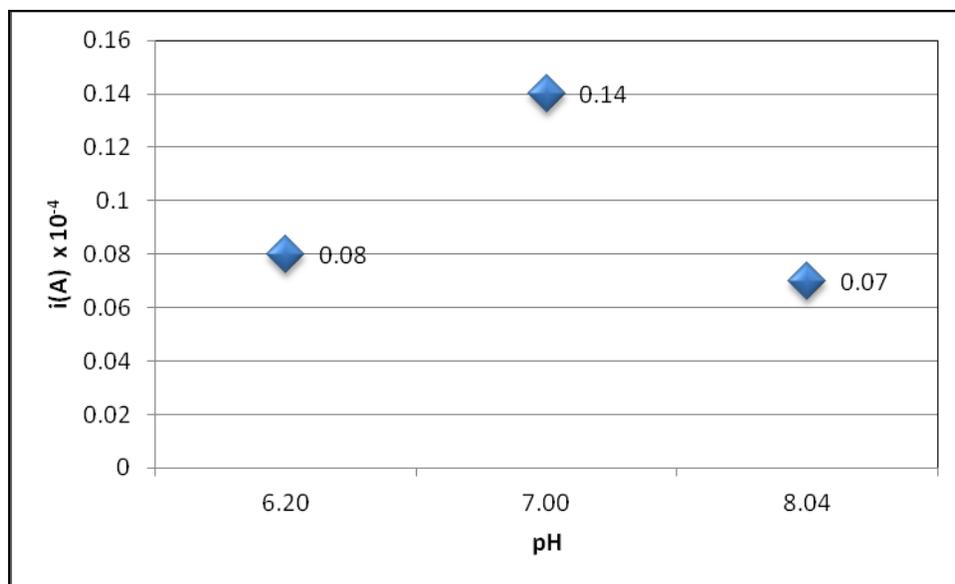


Figura 42. Intensidad de Corriente vs pH en un electrodo de Au/TOU/ NaH_2PO_4 /KCl/Ac 1hora/5 mL de *E.coli*.

5.2.6.- Estabilidad de la Inmovilización del Inmunocomplejo a diferentes pH.

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de la inmovilización del inmunocomplejo en el electrodo de oro modificado, se analizaron los valores de intensidad de corriente a los diferentes pH después de realizar barridos sucesivos en la solución electrolítica renovada. De acuerdo a lo observado podemos suponer que al ocurrir la inmovilización del inmunocomplejo por medio de su adsorción sobre la superficie del electrodo, se impide el flujo normal de electrones y se produce una disminución de la respuesta electroquímica, por tanto después de sucesivos barridos se observó mayor estabilidad en la adsorción del inmunocomplejo a pH 6,20 ($0,09 \times 10^{-4}$ A), y la permanencia de la inmovilización hasta después de cuatro barridos (Figura 43).

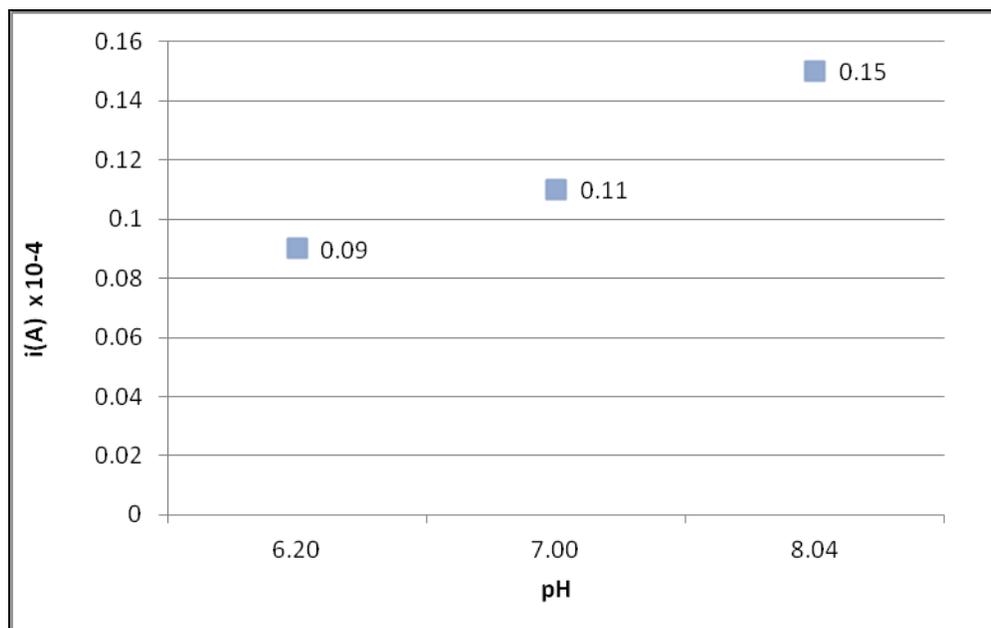


Figura 43. Intensidad de Corriente vs pH en un electrodo de Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora/5 mL de *E.coli* después de cuatro barridos consecutivos.

5.2.7.- Relación entre la Intensidad de Corriente y la concentración de *Escherichia coli* a pH 6,20.

De igual forma fue analizada la relación entre la intensidad de corriente y las cantidades de *Escherichia coli* agregadas a la solución electrolítica, donde se pudo observar que a medida que se aumentaron los volúmenes de ésta, disminuyeron los valores de intensidad de corriente hasta llegar a la saturación del electrodo (a partir de los 3 mL de *Escherichia coli*) ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL). Por tanto, reiteramos que a medida que ocurre la adsorción del inmunocomplejo en el electrodo de trabajo, éste se bloquea impidiendo el flujo de electrones con tanta facilidad y produciendo la disminución de la corriente de pico (Figura 44).

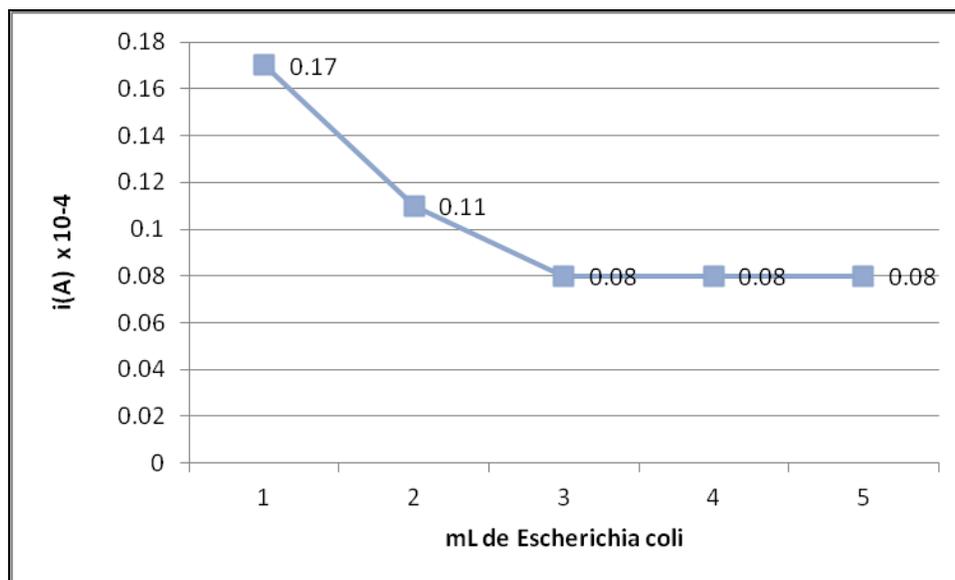


Figura 44. Intensidad de Corriente vs volumen de *Escherichia coli* en un electrodo de Au/TOU/NaH₂PO₄/KCl/Ac 1 hora a pH 6,20.

www.bdigital.ula.ve

5.2.8.- Mecanismo de Inmovilización del Inmunocomplejo.

Un proceso de inmovilización adecuado debe cumplir con ciertos requisitos de importancia: la retención de la actividad biológica de las biomoléculas después de la inmovilización sobre la superficie del sensor, poseer un enlace reproducible, duradero y estable con el sustrato, frente a las variaciones de pH, temperatura, fuerza iónica y a la naturaleza química del microambiente, además debe proporcionar una localización de las biomoléculas de manera uniforme, densa y orientada (Ocampo, A., 2007). De acuerdo a estos requerimientos hemos seleccionado el protocolo de trabajo a pH 6,20 debido a que representa la mejor opción de estabilidad de inmovilización del anticuerpo y detección de la *Escherichia coli*.

De acuerdo a lo observado a pH ácido, podemos suponer las siguientes interacciones en el mecanismo de inmovilización del anticuerpo: inicialmente se realizó la formación de la monocapa autoensamblada de tiourea sobre la superficie limpia del electrodo de oro,

mediante un proceso de quimisorción oxidativa en el que tiene lugar la adición del enlace S-H a la superficie del oro, lo que origina la eliminación reductiva de hidrógeno (Sánchez, J., 2007; Matheus, P., 2003), según la siguiente reacción:



Una vez formada la monocapa de tiourea, al incubar el electrodo modificado (Au/TOU) en la solución buffer de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ a pH ligeramente ácido (6,20), los grupos amino terminales de la tiourea se protonan, permitiendo su unión al anticuerpo a través de los grupos COO^{-} del mismo, por simple atracción electrostática. Posteriormente, al agregar a la solución la cepa de *Escherichia coli*, ésta se une al anticuerpo Anti-*E. coli*, por un proceso de afinidad específico de antígeno-anticuerpo. Esta afinidad viene determinada por la zona de enlace del anticuerpo, la cual consta de residuos de aminoácidos que interaccionan con la zona complementaria del antígeno, proceso resultante de las fuerzas de atracción y repulsión entre el anticuerpo y su antígeno correspondiente, debido a fuerzas no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals (Zacco, E., 2006).

5.3.- Aplicaciones del Biosensor (Au/TOU/Ac).

Una vez elaborado el inmunosensor se planteó someter a prueba el electrodo modificado (Au/TOU/Ac) utilizando muestras reales, que presentan matrices complejas con múltiples analitos y que pueden causar problemas de interferencias al momento de realizar las medidas. Se procedió a analizar muestras de agua potable. En la figura 45, se observan las voltametrías de pulso diferencial realizadas a muestras de agua de chorro, donde no se observó diferencia significativa en la corriente de pico anódica (aprox. a potencial de 0,35 V) de los voltamogramas b,c y d, característica de la detección de *Escherichia coli*, por tanto, es de suponer que al agregar los primeros 5 mL de agua de chorro (voltamograma b) la cantidad de *Escherichia coli* contenida en la muestra se unió al anticuerpo inmovilizado hasta ser saturado, por ende al seguir adicionando mayor volumen de muestra no se observó variación significativa en los siguientes voltamogramas.

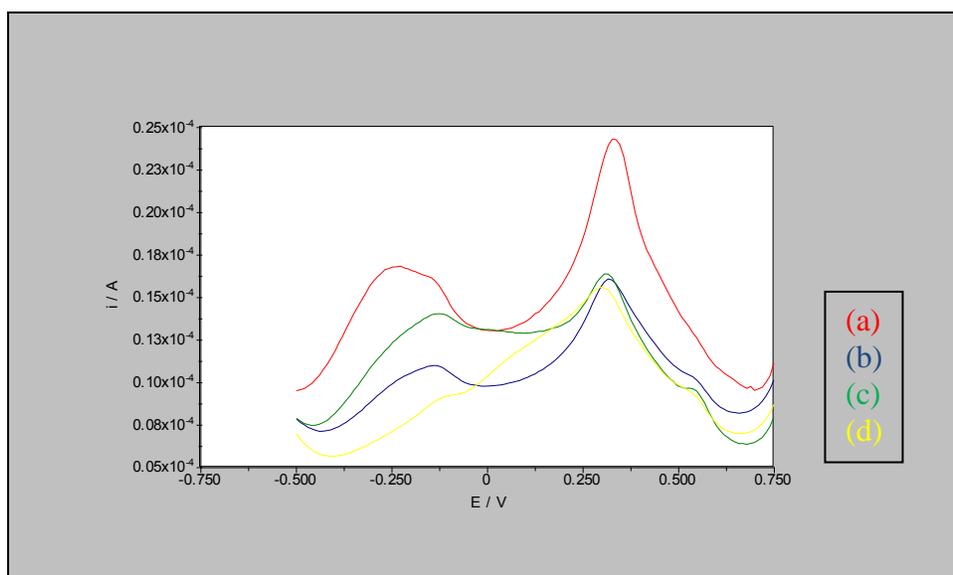


Figura 45. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,20. Para: (a) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5mL de Agua de chorro, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 10mL de Agua de chorro d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 15mL de Agua de chorro. Ventana de potencial desde -0,5 hasta +0,75 V. Atmósfera de N_2 .

De igual forma se analizaron muestras de agua del río Albarregas del Municipio Libertador del Estado Mérida, observándose que a medida que se agregaban cantidades determinadas de la muestra de agua, disminuía la corriente de pico anódica (ubicada aprox. a potencial de + 0,35 V) con cada adición (voltamogramas b, c y d). Podemos decir que el agua del río Albarregas posee *Escherichia coli* y al ser agregada, se unió al anticuerpo formando el inmunocomplejo en la superficie del electrodo de oro modificado (ver figura 46).

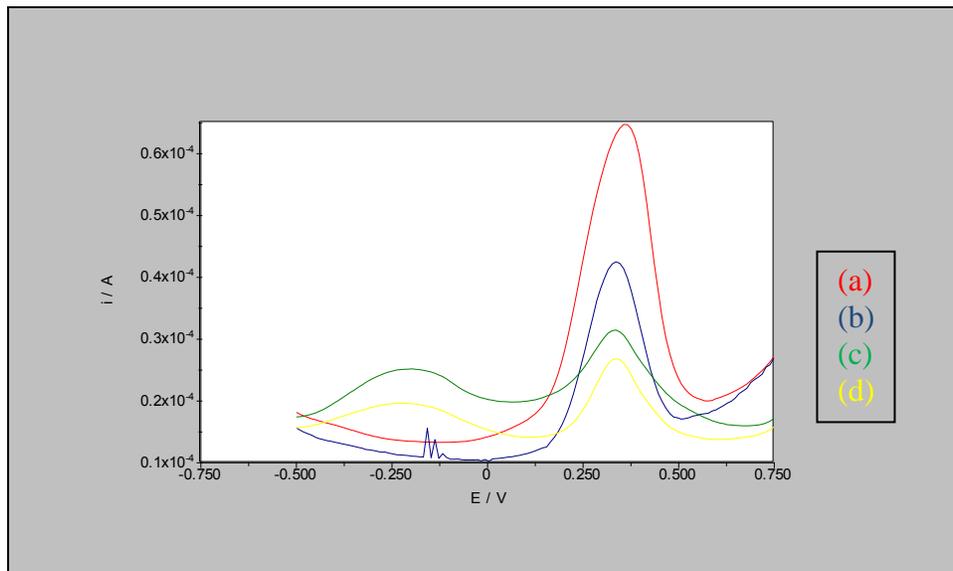


Figura 46. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,20. Para: (a) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 5mL de Agua de río, (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 10mL de Agua de río d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 15mL de Agua de río. Ventana de potencial desde -0,5 hasta +0,75 V. Atmósfera de N_2 .

5.3.1.- Especificidad de la Unión Anticuerpo-Antígeno.

Con el fin de comprobar la especificidad del electrodo modificado con el Anti-*E.coli*, se realizaron voltametrías de pulso diferencial agregando cantidades determinadas de solución de *Klebsiella pneumoniae* la cual no es específica para el anticuerpo utilizado (ver figura 47). Se puede observar que a medida que es agregada la cepa *Klebsiella pneumoniae*, no hay disminución de la corriente de pico anódica, es decir, ésta no se ve afectada por la adiciones de *Klebsiella pneumoniae*, suponiendo que la *Klebsiella pneumoniae* no se une al anticuerpo y por tanto, no es inmovilizada en la superficie del electrodo. Sin embargo, observamos que a medida que se agregan volúmenes de *Klebsiella pneumoniae*, las corrientes de pico anódicas aumentan, pudiendo concluir que además de ser un biosensor

específico para la unión anticuerpo-antígeno (*Anti-E.coli*), también puede ser selectivo para reconocer la presencia o ausencia de *E. coli* en un medio, así como para saber si un anticuerpo es específico o no para un determinado antígeno.

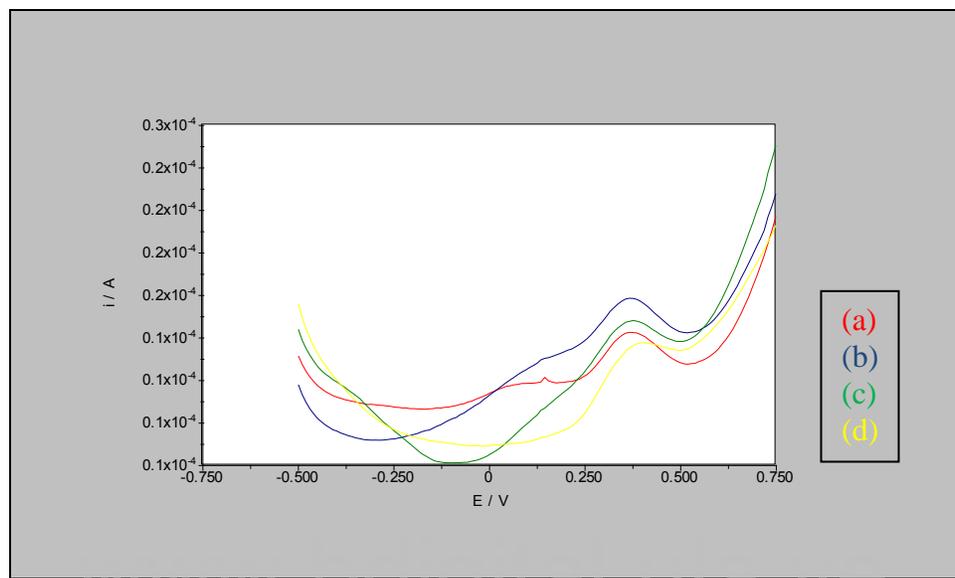


Figura 47. Voltametrías de pulso diferencial en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}$ 0,1 M pH 6,2. Para: (a) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora, (b) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 1mL de *Klebsiella pneumoniae* ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), (c) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 2mL de *Klebsiella pneumoniae* ($6,0 \times 10^8$ UFC/mL) d) Au/TOU/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KCl}/\text{Ac}$ 1 hora agregando 3mL de *Klebsiella pneumoniae* ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL). Ventana de potencial desde -0,5 hasta +0,75 V. Atmósfera de N_2 .

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a las experiencias obtenidas en el desarrollo de esta tesis se puede concluir:

1.- Las monocapas autoensambladas de tiourea sobre oro, representan un medio ideal para la inmovilización de biomoléculas, mostrando ser una excelente herramienta para la inmovilización de anticuerpos Anti-*E.coli*.

2.- La inmovilización de los anticuerpos Anti-*E. coli* sobre la superficie de los electrodos de oro modificados mostro una buena efectividad para la unión, inmovilización y detección de *Escherichia coli*.

3.- Los evaluación de pH demostró que con el fin de obtener mayor estabilidad y permanencia de la unión antígeno-anticuerpo, se deben utilizar pH ligeramente ácidos (pH 6,20), de allí la importancia del pH de la solución electrolítica en la respuesta obtenida.

4.- La utilización de anticuerpos específicos permite diferenciar y detectar específica- y selectivamente *Escherichia coli* mediante la unión antígeno-anticuerpo.

5.- La voltametría cíclica fue utilizada como técnica de diagnóstico en la caracterización de los soportes de oro y de las monocapas autoensambladas de tiourea.

6.- La voltametría de pulso de diferencial fue utilizada para mejorar la sensibilidad del método utilizado y permitió la observación mas detallada de la inmovilización del inmunocomplejo, debido a que esta técnica disminuyó los efectos de la corriente de carga capacitiva y mejoró la relación señal-ruido, mejorando a su vez el límite de detección.

7.- El tiempo requerido para el análisis de muestras utilizando el biosensor diseñado en esta investigación (previamente preparado con la monocapa toiurea/anticuerpo), aproximadamente 30 minutos, representa una ventaja frente a las técnicas microbiológicas clásicas (aproximadamente 48 horas), simplificando el proceso de análisis de muestras complejas con el fin de detectar este patógeno en particular.

8.- La metodología utilizada en esta investigación puede ser recomendada para la elaboración de un biosensor selectivo a *Escherichia coli* y para reconocer específicamente este patógeno en muestras complejas con múltiples microorganismos.

9.- Los resultados obtenidos permitieron sugerir un método para la inmovilización de moléculas biológicas en superficies de oro modificadas. De igual forma, el método utilizado en esta investigación permitió analizar la especificidad de la unión anticuerpo-antígeno (Anticuerpo-*E.coli*), al agregar concentraciones de *Klebsiella pneumoneae*, demostrando la capacidad de reconocer la presencia o ausencia de *E. coli* en un medio, así como conocer si un anticuerpo es específico o no para un determinado antígeno, resultados alentadores en el desarrollo de biosensores para la detección de patógenos.

www.bdigital.ula.ve

VII.- BIBLIOHEMEROGRAFIA

Abad J., Vélez MIN., Santamaría C., Guisán J., Matheus P., Vázquez L., Gazaryan I., Gorton L., Gibson T., Fernández V. Immobilization of Peroxidase Glycoprotein on Gold Electrodes Modified with Mixed Epoxy-Boronic Acid Monolayers. *J. Amin. Chemin. Soc.*, 2002; 124: 12845 – 12853.

Acuña W., Guevara J. Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*. 2002; 3 (1): 38-41.

Annapurna J., Schraa S., Anvarhusein A. Equilibrium binding constants and facile dissociation of novel serum albumin-dicyanoaurate(I) complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 1998; 3:9-17

AOAC. *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration. 7 th ed. Arlington, VA. 1992.

APHA. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association. 16th Edition. 1992; 47: 15-17.

Ataka K., Giess F., Knoll W., Naumann R., Haber-Pohlmeier S., Björn R., Heberl J. Oriented Attachment and Membrane Reconstitution of His-Tagged Cytochrome *c* Oxidase to a Gold Electrode: In Situ Monitoring by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. *J. Amin. Chemin. Soc.* 2004; 126:16199-16206.

Blanco J., Blanco MIN., Blanco JE., Mora A., Alonso MIN., González E., Bernárdez MIN. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. en: Vadillo S., Piriz S. y Mateos E. *Manual de Microbiología Veterinaria*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2002; 301- 325.

Bacteriological Analytical. [Manual Online] 2002. 4:G. [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en: www.scielo.com

Carreño MIN. Evaluación de técnicas moleculares e inmunoenzimáticas para la detección de *E. coli* enterohemorrágico en brotes de toxi-infecciones alimentarias. Revista Médica de Chile. 2002; 130 (6): 603-9.

Centro Europeo de Prevención y Control de las Enfermedades. Reporte Brote de *Escherichia coli* en Alemania. 2011. [Consultado el 18 de Junio de 2011] Disponible en: www.elmundo.es

Chinen I. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista Argentina de Microbiología. [Revista en línea] 2007; 39 (1). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Cochran W. Técnicas de Muestreo. Editorial C.E.C.S.A. México (México).1982. p.513.

Coffer MIN., Shaw C., Eidsness MIN. J._ Reactions of Aurano-fin and Et3PAuCl with bovine serum albumin. Inorg. Chem. 1986; 25:333-339

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Edition. Frances Pouch Downes. 1992

Costa A., González MIN., Escosura A. Complejos de oro como marca de moléculas. [Trabajo Especial de Grado]. Universidad de Oviedo Plaza de Riego. 2005.

Curtis MIN., Franceschi O., De Castro N. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. [Revista en línea] 2000; 50 (2). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Di Pietro S., Haritchabalet K., Cantoni G., Iglesias L., Mancini S., Temperoni A., Labanchi J., Barbarossa N., García MIN., Cofre MIN., Rosales S., Herrero E., Bigatti R., Orellana O., Larrieu E. Vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos en la provincia de Río Negro, Argentina, 1993-2001. *Medicina*. [Revista en línea]. 2004; 64 (2): 120-124 [Consultado el 12 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Donnenberg, MIN. Introducción. En: *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. Elsevier Science Inc. Baltimore. 2002.

Gómez D., Miliwebsky E., Silva A., Deza N., Zotta C. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un Jardín Maternal de la Ciudad de Mar del Plata. *Rev. argent. microbiol.* 2005; 37:4.

Gómez D., Miliwebsky E., Fernández C., Pascua A. Aislamiento y Caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda. Servicio de Bacteriología, Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan H. Jara” - ANLIS “Dr. Carlos G Malbrán”. Ministerio de Salud. Mar del Plata (Argentina). [Documento en línea]. [Consultado el 13 de julio de 2010].

González V., García E., Ruiz O. Aplicaciones de Biosensores en la Industria Agroalimentaria. [Informe en línea]. 2005. [Consultado el 27 de octubre de 2010] Disponible en: www.madrimasd.com

Gutiérrez, MIN. Comportamiento de la diarrea causada por virus y bacterias en regiones cercanas a la zona ecuatorial. *Colomin. Med.* 2005; 36(3): 6-14.

Hall R. Biosensor technologies for detecting microbiological foodborne hazards. *Microbes and Infection*. 2002; 4:425–32.

Heidenreich B. Detection of *Escherichia coli* in meat with an electrochemical biochip. *Journal of Food Protection*. 2010; 73(11):2025-33.

Ibarra C. Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Archivos argentinos de pediatría. [Revista en línea] 2008; 106(5). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. Biosensors & Bioelectronics. 1999;14: 599-624.

Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial Acribia. Madrid (España). 1994; 537-557.

Johnson J. *Escherichia coli*: Virulence mechanisms of a versatile pathogen. Editorial Elsevier Science Inc. Barcelona. 2002; 55-77.

Jung B., Jung S., Kweon C. Development of a rapid immunochromatographic strip for detection of *Escherichia coli* O157. Journal of Food Protection. 2005; 68(10):2140-3.

Kaper J., Nataro J., Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature. 2004; 2:123-40.

Keel K., Tosar J., Laíz J. Desarrollo de superficies modificadas oro – anticuerpo anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bovina. Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay. 2010; 5:29.

Kolthoff I., Tomsicek W. J. Phys. Chem. 1935; 39: 945-954

Koneman E., Allen S., Janda W. Diagnóstico Microbiológico. 4ta ed. Editorial JB Lippincott Company. Washington DC.1992;172- 243

Laguna J., Piña E. Bioquímica de Laguna. 5ta. ed. Editorial El Manual Moderno. 2002; 8-10.

Leonard P. Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. Enzyme and Microbial Technology. 2003; 32:3-13.

Luigi-Sandoval T., Loaiza R., López N., García F. Evaluación de la calidad sanitaria y detección de *Salmonella spp.*, en cremas de leche no pasteurizadas expandidas en el eje costero Carabobo-Falcón. Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. [Revista en línea] 2005; 25 (1):18-22

Margall N., Domínguez A., Prats G., Salleras L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. Revista Española de Salud Pública. 1997; 71:5.

Márquez O., Márquez J. Voltametría. 2012; 3: 46 -87.

Marzocca MIN., Marucci P., Sica MIN., Álvarez E. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. Revista Argentina de Microbiología. [Revista en línea] 2006; 38 (1). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Matheus P. Diseño y preparación de electrodos enzimáticos basados en interacciones específicas: Desarrollo de estrategias para su estabilización [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental. Madrid (España). 2003.

Matheus P., Abad J., Fernández V.MIN. Modificación de superficies de oro para la inmovilización orientada de peroxidasa de rábano recombinante. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia. 2007; 30 (3):225-35.

Matheus P., Abad J., Fernández V.MIN., Fernández L. Influencia del Estado de Oxidación del Ión Cobalto en la Estabilidad de Electrodos Modificados con Monocapas SAM-TOA-ANTA-Coⁿ⁺-HRP-N_{His}*. Avances en Química. 2008; 3(2):69-77.

Matheus P., Abad J., Navarro P., Belandria O., Hernández N., Fernández V.MIN. Efecto de la polietilenimina en la actividad catalítica de la peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*) inmovilizada en electrodos de oro modificados con monocapas autoensambladas de tioles (SAMs). Avances en Química. 2009; 4(1), 37-43.

Meichtri L. Shiga toxinproducing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 96:189-98.

Menolasina S. Fundamentos y Aplicaciones de electroquímica. 1era. ed. Mérida (Mérida): Universidad de Los Andes. Consejo de Publicaciones; 2004.

Miliwebsky E. Síndrome urémico hemolítico en niños de Argentina: su asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Bioquímica y Patología Clínica.* 1999; 63:113-21.

Molina A., Villavicencio C., Fernández L. Evaluación de un electrodo de carbón vítreo modificado con Zeolita tipo "A" en la adsorción de 2-clorofenol. *Avances en Química.* 2009; 4(2): 63-72.

Montiel F., Lam MIN. Manual de Microbiología Clínica. Editorial Mediterráneo. Madrid (España). 2000; 118-249.

Murray P. Microbiología Médica. 4ta ed. Editorial Elsevier Science. Madrid (España). 2002.

Narváez C., Carruyo G., Moreno MIN., Rodas A., Hoest A., Wittum T. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica.* 2009; XVII (3): 239 – 45.

Nicholson R., Shain I. *Anal. Chem.* 1964; 36: 706-723

Ocampo A., March C., Montoya A. Inmunosensores Piezoeléctricos: Revisión General y su Aplicación en el Análisis de Pesticidas. *Revista EIA.* 2007; 7: 97-110.

Otero E. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Revista Argentina de Microbiología. [Revista en línea] 2007; 39 (1). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Parra MIN. Síntesis y Caracterización de Ligandos Hidroxilados de Base de Schiff. Aplicación al desarrollo de Sensores y Biosensores. [Trabajo Especial de Grado Doctor en Ciencias Químicas]. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias ; Madrid. (España). 2009.

Patel P. Biosensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. Trends in Analytical Chemistry. 2002; 21(2): 96-115.

Pavoni S., Cobas H., Zayas A., Álvarez E. Evaluación de un sensor de capas delgadas para la detección voltamétrica del crecimiento de *Escherichia coli*. UCT. 2006;10:40

Peresi J., Almeida I., Lima S., Marques D., Rodrigues E., Fernandes S., Gell D., Irino K. Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella enteritidis*. Revista de Salud Pública. [Revista en línea]. 1998; 32 (5). [Consultado el 12 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Pishko MIN., Katakis I., Lindquist S., Ye L., Gregg B., Heller A. Direct Electrical Communication Between Graphite Electrodes and Surface Adsorbed Glucose Oxidase/Redox Polymer Complexes. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1990; 29:82-84

Prescott L., Harley J., Klein D. Microbiology. 5ta. ed. Editorial McGraw Hill. Madrid. 2002

Radke S., Alocilja E. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. Coli* O157:H7. Biosensors and Bioelectronics. 2005; 20(8):1662-7.

Randles, J. Trans. Faraday Soc. 1952; 48: 828-832.

Reuben A., Treminio H., Arias MIN., Chaves C. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* en alimentos de origen animal en Costa Rica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. [Revista en línea] 2003; 53 (4). [Consultado el 15 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Ricci F. Reagentless, Electrochemical Approach for the Specific Detection of Double- and Single-Stranded DNA Binding Proteins. Anal. Chemin. 2009; 81(4): 1608–14.

Rivas MIN., Balbi L., Miliwebsky E., García, B. Síndrome Urémico Hemolítico en Niños de Mendoza, Argentina. Asociación con la Infección por *Escherichia coli* Productor de Toxina Shiga. Medicina. 1998; 58:1-7

Rivas MIN. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del Agente Etiológico, Reservorios y Vías de Transmisión. Medicina (Buenos Aires), 2006; 66 (III): 27-32

Rodríguez MIN., Lengomín MIN., Caballero A., Castro A., Hernández A. Análisis de las enfermedades transmitidas por los alimentos en Cuba. Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. 1996; 10(2):100-4.

Rojas T., Vásquez Y., Reyes D., Martínez C., Medina L. Evaluación de la técnica de inmunoseparación magnética para recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche. Unidad de Microbiología Ambiental, Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. 2006; 56:3.

Rubeglio E. *Escherichia coli* O157 H7: presencia en alimentos no cárnicos. Arch. Argent. Pediatr. 2007; 105(3):193-4.

Sánchez J. Optimización de un Método Voltamétrico para la Inmovilización y Detección de Vitamina K3. [Trabajo Especial de Grado Licenciatura en Bioanálisis]. Universidad de Los Andes. Facultad de Farmacia y Bioanálisis; Mérida. (Venezuela). 2007.

Scheutz F., Strockbine N., Genus I. Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2da Ed. Editorial Bergey's Manual Trust. 2005; 2: 607-24.

Sousa C. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. J. Venomin. Animin. Toxins incl. Trop. Dis. 2006;12: 363-373.

Todar K. Online textbook of bacteriology. [Libro en línea]. 2008. [Consultado el 23 de Enero de 2011]. Disponible en: <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>.

Treviño R. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en Carne Fresca de Res Mediante PCR Múltiple. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. 2009; 10 (2).

Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. Chemin. Rev., 1996; 96: 1533 – 1554.

Universidad Nacional del Nordeste. Hipertextos del Área de la Biología. [Libro en Línea]. 2008. [Consultado el 28 de enero de 2011]. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar>.

Valeria J., Solari V., Álvarez I., Arellano C., Vidal R., Carreño MIN., Mamani N., Fuentes D., Oryan MIN., Muñoz V. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Período 1999-2000. Revista Médica de Chile, 2002; 130 (5): 495-501.

Varela G., Chinen I., Gadea P., Miliwebsky E. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. Revista Argentina de Microbiología. 2008; 40: 93-100

Vázquez MIN. Voltametría Cíclica. Instituto de Química de la Universidad de Antioquia. [Documento en línea]. 2007. [Consultado el 30 de enero de 2011]. Disponible en <http://aprendeenlinea.udea.edu.com>

Velasco MIN., Mottram T. Biosensor technology addressing agricultural problems. Biosystems Engineering. 2003; 84(1): 1-12.

Vidal MIN., Carreño MIN., Vidal R., Arellano C., Solar V., Prado V. Evaluación de técnicas moleculares e inmunoenzimáticas para la detección de *E coli* enterohemorrágico en brotes de toxi-infecciones alimentarias. *Revista Médica de Chile*. 2002; 130 (6): 603-609.

Villalobos L., Elguezabal L.. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Boletín del IOV* [Documento en línea] 2000; 39(1). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en <http://hdl.handle.net/123456789/823>

Villalobos L., Martínez B., Blanco A., Maldonado A., Bastardo J. Molecular detection of shiga toxin-producing (stx1) *Escherichia coli* and rotavirus in stools of children with diarrhea. *Invest. Clin*. 2008; 49(3): 387 – 95

Wang L. Sensing *Escherichia coli* O157:H7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based QCM immunosensor. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2008; 9(2): 121–31.

Yang L., Li Y. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst*. 2006; 131(3):394-401.

Zacco E. Diseño de Nuevos Materiales de Afinidad Universal. Aplicación en Sensores. Group of Sensors and Biosensors. Departamento de Química. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona.(España). 2006.

Zea Z., Rios MIN. Evaluación de la calidad microbiológica de los productos cárnicos analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" durante el período 1990-2000. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. [Revista en línea] 2004; 35 (1). [Consultado el 13 de julio de 2010]. Disponible en www.scielo.com

Zhu P. Detection of water-borne E.coli 0157 using the integrating waveguide biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005; 21:678-683.

Zuzuarregui A. Desarrollo de un Sistema de Detección de Endotoxinas basado en la Optimización e Implementación de un protocolo de Biofuncionalización sobre un Biosensor Electroquímico de diseño específico. [Tesis Doctoral]. Universidad de Navarra. 2013.

www.bdigital.ula.ve