

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN PARA EVALUAR LA CONTAMINACIÓN POR CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE TOXINA SHIGA (STEC) DE IMPACTO NACIONAL (STEC 0174) EN MUESTRAS DE CARNE

DEVELOPMENT OF A SCREENING METHOD TO ASSESS CONTAMINATION BY *ESCHERICHIA COLI* SHIGA TOXIN-PRODUCING (STEC) STRAINS WITH NATIONAL IMPACT (STEC 0174) IN MEAT SAMPLES

Cecilia Cundon (Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires [FCV, UBA]), María Valeria Rumi (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), 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), Verónica Sinatra (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])

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. Actualmente, afecta a 13,8 de cada 100.000 niños menores de 5 años, el registro más alto en el mundo, con 450 notificaciones anuales de casos. Este síndrome origina los costos más elevados para el Sistema Nacional de Salud y compromete la confianza del consumidor en los sistemas de control. La especie *Escherichia coli* comprende un conjunto de bacterias con características y patogenicidad diferente, por ello se categoriza a sus cepas en diferentes patotipos, como las *E. coli* enterotoxígenas (ETEC), *E. coli* enteropatógenas (EPEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* shigatoxigénico (STEC), *E. coli* enteroagregativas (EAggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (ADEC). Se considera que 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.

Abstract

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is a foodborne illness which is the leading cause of acute kidney failure and the second leading cause of chronic kidney failure and kidney transplantation in children in Argentina. Currently, our country has the highest record of HUS worldwide, with 450 cases per year affecting 13.8/100,000 children younger than 5 years old (Rivas, 2013). This illness determines the highest costs for the National Health System, compromising consumer's trust in control systems. While recognizing multiple etiological agents, *Escherichia coli* Shiga toxin-producer (STEC) is considered the main cause of HUS, mainly associated with serotype O157:H7, however non-O157 serogroups are frequent. Within the latter, four serogroups are prevalent in Argentina: O145, O121, O26 and O174 (Rivas, 2013). Of these, serogroup O174, stands out as a local problem due to its clinical prevalence and it is not considered in any European or American diagnostic protocols. STEC infections in Argentina, in view of their endemic nature, high incidence and diffuse outbreaks, differ from those reported in other regions, which are referential in their regulatory standards. Diagnosis of

Dentro de los no-O157, los cuatro serogrupos prevalentes en la Argentina 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. El diagnóstico de O174 en alimentos, dado su impacto para la salud de nuestra población, debería ser incluido en los protocolos de diagnóstico utilizados en la actualidad. 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.

O174 in foods should be included given its impact on health, as a part of diagnostic panels. The aim of this project is to assess specific diagnostic techniques for this serogroup.

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

El presente artículo refiere a un proyecto por desarrollarse en el marco de los Premios Senasa 2013 a la Investigación, Transferencia y Comunicación en Sanidad, Calidad e Inocuidad Agroalimentarias (rubro Investigación y Transferencia de Equipos Consolidados).

Escherichia coli es miembro de la microbiota intestinal de humanos y animales (Bergey *et al.*, 2005). Algunas cepas poseen un conjunto de factores de virulencia que, de estar presentes, pueden originar enfermedades intestinales y extraintestinales (Nataro y Kaper, 1998). Un tipo particular de *E. coli* se caracteriza por la producción de toxinas Shiga (Karmali, 1989). *E. coli* shigatoxigénica (STEC) es un patógeno endémico en la Argentina con alto impacto en el sistema de salud. STEC presenta genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1*, *stx2* y variantes) responsables del daño del endotelio vascular sistémico, junto con marcadores de virulencia adicionales que definen el potencial de riesgo de cada cepa (Parma *et al.*, 2000; Chinen *et al.*, 2001, 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).

Al ser reconocida esta enfermedad dentro de aquellas transmitidas por alimentos, 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, 2006; Miliwebsky *et al.*, 2007; Rumi *et al.*, 2007, 2008, 2012; Blanco Crivelli *et al.*, 2013, Brusa *et al.*, 2013). El ganado ha sido señalado como el principal reservorio de cepas STEC, incluidos los serotipos relacionados con el O157:H7 y los no-O157 (Blanco *et al.*, 2004; Kassenborg *et al.*, 2004). 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.*, 1985). En el nivel regional, la fuente de infección frecuente corresponde a los alimentos cárneos y lácteos deficientemente cocidos o sin pasteurizar (Rivas, *et al.*, 2006, 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 evidencia 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, el análisis de los agentes etiológicos implicados es relevante, oportuno y pertinente.

El serogrupo O174, de impacto local, no está incluido en los paneles previstos tanto por la Unión Europea como por los EE. UU. (USDA /FSIS MLG 5.04, 2008; USDA /FSIS MLG 5B.00, 2010). De esta forma, su diagnóstico escapa de los sistemas de control agroalimentario y genera una ventana de incertidumbre en los procesos de aseguramiento de inocuidad para el mercado interno (Código Alimentario Argentino, 2010). Merece destacarse que la identificación y clasificación precisa de los microorganismos patógenos 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).

Uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar un sistema de detección del serogrupo O174 que pueda implementarse en forma complementaria al tamizaje realizado con las normas vigentes (ISO/TS N.º 13136 y MLG 5B.03) y que permita identificar la contaminación de dicho serogrupo en alimentos.

Se espera desarrollar un protocolo de trabajo validado que posibilite identificar, mediante el rastillaje de las muestras, aquellas contaminadas con STEC O174, aplicarlo en muestras problema y evaluar la prevalencia de dicho serogrupo en alimentos *stx+*. Para ello se cuenta con un cepario propio, el de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, que incluye aislamientos de este serogrupo obtenidos de diversas fuentes (alimentos, bovinos y roedores) así como otros aislamientos de STEC y de *E. coli* no STEC.

Entre los objetivos de este trabajo está, además, el de evaluar los aislamientos de O174 mediante la caracterización de sus factores de virulencia.

La metodología propuesta se basa en los protocolos de trabajo descriptos en Trullols Soler (2006), De Smedt (1998) y la Guía para validación de métodos de ensayo del Organismo Argentino de Acreditación (2003) y contempla:

- Desarrollar un sistema de detección por PCR (convencional y *real time*) de STEC serogrupo O174 a partir de precultivos de alimentos y su evaluación en una selección de cepas que incluye al menos 15 aislamientos diferentes de STEC O174, y 30 serogrupos no-O174 (cepario propio, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA).

- Validar el sistema de detección por PCR convencional intralaboratorio, determinando el rango de trabajo, el límite de detección y el de corte y estableciendo la selectividad del sistema, su inclusividad y su exclusividad.

- Determinar la robustez del sistema con los análisis estadísticos correspondientes, utilizando Statistix.8.0, χ^2 , test de diferencia de proporciones y su estudio probabilístico.

- Desafiar el sistema de detección con cepas STEC O174 y una cepa STEC en interacción, en concentraciones de proporciones variables.

- Aplicar el método en precultivos *stx+* según norma ISO/TS N.º 13136 y MLG: 5B.03 (USDA/FSIS/OPHS) detectados por el laboratorio central de alimentos de Senasa.

- Aplicar el sistema a precultivos previamente obtenidos a partir de muestreos de carne molida en mercados de expendio minorista y que se mantienen congeladas en el laboratorio de Tecnología Protección e Inspección Veterinaria de Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA.

- Aislar cepas STEC O174 de las fuentes analizadas mediante el sistema de “pooles” (Bentancor *et al.*, 2006) y determinar su perfil de virulencia mediante protocolos de PCR (Pollard *et al.*, 1990; Tyler *et al.*, 1991; Pierard *et al.*, 1998; Paton y Paton, 1998, 2002; Jelacic *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2008; Scheutz *et al.*, 2013). Estos protocolos han sido previamente validados con el sistema de calificación externa europeo, dirigido por el Instituto Serum Statem de Dinamarca y por el laboratorio de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, incluyendo el panel de tipos y subtipos de STEC y la determinación de otras *E. coli* diarreogénicas (EQA4, 2013).

E. coli ha sido estudiada por su continua adaptación y emergencia de clones con nuevos factores de virulencia. La adquisición de genes de virulencia en forma transversal mediante diversos mecanismos y su recombinación mantienen en una continua evolución a esta especie bacteriana. Un ejemplo de ello ha sido la emergencia de un clon del serotipo O104:H4, cuyos factores de virulencia permitían identificarla como *E. coli* enteroagregativa (AggEC), que adquirió la capacidad de producir toxina Shiga sumando ambos caracteres patógenos, lo cual determinó un brote que afectó población adulta sana europea con alto número de muertes, características nuevas para ese serotipo.

Sobre la base del evento de transferencia de genes ocurrido por O104 en Europa se identificarán factores de virulencia adicionales, entre ellos los genes marcadores característicos de otras cepas de *E. coli* diarreogénicas, *invE*, *aggR*, *aaIC*, *afaC*, *eae*, *est*, *elt*, *astA*, *daaE*, con fines de vigilancia y factores de virulencia adicionales que contribuyen a la adhesión o aportan caracteres de virulencia a las cepas STEC: *saa*, *subAB*, *ehxA*, *iha*, *lpfA*, *toxB* identificando el perfil de virulencia adicional a *stx* en las cepas O174 aisladas (EQA4, 2013).

- Transferir el sistema al laboratorio central de Senasa.

En síntesis, este proyecto busca generar una técnica replicable para la identificación de microorganismos relevantes de impacto local. Por ello reviste interés nacional y podrá ser aplicada por laboratorios de diagnóstico no solo de alimentos, sino también de diagnóstico clínico, que alcancen cualquiera de los dos niveles de equipamiento, PCR convencional o tiempo real.

Se trata de una propuesta innovadora, con impacto potencial elevado para contribuir a los estándares de inocuidad de carnes y sus subproductos, a escala nacional y regional.

La metodología propuesta es sensible y adecuada para la detección del patógeno, y establece la posibili-

dad de obtener datos suficientes para considerar posibles modificaciones a la normativa vigente en materia de control de cárnicos.

El proyecto tiene el impacto potencial de mejorar la inocuidad de carnes mediante una valoración de las prácticas productivas nacionales a lo largo de la cadena agroalimentaria a través de indicadores moleculares. Asimismo, el protocolo será factible de ser empleado en laboratorios clínicos aplicados a otros tipos de muestras.

Por tanto, sus resultados permitirán desarrollar actividades de transferencia concretas, relevantes y oportunas frente a un problema de inocuidad agroalimentaria básico por su estrecha interdependencia entre la salud humana y la sanidad animal bajo el concepto “un mundo, una salud” que merece ser observado en forma abarcativa, del campo al plato y que está comprendida dentro de la misión y visión del Senasa.

Bibliografía

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, *Código Alimentario Argentino* Ley 18.284 18/07/69 Capítulo VI. Artículo 255 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N.º 79 y 500/04) [en línea]. Dirección URL: <http://www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_VI_Carneos_actuализ_2007-08.pdf>.

Beutin, L. (2006), “Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, Causes and Effects of the Rise of a Human Pathogen”, *Journal of veterinary medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, vol. 53, n.º 7, pp. 299-305.

Bentancor, A. *et al.* (2007), “Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina”, *FEMS Microbiology Letters*, vol. 267, n.º 2, pp.37-41.

Blanco, M. *et al.* (2004), “Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina”, *Instituto de Microbiología*, vol. 7, n.º 4, pp. 269-276.

Blanco Crivelli, X. *et al.* (2012), “Synanthropic rodents as possible reservoirs of shigatoxigenic *Escherichia coli* strains”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, n.º 2, p. 134.

Brusa, V. *et al.* (2013), “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, n.º 2, p. 171.

Caprioli, A.; Morabito, S.; Brugere, H. y E. Oswald (2005), “Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission”, *Veterinary Research*, vol. 36, n.º 3, pp. 289-311.

Chinen, I. *et al.* (2001), “Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina”, *Journal of Food Protection*, vol. 64, n.º 9, pp. 1346-1351.

Chinen, I. *et al.* (2009), “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 132, n.º 2-3, pp. 167-171.

De Smedt, J. M. (1998), “AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods. Association of Official Agricultural Chemists”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 45, n.º 1, pp. 25-28.

Etcheverría, A. I. *et al.* (2010), “Occurrence of Shiga-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina”, *Meat Science*, vol. 86, n.º 2, pp. 418-421.

Gioffre, A. *et al.* (2002), “Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by PCR in cattle in Argentina. Evaluation of two procedures”, *Veterinary Microbiology*, vol. 87, n.º 4, pp. 301-313.

Gomez, D. *et al.* (2002), “Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de Toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda”, *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 34, n.º 2, pp. 66-71.

Holt, J. G.; Krieg, N. R. y P. H. A. Sneath (eds.) (1984), “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, *Volumen 1: Gram-negative Bacteria of general, medical, or industrial importance*. Baltimore, Wilkins & Wilkins.

Jelacic, J. K. *et al.* (2003), “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles”, *Journal of Infectious Diseases*, vol. 188, n.º 5, pp. 719-729.

Jure, M. *et al.* (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*, vol. 42, n.º 4, pp. 284-287.

Karmali, M. A. (1989), “Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*”, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 2, n.º 1, pp. 15-38.

Kassenborg, H. D. *et al.* (2004), “Emerging Infections Program FoodNetWorking Group. Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites”, *Clinical Infectious Diseases*, vol. 38, n.º 3, pp. 271-278.

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*, vol. 157, n.º 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*, vol. 13, n.º 1, pp. 37-44.

Miliwebsky, E. *et al.* (2007), "Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina", *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 39, n.º 2, pp. 90-92.

Nataro, J. P. y J. B. Kaper (1998), "Diarrheagenic *Escherichia coli*", *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 11, n.º 1, pp. 142-201.

Organismo Argentino de Acreditación (2003), *Guía para validación de métodos de ensayo* (Código DC-LE-05, 1-16), Buenos Aires, Argentina.

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*, vol. 36, n.º 2, pp. 598-602.

Paton, A. W. y J. C. Paton (2002), "Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, n.º 1, pp. 271-274.

Parma, A. E. *et al.* (2000), "Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health", *European Journal of Epidemiology*, vol. 16, n.º 8, pp. 757-762.

Piérard, D.; Muyldermans, G.; Moriau, L.; Stevens, D. y S. Lauwers (1998), "Identification of new verocytotoxin type 2 variant B subunit genes in human *Escherichia coli* isolates", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, n.º 11, pp. 3317-3322.

Pollard, D. R.; Johnson, W. M.; Lior, H.; Tyler, S. D. y K. R. Rozee (1990), "Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 28, n.º 6, pp. 540-545.

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*, vol. 11, n.º 4, pp. 603-609.

Riley, L. W. *et al.* (1983), "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype", *The New England Journal of Medicine*, vol. 308, n.º 12, pp. 681-685.

Rivas, M. *et al.* (2003), "Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina", *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9, n.º 9, pp. 1184-1186.

Rivas, M. *et al.* (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*, vol. 3, n.º 1, pp. 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), I Simposio en Seguridad de Alimentos. Ponencia realizada el 8 de mayo de 2013 en Buenos Aires, Argentina.

Rumi, M. V. *et al.* (2007), "Contaminación de carne molida con cepas STEC según nivel socioeconómico de expendio", *Revista Argentina de Microbiología*, vol. 39, n.º 1, pp. 135.

Rumi, M. V. *et al.* (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*, vol. 41, pp. 40-41.

Rumi, M. V.; Irino, K.; Deza, N.; Huguet, M. y A. B. Bentancor (2012), "First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat", *Journal of Infection in Developing Countries*, vol. 6, n.º 4, pp. 358-363.

Statens Serum Institut, Division of Diagnostics and Infection Control - Dinamarca. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Escherichia coli* and *Klebsiella*, "External Quality Assurance Scheme for typing *Escherichia coli* Verotoxigenic (VTEC) & Other Diarrheagenic *E. coli* (DEC) 2012-2013 (EQA4)", The Danish National Reference Laboratory for *E. coli*.

Scheutz, F. *et al.* (2012), "Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 50, n.º 9, pp. 2951-63.

Tyler, S. D.; Johnson, W. M.; Lior, H.; Wang, G. y K. R. Rozee (1991), "Identification of Verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, n.º 7, pp. 1339-1343.

Trullols Soler, E. (2006), Validation of qualitative analytical methods, PhD tesis, Universitat Rovira I Virgili. [en línea]. Disponible en: <<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9004/EstherTrullols.pdf;jsessionid=60B0D8EDDA24BA08FB9EE495E95C0BD0.tdx2?sequence=1>>.

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]. Dirección URL: <<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>>.

Zheng, J. *et al.* (2008), "Identification and Characterization of Shiga Toxin Type 2 Variants in *Escherichia coli* Isolates from Animals, Food, and Humans", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, n.º 18, pp. 5645-5652.