

Puesta a punto del método para la detección de genes *stx*₁, *stx*₂ y *eae* según norma ISO 13136:2012 utilizando PCR de punto final a partir de cepas de *E. coli*

Optimization of the method for detecting *stx*₁, *stx*₂ and *eae* genes according to ISO 13136:2012 using endpoint PCR from *E. coli* strains

Agustín Pedro Albanesi¹ 

Mariana Aybar¹ 

María Soledad Sarniguet¹ 

Josefina Cabrera¹ 

Silvana Ruarte¹ 

¹Servicio de Microbiología,
Departamento Laboratorio Nacional
de Referencia, Dirección de
Fiscalización y Control,
INAL-ANMAT. Buenos Aires,
Argentina.

✉ Agustín Pedro Albanesi
agustin.albanesi@anmat.gob.ar

Recibido: 31 de enero de 2025

Aprobado: 17 de marzo de 2025

Publicado: 13 de mayo de 2025

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) causa casos esporádicos y brotes de diarrea, con o sin presencia de sangre, así como síndrome urémico hemolítico (SUH). El serotipo O157:H7 es endémico y el de mayor prevalencia en nuestro país. Además, existen otros serotipos (O26:H11; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145, entre otros) asociados a enfermedad humana severa. Las toxinas Shiga (*stx*₁, *stx*₂ y sus variantes), la proteína intimina, y la enterohemolisina son los principales factores de virulencia.

Entre los alimentos con riesgo de contaminación por STEC, se incluyen los productos cárnicos, principalmente aquellos provenientes de carnicerías que no aplican buenas prácticas de manufactura o de establecimientos no autorizados. También se consideran de riesgo los productos lácteos elaborados con leche sin pasteurizar y las verduras que no han sido adecuadamente sanitizadas. En el presente trabajo se puso a punto el Anexo C: Identificación de STEC por amplificación múltiple por PCR de los genes de virulencia y la detección de los productos de PCR en gel de agarosa de la Norma ISO 13136: 2012 "Microbiología de alimentos y piensos - Métodos basados en PCR para la detección de patógenos alimentarios - Método de plaqueo para la detección de STEC y la determinación de los serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145". Su ejecución permitió llevar a cabo la metodología de detección de genes productores de toxinas, *stx*₁ y *stx*₂, y el gen del factor de adherencia *eae*. Asimismo, se verificó la especificidad y sensibilidad de la metodología, junto con la evaluación de la robustez del colorante, garantizando así la confiabilidad de los resultados.

La implementación de esta metodología permite al Servicio de Microbiología confirmar las cepas de STEC, aisladas de muestras de alimentos, mediante la técnica de PCR punto final, una técnica más económica que la técnica de PCR en tiempo real, que permitirá al laboratorio ahorrar recursos y, al mismo tiempo, posibilitará la implementación de estrategias de prevención y control fundamentales para disminuir la morbi-mortalidad asociada al SUH y colaborar con el estudio epidemiológico en nuestro país.

Palabras clave: enfermedades transmitidas por los alimentos; *escherichia coli* enterohemorrágica; *escherichia coli* O157; *escherichia coli* shiga-toxigénica; estudio de validación; reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes sporadic cases and outbreaks of diarrhea, with or without bloody stools, as well as hemolytic uremic syndrome (HUS). The O157:H7 serotype is endemic and the most prevalent in our country; there are also other serotypes (O26:H11; O103:H2; O111:NM; O121:H19; O145:NM, among others) associated with severe human disease. Shiga toxins (*stx*₁, *stx*₂, and their variants), intimin protein, and enterohemolysin are the main virulence factors.

Foods at risk of STEC contamination include meat products, mainly those from butcher shops that do not implement good manufacturing practices or from unauthorized establishments. Dairy products made from unpasteurized milk and vegetables that have not been properly sanitized are also considered high-risk.

In this study, Annex C was optimized: Identification of STEC by multiple PCR amplification of virulence genes and detection of PCR products in agarose gel, of the ISO 13136:2012 "Microbiology of food and feed-PCR-based methods for the detection of foodborne pathogens-Plaques method for the detection of STEC and the determination of serogroups O157, O111, O26, O103 and O145". This allowed for the implementation of a methodology to detect toxin-producing genes, *stx*₁, and *stx*₂, as well as the adherence factor gene *eae*. Additionally, the specificity and sensitivity of the methodology were verified, along with the evaluation of the robustness of the dye, thus guaranteeing the reliability of the results.

The implementation of this methodology enables the Microbiology Service to confirm the STEC strains, isolated from food samples, using endpoint PCR, a more cost-effective technique than real-time PCR. This will help the laboratory optimize resources while facilitating the implementation of fundamental prevention and control strategies to reduce the morbidity and mortality associated with HUS and collaborate with the epidemiological studies in our country.

Keywords: foodborne diseases; enterohemorrhagic *escherichia coli*; *escherichia coli* O157; shiga-toxigenic *escherichia coli*; validation study; polymerase chain reaction.



Esta obra está bajo una licencia
[Creative Commons Atribución 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC BY 4.0).

Introducción

El término *Escherichia coli* (*E. coli*) productor de toxina Shiga (STEC) fue adoptado por la similitud de la toxina stx_1 con la producida por *Shigella dysenteriae*. Además de stx_1 , las cepas de STEC pueden presentar la toxina stx_2 , así como variantes de stx_1 y/o stx_2 . La proteína intimina, codificada por el gen *eae*, está asociada con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, permitiendo la invasión de la pared intestinal del huésped. Tras la invasión, las toxinas son liberadas y pueden causar complicaciones de salud potencialmente mortales. Los infantes, ancianos y personas con cuadros inmunocomprometidos son considerados de alto riesgo frente a STEC.

Las variantes de toxina *stx* se han agrupado según secuencia de aminoácidos, existiendo al menos 107 variantes reportadas^[1]. La variante stx_2a es la de mayor relevancia clínica por estar asociada a casos de SUH^[2]. La combinación de stx_2 con *eae* ha demostrado una asociación con el desarrollo de SUH y diarrea sanguinolenta^{[3][4]}.

La proteína intimina, codificada por el gen *eae*, es una proteína de membrana externa de 94-kDa, asociada con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, la iniciación de las señales de transducción, y la desorganización de las microvellosidades con la formación de la lesión A/E^[5]. El gen *eae* se clasifica en diferentes subtipos siendo el extremo C-terminal una región altamente divergente, capaz de unirse a los receptores en la célula epitelial^[6].

Las cepas de STEC pueden crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua mínima de 0,95; se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. *E. coli* O157:H7, identificado por primera vez como patógeno humano en 1982^[7], es el serotipo más importante por su impacto en la salud pública, asociado a grandes brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica y SUH. Existen más de

cien serotipos enterohemorrágicos que poseen un potencial patogénico similar.

En un 5% de los casos, la infección por STEC puede generar un cuadro clínico grave, conocido como síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática que afecta fundamentalmente el riñón, y además otros parénquimas como intestino, sistema nervioso central, corazón y páncreas. Es una enfermedad severa que hasta el momento no tiene tratamiento específico eficaz. Afecta principalmente a niños entre 2 meses y 5 años, y a adultos mayores de 65 años^[8]. La enfermedad tiene un fuerte impacto para el paciente y un alto costo para el sistema de salud.

La principal vía de transmisión de STEC son los alimentos contaminados, como carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros^[9]. Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, son descritos como los principales reservorios de STEC^[10]. Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral intrafamiliar o en jardines de infantes, y la contaminación fecal de aguas de recreación o aguas de pozo^[7]. Expertos de la Organización Mundial de la Salud han atribuido un 13% de casos de STEC a nivel global a productos agrícolas, 11% productos cárnicos y 7% proveniente de productos lácteos, en tanto que más del 60% de los casos no pudieron ser atribuidos^[11].

El proceso de enfermedad involucra la colonización del intestino y el daño debido a las toxinas. La colonización es el proceso por el cual STEC supera los mecanismos de defensa del huésped y se establece en el intestino. Es importante destacar que la dosis infectiva de este grupo bacteriano es de 10 a 100 bacterias

por gramo de alimento, muy baja al compararla con otros patógenos^[12].

En las últimas décadas, desde su descubrimiento, STEC ha estado relacionada con diversos brotes epidemiológicos. El primer reporte tuvo lugar en 1982 en Estados Unidos, donde una casa de comida rápida fue identificada como la fuente de infección de un brote de diarrea sanguinolenta que afectó a dos estados, marcando el inicio de la conciencia sobre la gravedad de estas infecciones y la necesidad de medidas preventivas en la cadena alimentaria. Posteriormente, en 1996, Japón enfrentó un brote significativo vinculado a la contaminación de rabanitos, cuyas fuentes de infección incluyeron viandas servidas en escuelas primarias, centros de cuidado infantil y hogares de ancianos, lo que afectó a 9.451 personas y provocó la muerte de 12; la cepa vinculada fue O157:H7^[13]. En 2011, Alemania experimentó un brote alarmante asociado a brotes de fenogreco contaminados, con la cepa O104:H4, resultando en 3.816 personas infectadas y 54 muertes. El brote epidemiológico mostró mayor agresividad, con una tasa de desarrollo de SUH del 22% y la capacidad de afectar a adultos, 88% de los casos reportados con una edad media de 42 años^[14]. Estos, entre otros brotes epidemiológicos, destacan la capacidad de STEC para contaminar diversas fuentes alimentarias y la importancia de una vigilancia constante y medidas coordinadas a nivel internacional para preservar la seguridad alimentaria y la salud pública.

El SUH típico o SUH causado por STEC es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda de insuficiencia renal crónica en Argentina, demandando luego diálisis y trasplante de riñón^[8]. En la última década, se reportaron anualmente entre 300 a 400 casos nuevos. La incidencia es la más alta a nivel mundial con una tasa poblacional de aproximadamente 0,8 casos/100.000 habitantes y 7,29 casos/100.000 niños menores de 5 años. Presenta una letalidad de entre 1 a 5%^[15].

El SUH es endémico también en otros países de la región del Cono Sur, y la notificación solo es obligatoria en Argentina, Bolivia, Chile y

Paraguay. En nuestro país, las cepas de *E. coli* serogrupo O157 son prevalentes en los casos clínicos, y entre las cepas STEC no-O157 es detectado con mayor frecuencia el serogrupo O145. Otros serogrupos relevantes son: O26, O91, O103, O111, O113, O121, O174^[15].

Entre 2019 y 2020, se detectaron en el laboratorio de referencia, Servicio de Fisiopatogenia del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", 54 brotes familiares de 1-5 casos, 2 brotes institucionales, y 6 de la comunidad. Si bien se realizaron las investigaciones por parte de las áreas de epidemiología local, no se pudo identificar la fuente de infección^[16].

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino. Diversos trabajos han puesto de manifiesto la presencia de STEC en frigoríficos argentinos y la importancia de aplicar planes de contención y buenas prácticas. Gomez y col. en un trabajo publicado en 2002 detectan STEC en el 8,4% de hamburguesas supercongeladas y 0,9% de los quesos de pasta blanda ensayados^[17]. Otro trabajo estudió la prevalencia en morcillas, entre 2001 y 2002, en el que se encontró que el 3% presentaba STEC^[18]. En un estudio realizado por Meichtri y col. publicado en 2004, la frecuencia de detección de STEC en terneros a nivel de playa de faena de un frigorífico argentino para consumo interno fue 38,5% de no-O157 y 0,5% de O157:H7^[19]. En 2011, Masana y col. realizaron un muestreo en nueve frigoríficos exportadores de Argentina encontrando una prevalencia de STEC O157 del 4,1% en materia fecal y del 2,6% en carcasas bovinas^[20]. Por otro lado, Costa y col. y Brusa y col. evalúan la importancia de la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura y capacitación del personal en frigoríficos y carnicerías respectivamente y, cómo a partir de ello se disminuye la presencia de cepas STEC circundantes^{[21][22]}. La aplicación de planes de HACCP en la cadena de producción disminuye la probabilidad de presencia de STEC en la carne y aumenta la seguridad del consumidor^[23].

Desde el año 2004, mediante las Resoluciones Conjuntas 79/2004 y 500/2004,

se incorpora al Código Alimentario Argentino (CAA) el criterio ausencia de *E. coli* O157:H7/NM en alimentos. En ese entonces la metodología propuesta era mediante técnicas de detección por aislamiento en placa según ISO 16654:2001. En 2017, de acuerdo con la Resolución Conjunta 4 - E/2017, se incorpora al CAA la detección de *E. coli* productor de toxina Shiga mediante PCR *real time* según ISO 13136:201224 y los procedimientos detallados por BAM-FDA y USDA-FSIS. Los artículos del CAA relacionados a STEC y su criterio microbiológico se resumen en **Tabla 1**.

Cabe mencionar que el CAA no contempla el serogrupo O104, responsable de un brote en Europa en 2011 ya mencionado anteriormente, a pesar de que sí está incluido en la norma ISO 13136:2012. Asimismo, el serogrupo O45 tampoco se encuentra en el CAA, a pesar de ser considerado por la Food Safety and Inspection Service del United States Department of Agriculture (FSIS-USDA) como uno de los serogrupos "Big Six"^[25]. La diferencia entre estas normativas radica en que la ISO tiene un alcance internacional, mientras que la FSIS-USDA se enfoca en los brotes epidemiológicos de América del Norte.

En el Servicio de Microbiología del Instituto Nacional de Alimentos se realiza la detección

de *E. coli* O157: H7/NM en alimentos según norma ISO 16654:2001 y, desde el año 2008, se comenzó a confirmar los aislamientos por PCR en tiempo real. A partir de la implementación del criterio microbiológico para STEC no O157 en el CAA en el año 2017, se puso a punto la metodología establecida en la norma ISO 13136:2012. El procedimiento según esta norma consiste en un enriquecimiento del alimento, utilizando una porción de muestra según el CAA (25 o 65 g, ver **Tabla 1**), en nueve partes de caldo de cultivo de tripticasa-soja modificado con novobiocina o acriflavina, o en agua de peptona tamponada, incubando de 18 a 24 horas a 37 °C. A continuación, se purifica el ADN de 0,1 ml de cultivo y se realiza un ensayo de PCR en tiempo real en búsqueda de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *eae*. Los caldos de enriquecimiento que hayan resultado positivos son sometidos a una separación inmunomagnética o, directamente plaqueados en agar diferencial. Para la separación inmunomagnética se utiliza el serogrupo específico reportado previamente por un ensayo de PCR tiempo real de genotipificación. Una vez finalizada la recuperación se estría sobre los medios diferenciales TBX o SMAC. A continuación, se escogen 50 colonias típicas, realizando una inoculación en punto en agar AN o TSA y en paralelo se suspende en 1 ml de agua

TABLA 1: ARTÍCULOS DEL CAA, ALIMENTOS Y SU CRITERIO MICROBIOLÓGICO RESPECTO DE STEC.

Artículo	Alimento	Determinación	Criterio microbiológico
156 trís	Comidas preparadas*	<i>E. coli</i> O157:H7/NM y <i>E. coli</i> no O157**	n=5, c=0, ausencia en 65 g
255	Carne picada fresca	<i>E. coli</i> O157:H7/NM y STEC no O157**	n=5, c=0, ausencia en 65 g
286 bis	Salazones cocidas	<i>E. coli</i> O157:H7, NM	n=5, c=0, ausencia en 65 g
302	Chacinados embutidos frescos, secos y cocidos. Chacinados no embutidos	<i>E. coli</i> O157:H7/NM y <i>E. coli</i> no O157**	n=5, c=0, ausencia en 65 g
925 quáter	Hortalizas frescas y frutas frescas. Vegetales mínimamente procesados, listos para su consumo o que demanden lavado con agua	<i>E. coli</i> O157:H7/NM y <i>E. coli</i> no O157**	n=5, c=0, Ausencia en 25g

* En alimentos a base de carne picada y/o vegetales crudos.

***E. coli* productor de toxina Shiga de los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103. Se considerarán solo aislamientos de los mencionados serogrupos positivos para los genes *stx* y *eae*.

ultrapura, formándose *pooles* de 10 colonias sobre los cuales se realiza la búsqueda de genes *stx1*, *stx2* y *eae* mediante PCR tiempo real (ISO 13136:2012, anexo E), PCR punto final (ISO 13136:2012, anexo C) u otro protocolo de PCR equivalente. En caso de que uno o varios de los *pooles* ensayados hayan generado amplificación de los genes buscados, se procede al estudio individualizado de las colonias constitutivas del *pool*.

El presente trabajo tiene como objetivo la puesta a punto del Anexo C: Identificación de STEC por amplificación múltiple por PCR de los genes de virulencia y la detección de los productos de PCR en gel de agarosa, de la Norma ISO 13136:2012.

Materiales y métodos

El procedimiento aquí detallado permite la detección de colonias de STEC, respetando condiciones y concentraciones detallados en la norma ISO 13136:2012 Anexo C y F. Además, se realizaron pruebas complementarias para evaluar la competitividad del método, estudiando la reactividad de los *primers* frente a cepas de referencia presentes en el laboratorio y alineamiento *in silico* con genomas de interés, la especificidad frente a otros géneros y especie, los límites de cuantificación, la detección en *pooles* y la robustez del colorante.

Cepas de trabajo

Se utilizaron cepas conservadas a -70 °C en perlas de criopreservación. Se dispuso de 6 cepas STEC de referencia brindadas por el Servicio de Fisiopatogenia, ANLIS-Malbrán, identificadas como O103:H2, O111:NM, O26:H111, O145:NM, O121:H19 y O157:H7. Las cepas fueron estriadas en agar TSA e incubadas a 37 °C durante 18 horas.

Además, se evaluó la especificidad de la técnica frente a 29 cepas de referencia criopreservadas por el servicio de microbiología. Las cepas conservadas a -70 °C en perlas de criopreservación, fueron sembradas según se detalla a continuación.

Medio TSA a 30 °C durante 18h: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *B. cereus* ATCC 4778. Medio TSA a 37°C durante 18h: *Cronobacter sakazakii* ATCC 2954, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *Klebsiella aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Salmonella entérica Choleraesuis* ATCC 10708, *Salmonella entérica Paratyphi*, *S. entérica Typhimurium* ATCC 14028, *S. entérica Enteritidis* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 49444 y *S. aureus* ATCC 25923. Medio TSA a 37 °C durante 48h: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 y *Lactobacillus leichmanii* ATCC 4797. Medio TSYEA a 30 °C durante 48h: *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *L. monocytogenes* ATCC 19118, *Listeria seeligeri* ATCC 35967 y *Listeria innocua* ATCC 33090.

Evaluación de *primers*

Con el fin de evaluar las secuencias de los *primers* provistos por ISO 13136:2012 Anexo C para PCR punto final se realizó el alineamiento de *primers* con el genoma de *E. coli* EDL 933 disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/^[26].

Para conocer la competencia de los *primers* utilizados en el presente trabajo en la búsqueda de cepas STEC, se realizó una búsqueda *in silico* en el sitio <http://insilico.ehu.es/> con genomas pertenecientes a *E. coli*.

Extracción de ADN

Se realizó el procedimiento de extracción de ADN detallado en norma ISO 20837:2006 punto B.6.2. En el caso de una colonia aislada se disuelve en 0,1 ml de agua ultrapura, y en el caso de un *pool* de 10 colonias se disuelven en 1 ml de agua. Se sometió a tratamiento térmico por 10 minutos a 100 °C en bloque térmico y luego se enfrió en bloque frío 10 minutos, se sometió a vortex y se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10.000 g.

En caso de no utilizar en el momento, se conserva transfiriendo el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de reacción estéril y se conserva a -20 °C hasta su uso.

Amplificación por PCR de punto final según ISO 13136:2012 C3.3

Cada muestra tiene un volumen final de 50 µl, con un buffer de reacción compuesto por MgCl₂ 1,2 mmol/l, dNTPs 0,2 mmol/l de cada uno, 50 pmol de cada *primer*, 2 unidades de Taq polimerasa y 10 µL de extracto de ADN del punto.

Para la reconstitución de *primers* y dilución de dNTPs se utilizó buffer TE 1X. Para la elaboración de TE 1X se colocó 1 ml de Tris HCl 1M y 200 µl de EDTA 0,5M pH 8 y se llevó a volumen de 100 ml. Los genes amplificados son aquellos que codifican para los factores de virulencia *stx*₁, *stx*₂ y *eae*, identificados a partir del tamaño de los amplicones obtenidos según **Tabla 2**.

En cada ensayo de PCR se incluyó un control positivo y dos negativos. El control positivo utilizado fue una colonia de la cepa E. coli EDL933 (O157:H7, *stx*₁/*stx*₂), en tanto que un control negativo está compuesto por la cepa sin genes de virulencia E. coli ATCC 25922 y otro sin cepa, sustituyendo el volumen de muestra de ADN por agua.

El perfil térmico constó de 35 ciclos, cada uno consistió en 1 minuto de desnaturalización a 95 °C, 2 minutos de alineación a 65 °C para

los primeros 10 ciclos y disminuyendo 1 °C entre los ciclos 11 a 15, hasta los 60 °C y, 1,5 minutos de elongación a 72 °C, incrementando gradualmente el tiempo entre los ciclos 25 a 35 hasta llegar a 2,5 minutos. Se utilizó el termociclador T100 de Bio-Rad.

Electroforesis en gel de agarosa según ISO 13136:2012 C3.4

Se preparó un gel de 20 g/l de agarosa en TAE 1X. Se carga cada pocillo del gel con 15 µl del producto de PCR mezclado con 3 µl de colorante. Las muestras se corren a voltaje constante de 100V durante 70 minutos.

Buffer de electroforesis TAE 1x. 40mM tris pH 7,6, 20mM ácido acético y 1mM EDTA, se prepara a partir de TAE 50X, 108 g/l Tris base (PM: 121), 57,1 ml/l ácido acético glacial, 100 ml/l 0,5M EDTA pH 8.

Se utilizó la cuba de electroforesis Sub cell GT de Bio-Rad, fuente Bio-Rad Powerpack Basic Power, transiluminador Bio-Rad UVView Mini, el colorante utilizado fue UVView 6x Loading Dye de Bio-Rad. Se utilizó un marcador de peso molecular de ADN 100-1000pb para asignar correctamente el peso a los amplicones producidos, sembrando 20 µl de marcador con 4 µl de colorante.

El gel de agarosa fue analizado a ojo desnudo y mediante fotografía utilizando el programa pixlr.com. Se realizó un ajuste monocromático Red-Green y a continuación se invirtieron los colores.

TABLA 2: SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *EAE*, *STX*₁ Y *STX*₂, Y SU TAMAÑO DE AMPLICÓN ESPERADO. FUENTE ISO 13136:2012.

Gen	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>	Tamaño del amplicón
<i>eae</i>	<i>eae</i> AF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
	<i>eae</i> AR	CCACCTGCAGCAACAAGA	
<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₁ F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180
	<i>stx</i> ₁ R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	
<i>stx</i> ₂	<i>stx</i> ₂ F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255
	<i>stx</i> ₂ R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	

Límite de detección

Se seleccionó la cepa *E. coli* O157 H7:NM $stx_1(+)$ $stx_2(+)$ $eae(+)$ para realizar los ensayos por contener los tres genes de interés. Para ello se realizó un cultivo en caldo BHI a partir de una colonia aislada en TSA y se incubó a 37 °C durante 18 h y recuento en TSA por duplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y la concentración bacteriana se expresó en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

A continuación 100 µl de los tubos de BPW empleados para las diluciones de cultivo fueron centrifugados a 10.000 g durante 10 minutos de acuerdo con ISO 20837:2007 "Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos en los alimentos. Requisitos para la preparación de las muestras para la detección cualitativa". Se descartó el sobrenadante y se agregó a cada tubo 100 µl de agua ultrapura, luego se continuó con la extracción de ADN, reacción de PCR y revelado por electroforesis como se mencionó con anterioridad.

Sensibilidad de *pooles*

Se realizaron *pooles* de diez colonias para evaluar la sensibilidad de la técnica frente a una colonia de STEC con interferencia de otras colonias no toxigénicas tal como se describe en ISO 13136:2012 para la detección y aislamiento de cepa STEC. Para ello, se colocaron 9 colonias de *E. coli* no toxigénica y una colonia productora de toxina Shiga en 1 ml de agua ultrapura. Las cepas no toxigénicas evaluadas fueron *E. coli* ATCC 25922, ATCC 35218 y ATCC 11229, la cepa toxigénica utilizada fue *E. coli* O157 H7. La extracción de ADN, reacción de PCR y revelado por electroforesis se realizó tal como se detalló con anterioridad.

Robustez del colorante

Se realizaron tinciones de distintas concentraciones de colorante con el fin de optimizar el uso del reactivo. Se utilizaron

15 µl de amplicones obtenidos a partir de PCR punto final utilizando como muestra el límite de detección detectado en el punto 2.6, es decir dilución -4. Al momento de sembrar se utilizaron 3, 2.5, 2, 1.5, 1 y 0.5 µl de colorante UView Bio-Rad siendo las concentraciones finales de colorante 1x, 0.85x, 0.70x, 0.54x, 0.37x y 0.19x respectivamente.

Resultados y Discusión

Alineamiento *in silico* de *primers* con genomas y tamaño de bandas

Se realizó un alineamiento de los *primers* especificados en la ISO 13136:2012 para PCR punto final con el genoma de *E. coli* EDL933^[25], obteniéndose buena complementariedad y el tamaño esperado de amplicones que permita una buena resolución en el gel de agarosa. Los *primers* para stx_1 y stx_2 amplifican regiones que codifican para la subunidad A de la toxina.

La alineación *in silico* realizada en el sitio <http://insilico.ehu.es/> con los *primers* en estudio permitió la comparación con 65 genomas de *Escherichia*, de los cuales se obtuvieron amplificaciones para 14 genomas según cuentan con los genes *eae*, stx_1 y stx_2 . La búsqueda se realizó permitiendo hasta 2 nucleótidos de diferencia y amplicones posibles menores a 3000pb. La búsqueda de amplificaciones inesperadas, es decir el *primer forward* de un gen con el *primer reverse* de los otros genes, no arrojó la formación de nuevas bandas.

Los genomas que presentaron amplificación para los genes de interés fueron *E. coli* O127:H6 E2348/69, *E. coli* O103:H2 str. 12009, *E. coli* 104:H4 str. 2009EL2050, *E. coli* 104:H4 str. 2009EL2071, *E. coli* 104:H4 str. 2011C-3493, *E. coli* O111:H5 str. 11128, *E. coli* O157:H7 EDL933, *E. coli* O157:H7 EC4115, *E. coli* O157:H7 str. Sakai, *E. coli* O157:H7 TW14359, *E. coli* O26:H11 str11368, *E. coli* O55:H7 CB9615, *E. coli* O55 str. RM12579 y *E. coli* Xuzhou21.

Caracterización de cepas STEC

Para evaluar la amplificación de todos los primers se utilizó la cepa de *E. coli* O157 H7:NM provista por el Servicio de Fisiopatogenia del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", previamente caracterizada por tal servicio, productora de los tres genes de interés: *stx*₁, *stx*₂ y *eae*.

Se sembró un patrón de peso molecular para conocer el peso de los amplicones obtenidos. Los amplicones obtenidos, representados por bandas en el gel de agarosa presentaron los pesos esperados. Siendo la banda de *eae* la banda superior, con un peso molecular de 384pb, seguido de *stx*₂ 255 pb y *stx*₁ siendo la banda más liviana con 180pb. Ver **Figura 1**.

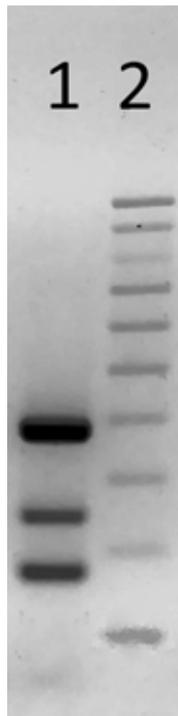


Figura 1: Comparación de amplicones obtenidos con patrón de peso molecular. Calle 1 muestra las bandas obtenidas utilizando *E. coli* O157 H7:NM como muestra, siendo de arriba a abajo las amplificaciones para *eae*, *stx*₂ y *stx*₁ respectivamente. Calle 2 presenta 20 µl de control de peso molecular Bio-Rad 100-1000, siendo la banda superior de 1000 pb y disminuyendo de a centena de pb hasta la última banda correspondiente a 100 pb. El tamaño de los amplicones obtenidos coincide con lo esperado.

La caracterización de las cepas de referencias O103:H2, O111:NM, O26:H111, O145:NM, O121:H9 y O157:H7 coincide con lo reportado por el Servicio de Fisiopatogenia del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" al momento de brindar las cepas. Ver **Figura 2**. Los genotipos encontrados se resumen en **Tabla 3**.

La detección de *stx*₁, *stx*₂ y *eae* por PCR de punto final, utilizando los mismos pares de primers, ya había sido descripta para otros serogrupos no O157 con anterioridad. Kobayashi y col. reportaron la presencia de estos genes en cepas de los serogrupos O8, O84, O113, y O116, aisladas de ganado vacuno²⁷.

Resultados de especificidad

Sobre muestras de ADN de las 29 cepas de referencia, no STEC, presentes en el servicio de microbiología, se realizó amplificación de PCR utilizando los primers específicos para *stx*₁, *stx*₂ y *eae*, y luego fueron sometidas a corrida electroforética. Al revelar el gel de agarosa se observa que las bandas de mayor intensidad se corresponden con los controles positivos. Ver **Figura 3**.

Se apreciaron bandas de intensidad débil propias de amplificaciones inespecíficas para las cepas *C. sakazakii* ATCC 29544, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *L. monocytogenes* ATCC 19118 y *P. aeruginosa* ATCC 15442.

Resultan de interés aquellas bandas que presentan valores próximos a los amplicones esperados, ya que podrían resultar en falsos positivos. En las amplificaciones de *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 11229 se observó una banda de aproximadamente 200 pb corriendo entre las bandas esperadas para los genes de *stx*₁ y *stx*₂. En tanto *L. monocytogenes* ATCC 19118 presentó una banda de 320 pb, próxima a la amplificación esperada del gen *eae*.

C. sakazakii ATCC 29544 presentó una banda menor a 100 bp en tanto que *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 11229, *L. monocytogenes* ATCC 19118 y *P. aeruginosa* ATCC 15442 presentaron otras bandas de mayor peso molecular.

Leotta y col., en su trabajo para la validación de la técnica de PCR, realizan un estudio de

especificidad en 30 cepas no productoras de los genes de interés sin obtener interferencias en sus genes de estudio; no detallan la aparición de bandas inespecíficas^[27]. Las cepas coincidentes con el trabajo de Leotta y col. son *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923; otras especies coincidentes son *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Salmonella spp.*

Límite de detección

La concentración de *E. coli* O157 en caldo BHI luego de 18 horas de incubación a 37 °C fue determinado mediante recuento en TSA, obteniéndose un valor de 2.0x10⁹ UFC/ml.

Previamente se había estudiado la técnica de PCR de punto final para la detección de los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb0157* por Leotta y col. 2005. En dicho trabajo si bien utilizan *primers*,

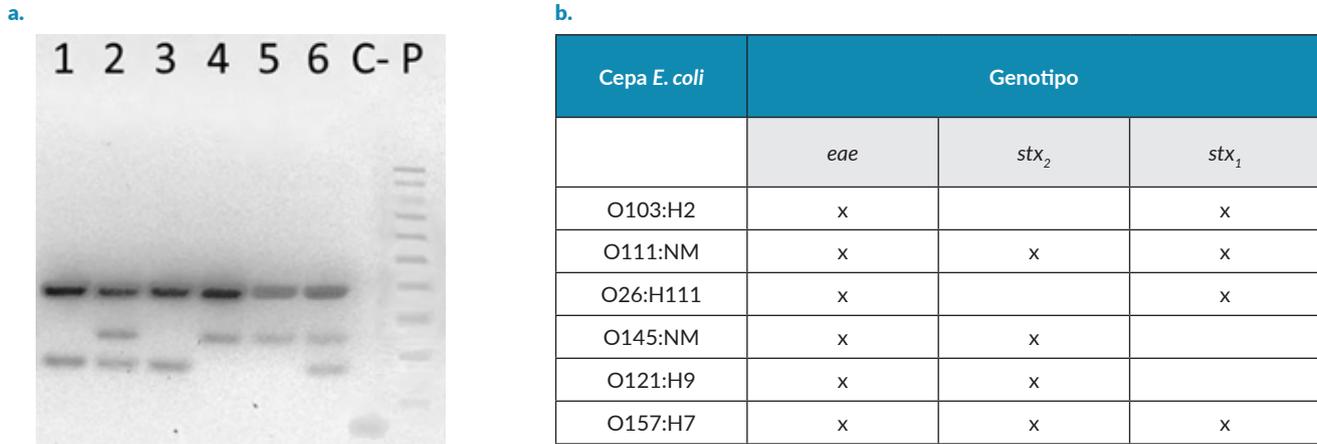


Figura 2: Caracterización de las cepas de *E. coli* criopreservadas de referencia mediante detección de genes que codifican factores de virulencia por PCR de punto final. **a.** Electroforesis en gel de agarosa. Calle 1: O103, calle 2: O111, calle 3: O26, calle 4 *E. coli* O145, calle 5: *E. coli* O121, calle 6: *E. coli* O157, C- control negativo, P patrón de peso molecular Bio-Rad 100-1000. **b.** Genotipo encontrado según cepa de *E. coli*.

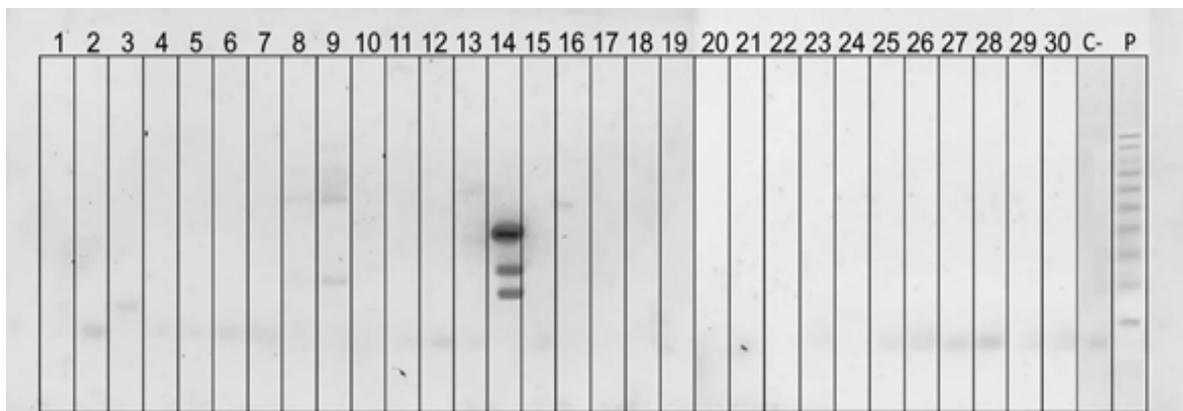


Figura 3: Gel de agarosa con los productos de PCR punto final con muestras de distintos géneros y especie, siendo calle 1 *B. cereus* ATCC 11778, 2 *B. subtilis* ATCC 6633, 3 *C. sakazakii* ATCC 29544, 4 *E. cloacae*, 5 *E. faecium* ATCC 6569, 6 *E. faecalis* ATCC 29212, 7 *E. coli* ATCC 25922, 8 *E. coli* ATCC 35218, 9 *E. coli* ATCC 11229, 10 *K. aerogenes* ATCC 13048, 11 *K. pneumoniae* ATCC 700603, 12 *L. leichmanii* ATCC 4797, 13 *L. monocytogenes* (4e) ATCC 19118, 14 *E. coli* O157:H7, 15 *L. innocua* (6a) ATCC 33090, 16 *P. aeruginosa* ATCC 15442, 17 *P. aeruginosa* ATCC 27853, 18 *R. equi* ATCC 6939, 19 *S. choleraesuis* ATCC 10708, 20 *B. cereus* ATCC 4778, 21 *L. acidophilus* ATCC 314, 22 *L. ivanovii* ATCC 19119, 23 *L. monocytogenes* (1) ATCC 19111, 24 *L. seeligeri* ATCC 35967, 25 *S. entérica* serov. *Paratyphi*, 26 *S. entérica* subesp. *entérica* serov. *Typhimurium* ATCC 14028, 27 *S. entérica* subesp. *entérica* serov. *Enteritidis* ATCC 13076, 28 *S. aureus* ATCC 6538, 29 *S. aureus* ATCC 49444, 30 *S. aureus* ATCC 25923, C- control negativo y P patrón de peso molecular Bio-Rad 100-1000.

perfiles térmicos y colorante de ADN distintos, mencionan un límite de detección de 4×10^5 UFC/ml^[26]. En el mismo trabajo realizan la lisis celular con solución de tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X, hirviendo por 15 m y centrifugando 5 m a 10000 g. Al realizar una comparación en el límite de detección dada una muestra de ADN extraída con Tritón X-100 al 1% respecto de una extracción con kit comercial Wizard® (Wisconsin, EEUU) Leotta y col. obtienen una sensibilidad de un orden de magnitud mayor al utilizar Tritón^[25]. Otro trabajo, realizado por Paton y col., también con otros pares de *primers* y colorante, para la detección de los genes de STEC por PCR múltiple el límite de detección había sido reportado en la dilución decimal -4 ^[28].

El límite de detección, definido como la última dilución capaz de presentar amplificación detectable en el gel de agarosa, se correspondió con la dilución -4 , siendo apreciada amplificación también en las calles -1 , -2 , -3 , en tanto que no se observó detección en las calles -5 , -6 y -7 . Ver **Figura 4**. Esto quiere decir que para concentraciones inferiores a 2×10^5 UFC/ml, la detección no es posible. Eso puede deberse a la pérdida de material genético en los pasos de extracción y una baja sensibilidad en la técnica. Cabe destacar que la imposibilidad de cuantificar el ADN presente en la muestra impide determinar el número de copias de ADN exacto.

Los resultados obtenidos coinciden en el límite de detección reportado por Leotta y col, quienes también lo observan en la dilución -4 ^[25]. Por otro lado, Patón y col. reportan un límite de detección dos órdenes de magnitud menor, siendo su sensibilidad reportada superior^[28].

Sensibilidad en *pool*

El ensayo demuestra la competitividad del ensayo de PCR para la detección de genes de interés aún en *pool* con 9 colonias interferentes de tres cepas de *E. coli* ATCC distintas, tal como se especifica en ISO 13136:2012, permitiendo la búsqueda y aislamiento de la cepa productora de genes de virulencia. Ver **Figura 5**.

El análisis de los *pooles* de las distintas cepas de *E. coli* ATCC en presencia de *Escherichia coli* O157:H7 no evidenció la presencia de amplicones inespecíficos observados durante el ensayo de especificidad para las mismas cepas de *E. coli* no toxigénica; de este modo se pone de manifiesto que la amplificación ocurriría preferentemente entre los *primers* y los genes diana por sobre secuencias de ADN que no complementen adecuadamente con los *primers* utilizados. Los resultados obtenidos disminuyen la posibilidad de falsos positivos debido a que las bandas esperadas para los genes *stx*₁, *stx*₂ y *eae* aún en *pool* presentaron una intensidad notablemente mayor a las bandas inespecíficas descritas con anterioridad.

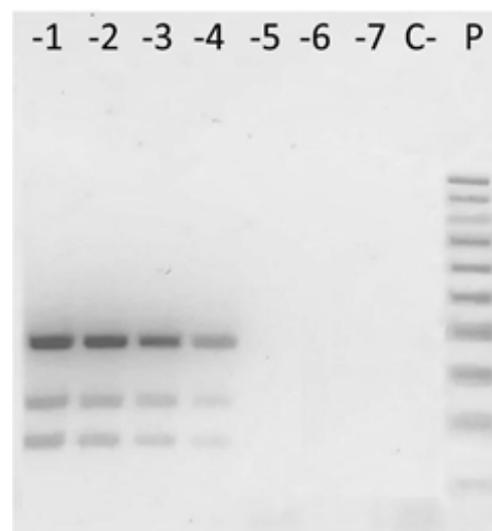


Figura 4: Gel de agarosa de los productos de PCR respectivos a las diluciones seriadas de un cultivo de *E. coli* O157:H7. Las calles -1 a -7 presentan la respectiva dilución del cultivo de *E. coli*, C- control negativo y P patrón de peso molecular Bio-Rad 100-1000. Las bandas presentes en el gel de arriba a abajo corresponden con los genes *eae*, *stx*₂ y *stx*₁.

Robustez del colorante

Se realizó la siembra de 15 μ l de amplicón respectivo de la dilución -4 correspondiente del análisis del límite de detección añadiendo de 0,5 a 3 μ l del colorante. Luego se realizó la corrida electroforética y se reveló bajo luz UV.

El colorante demostró gran sensibilidad en los ensayos realizados, obteniéndose positividad en todas las concentraciones utilizadas y sin presencia de falsos negativos aún en bajas concentraciones. No se evidenciaron diferencias al usar 1,5 μl o más colorante. Al agregar 1 μl de colorante las muestras presentaron bandas más delgadas, aún con buena visibilidad; en tanto que al utilizar 0,5 μl de colorante se evidenciaron bandas poco definidas.

Por otro lado, todas las bandas presentaron una corrida uniforme y semejante, por lo que las variaciones del colorante no afectaron en la determinación del peso de las bandas. Estudios previos realizados por Huang y col. mencionan que el uso de colorantes como SYBR green y SYBR gold modifican la distancia recorrida por las bandas de ADN y dificultan una determinación precisa del peso molecular^[29]. En el mismo trabajo no observan tal alteración al teñir con GelRed o Bromuro de etidio. UView Loading dye 6x de Bio-Rad no especifica el colorante de ADN en su formulación por lo que la discusión acerca del uso del colorante es limitada.

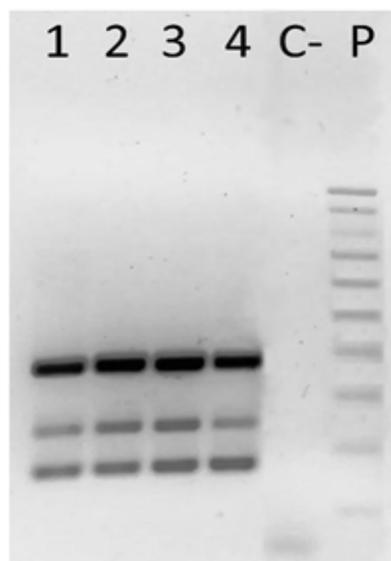


Figura 5: Gel de agarosa con los *pooles* conformados por una colonia de *E. coli* O157 H7 y nueve colonias de *E. coli* ATCC; siendo calle 1 *E. coli* ATCC 25922, calle 2 *E. coli* ATCC 35218, calle 3 *E. coli* ATCC 11229 y calle 4 el control positivo de *E. coli* O157. Las bandas presentes en el gel de arriba a abajo corresponden con los genes *eae*, *stx*₂ y *stx*₁.

El uso del patrón de peso molecular 100 bp Molecular Ruler de Bio-Rad especifica el uso de 2.5 μl de patrón en el caso de tinción con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bromuro de etidio. En el presente trabajo se requirieron 20 μl de patrón para permitir una buena definición de las bandas utilizando UView Loading dye 6x de Bio-Rad al 1x. Tales diferencias sugieren que la sensibilidad del colorante bromuro de etidio al 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sería mayor respecto del colorante utilizado en el presente trabajo al 1x. El colorante UView Loading dye 6x de Bio-Rad respecto del bromuro de etidio presenta los beneficios de ser no carcinogénico, de baja toxicidad y bajo impacto ambiental, sin necesidad de limitar un espacio en el laboratorio para su manipulación^[30].

Conclusión

La implementación de una metodología eficaz para la detección de STEC es crucial en la lucha contra el síndrome urémico hemolítico (SUH), una enfermedad grave que puede resultar en morbilidad y mortalidad significativas. La adopción de estrategias preventivas y de control en Salud Pública es esencial para reducir el impacto del SUH, contribuyendo así al objetivo de bienestar y salud establecido como meta de desarrollo sustentable por la Organización Mundial de la Salud.

La detección y aislamiento de *Escherichia coli* shigatoxigénica en alimentos es de suma importancia en nuestro país debido a su alta incidencia. La detección temprana prevendría casos de SUH y reduciría costos en el sistema de salud. El aislamiento de la colonia permitirá el análisis epidemiológico y conocer su evolución. El uso de la técnica de PCR de punto final ha sido utilizada con anterioridad para la genotipificación de cepas de STEC provenientes de muestras vacunas, porcinas, lácteas y vegetales, entre otras^{[31][32]}.

El método desarrollado ha demostrado ser altamente específico y sensible, lo que permite un monitoreo efectivo del mercado y la colaboración con otros organismos en la

identificación y caracterización de STEC. Si bien se reconoce que existen oportunidades de mejora, especialmente en lo que respecta a la sensibilidad de la detección, la técnica aquí expuesta es una alternativa a la detección por PCR en tiempo real de acuerdo con la ISO 13120:2012.

Explorar otros medios de extracción de ADN, como diferentes kits o el uso de tritón, podría mejorar aún más la sensibilidad del método. Además, la reducción de volúmenes de reacción y colorante podría optimizar el uso de los reactivos, haciéndolo más eficiente y económico.

La implementación y puesta a punto de esta metodología en el Laboratorio Nacional de Referencia no solo beneficia la capacidad de detección y caracterización de STEC, sino que también facilita la colaboración con diversos actores a lo largo de la cadena agroalimentaria. Esta articulación entre distintos sectores es fundamental para abordar de manera integral los riesgos asociados con la contaminación por STEC y garantizar la seguridad alimentaria en toda la cadena de suministro. En última instancia, estas acciones contribuyen a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos y al cumplimiento de los objetivos de salud pública.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*. 2012 Sep;50(9):2951-63. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
2. Kawano K, Okada M, Haga T, Maeda K, Goto Y. Relationship between pathogenicity for humans and stx genotype in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O157. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2008 Mar;27(3):227-32. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0420-3>
3. Persson S, Olsen KE, Ethelberg S, Scheutz F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *Journal of clinical microbiology*. 2007 Jun;45(6):2020-4. <https://doi.org/10.1128/JCM.02591-06>
4. Miliwebsky E, Deza N, Zolezzi G, Baschkier A, Carbonari C, Manfredi E, D´Astek B, Chinen B, Rivas M. Manual de procedimientos: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en el marco de la detección de *E. coli* diarreigénico. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: ANLIS Dr. C. G. Malbrán, 2019. (ANLIS/INEI/MPY ARG;2019)
5. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina*. 2006;66(supplement 3):27-32.
6. Yang X, Sun H, Fan R, Fu S, Zhang J, Matussek A, Xiong Y, Bai X. Genetic diversity of the intimin gene (eae) in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in China. *Scientific reports*. 2020 Feb 24;10(1):1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60225-w>
7. Alconcher LF, Rivas M, Lucarelli LI, Galavotti J, Rizzo M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in household members of children with hemolytic uremic syndrome.

- European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2020 Mar;39(3):427-32. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03738-1>
8. Cody EM, Dixon BP. Hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Clinics*. 2019 Feb 1;66(1):235-46. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.09.011>
 9. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci* 2007; 85: E45-62. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>
 10. Galarce N, Sánchez F, Escobar B, Lapierre L, Cornejo J, Alegría-Morán R, Neira V, Martínez V, Johnson T, Fuentes-Castillo D, Sano E. Genomic epidemiology of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the livestock-food-human interface in South America. *Animals*. 2021 Jun 22;11(7):1845. <https://doi.org/10.3390/ani11071845>
 11. World Health Organization. Shiga Toxin-producing *Escherichia Coli* (STEC) and Food: Attribution, Characterization and Monitoring. World Health Organization; 2019 Jan 22.
 12. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization Rome, 2018
 13. Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., ... & Yanagawa, H. (1999). Massive outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American journal of epidemiology*, 150(8), 787-796. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010082>
 14. Frank, C., Werber, D., Cramer, J. P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., ... & Krause, G. (2011). Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*, 365(19), 1771-1780. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106483>
 15. Alconcher LF, Balestracci A, Coccia PA, Suarez AD, Ramírez FB, Monteverde ML, Perez y Gutiérrez MG, Carlopío PM, Principi I, Estrella P, Micelli S. Hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in Argentina: update of serotypes and genotypes and their relationship with severity of the disease. *Pediatric Nephrology*. 2021 Sep;36(9):2811-7. <https://doi.org/10.1007/s00467-021-04988-y>
 16. Ministerio de Salud de la Nación. Boletín integrado de vigilancia N560 SE30 2021.
 17. Gómez D. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda. *Rev. argent. microbiol*. 2002:66-71.
 18. Oteiza JM, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food Microbiology*. 2006 May 1;23(3):283-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.003>
 19. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BE, Masana MO, Cataldi A, Rodríguez HR, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *International journal of food microbiology*. 2004 Nov 1;96(2):189-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.018>

20. Masana MO, D'ASTEK BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, Leotta GA, Vilacoba E, Irino K, Rivas M. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *Journal of food protection*. 2011 Dec;74(12):2008-17. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-189>
21. Costa M, Londero A, Brusa V, Galli L, Van Der Ploeg C, Roge A, Leotta GA. Characterization and molecular subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in provincial abattoirs from the Province of Buenos Aires, Argentina, during 2016-2018. *Preventive veterinary medicine*. 2020 Oct 1;183:105133. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105133>
22. Brusa V, Restovich V, Signorini M, Pugin D, Galli L, Díaz VR, Arias R, Leotta GA. Evaluation of intervention measures at different stages of the production chain in Argentinian exporting abattoirs. *Food Science and Technology International*. 2019 Sep;25(6):491-6. <https://doi.org/10.1177/1082013219836326>
23. Brusa V, Costa M, Padola NL, Etcheverria A, Sampedro F, Fernandez PS, Leotta GA, Signorini ML. Quantitative risk assessment of haemolytic uremic syndrome associated with beef consumption in Argentina. *PLoS One*. 2020 Nov 13;15(11):e0242317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242317>
24. Genome Information by Organism *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information. Consultado el 5/3/22. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/167/Escherichia%20coli%20O157:H7%20str.%20EDL933>
25. Pihkala, N. (2012). Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC). Office of Public Health Science, Office of Policy and Program Development, Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture.
26. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista argentina de microbiología*. 2005 Mar;37(1):1-0.
27. Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, & Yamamoto K (2001). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 484-489. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.484-489.2001>
28. Paton AW, Paton JC. Direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157, and O113 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999 Oct 1;37(10):3362-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3362-3365.1999>
29. Huang Q, Baum L, Fu WL. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory Journal For Clinical Laboratories And Laboratories Related*. 2010 Jan 1;56(3):149.
30. UVView Loading dye 6x Bio-Rad. Disponible en <https://www.bio-rad.com/es-ar/sku/1665112EDU-uvview-6x-loading-dye-1-ml?ID=1665112EDU>

31. Samadpour M, Barbour MW, Nguyen T, Cao TM, Buck F, Depavia GA, ... & Stopforth JD (2006). Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts, and mushrooms. *Journal of food protection*, 69(2), 441-443. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.2.441>
32. Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, ... & Meng J (2002). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Applied and environmental microbiology*, 68(2), 576-581. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.576-581.2002>