



Facultad de Ciencias Veterinarias

Licenciatura en Tecnología de los Alimentos

-UNCPBA-

**Revisión bibliográfica sobre métodos de detección
de *Escherichia coli* verotoxigénico y verotoxinas
en carne bovina**

Radeland, María Belén; Krüger, Alejandra; Lucchesi, Paula M. A.

Mayo, 2017

Tandil

**Revisión bibliográfica sobre métodos de detección de
Escherichia coli verotoxigenico y verotoxinas en carne bovina**

Tesis de Licenciatura en Tecnología de los Alimentos con Mención en Productos de Origen Animal presentada como parte de los requisitos para optar al título de grado de Licenciado de la alumna: Radeland, María Belén.

Director/a: **Dra. Lucchesi, Paula M.A.**

Co- director/a: **Dra. Krüger, Alejandra.**

Evaluador/a: **Dra. Etcheverría, Analía**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a mis tutoras de tesis, Lucchesi Paula y Krüger Alejandra, por su compromiso y ayuda diaria para poder realizar la tesis. Por sus devoluciones y principalmente su paciencia y trabajo tomado en cada una de las correcciones.

A mi familia que fueron un apoyo incondicional durante toda mi carrera y lo siguen siendo en todos los proyectos que emprendo.

Especialmente a mis papás que gracias a ellos tuve la posibilidad de estudiar una carrera universitaria.

A mi hermano Agustín, que a pesar de la distancia siempre me brindo su apoyo incondicional.

A mis queridas amigas que me dio esta etapa maravillosa que es la facultad, Chechu, Lula, Abi, Flor, Euge, Paz y las Lulis, gracias a ellas me llevo los recuerdos más lindos y hoy siguen siendo parte de mi vida.

Mis amigas de la secundaria que recorro con ellas un camino más largo y me siguen acompañando como el primer día.

A todos aquellos que me dieron su apoyo y confiaron en mí, por su cariño y amistad, Gracias!!

RESUMEN

Uno de los patotipos de *Escherichia coli* más importantes asociados a problemas de Salud Pública en Argentina es *E. coli* verotoxigénico (VTEC), el cual es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos. Los alimentos de origen bovino contaminados con VTEC son los principales vehículos de transmisión de la bacteria al hombre, aunque también se han observado casos de infección por contaminación cruzada, contacto directo con animales y su ambiente, o por transmisión de persona a persona. VTEC provoca diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Su dosis infectiva es baja, ya que sólo 1 a 100 bacterias pueden producir enfermedad. Se caracteriza por producir verotoxinas (VT1 y VT2) que son su principal factor de virulencia y se encuentran codificadas en fagos incorporados al genoma de VTEC. Existen distintas estrategias para la detección de VTEC, entre las cuales están los métodos microbiológicos y distintos métodos inmunológicos basados en la detección de verotoxinas. Sin embargo, nuevas estrategias basadas en métodos moleculares que detectan los genes codificantes de VT y de otros factores de virulencia están siendo propuestos para el control de alimentos. Dado el problema para la Salud Pública que representa la contaminación de alimentos con VTEC, el cual es, además, un tema importante a considerar por la industria cárnica, el objetivo de esta tesis fue realizar una revisión bibliográfica sobre métodos de detección de *Escherichia coli* verotoxigenico y verotoxinas en carne bovina.

Palabras claves: *Escherichia coli*, VTEC, verotoxinas, detección.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Enfermedades transmitidas por los alimentos	2
1.2 Estrategias para prevenir una ETA	2
1.3 <i>Escherichia coli</i>	3
1.4 Síndrome Urémico Hemolítico	4
1.5 Reservorios y vías de transmisión de VTEC	5
1.6 Factores de virulencia de VTEC	6
2. Objetivos	7
3. Métodos para detección de VTEC y verotoxinas en carne bovina	7
3.1 Métodos fenotípicos	8
3.1.1 Pruebas bioquímicas	9
3.1.2 Pruebas inmunológicas	10
3.1.2.1 Pruebas de interacción primaria	10
3.1.2.1.1 Métodos inmucromatográficos	10

3.1.2.1.2 Detección de antígenos por ELISA	12
3.1.2.2 Pruebas de interacción secundaria	13
3.1.2.2.1 Pruebas de Aglutinación	13
3.1.2.2.1.1 Kit VTEC-RPLA	14
3.2 Métodos genotípicos	15
3.2.1 Pruebas moleculares	15
3.2.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
3.2.1.2 PCR en tiempo real	16
3.2.1.2.1 Sistemas de detección	17
4. Normativas para la detección de VTEC en alimentos	19
5. Conclusiones	25
6. Bibliografía	26

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos que consumimos generalmente pertenecen al reino animal y vegetal; raramente, por no decir nunca, son estériles, sino que contienen asociaciones microbianas cuya composición depende de qué organismos llegan a él y de cómo se multiplican, sobreviven e interaccionan en el alimento con el transcurso del tiempo.

Cuando hablamos de la inocuidad de los alimentos hacemos referencia a que cuando se consume un alimento no ocasione ningún daño o enfermedad a la persona que lo consume, esta característica junto con las nutricionales y organolépticas componen la calidad total de los alimentos (De la Fuente Salcido y Barboza Corona, 2010).

Los microorganismos que se pueden encontrar en los alimentos de origen animal proceden tanto de la microbiota de la materia prima, principalmente de animales destinados para el consumo humano, como de la que se incorpora durante las operaciones de recolección/sacrificio, tratamiento, almacenamiento y distribución (González Flores y Rojas Herrera, 2005). Los tipos y cantidad de microorganismos además son determinados por las propiedades del alimento, por la atmósfera donde se almacenan y por sus propias características. Los alimentos pueden poseer microorganismos que modifican la microbiota del huésped provocando un efecto benéfico para su salud. Estos se llaman microorganismos probióticos y los principales son los de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Sanz *et al.*, 2003). Por otra parte, en los alimentos pueden estar presentes patógenos contaminantes que podrían desencadenar diversas enfermedades con síntomas leves, como diarrea, o enfermedades severas como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Dichas enfermedades, conocidas como Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) tienen un fuerte impacto a nivel de la salud pública y la industria.

1.1 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS

Las ETA constituyen un importante problema de salud a nivel mundial, se producen por la ingestión de alimentos y/o bebidas contaminados con microorganismos patógenos (bacterias, virus y parásitos) o las sustancias producidas por ellos, que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Sus síntomas más comunes son diarreas y vómitos, pero también se pueden presentar otros como *shock* séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etcétera (González Flores y Rojas Herrera, 2005). Entre los microorganismos patógenos comúnmente reconocidos como causantes de ETA, se pueden encontrar los siguientes: *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ANMAT, 2011).

1.2 ESTRATEGIAS PARA PREVENIR UNA ETA

Para prevenir y controlar las ETAs se necesita hacer un enfoque basado en el análisis y control de riesgos a lo largo de toda la cadena de abastecimiento de alimentos, incluyendo la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) desde el campo hasta llegar al consumidor final (FAO, 1995).

Asimismo, el consumidor final debe ser consciente de cómo manipular un alimento a la hora de su preparado, como por ejemplo:

- Realizar una correcta cocción de la carne molida
- Evitar el contacto de la carne cruda con el resto de los alimentos y no realizar contaminación cruzada
- Lavar bien las verduras y frutas
- Higienizar bien las manos y los utensilios a utilizar
- Consumir lácteos pasteurizados y que no hayan perdido la cadena de frío.

1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Logan, 1994) que forma parte de la microbiota anaeróbica facultativa del tracto intestinal del hombre y de algunos animales. Sin embargo, ciertas cepas de esta especie son capaces de causar enfermedades en el hombre tales como infección urinaria, septicemia, meningitis y diarrea (Kaper *et al.*, 2004). Las cepas de *E. coli* asociadas con infecciones gastrointestinales se clasifican, en al menos, seis patogrupos, los cuales causan enfermedad por diferentes mecanismos y son: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* verotoxigénico (VTEC), del cual *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) es un subgrupo, *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAaggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Bettelheim, 2007).

VTEC también denominado STEC (*E. coli* productora de toxina Shiga) representa un grupo muy importante de patógenos emergentes. Estas cepas se caracterizan por producir verotoxinas, y pueden causar diarrea y severas enfermedades en seres humanos, tales como colitis hemorrágica (CH) y Síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali *et al.*, 1985). Dentro de VTEC existen distintos serogrupos, de los cuales O157, O26, O103, O111, O145 y recientemente O104, son los que han sido reportados con mayor frecuencia a nivel mundial, aunque existen diferencias regionales (EFSA Journal, 2013).

Se ha observado que, mundialmente, las características epidemiológicas de las infecciones por VTEC han cambiado notablemente durante los últimos años, posiblemente debido a cambios en la producción, procesamiento y distribución de alimentos, en los hábitos de consumo, y a la utilización de métodos más sensibles de detección (Gómez *et al.*, 2005). También es importante destacar la aparición de vehículos alimentarios inusuales, como por ejemplo en el brote surgido en el norte de Alemania que luego se extendió a 15 países, en el año 2011. Éste fue generado por el consumo de brotes de fenogreco contaminados con una cepa atípica de VTEC, perteneciente al serogrupo O104:H4, y provocó más de 3500

casos de infección, incluyendo 54 muertes y 845 casos de SUH (Frank *et al.*, 2011).

Tanto en Europa como en Norteamérica los casos confirmados de infección por VTEC no-O157 en la población humana han igualado o superado los causados por VTEC O157 en los últimos años (EFSA, 2007; Bosilevac y Koochmaraie, 2011). Los serogrupos no-O157 asociados a menudo con enfermedad grave en Europa son O26, O103, O145 y O111 (EFSA, 2013). En EEUU sólo cinco serogrupos representan alrededor del 70% de las infecciones por no-O157: O26 (22%), O111 (16%), O103 (12%), O121 (8%), O45 (7%) y O145 (5%) (Gill y Gill, 2010). Debido a que estos serogrupos representan un riesgo biológico potencialmente alto en relación a diarreas, CH y SUH, la Unión Europea, mediante la Norma ISO 13136 del año 2012, propuso una mejora en la detección de VTEC en alimentos al incluir la identificación de varios serogrupos además de O157 (EFSA, 2013). Por las mismas razones, el USDA-FSIS (United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service) propuso, en el mismo año, comenzar a detectar los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121, y O145 denominados como “the big six”, en productos cárnicos derivados de la faena de ganado bovino (USDA-FSIS, 2012).

1.4 SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)

El SUH es una enfermedad de comienzo agudo que involucra la presencia de anemia hemolítica microangiopática (hemólisis intravascular causada por la fragmentación de glóbulos rojos al pasar por pequeños vasos cuyo endotelio se encuentra alterado), trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas) y daño renal (Voyer, 1996). Afecta principalmente a lactantes y niños en la primera infancia.

En general, la enfermedad presenta un período de incubación de 3-4 días, seguido de diarrea con dolor abdominal y en algunos casos fiebre. A medida que van avanzando los días los dolores abdominales aumentan y la diarrea se torna sanguinolenta. Luego de 7 días la enfermedad suele resolverse sin presentar secuelas aparentes, sin embargo, en aproximadamente un 10-15% de pacientes

menores de 10 años la enfermedad progresa a SUH (Nataro y Kaper, 1998; Besser *et al.*, 1999; Karch *et al.*, 2005).

La mitad de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% necesita transfusiones de eritrocitos y/o plaquetas. Desafortunadamente, alrededor del 1% de los casos de SUH puede derivar en la muerte del paciente debido a que otros órganos como sistema nervioso, pulmones, páncreas y corazón han sido afectados (Doyle *et al.*, 2001).

En Argentina, en el periodo 2006-2016 la tasa de notificación de SUH fue de 1 caso cada 100.000 habitantes/año y la mediana de casos anuales notificados de 428. En este período, el año con mayor cantidad de casos notificados fue el 2008 con 543. Con respecto al transcurso del año 2017, hasta la SE02 (Semana epidemiológica) se notificaron al SNVS (Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud) 19 casos de SUH (Boletín integrado de vigilancia) <http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/Boletin-Integrado-De-Vigilancia-N322-SE32.pdf>)

1.5 RESERVORIOS Y VÍAS DE TRANSMISIÓN DE VTEC

Luego de varios estudios realizados por distintos países del mundo, se confirmó que el ganado bovino es el principal reservorio de VTEC, aunque también las ovejas y cabras son descritas como importantes reservorios.

Las cepas de VTEC se encuentran en la flora intestinal comportándose como comensales, y son excretadas con las heces (Todd *et al.*, 2001). Se transmiten al hombre a través de los alimentos contaminados, el agua contaminada, de animal a persona o directamente de persona a persona (Armstrong *et al.*, 1996).

En particular, la contaminación puede darse durante la faena, especialmente durante el desollado y la evisceración, contaminando la superficie de las canales y de las vísceras (Blanco *et al.*, 1996; Signorini *et al.*, 2009).

Generalmente las hamburguesas y la carne picada son los alimentos más peligrosos al momento de consumirlos, esto se debe a que la contaminación no sólo se encuentra en la superficie de la carne sino en toda la masa, por eso es

importante que la cocción llegue a la temperatura adecuada, de lo contrario el patógeno permanecerá vivo en el alimento causando daño al consumidor final (Blanco *et al.*, 1996; Signorini *et al.*, 2009).

Es importante destacar que la dosis infectiva capaz de ocasionar enfermedad por parte de este grupo bacteriano es muy baja: de 10 a 100 CFU bacterias (Paton y Paton., 1998).

En nuestro país se realizaron diferentes estudios y entre ellos se pueden mencionar los realizados en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología de esta Facultad, que detectaron VTEC en el 29% de muestras de hamburguesas y en el 25% de muestras de carne picada de distintas localidades (Parma *et al.*, 2000). Por otro lado en la ciudad de Tandil, analizaron muestras tanto de hamburguesa como de carne picada y detectaron VTEC en un 43% de ellas (Sanz *et al.*, 2007).

1.6 FACTORES DE VIRULENCIA DE VTEC

Entre las características que determinan la virulencia de VTEC se destaca la producción de verotoxinas (O'Brien *et al.*, 1982; Nataro y Kaper, 1998).

Las verotoxinas (VT) se denominan así porque tienen un efecto citotóxico sobre las células Vero. Se dividen en dos grupos principales: VT1 y VT2, y los genes que las codifican se encuentran localizados en el genoma de bacteriófagos temperados que se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano (Scotland *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984).

Otro factor que suele estar presente es la intimina, es una proteína codificada por el gen *eae* del cromosoma bacteriano, responsable de la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de la célula intestinal (lesión de "adherencia y borrado" de las microvellosidades). En cepas VTEC y EPEC de diferentes serotipos se han descrito más de 20 variantes del gen *eae* (Nataro y Kaper, 1998).

Además, se han identificado otros genes codificados en megaplásmidos que podrían contribuir a la virulencia de las diferentes cepas: una enterohemolisina codificada por el gen *ehxA* capaz de producir la lisis de los glóbulos rojos (Schmidt *et al.*, 1994); una adhesina aglutinante denominada Saa que estaría involucrada

en la colonización de la mucosa intestinal (Paton *et al.*, 2001) y la citotoxina subtilasa (Paton *et al.*, 2001), entre otros factores de virulencia.

2. OBJETIVO

La carne es uno de los alimentos base en la dieta de los seres humanos debido al gran aporte de nutrientes y es consumida de manera diaria no sólo en la Argentina sino también en muchos países del mundo. Lamentablemente, los productos cárnicos son uno de los principales vehículos involucrados en la transmisión de VTEC a los seres humanos y provocan distintos tipos de enfermedades, desde la más leve como diarrea hasta la más severa como es el SUH, que en nuestro país alcanza la mayor incidencia a nivel mundial. Por lo mencionado, la contaminación de alimentos con VTEC genera un gran impacto en la salud pública.

Argentina es uno de los productores de alimentos cárnicos más grandes a nivel mundial y esa característica nos mantiene en una posición muy importante dentro del comercio internacional. La presencia de VTEC en estos alimentos tiene por lo tanto también un gran impacto en el sector socioeconómico, afectando nuestras exportaciones.

Debido a las características de las enfermedades causadas por VTEC, su epidemiología y el efecto que provoca en la sociedad, el objetivo de esta revisión es el estudio de distintos métodos de detección de VTEC y verotoxinas en carne bovina.

3. MÉTODOS PARA DETECCIÓN DE VTEC Y VEROTOXINAS EN CARNE BOVINA

Los métodos de detección microbianos pueden clasificarse de manera general en dos grupos: fenotípicos y genotípicos.

Los métodos fenotípicos son aquellos que se basan en la determinación de características bioquímicas y fisiológicas, dentro de estas características se encuentran la determinación de actividades enzimáticas, capacidades

metabólicas, etc. Por ejemplo, *E. coli* O157:H7 tiene la incapacidad de fermentar el sorbitol, esto permitió que se desarrollaran estrategias de diagnóstico utilizando medios de cultivo específicos para la identificación de este serotipo. Es importante destacar que el poder discriminatorio de los métodos fenotípicos puede verse afectado por cambios en la expresión genética debido, por ejemplo, a la influencia del ambiente.

Por otra parte, los métodos genotípicos se basan en la detección del material genético del organismo, es decir, no es afectado por influencias ambientales. En estos casos, para obtener una primera información, no es necesario realizar un aislamiento ni tampoco cultivar los microorganismos. Por lo tanto se obtienen los resultados en tiempos más cortos, con mayor poder de resolución, sensibilidad y especificidad (Vilchez y Alonso, 2009).

3.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS

Dentro de los métodos fenotípicos existen distintas estrategias para la detección de VTEC. Entre ellos podemos encontrar los métodos microbiológicos y diferentes métodos inmunológicos.

Las primeras pruebas presuntivas para la detección de VTEC son las llamadas bioquímicas, como por ejemplo, la incapacidad de muchas cepas para fermentar el sorbitol. Otro de los métodos utilizados son los serológicos o llamados también inmunológicos, los cuales se basan en la determinación de ciertos serogrupos asociados a cepas patógenas o en la detección de verotoxinas (Nataro y Kaper., 1998).

3.1.1 Pruebas bioquímicas

Consisten en el uso de cultivos selectivos o cromogénicos que permiten el crecimiento y/o identificación de cepas con determinadas características.

Si bien no hay características bioquímicas que diferencien a la mayoría de las VTEC de otras *E. coli*, las cepas de *E. coli* O157:H7 son incapaces de fermentar D-sorbitol rápidamente y carecen de actividad beta-glucuronidasa. Estas características se suelen utilizar en el aislamiento e identificación de estos organismos (Karch y Bielaszewska, 2001).

Existen medios cromogénicos comercialmente disponibles recomendados para facilitar la detección de VTEC O157, ellos son: CHROMAgar O157 (CHROM) y Agar O157:H7 ID (BioMérieux) (fig.1)

(<http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?id=67>).

La característica diferencial de los medios cromogénicos se basa en la detección de la actividad de enzimas específicas, utilizando diferentes cromógenos. Las colonias presentarán colores específicos (según el cromógeno utilizado por el fabricante) que van a permitir la identificación de *E. coli* O157:H7/NM (Manual de Procedimientos “Detección de STEC O157 en alimentos”).

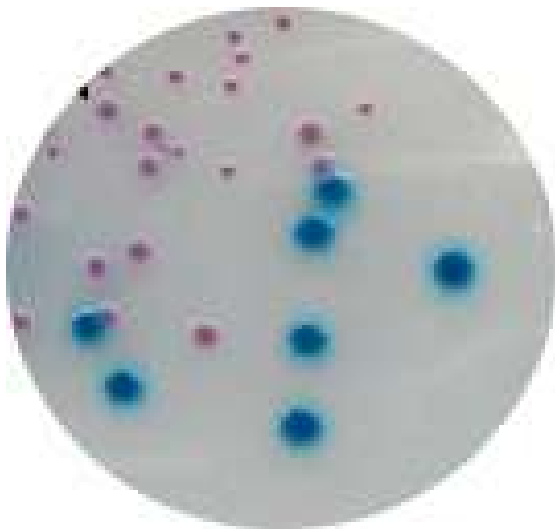


Figura 1. Medio cromogénico comercial CHROMAgar O157, colonias de color malva correspondientes a *E. coli* O157, y las de color azul a *E. coli* no – O157

3.1.2 Pruebas inmunológicas

Los inmunoensayos son técnicas que utilizan la reacción de antígeno - anticuerpo (Ag-Ac) para poder identificar diversas sustancias. Dentro de los inmunoensayos utilizados para la detección de microorganismos se encuentran los métodos de interacción primaria, como por ejemplo los enzimoimmunoensayos (ELISA) y los métodos de interacción secundaria como son los de precipitación y aglutinación (Schmidt K *et al.*, 2000).

Como en las pruebas de interacción primaria no se puede observar a simple vista la interacción Ag-Ac, lo que se hace es marcar el Ac o el Ag mediante la unión covalente (conjugación) con determinadas moléculas que sean detectables (fluorocromos, isótopos radiactivos, enzimas o nanopartículas coloreadas, como el oro coloidal). Dependiendo del marcador que se use, la técnica inmunológica recibe un determinado nombre y utiliza un sistema de detección diferente. Por ejemplo, en el ELISA se utiliza como marcador una enzima y un espectrofotómetro (lector de ELISA) para efectuar la lectura de las microplacas (Ashihara *et al.*, 2006).

En general las técnicas de interacción primaria son muy sensibles, es decir pueden detectar bajas concentraciones de antígenos o anticuerpos (Wild, 2008).

3.1.2.1 Interacción primaria

3.1.2.1.1 Métodos inmunocromatográficos

Utilizan anticuerpos marcados con metales pesados los cuales pueden ser oro coloidal (tonalidad rosa) o selenio (tonalidad azul). Todos los reactivos están presentes en el soporte, de modo que sólo se agrega la muestra a analizar. La muestra con el antígeno a detectar fluye por capilaridad sobre una tira porosa, generalmente de nitrocelulosa, y reacciona con un anticuerpo conjugado con el metal pesado formando un inmunocomplejo que fluye a través de la membrana. El

inmunocomplejo es capturado por un anticuerpo específico. Al depositarse produce la aparición en la zona de captura de una línea de color rosa o azul, según el metal que se haya utilizado como marcador (Garrido Jimenez y Serrano de Burgos, 2006). El exceso de anticuerpo marcado es retenido en la zona de control produciéndose la línea correspondiente.

Como ejemplo de métodos inmunocromatográficos para la detección de VTEC se describe brevemente el Duopath® Verotoxins. Con este método se detectan por separado VT1 y VT2 con Ac específicos que están asociados a la membrana en dos zonas de captura. Como conjugado se utilizan anticuerpos marcados con oro coloidal, que en caso de estar presentes VT1 y/o VT2, quedan unidos en las zonas de detección de VT1 y/o VT2 según corresponda (Fig. 2) (Merck Microbiology Manual).

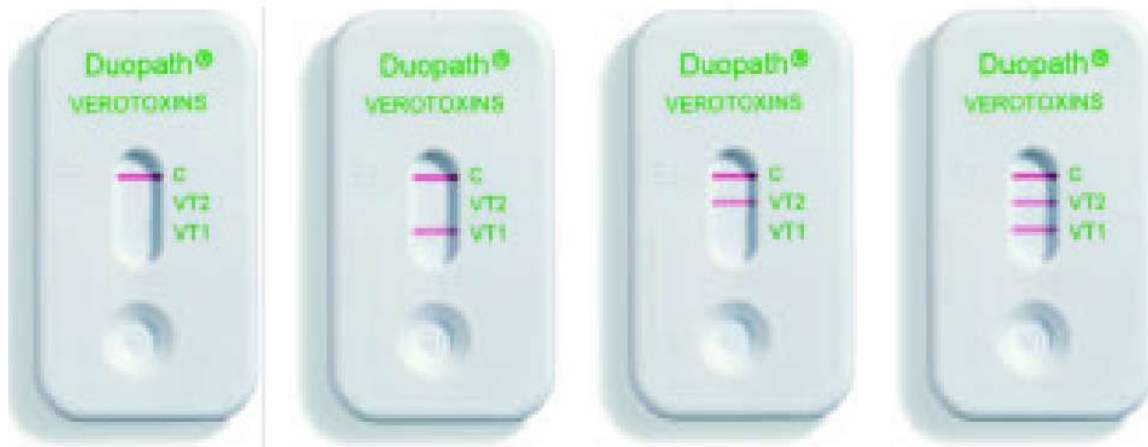


Figura 2. Imagen de distintos resultados obtenidos con el test inmunocromatográfico Duopath® Verotoxins (extraída de: http://www.mibius.de/out/oxbaseshop/html/0/images/wysiwigpro/Duopath_Verotoxins_104144_engl.pdf).

3.1.2.1.2 Determinación de antígenos por ELISA

Una de las modalidades más utilizada del método ELISA para la determinación de antígenos es el ELISA "sandwich". Esta prueba se realiza utilizando microplacas con pocillo de fondo plano. El Ac específico para el Ag de interés se encuentra adsorbido en el pocillo sobre el cual se añade la muestra biológica. Si en la muestra se encuentra el Ag de interés, este quedará capturado en el pocillo y será detectado después de agregarle otro Ac específico conjugado con una enzima. Por último, se añade un sustrato y un cromógeno, que por acción de la enzima, dará un producto coloreado observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro (Fig. 3) (Gosling, 2000).

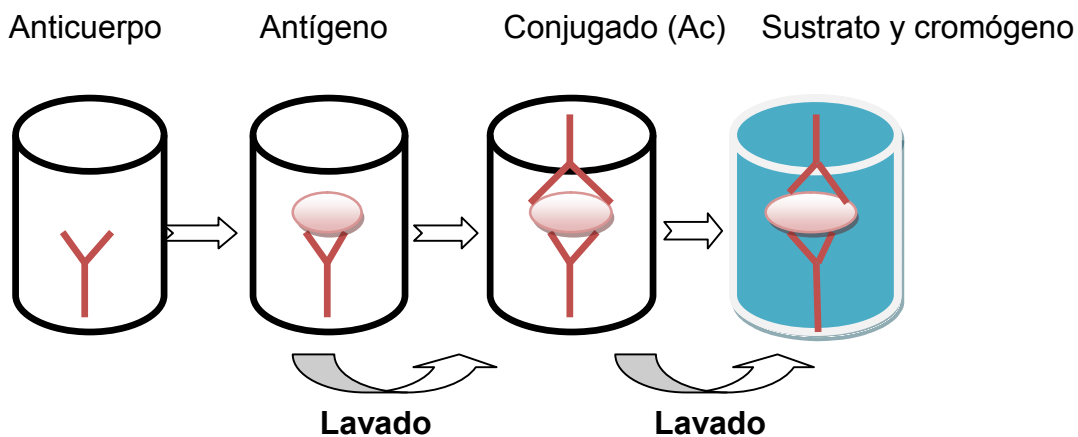


Figura 3. Método de ELISA "sándwich". Esquema simplificado mostrando pasos y reactivos.

Aunque en general los métodos de ELISA han sido desarrollados para la detección de VT en muestras de pacientes, varios han sido evaluados para la detección de VT a partir de muestras de alimentos (Willford, 2009). Ellos son:

- Premier EHEC
- Biopharm Ridascreen Verotoxin Enzyme Immunoassay
- ProSpect Shiga Toxin *E coli* Microplate Assay

Estos tres métodos tienen la capacidad de detectar la presencia, tanto de VT1 como VT2, pero ninguno de ellos es capaz de diferenciarlas.

Tanto en el método Premier EHEC como en el ProSpect Shiga Toxin *E. coli* Microplate Assay los resultados se pueden observar a simple vista o realizar la lectura con un espectrofotómetro (<http://www.meridianbioscience.com/Content/Assets/PackInsert/8.5x11%20CLEAN%20NEW%20SN11151%20Premier%20EHEC%20PI%20REV%2001-15.pdf>); (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/X7834.pdf>). En el caso de Biopharm Ridascreen Verotoxin Enzyme Immunoassay, para la lectura de los resultados se recomienda el uso de un espectrofotómetro (http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/3866/C2201-RIDASCREEN-Verotoxin_2016-06-22_ES.pdf).

3.1.2.2 Interacción secundaria

3.1.2.2.1 Pruebas de Aglutinación

Las reacciones de aglutinación involucran una interacción entre el Ag y el Ac que llevará a la aparición de un agregado que se observa como grumo o aglutinado. Esto se debe a la característica física del antígeno particulado y a la formación de una red (red de Marrack) al unirse con el anticuerpo. El método consiste en hacer reaccionar cantidades equivalentes de Ag y Ac. Con un Ag soluble se puede transformar una reacción de precipitación en una de aglutinación si se utilizan partículas como el látex recubiertas con el Ag, generando un "Ag particulado" útil para fines de identificación. Otra opción, cuando la prueba está orientada a la detección de Ag, es la unión de los Ac a las partículas. Estas reacciones de aglutinación se denominan indirectas o pasivas (Garrido Jiménez y Serrano de Burgos, 2006).

Las reacciones de aglutinación desde el punto de vista de su utilidad en el laboratorio tienen la ventaja de ser muy sencillas de realizar y no requieren de ningún equipamiento para su lectura.

En cuanto a la detección de VTEC, existen productos comerciales basados en la técnica de aglutinación dirigidos en la detección específica del serogrupo O157,

así como otros que detectan las verotoxinas. A continuación se describe como ejemplo de este último grupo de prueba al Kit Oxoid VTEC-RPLA.

3.1.2.2.1.1 Kit VTEC-RPLA PARA DETECCIÓN DE TOXINAS

En esta prueba se utilizan partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos para VT1 (uno de los reactivos) y para VT2 (otro de los reactivos). La reacción se realiza en microplacas con pocillos de fondo en V. Las partículas aglutinarán en el caso que en la muestra en estudio se encuentre una o ambas toxinas. En el caso de que no estén presentes las verotoxinas o su concentración sea muy baja, las partículas sedimentaran en el fondo del pocillo formando una especie de “botón compacto” (Fig.4) (http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/TD0960%20KIT%20VTEC-RPLA_es.pdf).

Es una técnica de fácil interpretación y es capaz de diferenciar VT1 de VT2. (Manual de Procedimientos “Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos”).

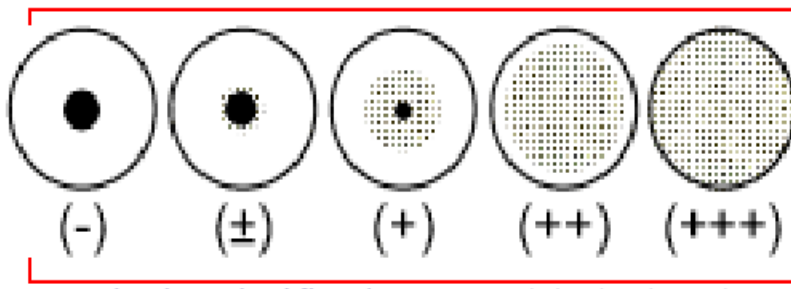


Figura.4 Esquema de resultados obtenidos con el Kit VTEC-RPLA PARA DETECCIÓN DE TOXINAS (http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/TD0960%20KIT%20VTEC-RPLA_es.pdf). Los dos primeros representan resultados negativos y los tres últimos, resultados positivos.

3.2 METODOS GENOTIPICOS

3.2.1 Pruebas moleculares

Son técnicas desarrolladas específicamente para el estudio de ácidos nucleicos (www.genmolecular.com). Estas técnicas se aplican para diversos fines, entre ellos, la identificación del ADN bacteriano involucrado en la contaminación de productos alimenticios. En la industria alimentaria, las pruebas conocidas como PCR y PCR en tiempo real son ampliamente utilizadas para detectar tanto VTEC O157 como VTEC no- O157.

3.2.1.1 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR, conocida así por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), produce múltiples copias de segmentos específicos de ADN *in vitro* (Manual de Procedimientos “Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos). Para poder llevarla a cabo es necesario realizar una mezcla de reacción, llamada también *master mix*, que contiene un par de *primers* (oligonucleótidos) que sirven como iniciadores, una enzima ADN polimerasa termoestable (*Taq*), nucleótidos (dNTPs), Mg^{+2} , buffer de PCR y agua tridestilada (www.genome.gov/27562618/reaccin-en-cadena-de-la-polimerasa-rcp).

Una vez realizada la mezcla de reacción, y agregada la muestra a evaluar, se realizan los distintos ciclos de termociclado. Cada ciclo se lleva a cabo en tres pasos. Primero comienza con una **desnaturalización**, que permite la separación de las cadenas de ADN. Para poder llevar a cabo este paso es necesaria una temperatura de 90-95 °C durante unos minutos (Tamay de Dios L., *et al* 2013). Como segundo paso comienza la fase de **hibridación o annealing** a una temperatura menor a la anterior, a unos 40-60 °C aproximadamente, permitiendo que cada *primer* se una a su región específica dentro de la cadena. Como último paso se realiza la **extensión** de la cadena de ADN. La ADN polimerasa incorpora nucleótidos complementarios en el extremo 3' OH del *primer* utilizando de molde la

cadena de ADN previamente desnaturalizada. Este paso se realiza a 72 °C porque la *taq* polimerasa tiene mayor actividad a esa temperatura. Los ciclos se repiten amplificando ADN de manera exponencial (Fig.5) (www.genome.gov/27562618/reaccin-en-cadena-de-la-polimerasa-rcp).

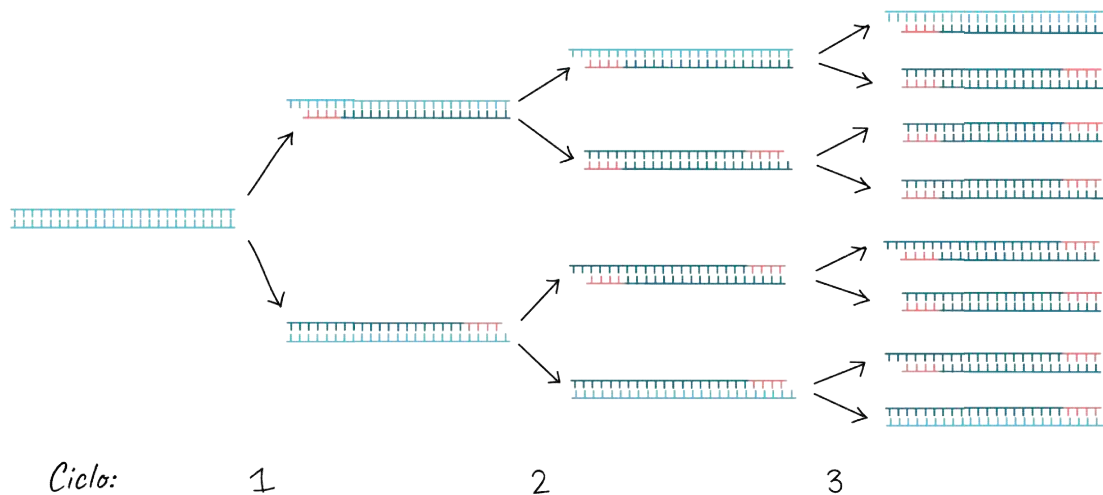


Figura. 5: Esquema de los ciclos de una PCR, obtenido de <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>

3.2.1.2 PCR en tiempo real

En la PCR a tiempo real se realiza la amplificación y la detección de ADN específico de manera simultánea, evitando el uso de geles para la detección de los productos y permitiendo la cuantificación. Se utilizan termocicladores que incorporan un lector de fluorescencia, es decir que durante la amplificación se puede cuantificar el ADN sintetizado debido a que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN formado (Tamay de Dios L., *et al* 2013).

Ventajas de la PCR a tiempo real

- Es una técnica rápida y eficaz
- Utiliza sistemas cerrados evitando la contaminación
- Permite llevar a cabo en el mismo instrumento ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc
- Alta especificidad y sensibilidad

3.2.1.2.1 Sistemas de detección

La PCR en tiempo real se basa en detección de fluorescencia utilizando agentes intercalantes o sondas específicas. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a la doble hélice de ADN. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I (Higuchi *et al.*, 1993). Las sondas de hibridación específica están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas molecular Beacons y las sondas FRET (Higuchi *et al.*, 1993).

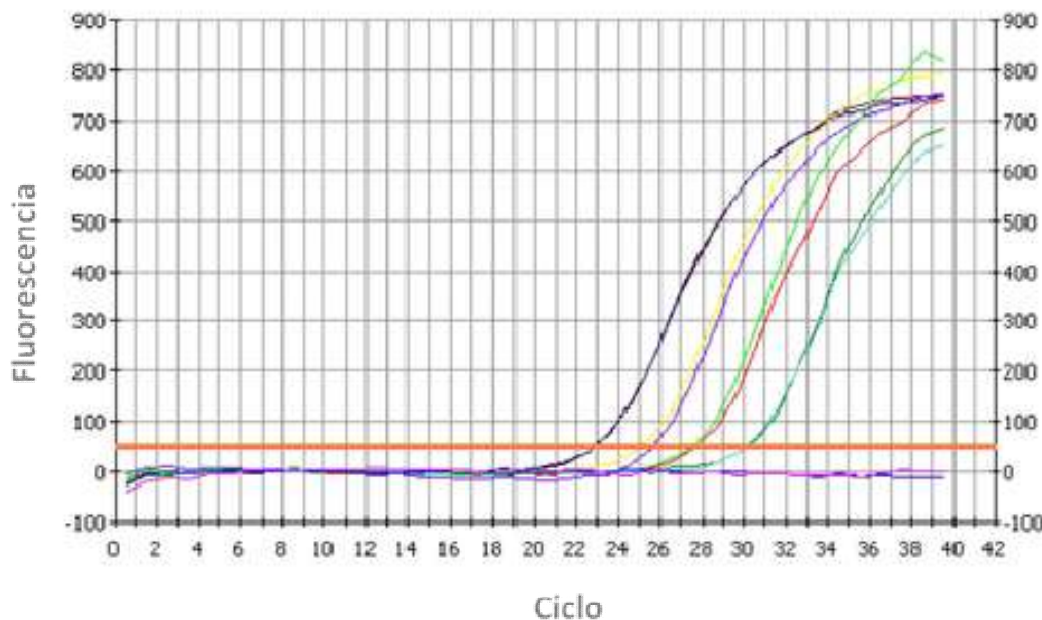


Figura. 6 Ejemplo de amplificación de PCR en tiempo real

Basados la tecnología de PCR, se han desarrollado numerosos kits para la detección de genes de virulencia de VTEC como también de algunos serogrupos en muestras de alimentos. Algunos ejemplos de kits comerciales son:

Foodproof® STEC ScreeningLyokit: permite la detección de los genes *vtx1*, *vtx2* (incluyendo *vtx2f*) y *eae* en una única reacción de PCR múltiple en tiempo real. Y **foodproof® STEC IdentificationLyokit:** detecta e identifica 8 serogrupos O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 y O157 en una única reacción de PCR en tiempo real.

IQ – Check TM STEC Kits: incluye dos kits, basados en PCR en tiempo real, destinados a la detección de genes de virulencia VTEC (*vtx1*, *vtx2* y *eae*) y 7 serogrupos principales de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157:H7), respectivamente, en productos cárnicos y lácteos.

BAX® System Real-Time PCR STEC Suite: sistema, basado en reacciones de PCR en tiempo real, diseñado para la detección de los *top six* VTEC en productos cárnicos. Incluye un *screening* para la detección de los genes *vtx* y *eae*, y dos paneles que identifican los serogrupos O26, O111, O121 (panel 1) y O45, O103, O145 (panel 2).

GeneDisc® Technologies – STEC: presenta distintos productos que, a través de la tecnología de PCR en tiempo real, permite la detección de cepas VTEC en numerosos tipos de alimentos, especialmente cárnicos y lácteos: GeneDisc Shiga Toxic *E. coli*, GeneDisc EHEC 5 ID (H7, O26, O103, O111, O145), GeneDisc STEC Top 7 (genes de virulencia O157, O26, O103, O111, O145, O45, O121 serogrupos), GeneDisc STEC Plus (genes de virulencia).

4. NORMATIVAS PARA LA DETECCIÓN DE VTEC EN ALIMENTOS

Durante varios años se establecieron normas y se desarrollaron tecnologías para la detección de O157 en alimentos.

Como hemos mencionado anteriormente, y a partir de la gran importancia de las infecciones provocadas por serogrupos de *E. coli* no-O157, la Unión Europea decidió mediante la Norma ISO 13136 del año 2012 incluir otros serogrupos (no-O157) en la detección de VTEC. En particular, la norma contempla la identificación de VTEC correspondiente a los serogrupos: O26, O103, O111 y O145.

Tanto la detección de los genes codificantes de verotoxinas: *vtx1* y *vtx2*, como los genes asociados a los serogrupos anteriormente mencionados y el gen que codifica la intimina (*eae*), se realizan a través de la PCR en tiempo real (Agencia Española de seguridad alimentaria y nutrición, 2013).

La norma se aplica para:

1. Productos destinados al consumo humano y alimentación animal.
2. Muestras ambientales en el área de producción y manipulación alimentaria.
3. Muestras ambientales en el área de producción animal.

Para poder llevar a cabo el siguiente análisis es importante realizar una serie de pasos indispensables:

1. Enriquecimiento de la muestra.
2. Fase de Extracción del ADN.
- 3 y 4. Detección de los genes mediante tiempo real.

La figura 7 muestra el flujograma para la detección de VTEC por la norma ISO 13136.

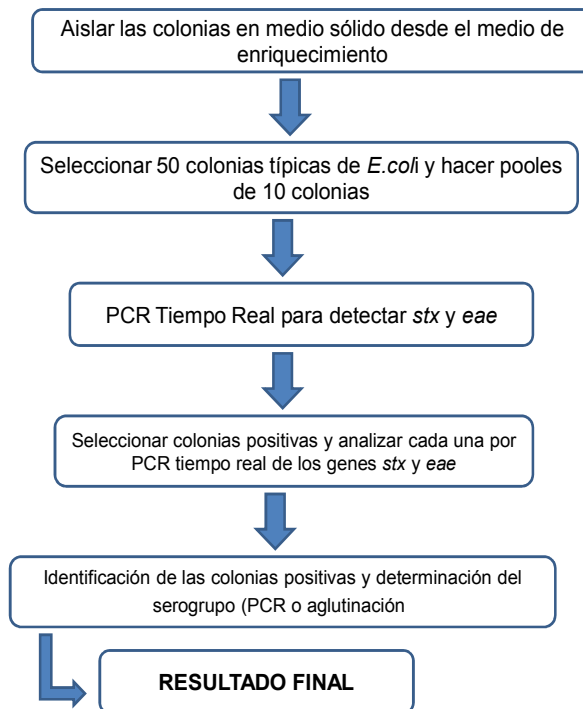
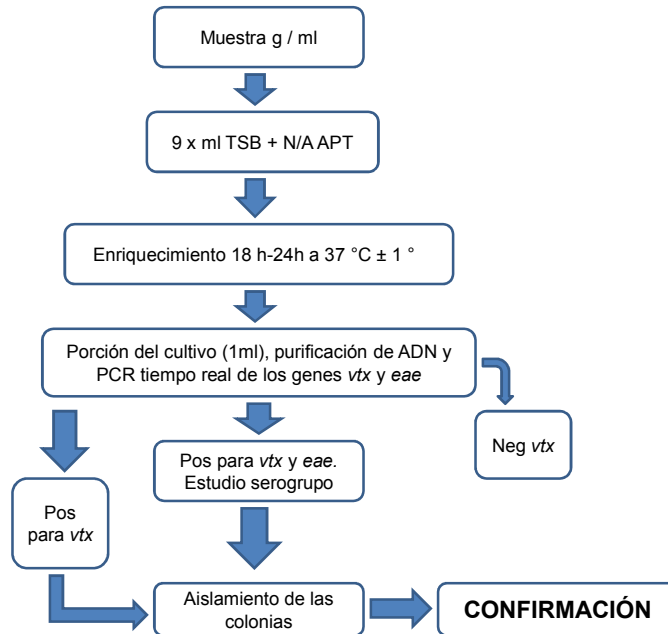


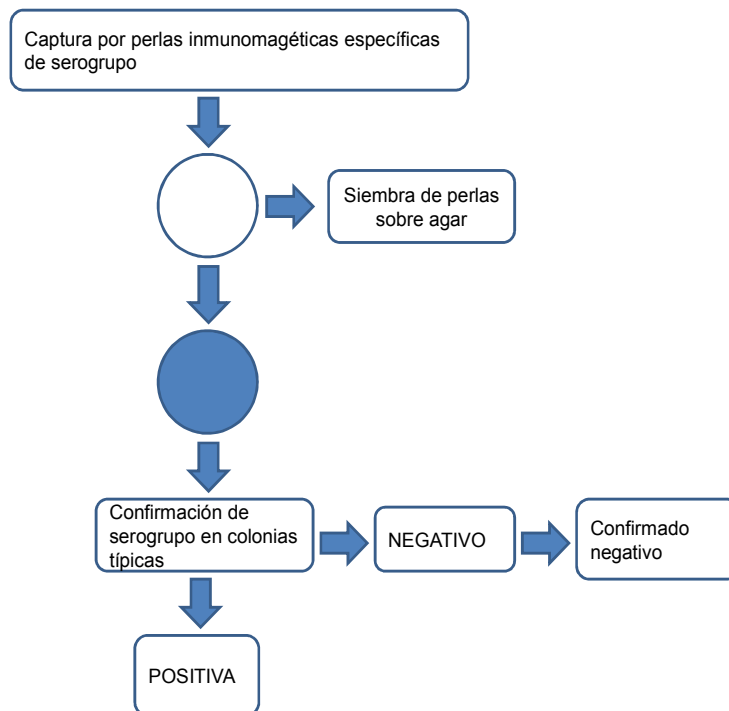
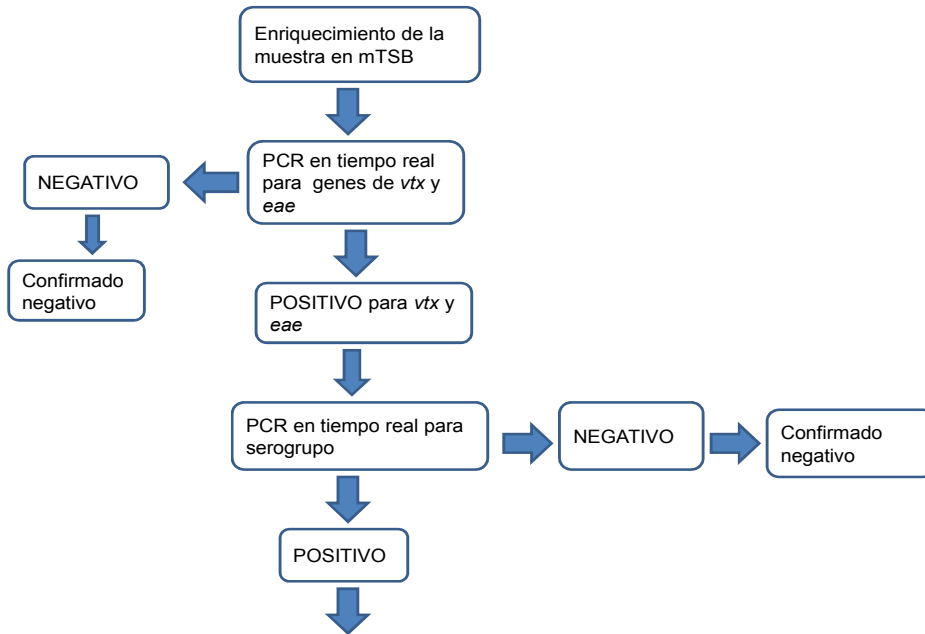
Figura. 7 Flujoograma para la detección de VTEC por la norma ISO 1313

Los posibles resultados son:

- Muestra negativa: no se han detectado genes de *vtx*
- Muestra positiva: para *vtx*; *vtx* y *eae*, *vtx*, *eae* y algún serogrupo de los analizados. En estos casos en los que se detecta el/los genes sin lograr el aislamiento de la bacteria se considera detección presuntiva.
- *E. coli* aislada positiva: para *vtx*; *vtx* y *eae*, *vtx*, *eae* y algún serogrupo de los analizados. En este caso queda confirmada la presencia de VTEC en la muestra (Agencia Española de seguridad alimentaria y nutrición, 2013).

Por las mismas razones mencionadas anteriormente Estados Unidos también al igual que la Unión Europea decide incorporar la identificación de los serogrupos O111, O26, O45 ,O103, O121, O145 y en productos cárnicos (USDA-FSIS, 2012).

A continuación en la figura. 8 se describe la detección y aislamiento de no- O157 productora de VTEC de los productos cárnicos, de la canal y de esponjas ambientales, procedimiento específico de FSIS (Food safety and Inspection Service) laboratorio de análisis de *E coli* no-O157 (USDA, 2014).



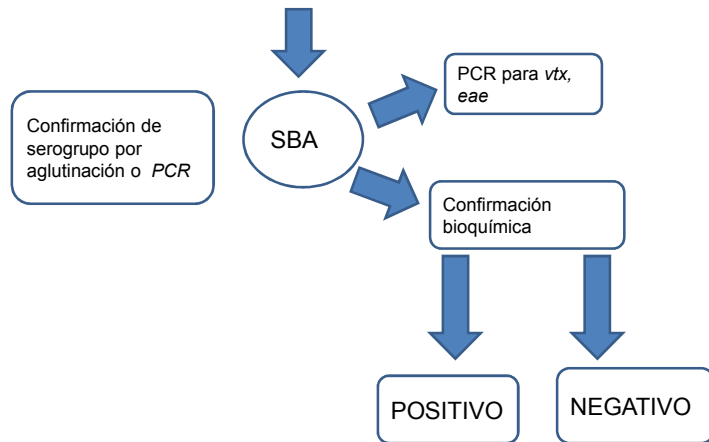


Figura. 8 Flujograma para la detección de VTEC no O-157 por el laboratorio FSIS (MLG 5B Appendix 4.03)

Interpretación de los resultados:

- **Potencial:** muestra con reacción positiva con ambas pruebas
Nivel 1 negativo para los genes *vtx* y *eae*
Nivel 2 (concurrente al nivel 1) para uno más de los genes del serogrupo objetivo.
- **Presuntivo:** muestra que tiene colonias típicas, observado en agar arco iris, y reacciona específicamente con uno o más de los antisueros del serogrupo objetivo.
- **Confirmado:** muestra aislada que tiene *vtx*, *eae* y uno de los sergrupos diana, y que se ha confirmado bioquímicamente que es *E. coli*.

Recientemente, y en relación con las normas actuales de la Unión Europea y de Estados Unidos, Argentina actualizó su normativa nacional respecto a la detección de VTEC no-O157 en alimentos. A través de las Resolución Conjunta N° 4 - E/2017, de la Secretaría de Agregado de Valor y de la Secretaría de Políticas

Regulación e Institutos del Ministerio de Salud de la Nación, fue actualizado el C.A.A. incorporando nuevos criterios microbiológicos para serotipos de VTEC no O157 a los artículos 156 tris, 255, 302 y 925 quáter, respectivamente. De esta forma, se incluye en la nueva normativa de CAA la detección de STEC (positivo para *vtx* y *eae*) los serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103 en carne picada fresca, chacinados embutidos frescos y secos, y chacinados no embutidos frescos y cocidos (http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI_2017.pdf).

5. CONCLUSIÓN

A partir del siguiente trabajo podemos concluir que:

Los métodos rápidos y automatizados en microbiología de los alimentos representan un área en constante crecimiento. Por este motivo, están siendo propuestas nuevas estrategias para el control de alimentos basadas en métodos moleculares como PCR que detectan los genes que codifican verotoxinas y otros factores de virulencia típicos de VTEC que le dan el carácter de patogenicidad a la bacteria. En los últimos años, se han registrado, con una frecuencia creciente, casos de infecciones causadas por serogrupos VTEC no-O157. Esta situación generó un gran alerta a la sociedad y las normativas en diferentes países se han ido modificando para incluir estos serogrupos.

Los avances que se desarrollan en las técnicas de detección ofrecen numerosas ventajas. Sin embargo, no todos los países pueden implementar este tipo de técnicas de detección, ya sea por limitaciones económicas, por la falta de equipamiento específico y personal altamente capacitado. Por lo tanto, considero que la legislación debería contemplar las condiciones de cada país, de modo de favorecer su implementación y cumplimiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Administración nacional de medicamentos, alimentos y tecnología médica (ANMAT).
http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf (02/2017)
- ✓ Agencia Española de seguridad alimentaria y nutrición, 2013
- ✓ Armstrong, G. L.; Hollingsworth, J.; Morris, J. G. (1996). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiologic Reviews* **18**, 29-51.
- ✓ Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura RM. Immunoassay and immunochemistry. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p. 128-212.
- ✓ Besser, R. E.; Griffin, P. M.; Slutsker, L. (1999). *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. *Annual Review of Medicine*. **50**, 355-367.
- ✓ Bettelheim, K. A. (2007). The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* **33**, 67-87.
- ✓ Blanco, J. E.; Blanco, M.; Blanco, J. (1996). *Escherichia coli* toxigénicos en alimentos y muestras clínicas de origen humano y animal. *Medicina Veterinaria* **13**, 207-221.
- ✓ Blanco, M.; Padola, N. L.; Krüger, A.; Sanz, M. E.; Blanco, J. E.; González, E. A.; Dahbi, G.; Mora, A.; Bernárdez, M. I.; Etcheverría, A. I.; Arroyo, G. H.; Lucchesi, P. M. A.; Parma, A. E.; Blanco, J. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology*. **7**, 269-276
- ✓ Brenner, D. J. (1984). Facultatively anaerobic Gram-negative rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore and London, pp. 408-516.
- ✓ Boletín integrado de vigilancia-Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en el URL: <http://www.msal.gob.ar> 02/2017

- ✓ Bosilevac, J. M.; Koochmaraie, M. (2011). Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from commercial ground beef in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*.**77**, 2103–2112.
- ✓ Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real Servicio de Microbiología. Hospital Clínic i Provincial. Barcelona. España in Elsevier, 2004.
- ✓ David Wild. *The Immunoassay Handbook*. Pittsburgh in Elsevier, 2008.
- ✓ De la Fuente Salcido, N. M.; Barboza Corona, J. E. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, dirección de apoyo a la investigación y al postgrado **20**, 43-46.
- ✓ Doyle, M. P.; Beuchat L. R.; Montville, T. J. (ed). 2001. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd edition. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 872 pp.
- ✓ EFSA (2007).Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards on a request on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human VTEC types. *EFSA Journal*.**579**, 1–61.
- ✓ EFSA (2013a).Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment.EFSA Journal. **11** (4), 3138.
- ✓ Frank, C.; Werber, D.; Cramer, J. P.; Askar, M.; Faber, M.; an der Heiden, M.; Bernard, H.; Fruth, A.; Prager, R.; Spode, A.; Wadl, M.; Zoufaly, A.; Jordan, S.; Kemper, M. J.; Follin, P.; Müller, L.; King, L. A.; Rosner, B.; Buchholz, U.; Stark, K.; Krause, G.; the HUS Investigation Team (2011)Epidemic Profile of Shiga-Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *New England Journal of Medicine*. **365**, 1771–1780.
- ✓ Food and Agriculture Organization (1995). *Alimentación, Nutrición y Agricultura - Inocuidad y comercio de los alimentos*. Disponible en el URL: <http://www.fao.org/docrep/V9723T/V9723T00.htm> (09/2016).
- ✓ Garrido Jiménez, M. R. F; Serrano de Burgos, E. (2006). Valoración de la respuesta inmune de base humoral, pp 309-353. In: E. Gómez- Lucia; M. M

- Blanco; A. Doménech (eds.) Manual de Inmunología Veterinaria en Pearson Educación, S.A., Madrid.
- ✓ Gill, A.; Gill, C. O. (2010). Non-O157 verotoxigenic *Escherichia coli* and beef: A Canadian perspective. The Canadian Journal of Veterinary Research. **74** (3), 161–169.
 - ✓ Gómez, D.; Miliwebsky, E.; Silva, A.; Deza, N.; Zotta, C.; O. Cotella, O; Martínez Espinosa, E.; Chinen, I.; Fernández Pascua, C.; Rivas, M. (2005). Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un jardín maternal de la ciudad de Mar del Plata. Revista Argentina de Microbiología. **37**, 176-181.
 - ✓ González Flores, T.; Rojas Herrera, R. A. (2005). Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. salud pública de México / vol. 47 no.5: 388-390
 - ✓ Gosling JP. Immunoassays: A Practical Approach. Oxford: Oxford University Press; (2000).
 - ✓ Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology 11:1026-30
 - ✓ Nataro, J. P.; Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. **11**, 142-201
 - ✓ Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature reviews. Microbiology **2**, 123-140.
 - ✓ Karch H. y Bielaszewska M. (2001). Sorbitol–fermenting Shiga toxin–producing *Escherichia coli* O157:H7– strains: Epidemiology, phenotypic and molecular characteristics and microbiological diagnosis. J. Clin. Microbiol. **39**, 2043–2049.
 - ✓ Karch, H.; Tarr, P. I.; Bielaszewska, M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. **2**, 15-38.
 - ✓ Karmali, M. A.; Petric, M.; Lim, C.; Fleming, P. C.; Arbus, G. S.; Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. Journal Infectious Diseases **151**, 775-782. En: Journal Infectious Diseases **189**, 552-563.

- ✓ Khan Academy. <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/polymerase-chain-reaction-pcr>.
- ✓ KIT VTEC-RPLA detección de toxinas. http://www.analisisavanzados.com/modules/mod_tecdata/TD0960%20KIT%20VTEC-RPLA_es.pdf 02/2017
- ✓ Logan, N. A. (1994). Bacterial systematics, pp 263. In: ebrary Inc. (Au) Black Well Scientific publications, Oxford.
- ✓ López, E. L.; Contrini, M. M.; De Rosa, M. F. (1998). Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. pp. 30-37. En: Kaper, J. B; O'Brien, A. D. (eds). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- ✓ Merck Microbiology Manual 12th Edition
- ✓ Nataro, J. P.; Kaper, J. B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clinical Reviews Microbiology **11**, 142-2001.
- ✓ O'Brien, A. D.; LaVeck, G. D.; Thompson, M. R.; Formal, S. B. (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. Journal Infectious Diseases 146, 763-769.
- ✓ O'Brien, A. D.; Newland, J. W.; Miller, S. F.; Holmes, R. K.; Smith, H. W.; Formal, S. B. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea Science **226**, 694-696.
- ✓ OIE (2004) (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres Quinta Edición, 2004.
- ✓ Panalimentos (2008). Manual de Procedimientos "Detección de STEC O157 en alimentos". Disponible en el URL: <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?id=67> (11/2016)
- ✓ Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia*

- coli isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in Public Health. *Europ J Epidemiol* 2000; 16: 757-62.
- ✓ Paton, A. W.; Srimanote, P.; Woodrow, M. C.; Paton, J. C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacementnegative Shiga toxicogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infection and Immunity* **69**, 6999- 7009.
 - ✓ ProSpecT Shiga Toxin E.coli (STEC) Microplate Assay. (<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/X7834.pdf>)
 - ✓ Ridascreen Verotoxin (http://www.r-biopharm.com/wp-content/uploads/3866/C2201-RIDASCREEN-Verotoxin_2016-06-22_ES.pdf) (02/2017).
 - ✓ Rivas, M.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Deza, N.; Leotta, G. (2006). Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina (Buenos Aires)* **66 (3)**: 27-32.
 - ✓ Schmidt, H.; Karch, H.; Beutin, L. (1994). The large-size plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 encode hemolysins wich are presumably members of the *E. coli* α -hemolysin family. *Federación Europea de Sociedades de Microbiología. Microbiology Letters* **117**, 189- 96.
 - ✓ Schmidt K, Thakur R, Jiang G, Fung D. *Rapid Methods Automat. Microbiol.* (2000); 8-21.
 - ✓ Scotland, S. M.; Smith, H. R.; Willshaw, G. A.; Rowe, B. (1983). Vero cytotoxin production in a strain of *Escherichia coli* determined by genes carried on bacteriophage. *The Lancet* **332**, 179-234.
 - ✓ Signorini, M. L.; Marín, V.; Quinteros, C.; Tarabla, H. (2009). Hábitos de consumo de hamburguesas y riesgo de exposición a *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): modelo de simulación. *Revista Argentina de Microbiología* **41**, 168-176.
 - ✓ Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, Vol. 2, Núm pp 70-78

- ✓ Todd, W. T. A.; Dundas, S.; Coia, J. (2001). Clinical Management of *Escherichia coli* O157 Infection, pp. 394-420. in: Duffy G, Garvey P, McDowell D (Eds.), Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull.
- ✓ USDA-FSIS (2012). Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC). Disponible en el URL: http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-65c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May2012.pdf?MOD=AJPERES (02/ 2016).
- ✓ Vilchez,G; Alonso,G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. Revista de la Sociedad Venezolana de microbiología 2009; 29: 6-12.
- ✓ Voyer L. E. (1996). Síndrome Urémico Hemolítico, Ed. López, Buenos Aires, Argentina.
- ✓ Wang,F; Yang,Q ; Kease, J.A; Meng,J; Clotilde,L.M; Lin,A; Ge,B.(2013).Current Trends in Detecting Non-O157 ShigaToxin–Producing *Escherichia coli* in Food. Foodborne pathogens and disease Review 10.
- ✓ Willford J, Mills K, Goodridge LD. Evaluation of three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of Shiga toxin. J Food Prot 2009; 72:741–747.
- ✓ Y. Sanz, M.C Callado, J. Dalmau. (2003)Probioticos: Criterios de calidad y orientaciones para el consumo Acta pediátrica Española, Vol. 61, N9.