

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE *ESCHERICHIA COLI* O174 PRODUCTOR DE TOXINA

PRELIMINARY DETECTION AND CHARACTERIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* O174 SHIGA TOXIN-PRODUCING

Cecilia Cundon (Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]), **Edith Marey** (Tecnología, Protección e Inspección Veterinaria de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]), **Fernanda Roldán** (Tecnología, Protección e Inspección Veterinaria de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]), **Clotilde S. Canosa Montero** (Microbiología, Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios y Conexos [APAC], DLA/DGLyCT/Senasa), **Armando Navarro** (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM]), **Nora Lia Padola** (Inmunoquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires [FCV, UNCPBA]), **Pilar Gadea** (Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay [FM, UR]), **Ximena Blanco Crivelli** (Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]), **Jessica Babich** (Microbiología, Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios y Conexos [APAC], DLA/DGLyCT/Senasa), **Daniela Rocchi** (Microbiología, Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios y Conexos [APAC], DLA/DGLyCT/Senasa), **María Cecilia Kiernicki** (Microbiología, Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios y Conexos [APAC], DLA/DGLyCT/Senasa), **Susana Binotti** (Microbiología, Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios y Conexos [APAC], DLA/DGLyCT/Senasa), **Andrea Calzetta Resio** (Tecnología, Protección e Inspección Veterinaria de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]) y **Adriana Bentancor** (Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]) - Argentina

Resumen

El síndrome urémico hemolítico (SUH), una enfermedad transmitida por alimentos, es la principal causa de insuficiencia renal aguda y la segunda causa de insuficiencia renal crónica y de trasplante renal en niños en la Argentina, con 400 a 500 notificaciones anuales de casos. Este síndrome origina los costos más elevados para el Sistema Nacional de Salud. Se considera que *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) es el agente etiológico más frecuente del SUH. Dentro de este patotipo STEC asociado a SUH, se destaca el serotipo STEC O157:H7 que representa el 60 % de dichos aislamientos. Otros serogrupos STEC no-O157 representan el 40 % de los aislamientos de STEC provenientes de SUH. La prevalencia de cada serotipo depende de cada país. Se informó que los cuatro serogrupos prevalentes en la Argentina dentro de los no-O157 son O145, O121, O26 y O174. De ellos, el serogrupo O174 se destaca como problemática local y no está cubierto por protocolos de diagnóstico europeos ni americanos. Las infecciones por STEC en la Argentina, por su naturaleza endémica, su alta incidencia y la presentación de brotes difusos, difieren de las de otras regiones referenciales en materia normativa. Para asegurar la calidad e inocuidad agroalimentaria, podría ser incluido el diagnóstico de O174 en alimentos. El objetivo de este proyecto es evaluar técnicas diagnósticas específicas de este serogrupo.

Palabras clave: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, síndrome urémico hemolítico, No-O157, O174, diagnóstico, alimentos, calidad e inocuidad agroalimentarias.

Abstract

Hemolytic uremic syndrome (HUS), a foodborne disease, is the main cause of acute renal failure and the second cause of chronic renal failure and kidney transplant in children in Argentina, with 400-500 cases each year. This syndrome provokes the highest costs to the National Health System. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is considered the most frequent etiological agent of HUS. Among STEC serotypes associated with HUS, O157:H7 represents 60% of the isolates. Other non-O157 STEC serogroups account for the remaining 40%. The prevalence of each serotype varies from one country to other. It was reported that the four prevalent non-O157 serogroups in Argentina are O145, O121, O26 and O174. Among these, serogroup O174 stands out as a local problem and is not included in european or american diagnostic protocols. STEC infections in Argentina, due to their endemic nature, high incidence and occurrence of diffuse outbreaks differ from those taking place in countries whose regulatory standards serve for reference purposes. In order to ensure food quality and safety, diagnosis of O174 in food should be included. The aim of this study is to assess specific diagnostic techniques for this serogroup.

Keywords: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, hemolytic uremic syndrome, non-O157, O174, diagnosis, foods, agri-food quality and safety.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un importante miembro de la microbiota intestinal de humanos y animales. Algunas cepas poseen un conjunto de factores de virulencia que, de estar presentes, pueden afectar un amplio rango de procesos celulares dando origen a enfermedades intestinales y extraintestinales. Se reconocen seis grupos de *E. coli* productores de diarrea: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* shigatoxigénica (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). Estos “patotipos” se distinguen de los simbiontes de la microbiota por la presencia de factores de virulencia adquiridos principalmente por transferencia horizontal de genes a partir de otras bacterias (Kaper *et al.*, 2004). Debido a este mismo fenómeno, además de las cepas patógenas intestinales, se identifican *E. coli* extraintestinales causantes de distintos tipos de patologías (Nataro *et al.*, 1998).

E. coli shigatoxigénica STEC es un patógeno endémico en la Argentina con alto impacto en el sistema de salud. Los principales genes de virulencia de STEC son los que codifican para las toxinas Shiga (*stx1*, *stx2* y sus variantes), responsables del daño del endotelio vascular sistémico, de adhesinas tales como la intimina (*eaeA*) y una enterohemolisina (*ehxA*) codificada en un megaplásmido (Paton *et al.*, 1998). Las potentes citotoxinas Stx están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. Stx2 tiene una actividad citotóxica cien veces superior a Stx1 (Valdivieso-García *et al.*, 1993).

STEC presenta genes que codifican para las toxinas Shiga, junto con marcadores de virulencia adicionales que definen el potencial de riesgo de cada cepa (Parma *et al.*, 2000; Chinen *et al.*, 2001 y 2009; Gómez *et al.*, 2002; Gioffre *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2003; Lucchesi *et al.*, 2006; Jure *et al.*, 2010; Miccio *et al.*, 2011). Este patógeno, con una dosis infectiva muy baja (<100UFC.g⁻¹) y una vía de transmisión fecal-oral, determina la aparición de brotes transmitidos por alimentos (Bender *et al.*, 1997; Wendel *et al.*, 2009). Por sus características epidemiológicas y el impacto en el sistema de salud, se iniciaron sistemas de vigilancia activa internacionales que permiten correlacionar cepas de campo, alimentos, portadores, reservorios y casos clínicos (Caprioli *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2005; Beutin *et al.*, 2006; Miliwebsky *et al.*, 2007; Rumi *et al.*, 2007, 2008, 2012; Blanco Crivelli *et al.*, 2012, Brusa

et al., 2013). *E. coli* O157:H7 es el serotipo prevalente asociado a grandes brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica (CH) y SUH. Sin embargo, más de cien serotipos poseen un potencial patogénico similar. Genéricamente se los ha denominado STEC no-O157 (Karmali, 1989). Dentro de este grupo, los cuatro serogrupos con mayor prevalencia en la Argentina son O145[H27, H-, NT], O121[H19], O26[H2, H11, NT] y O174[H8, H21, H28, H-] (Rivas, 2013). Potencialmente, el vehículo para STEC son los alimentos crudos o elaborados contaminados, en algún punto de su proceso, con materia fecal de animales portadores (Riley *et al.*, 1983). En el nivel regional, la fuente de infección frecuente corresponde a productos cárneos y lácteos deficientemente cocidos o sin pasteurizar (Rivas *et al.*, 2006 y 2008).

El sistema nacional de salud, mediante su centro de referencia, ha determinado los serotipos prevalentes de impacto nacional. Entre los primeros cuatro serotipos prevalentes no-O157, se señaló O174, a diferencia de los EE. UU. y Europa (Rivas *et al.*, 2013).

Considerando que la epidemiología de las infecciones por STEC en la Argentina es distinta de las detectadas en otros países, con brotes difusos y casos esporádicos (Rivas *et al.*, 2008), el análisis de los agentes etiológicos implicados es relevante y oportuno.

El serogrupo O174, de impacto local, no está incluido en los paneles previstos por la Unión Europea ni por los EE. UU. (USDA /FSIS MLG 5.04, 2008; USDA /FSIS MLG 5B.00, 2010). De esta forma, su diagnóstico escapa a los sistemas de control agroalimentario y genera una ventana de incertidumbre en los procesos de inocuidad para el mercado interno (Código Alimentario Argentino, 2010). La identificación y clasificación precisa de los microorganismos patógenos, por lo tanto, es de valor crítico en la evaluación epidemiológica de un brote y en la identificación de potenciales fuentes de infección (Rangel *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2006). En este sentido, las técnicas microbiológicas tradicionales no permiten evaluar la identidad de los clones circulantes; por ello, los sistemas contemporáneos de vigilancia epidemiológica utilizan cada vez más los métodos basados en el ADN para identificar o caracterizar microorganismos patógenos (Bergey *et al.*, 2005). La presencia de distintos factores de virulencia según la cepa indica que STEC es un patotipo genéticamente diverso. Ciertas cepas de STEC son capaces de producir la lesión de “adherencia y borrado” (A/E, del inglés *attaching and effacing*) en el

enterocito, en la cual participa una adhesina conocida como intimina codificada por el gen *eae* (Paton *et al.*, 1998). Sin embargo, existen cepas que cuentan con otros factores de virulencia: gen regulador del hierro (*iha*), toxina letal de distensión del citoesqueleto (*cdt-III, cdt-V*), adhesina afimbrial (*afa C*) (Galli *et al.*, 2010). Los mecanismos de adhesión de aquellas cepas *eae* negativas son en la actualidad objeto de estudio, dado que muchas de ellas fueron asociadas con casos esporádicos y pequeños brotes de SUH. Una adhesina autoaglutinante conocida como *saa* fue caracterizada en un aislamiento de STEC no-O157 en Australia. La adhesina autoaglutinante –una proteína de membrana externa codificada en un plásmido con homología a otras adhesinas bacterianas– fue detectada en casos de SUH producidos por cepas *eae* negativas (Paton *et al.*, 2002). Si bien se han reportado aislamientos en humanos, *saa* fue ampliamente aislado en bovinos (Toma *et al.*, 2004; Cergolle- Novella *et al.*, 2007; Vidal *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2010), lo cual sugiere que podría tener un rol más importante en la colonización del intestino en bovinos que en humanos (Torres, 2010).

Más allá de la variabilidad de su genoma, *E. coli* presenta un core conservado que permite determinar la relación clonal y filogenética del microorganismo. Existen distintas técnicas moleculares para llevar a cabo este propósito, sumamente útiles y precisas al momento de la vigilancia epidemiológica y la asociación de aislamientos en forma independiente de su relación témporo-espacial. Sin embargo, demandan mayor cantidad de tiempo y recursos. El esquema de Clermont *et al.* (2000) permite una primera aproximación a la filogenia de *E. coli* en dos grandes grupos: extraintestinales (clados B2 y D) e intestinales (clados B1 y A). Este método posibilita relacionar el grupo filogenético con la virulencia de la cepa y asociar, dentro de los aislamientos ambientales, aquellos pertenecientes a grupos patógenos

Uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar un sistema de detección del serogrupo O174 que permita identificar la contaminación en alimentos. Asimismo, intentará evaluar el perfil de virulencia de una colección de cepas O174 provenientes de animales y alimentos aisladas regionalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se seleccionó un total de 189 cepas. Se incluyeron en el estudio 34 cepas controles de STEC provenientes Staten Serum Dinamarca y 126 cepas del cepario de la FCV, UBA, previamente serotipificadas en el centro Adolfo Lutz del Brasil. Los serotipos STEC evaluados incluyeron: O2:H25, O8:H19, O15:H27, O22:H8, O26:H11, O55:H7, O78:H2, O79:H19, O82:H8, O91:[H14,H16,H21], O103:H2, O111:[H8,NM], O113:H21, O121:H19, O130:H11, O145:[H34,NM], O153:H21, O156:NM, O157:H7, O166:H15, O174:[H8,H21,H28], O178:H19, O179:H8, ONT[H7,H8,H19,H21,H46,NM].

A su vez, se evaluaron ocho cepas de *E. coli* diarreogénicas no STEC correspondientes a cepas EPEC (3), ETEC (4), EIEC (1), y 17 cepas no diarreogénicas aisladas de otras fuentes: O4:H-, O6:H49, O64:H12, O87:H7, O103:H2, O109:H11, O117:H4, O125:H19, ONT:H9, ONT:H10, ONT:H11, ONT:H12, ONT:H18, ONT:H21, ONT:H25, ONT:H30 y ONT:H49.

También se evaluó el protocolo utilizando cuatro enterobacterias no *E. coli*: *E. hermannii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxycytoca* y *K. fleitas*.

Se recolectó un total de 18 aislamientos STEC O174:[H21,H28] de alimentos y animales a partir de diversas colecciones de cultivos (FCV, UBA; FCV, UNCPBA; FM, UR, Uruguay). El seroagrupamiento de O174 fue corroborado mediante análisis en la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Preparación de las muestras de ADN

Las cepas conservadas a -20 °C en caldo tripteaína soja (Oxoid) (CTS) con 20 % de glicerol fueron sembradas en CTS e incubadas a 37 °C durante 24 horas y luego repicadas a agar McConkey (Oxoid) e incubadas a 37 °C durante 18 horas; a partir del cultivo se realizó una suspensión en agua destilada con una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland, de la cual se realizaron diluciones en agua bidestilada en base 10. La concentración bacteriana se determinó luego de la incubación a 37 °C durante 18 horas en agar de recuento en placa (Oxoid). La concentración

bacteriana se expresó en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Asimismo, se tomó 1 ml de cada dilución del inóculo, se lisaron las bacterias con tratamiento calórico durante 10 minutos en baño de agua hirviendo, luego se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos. Se conservó a -20 °C el sobrenadante para realizar PCR.

PCR para detección de los genes O174wzx y O174wzy

Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos iniciadores para amplificar un fragmento del gen correspondiente a la detección de dos enzimas precursoras de la pared celular, flipasa y polimerasa, O174wzx y O174wzy. Se utilizaron los oligonucleótidos propuestos por Beutin *et al.* (2006) (Tabla1). Se usó una mezcla de reacción con 5 µl de buffer de PCR, 1,75 mM de Cl₂Mg, 200 mM de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), 0,05 pM de cada primer, 1U de GoTaq DNA polimerasa (Promega) y 5 µl de templado, alcanzando un volumen final de 25 µl. Se amplificó el ADN bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos a 94 °C por 45 segundos, 60 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto, con una extensión final 72 °C por 7 minutos. Se utilizó la cepa O174:H8 DG131/13 y O157:H7 EDL933 como control positivo y negativo de reacción, respectivamente. Se usaron 25 µl de mezcla de reacción de PCR sin ADN templado como control de sistema. Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 0,5x. Se utilizaron los marcadores de peso molecular CienMarker (Biodynamics). Los geles fueron teñidos en una solución de 0,5 µg de bromuro de etidio/ml (Promega). La documentación se hizo con un transiluminador MultiDoc-It Imaging System (UVP) y el *software* de adquisición de imágenes Doc-it LS (UVP).

Evaluación de la técnica

El protocolo empleado para cada gen se evaluó diez veces por cuatro operadores en tres termocicladores (dos marcas comerciales, GenPro y Eppendorf), en dos laboratorios independientes.

Límite de detección y desafío

Se seleccionó el gen O174wzx para determinar el límite de detección del ensayo. Se realizaron diluciones sucesivas en base 10 de la cepa O174 DG131/13 a partir del cultivo equivalente al 0,5 McFarland, de forma tal que la cepa O174:H8 DG131/13 fue analizada en un rango de 0 a 10¹³ UFC/µl de mezcla de reacción de PCR.

Se realizó el desafío de la cepa O174:H8 DG131/13 en dilución ½ y 1/10 frente a las cepas control de Satens Serum Institut (EDL933: O157:H7, MH1813: O8:K85:Hr, EH250: O118:H12, S1191:O139:K12:H1, T4/97: O198ac:[H2], 7v: O2:H25).

Se repitió el ensayo de desafío por duplicado, utilizando el límite de detección (LD) y 10LD de la cepa O174 DG131/13 junto con las cepas patrones de Satens Serum Institut precitadas.

La preparación de las muestras se hizo por triplicado, por un mismo operador, en un intervalo de uno a dos días. La PCR se realizó simultáneamente a todos los extractos de ADN, empleando el mismo equipamiento y los mismos reactivos.

Caracterización preliminar de las cepas STEC O174

Se analizó el perfil de virulencia de una colección de 16 cepas STEC O174 obtenidas de alimentos o animales. Se detectó el tipo de toxina Shiga (*stx1* y/o *stx2*) de acuerdo al protocolo validado en el esquema de calificación externo del que participó el laboratorio (EQA4 y EQA5) conforme al protocolo establecido por Scheutz *et al.* (2012). Se analizaron factores de virulencia adicionales incluidos intimina (*eae*), adhesina autoaglutinante (*saa*), adhesinas afimbriales (*afaC*), enterohemolisina (*ehxA*), gen regulador del hierro (*iha*) y toxina letal de distensión del citoesqueleto (*cdtVA-cdtVB*). Se determinó el clado filogenético (Clermont *et al.*, 2000) y la presencia de genes marcadores de otras *E. coli* diarreogénicas.

Tabla 1. Cebadores y condiciones de ciclados

Gen	Secuencia de cebadores	Amplicón (bp)	Annelaling	Referencia
O174wzx	5' TCTAGGACCTGGTAGAA 3' 3' GTAGTTGATCTGAGCGAT 5'	656	45 °C 45 s	Beutin, 2005
O174wzy	5' TATGGGTCCTATTACTTTC 3' 3' GTATCGGAGATCATTATTAC 5'	759	45 °C 45 s	Beutin, 2005
stx1	5' GAAGAGTCCGTGGGATTACG 3' 3' AGCGATGCAGCTATTAATAA 5'	130	56 °C 30 s	Pollard, 1990
stx2	5' TTAACACACACCCACCGGGCAGT 3' 3' GCTCTGGATGCATCTCTGGT 5'	346	56 °C 30 s	Pollard, 1990
eae ¹	5' GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG 3' 3' GGCGCTCATCATAGTCTTTTC 5'	350	62 °C 30 s	Blanco, 2004
saa	5' CCTCACATCTTCTGCAAATACC 3' 3'	119	55 °C 30 s	Patton, 2001
afaC	5' CGGCTTTTCTGCTGAACTGGCAGGC 3' 3' CCGTCAGCCCCACGGCAGACC 5'	672	65 °C 60 s	Scaletsky,
ehxA	5' GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG 3' 3' TCTCGCCTGATAGTGTITGGTA 5'	1551	57 °C 1:30 m	Schmidt, 1995
iha	5' GAAATCAGCATCCGAGG 3' 3' ATACGCTGGTGCTG 5'	410	55 °C 30 s	Wu, 2009
cdtV	5' TTCATTGTTCCGCCTCCTG 3' 3' TTTATAAGCTGGTATCCTG 5'	750	50 °C 30 s	Cergolle 2007
chuA ²	5' GACGAACCAACGGTCAGGAT 3' 3' TGCCGCCAGTACCAAAGACA 5'	279	59 °C 10 s	Clermont,
yjaA ²	5' TGAAGTGTGAGGAGACGCTG 3' 3' ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC 5'	211	59 °C 10 s	Clermont,
tspE4 ²	5' GAGTAATGTGCGGGGCATTCA 3' 3' CGCGCCAACAAAGTATTACG 5'	152	59 °C 10 s	Clermont,
astA ³	5' CCATCAACACAGTATATCCGA 3' 3' GGTGCGGAGTGACGGCTTTGT 5'	111	65 °C 60 s	Scaletsky,
aggR ³	5' GTATACACAAAGAAAGGAAGC 3' 3' ACAGAATCGTCAGCATCAGC 5'	254	64 °C 30 s	Kobayashi,
aiiC ³	5' TGGTGACTACTTTGATGGACATTGT 3' 3' GACACTCTCTTCTGGGGTAAACGA 5'	250	57 °C 1:30 m	Boisen, 2011
invE ⁴	5' ATATCTCTATTCCAATCGCGT 3' 3' GATGGCGAGAAAATTATATCCCG 5'	382	48 °C 1:30 s	Itho, 1992
elt ⁵	5' AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA 3' 3' GTGCTCAGATTCTGGGTCTC 5'	132	48 °C 1:30 s	Itho, 1992
est ⁵	5' TTTATTTCTGTTTGTCTTT 3' 3' ATTACAACACAGTTCACAG 5'	171	48 °C 1:30 s	Itho, 1992

Referencias: Genes evaluados, cebadores utilizados y condiciones de ciclado.

¹ Gen marcador de EPEC en cepas *stx* negativas.

² Genes determinantes de filogenia

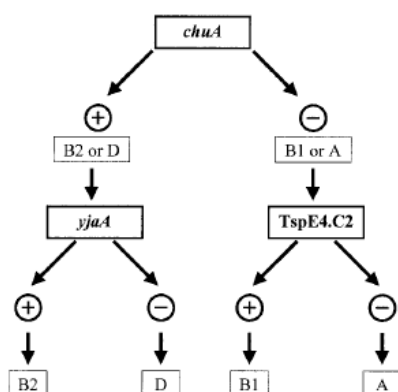
³ Genes marcadores de EAggEC

⁴ Gen marcador de EIEC

⁵ Gen marcador de ETEC

La determinación del clado filogenético se estableció de acuerdo a la presencia/ausencia de los amplicones mencionados en la Tabla 1. La clasificación se llevó a cabo siguiendo el esquema de Clermont (Figura 1).

Figura 1: Diferenciación de clados según el esquema de filogenia de *Escherichia coli*
(Clermont *et al.*, 2000)



Referencias: Clados B2 y D: cepas extraintestinales, clados B1 y A: cepas intestinales.

RESULTADOS

Se desarrollaron dos sistemas de PCR convencional para la detección de la flipasa (*wzx*) y polimerasa (*wzy*) de STEC O174. De ambas, se obtuvieron mejores resultados con el gen de la flipasa al evaluarse sobre una colección de cepas serotipificadas como O174. La PCR, utilizando O174*wzx*, confirmó la identidad de 16/18, mientras que con O174*wzy* confirmó 14/18 aislamientos previamente serotipificados. La serotipificación de las cuatro cepas con resultado negativo a alguna PCR fue corroborada, y se demostró que las dos cepas con resultado negativo por O174*wzx* y O174*wzy* correspondían a los serogrupos O22 y O109. A su vez, las otras dos cepas que mostraron un resultado compatible con el serogrupo analizado con O174*wzx*, pero no con O174*wzy*, correspondían al serogrupo O174. Este análisis permitió establecer que hubo dos resultados falsos negativos con O174*wzy*, mientras que no se observaron falsos negativos con O174*wzx*. El sistema se contrastó en 86 cepas no-O174. No se observaron reacciones cruzadas con los serotipos analizados. Tampoco se observó reacción con las otras enterobacterias que se incorporaron al ensayo.

Se observó que O174*wzx* era un marcador específico para reconocer el serogrupo O174, no se observaron con este protocolo ni falsos positivos ni falsos negativos. La robustez del ensayo se estableció mediante la repetibilidad y reproducibilidad de los ensayos, con cambios del operador, evaluando en tres cicladores (de dos marcas comerciales), en dos laboratorios diferentes con excelentes resultados.

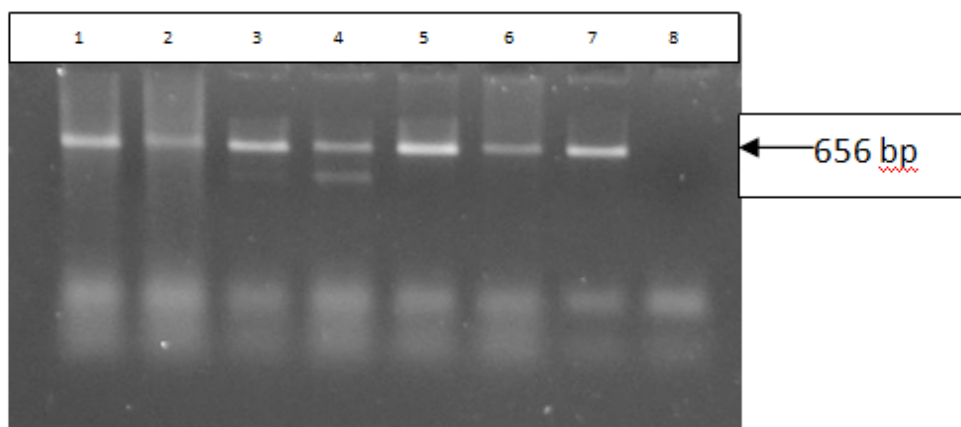
El límite de detección del ensayo, utilizando el gen O174*wzx*, se determinó en 44UFC.µl⁻¹.

El desafío en el diagnóstico del serogrupo O174 se llevó a cabo utilizando el gen O174*wzx*, cepa DG131/13, frente a las cepas del centro de referencia Staten Serum Institute: *E. coli* O157, O121 y O26. Se investigaron dos concentraciones diferentes: ½ y 1/10. En todos los casos ensayados y en todas las concentraciones, se detectó O174 correctamente.

Al utilizar los oligonucleótidos de O174*wzy*, también se detectó la presencia de O174 en la muestra en ambas diluciones, ½ y 1/10.

Se comprobó que al desafío con 10LD y 1LD de O174, la detección del gen O174*wzx* era eficiente (Figura 2).

Figura 2. Desafío de O174*wzx* con cepas patrones en concentraciones límite de detección



Referencias: calles: 1- Detección de 10 LD O174:H21 desafiado con O157:H7, 2- 1 LD O174:H21 desafiado con O157:H7, 3- 10 LD O174:H21 desafiado con O121, 4- 1 LD O174:H21 desafiado con O121, 5- 10 LD O174:H21 desafiado con O26, 6- 1 LD O174:H21 desafiado con O26, 7- O174:H21 control positivo, 8- O157:H7 EDL933 control negativo.

En los ensayos de desafío con el serogrupo O121 se observaron, además del amplicón esperado, bandas espúreas de otro PM.

Al determinar el clado filogenético de acuerdo al esquema de Clermont (2000), se observó que todas las cepas bajo estudio pertenecen a clados intestinales: 3/16 A0 y 13/16 B1.

Los 16 aislamientos del serogrupo O174 fueron categorizados según la presencia de factores de virulencia, todas fueron *stx2* y solo una *stx1/stx2*. En dos casos no pudo detectarse el amplicón genérico de *stx2* con el protocolo de subtipificación de Scheutz. Ocho aislamientos portaban el subtipo *stx2c* y seis el subtipo *stx2a*.

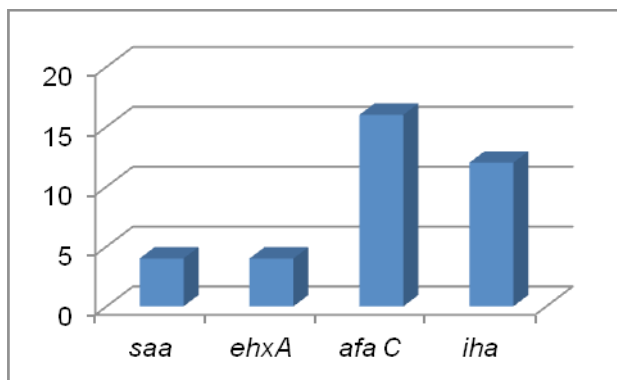
Se detectó en 4/16 cepas simultáneamente la enterohemolisina (*ehxA*) y la adhesina autoaglutinante (*saa*), 16/16 cepas presentaron adhesina afimbrial (*afaC*), y 12/16 demostraron la presencia del gen fijador del hierro (*ihA*). No se detectó la intimina (*eae*) ni la toxina de distensión del citoesqueleto (*cdtVA*, *cdtVB*). Tampoco se detectaron los marcadores de otros patotipos, excepto *astA*, responsable de la producción de la enterotoxina 1 termoestable (EAST1) de *E. coli* enteroagregativa (EAggEC). La presencia de *astA*, indicador de cepas EAggEC, fue evaluado con los otros marcadores para el patotipo (*aggR* y *aaiC*), los cuales dieron resultados negativos. De esta forma, se comprobó la ausencia de cepas EAggEC-STEC O174.

Los perfiles de virulencia detectados se observan en la Tabla 2, y la proporción de los factores de virulencia detectados en las cepas STEC O174 analizadas se observa en la Figura 3.

Tabla 2: Perfiles de virulencia obtenidos de las cepas O174

Seroti po	n	Fuent e	Stx genotip o	Subti po (Scheu tz)	Clermo nt	O15 7	O17 4	<i>elt</i>	<i>est</i>	<i>inv</i> E	<i>afa</i> C	<i>eae</i>	<i>ast</i> A	<i>saa</i>	<i>eh</i> <i>x</i> A	<i>ih</i> A	<i>cdt</i> V
O174: H21	1	bov pastu ra	Stx 2	Stx 2c	B 1	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
O174: H21	1	bov pastu ra	Stx 2	Stx 2c	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O174: H21	1	bov pastu ra	Stx 2	Sin ampli cón genéri co	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O174: H21	1	feed lot	Stx 2	Stx 2c	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O174: H21	1	feed lot	Stx 2	Stx 2c	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
O174: H21	1	carne molid a	Stx 2	Stx 2c	A 0	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O174: H21	1	carne	Stx 2	Stx 2a	A 0	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O174: H21	1	carne	Stx 2	Sin ampli cón genéri co	B 1	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
O174: H21	2	carne	Stx 2	Stx 2c	B 1	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
O174: H21	1	rata	Stx 2	Stx 2c	A 0	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
O174: H28	2	feed lot	Stx2	stx 2a	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
O174: H28	1	feed lot	Stx1/ Stx 2	stx 2a	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O174: H28	2	carne	Stx 2	Stx 2a	B 1	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
totales	16					0	16	0	0	0	16	0	5	4	4	12	0

Figura 3: Frecuencia de factores de virulencia en cepas STEC O174



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se desarrollaron dos sistemas de detección por PCR convencional del serogrupo STEC O174 basados en la detección de dos enzimas precursoras de la pared celular (flipasa y polimerasa), *wzx* y *wyx*, aplicables para la detección del serogrupo en alimentos o animales. Los resultados obtenidos mediante los ensayos serológicos y por PCR con O174*wzx* confirmaron la presencia o ausencia del serogrupo O174 en todas las muestras. El desafío de la detección en muestras con otros serotipos no inhibió la reacción en cantidad equivalente al límite de detección del analito en muestras puras.

Pudo comprobarse la heterogeneidad del serogrupo O174 respecto a los factores de virulencia prevalentes y el origen de las muestras, lo cual sugiere una baja clonalidad. Los aislamientos analizados en este trabajo provenían de diversas fuentes, pero todos correspondieron a cepas de circulación regional. En forma general, y en coincidencia con los reportes previos de la región (Rivas *et al.*, 2003, 2007, 2008, 2013; Rumi *et al.*, 2007, 2008), los genes de toxina Shiga detectados correspondieron a *stx2*, la cual tiene una potencia cien veces superior a la *stx1* (Valdivieso-García *et al.*, 1993; Jelacic *et al.*, 2003). Es de interés no solo identificar los serogrupos prevalentes, sino también evaluar la relación que tienen las cepas aisladas de casos clínicos y de alimentos o animales. Quizá los parámetros de control deben acotarse según dichos resultados.

Para este trabajo, la selección del serotipo en estudio se basó en su destacada prevalencia determinada por los informes técnicos del centro de referencia nacional, ANLIS-Malbrán (Rivas *et al.*, 2013). Este serogrupo ha sido asociado a patologías severas en el hombre, que incluyen sepsis en el adulto (Clermont *et al.*, 2007;

O'Reilly *et al.*, 2010). Por ello, el estudio del perfil de virulencia de las cepas ha sido de gran interés y permite ampliar el panorama del grado de patogenicidad del serogrupo. Si bien no se encontró el locus LEE, se observó que algunas cepas presentaban la adhesina *saa*, caracterizada previamente como adhesina en cepas STEC LEE negativas (Paton *et al.*, 2001; Caprioli *et al.*, 2005). Asimismo, se observaron genes putativos codificantes de adhesinas afimbriales (*afaC*) y que un cuarto de las cepas analizadas presentaban la enterohemolisina característica de cepas EHEC (*ehxA*) (Schmidt *et al.*, 1995). También, al igual que en otros serogrupos, se detectó con alta prevalencia el gen regulador del hierro (*iha*) (Wu *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos sobre las cepas recolectadas indicaron que hubo reacciones cruzadas con otros serotipos que no fueron detectadas previamente. Este hallazgo permitiría considerar que también existan diferencias en otros ceparios, en los que algunos serotipos pudieron ser clasificados en forma equivocada. El serogrupo O174 forma parte de uno de los serogrupos de identificación más tardía, por lo que recién ahora pueden corroborarse los resultados de prevalencia (Tarr *et al.*, 2008). La puesta a punto de esta técnica en otros laboratorios posibilitará establecer con certeza el seroagrupamiento en distintas bases de datos y permitirá su depuración. En vista de los resultados obtenidos, sería conveniente reevaluar en los serogrupos STEC no-O157 de impacto en la salud más frecuentes a nivel nacional, confirmar su identidad y establecer la necesidad, o no, de ser evaluadas por Senasa junto a los protocolos internacionales.

Considerando la regionalización del país y, en forma paralela, la regionalización de Senasa, sería de gran interés la evaluación de otros serogrupos de impacto nacional. Para ello, el modelo utilizado en este proyecto puede ser aplicado en otros serogrupos, analizando así su prevalencia. Este sería un aporte necesario a la hora de comprender la epidemiología del SUH en nuestro país y aplicar medidas nacionales que permitan ahondar en seguridad alimentaria.

El análisis de la prevalencia de cada serogrupo de impacto en la salud y su distribución nacional puede orientar las acciones de control de Senasa sobre muestras de comercio de carne bovina en particular.

BIBLIOGRAFÍA

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, *Código Alimentario Argentino* Ley N.º 18.284 18/07/69 Capítulo VI. Artículo 255 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N.º 79 y 500/04) [en línea]. Disponible en: <[http://www.anmat.gov.ar/codigoal/](http://www.anmat.gov.ar/codigoal/Capitulo_VI_Carneos_actualiz_2007-08.pdf) Capitulo_VI_Carneos_actualiz_2007-08.pdf>.
- Bender, J. B.; Hedberg, C. W.; Besser, J. M.; Boxrud, D. J.; MacDonald, K. L. y M. T. Osterholm (1997), "Surveillance for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping", *The New England Journal of Medicine*, 337 (6), pp. 388-394.
- Beutin, L.; Kong, Q.; Feng, L.; Wang, Q.; Krause, G.; Leomil, L.; Jin, Q. y L. Wang (2005), "Development of PCR assays targeting genes involved in synthesis and assembly of new *Escherichia coli* O174 and O177 O antigens", *Journal of Microbiology*, 43, pp. 5143-5149.
- Blanco, J. E.; Blanco, M.; Alonso, M. P.; Mora, A.; Dahbi, G.; Coira, M. A. y J. Blanco (2004), "Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999", *Journal of Clinical Microbiology*, 42, pp. 311-319.
- Blanco Crivelli, X.; Rumi, M. V.; Carfagnini, J. C.; Degregorio, O. y A. B. Bentancor (2012), "Synanthropic rodents as possible reservoirs of shigatoxigenic *Escherichia coli* strains", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, (134), pp. 1-4.
- Boisen, N.; Scheutz, F.; Rasko, D. A.; Redman, J. C.; Persson, S.; Simon, J.; Kotloff, K. L.; Levine, M. M.; Sow, S.; Tamboura, B.; Toure, A.; Malle, D.; Panchalingam, S.; Krogfelt, K. A. y J. P. Nataro (2011), "Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Mali", *Journal of Infectious Diseases*, 205, pp. 431-444.
- Brusa, V.; Aliverti, V.; Aliverti, F.; Ortega, E. E.; de la Torre, L. J. H.; Linares, L. H.; Sanz, M. E.; Etcheverría, A. I.; Padola, N. L.; Galli, L.; Peral García, P.; Copes, J. y G. A. Leotta (2013), "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 [en línea]. Disponible en: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23346554>.
- Caprioli, A.; Morabito, S.; Brugere, H. y E. Oswald (2005), "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission", *Veterinary Research*, 36 (3), pp. 289-311.
- Cergole-Novella, M. C.; Nishimura, L. N.; Dos Santos, L. F.; Irino, K.; Mara, T. I.; Vaz, A.; Bergamini, M. M. y B. E. C. Guth (2007), "Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil", *Federation of European Microbiological Societies*, 274, pp. 329-334.
- Chinen, I.; Tanaro, J. D.; Miliwebsky, E.; Lound, L. H.; Chillemi, G.; Ledri, S.; Baschkier, A.; Scarpin, M.; Manfredi, E. y M. Rivas M (2001), "Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina", *Journal of Food Protection*, 64 (9), pp. 1346-1351.
- Chinen, I.; Epszteyn, S.; Melamed, C. L.; Aguerre, L.; Martínez Espinosa, E.; Motter, M. M.; Baschkier, A.; Manfredi, E.; Miliwebsky, E. y M. Rivas (2009), "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina", *International Journal of Food Microbiology*, 132 (2-3), pp. 167-171.
- Clermont, O.; Bonacorsi, S. y E. Bingen (2000), "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group", *Environmental Microbiology*, 13 (9), pp. 4555-4558.
- Clermont, O.; Johnson, J. R.; Menard, M. y E. Denamur (2007), "Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57, pp. 129-136.

- Galli, L.; Miliwebsky, E.; Irino, K.; Leotta, G. y M. Rivas (2010), "Virulence profile comparison between LEE- negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolate from cattle and humans", *Veterinary Microbiology*, 143, pp. 307-313.
- Gioffré, A.; Meichtri, L.; Miliwebsky, E.; Baschkier, A.; Chillemi, G.; Romano, M. I.; Sosa Estani, S.; Cataldi, A.; Rodríguez, R. y M. Rivas (2002), "Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina. Evaluation of two procedures", *Veterinary Microbiology*, 87 (4), pp. 301-313.
- Gómez, D.; Miliwebsky, E.; Fernández Pascua, C.; Ameztoy, A. M.; Baschkier, A.; Manfredi, E.; Zotta, M.; Córdoba, M.; Nario, F.; Piquín, A.; Rivas, M. y A. Parma (2002), "Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda", *Revista Argentina de Microbiología*, 34 (2), pp. 66-71.
- Guth, B. E. C.; Pardo, V. y M. Rivas (2010), "Shiga toxin- producing *Escherichia coli*", en Torres, A., *Pathogenic E. coli in Latin America*, University of Texas, Bentahm Books, pp. 65-83.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R. y P. H. A. Sneath (eds.) (2005), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", *Volumen 1: Gram-negative Bacteria of general, medical, or industrial importance*, Baltimore, Wilkins & Wilkins.
- Itho, F.; Ogino, T. y K. Itho (1992), "Differentiation and detection of pathogenic determinants among diarrheagenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction using mixed primers", *Japanese Journal of Clinical Medicine*, 50, pp. 343-347.
- Jelacic, J. K.; Damrow, T.; Chen, G. S.; Jelacic, S.; Bielaszewska, M.; Ciol, M.; Carvalho, H. M.; Melton-Celsa, A. R.; O'Brien, A. D. y P. I. Tarr (2003), "Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles", *Journal Infectious Disease* 188, (5), pp. 719-729.
- Jenkins, C.; Perry, N. T. y T. Cheasty (2003), "Distribution of the *saa* gene in strains of Shiga toxin-producing *E. coli* of human and bovine origins", *Journal of Clinical Microbiology*, 41, pp. 1775-1778.
- Jure, M. A.; Condorí, S.; Leotta, G. A. y I. Chinen (2010), "Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, Provincia de Tucumán", *Revista Argentina de Microbiología* 42, (4), pp. 284-287.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P. y H. L. Mobley (2004), "Pathogenic *Escherichia coli*", *Nature Reviews Microbiology*, 2, pp. 123-140.
- Karmali, M. A. (1989), "Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*", *Clinical Microbiology Reviews* 2, (1), pp. 15-38.
- Kobayashi, K.; Seto, K.; Yatsuyanagi, J.; Saito, S.; Terao, M.; Kaneko, M.; Serikawa, T. y S. Kuramoto (2002), "Presence of the genes regarding adherence factors of *Escherichia coli* isolates and a consideration of the procedure for detection of diarrheagenic strain", *Kansenshogaku Zasshi* 76, pp. 911-920.
- Lucchesi, P. M.; Krüger, A. y A. E. Parma (2006), "Distribution of *saa* gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food", *Microbiological Research* 157, (3), pp. 263-266.
- Miccio, L.; Rumi, M. V.; Llorente, P. y A. B. Bentancor (2011), "Contaminación de carne molida con cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénico (STEC) provenientes de comercios minoristas de San Martín, Buenos Aires, categorizados según nivel socioeconómico", *INVET* 13, (1), pp. 37-44.
- Miliwebsky, E.; Deza, N.; Chinen, I.; Martinez Espinosa, E.; Gomez, D.; Pedroni, E.; Caprile, L.; Bashckier, A.; Manfredi, E.; Leotta, G. y M. Rivas (2007), "Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina", *Revista Argentina de Microbiología* 39, (2), pp. 90-92.
- Nataro, J. P. y J. B. Kaper (1998), "Diarrheagenic *Escherichia coli*", *Clinical Microbiology Reviews* 11, pp. 142- 201.

- O'Reilly, K. M.; Low, J. C.; Denwood, M. J.; Gally, D. L.; Evans, J.; Gunn, G. J.; Mellor, D. J.; Reid, S. W. y L. Matthews (2010), "Associations between the presence of virulence determinants and the epidemiology and ecology of zoonotic *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology* 76, pp. 8110-8116.
- Parma, A. E.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; Blanco, J.; Viñas, M. R.; Blanco, M.; Padola, N. L. y A. I. Etcheverría (2000), "Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health", *European Journal of Epidemiology* 16, (8), pp. 757-762.
- Paton, A. W. y J. C. Paton (1998), "Detection and characterization of Shiga toxigenic *E. coli* by using Multiple PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO11*, and *rfbO157*", *Journal of Clinical Microbiology* 36, (2), pp. 598-602.
- Paton, J. C. y A. W. Paton (1998), "Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections", *Clinical Microbiology Reviews* 11, pp. 450-479.
- Paton, A. W. y J. C. Paton (2001), "Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*", *Journal of Clinical Microbiology* 40 (1), pp. 271-274.
- Pollard, D. R.; Johnson, W. M.; Lior, H.; Tyler, S. D. y K. R. Rozee (1990), "Differentiation of Shiga toxin and Vero cytotoxin type 1 genes by polymerase chain reaction", *Journal of Infectious Diseases* 162, pp. 1195-1198.
- Rangel, J. M.; Sparling, P. H.; Crowe, C.; Griffin, P. M. y D. L. Swerdlow (2005), "Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002", *Emerging Infectious Diseases* 11 (4), pp. 603-609.
- Rivas, M.; Caletti, M. G.; Chinen, I.; Refi, S. M.; Roldán, C. D., Chillemi, G., Fiorilli, G., Bertolotti, A., Aguerre, L. y S. Sosa Estani (2003), "Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina". *Emerging Infectious Diseases* 9 (9), 1184-1186.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldán, C. D., Balbi, L., García, B., Fiorilli, G., Sosa-Estani S., Kincaid, J., Rangel, J. y P. M. Griffin (2006), "Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina", *Foodborne Pathogens and Disease* 3 (1), 88-96.
- Rivas, M., Leotta, G. y I. Chinen (2008). *Manual de procedimientos, diagnóstico y caracterización de Escherichia coli O157 productora de toxina Shiga a partir de alimentos*, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. Dr. Carlos G. Malbrán, Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Rivas, M. (2013), "Avances en el conocimiento de la epidemiología de STEC Experiencia en frigoríficos de Argentina", *Primer Simposio Life Technologies en Seguridad de Alimento*, 8 de mayo 2013.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgersson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. y M. L. Cohen (1983), "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype", *The New England Journal of Medicine* 308 (12), pp. 681-685.
- Rumi, M. V., Gentilini, M. V., Calviño, F., Miccio, L., Gonzalez, S., Cichoki, F., Godaly, S., Degregorio, O. y A. Bentancor (2007), "Contaminación de carne molida con cepas STEC según nivel socioeconómico de expendio", *Revista Argentina de Microbiología* 39 (1), p. 135.
- Rumi, M. V., Llorente, P., Gentilini, V., Calviño, F., Miccio, L., González, S., Cichocki, F., Jiménez, L., Martínez, C., Irino, K., Godaly, S., Degregorio, O., y A. Bentancor (2008), "Grado de contaminación de carne molida por cepas STEC en el partido de General San Martín (estudio preliminar)", *Suplemento Técnico Veterinario de la Revista del Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires* 41, pp. 40-41.

- Scaletsky, I. C., Aranda, K. R., Souza, T. B. y N. P. Silva (2009), "Adherence factors in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains expressing the localized adherence-like pattern in HEp-2 cells", *Journal of Clinical Microbiology* 48, pp. 302-306.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N., Melton-Celsa, A., Persson, S. y A. O'Brien (2012), "Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing *stx* nomenclature", *Journal of Clinical Microbiology* 50 (9), pp. 2951-2963.
- Schmidt, H., Beutin, L. y J. Karch (1995), "Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933", *Infection and Immunity* 63 (3), pp. 1055-1061.
- Tarr, C. L., Nelson, A. M., Beutin L., Olsen, K. E. P. y T. S. Whittam (2008), "Molecular characterization reveals similar virulence gene content in unrelated clonal groups of *Escherichia coli* of serogroup O174 (OX3)", *Journal of Bacteriology* 190, pp. 1344-1349.
- Toma, C., Martínez Espinosa, E., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., Iwanaga, M. y M. Rivas (2004), "Distribution of putative adhesin genes in Shiga toxigenic *E. coli* isolated from different sources", *Journal of Clinical Microbiology* 42, pp. 4937-4946.
- United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (2013), *Detection, Isolation and Identification of Escherichia coli O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges*, Laboratories-and-procedures/guidebooks Chapter revised: MLG 5.07 [en línea]. Disponible en: <<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/51507fdb-dded-47f7-862d-ad80c3ee1738/MLG-5.pdf?MOD=AJPERES>>.
- United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (2013), *Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges*, Laboratories-and-procedures/guidebooks Chapter revised: MLG 5B.04 [en línea]. Disponible en: <<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>>.
- Valdivieso-Garcia, A., Clarke, R. C., Rahn, K., Durette, A., Macleod, D. L. y C. L. Gyles (1993), "Neutral red assay for measurement of quantitative vero cell cytotoxicity", *Applied and Environmental Microbiology* 59 (6), pp. 1981-1983.
- Vidal, M., Escobar, P. y V. Prado (2007), "Distribution of putative adhesins in Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains isolated from different source in Chile", *Epidemiology & Infection* 135, pp. 688-694.
- Wu, Y., Hinenoya, T., Taguchi, T., Nagita, A., Shima, K., Tsukamoto, T., Sugimoto, N., Asakura, M. y S. Yamasaki (2010), "Distribution of virulence genes related to adhesin and toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan", *Journal of Veterinary Medical Science* 72, pp. 589-597.