

Contaminación de carne molida con cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénico (STEC) provenientes de comercios minoristas de San Martín, Buenos Aires, categorizados según nivel socioeconómico

Contamination of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh ground beef from butcher shops in San Martín, Buenos Aires Province, among different socioeconomic strata

Miccio, L.¹; Rumi, M.V.²; Llorente, P.²; Bentancor, A.B.²

¹Cátedra de Química Orgánica de Biomoléculas, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. ²Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (C1427 CWO)

RESUMEN

Escherichia coli shigatoxigénico (STEC) produce enfermedades de transmisión alimentaria, desde diarreas leves a Síndrome Urémico Hemolítico, enfermedad de impacto en Argentina. Dentro de los alimentos implicados se destaca la carne bovina insuficientemente cocida. La contaminación de la carne molida y su relación con los estratos socioeconómicos no ha sido estudiada. El objetivo de este trabajo fue identificar en muestras de carne cepas STEC y establecer su perfil de virulencia, considerando la zona socioeconómica de procedencia y la persistencia de la contaminación en el local de venta. Se seleccionó el 30% de las bocas de expendio habilitadas en cada nivel socioeconómico. Se analizaron 72 muestras provenientes de 36 carnicerías de San Martín, Buenos Aires, en dos muestreos independientes utilizando PCR múltiple para *stx1/stx2* e inmunocaptura para O157 al tamizaje. Se obtuvieron 11 cepas de 26 muestras sospechosas, 7% de los aislamientos fueron STEC O157. La proporción en la contaminación ponderada fue mayor en las zonas media y baja. No se comprobó persistencia. El grado de contaminación por STEC en carne para el área estudiada fue elevado y las cepas aisladas fueron altamente virulentas. En consideración a ello es necesario implementar programas de capacitación y control para reducir los riesgos para la salud pública.

Palabras clave: (STEC), (Síndrome Urémico Hemolítico), (carne), (enfermedad transmitida por alimentos), (nivel socioeconómico).

Correspondencia *e-mail*: Adriana Bentancor aben@fvvet.uba.ar

Recibido: 29-07-2011

Aceptado: 30-08-2011

* Premio "Estímulo a la Investigación Científica 2011" en la categoría graduados de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

SUMMARY

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes foodborne diseases, from mild diarrhea to hemolytic uremic syndrome which impact in Argentina. Many human infections were acquired from eating undercooked contaminated beef. The contamination of ground beef and their relation to socio-economic strata has not been studied. The aim of this study was to identify STEC in meat samples and establish virulence profile, considering the socio-economic area of origin and persistence of contamination in local sales. It was selected 30% of the butcher shop of each socioeconomic level. It was analyzed 72 samples from 36 butcher shop of San Martín, Buenos Aires, in two independent sampling using multiplex PCR for *stx1/stx2* and immunocapture for O157 at screening. Eleven strains were obtained from 26 suspect samples, 7% of the isolates were STEC O157. The weighted proportion of contamination was higher in the middle and low strata. Contamination from butcher shops was not persistent in both sampling. The degree of contamination by STEC in meat and the virulence of isolates were high for the study area. In view of this it is necessary to implement programs which help to reduce risks in public health.

Key words: (STEC), (Hemolytic uremic syndrome), (ground beef), (foodborne disease), (socioeconomic strata).

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es responsable de enfermedades de transmisión alimentaria con cuadros clínicos diversos que incluyen daño intestinal, renal, cerebral y/o multisistémico que determinan diarreas leves a graves, síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica¹¹. Los principales genes de virulencia de STEC son los que codifican para las toxinas Shiga (*stx1*, *stx2* y sus variantes) responsables del daño del endotelio vascular sistémico; adhesinas tales como la intimina (*eaeA*) responsable de las lesiones intestinales de adhesión y borrado de vellosidades intestinales o la adhesina autoaglutinante de STEC (*saa*), y una potente enterohemolisina (*ehxA*) codificada en un megaplásmido^{17,18}.

Las potentes citotoxinas Stx están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. Si bien los miembros de la familia de Stx muestran similitud en su estructura y actividad biológica, cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad. Stx2 tiene una actividad citotóxica 100 veces

superior a Stx1. Dentro de las distintas variantes de Stx2 también existen diferencias en la toxicidad, incluyendo aquellas activables por mucus colónico que producen un incremento en la actividad citotóxica sobre células Vero^{10,24}.

El SUH ha sido descrito en Argentina desde 1964⁷ y actualmente es el país donde se registra la mayor incidencia mundial, con un número de casos nuevos por año que supera los 500¹⁶. En pediatría, este síndrome causa un fallo renal agudo en 20-35% de los casos y es la segunda causa de insuficiencia renal crónica en Argentina. El 3,2% de los casos de SUH necesitan a corto o largo plazo trasplante renal⁶. Descripciones locales de los brotes de SUH han señalado una incidencia desigual relacionada a la franja socioeconómica de la población afectada.

Potencialmente el vehículo para STEC son alimentos crudos o mal cocidos, contaminados en algún punto de su proceso¹⁴. La etiología local de los cuadros de SUH corresponde, en 60% de los casos, a cepas STEC relacionadas particularmente con carne molida¹⁵. Se ha postulado que el principal reservorio es el bovino, y que la carne se contamina en la faena con coliformes, dentro de las que se encuentran

STEC. Se observó una mayor prevalencia de STEC en animales provenientes de feedlot, motivo por el cual la carne de los mismos ofrece mayores riesgos. La misma se distribuye principalmente en áreas con mayor poder adquisitivo de CABA y Gran Buenos Aires. La faena de animales de feedlot representa 18 al 21% del total nacional, que se distribuye mayoritariamente en la región Bonaerense⁹.

El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo de análisis para detectar, aislar y caracterizar STEC O157 y no-O157 a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de diferentes estratos socioeconómicos del partido de General San Martín, Buenos Aires, considerando la persistencia de la contaminación en la boca de expendio y estimar la relación entre contaminación y buenas prácticas de los locales de venta, puntos críticos en la epidemiología local. Dado el alto impacto que representa esta enfermedad sobre nuestro sistema de salud es necesario el abordaje exhaustivo del problema.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 72 muestras de carne molida obtenidas por compra durante la misma semana epidemiológica, con una repetición a los 60 días, en 36 comercios minoristas del partido de General San Martín, Buenos Aires (octubre y diciembre de 2009). Las muestras en su envase original provisto por el comerciante fueron colocadas en envoltorios individuales y se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio. Se seleccionó mediante muestreo aleatorio simple sin reposición el 30% de las bocas de expendio habilitadas, en unidades censales homogéneas para cada nivel socioeconómico (INDEC, 2001)⁸. Para este estudio se definieron tres niveles: A: alto y medio-alto, M: medio y B medio-bajo y bajo. El total de locales identificados fueron 11, 13 y 12 para A, M y B respectivamente. En cada visita se completaron fichas epidemiológicas observacionales evaluando la higiene general del establecimiento, del manipulador y de la picadora de carne, presencia de insectos y presencia de carne molida en bandeja expositora.

Aislamiento, identificación bioquímica y serológica de cepas STEC

Las muestras fueron procesadas por dos algoritmos, para identificar cepas STEC O157:H7²³ y en forma paralela STEC no-O157. Para detección de O157 se realizó enriquecimiento de 65 g de carne en 585 ml de Caldo Tripteína Soja modificado (CTSm) adicionado con 20 mg/ml de novobiocina, homogeneizado en stomacher 2 minutos e incubado a 42°C 18 h. Un ml del cultivo fue sometido a separación inmunomagnética para O157 (Neogen Corp, Lansing, MI, USA) según las instrucciones del fabricante y sembrado en Agar MacConkey Sorbitol adicionado con cefixime-telurito (Biomérieux) (SMAC-CT).

La detección de cepas STEC no-O157 se realizó con iguales proporciones de muestra en CTS, homogeneizado 2 minutos e incubado a 37°C 18 h. El cultivo fue sembrado en Agar MacConkey (AMC).

Las placas de AMC y SMAC-CT fueron cultivadas a 37° C 24 h. De la zona de confluencia se realizó el tamizaje por PCR de los genes *stx1*, *stx2* (Tabla1) que codifican toxina Shiga (Stx1 y 2) y en placas positivas al tamizaje se analizaron hasta 100 UFC para obtener el aislamiento de STEC¹. Se utilizaron las cepas control ATCC 25922 (control negativo) y EDL 933 O157:H7 (control positivo *stx1*, *stx2* y *rfbO157*)¹⁹.

Se definieron tres categorías de muestras, negativas (resultado negativo al tamizaje), sospechosas (positivas al tamizaje sin aislamiento de STEC) y positivas (con aislamiento).

Los aislamientos fueron identificados bioquímicamente mediante pruebas standard¹³. Se evaluó la movilidad de cada cepa. Todos los aislamientos fueron contrastados con suero anti-O157 (ANLIS). Se investigó la presencia del antígeno somático O157 por medio de la presencia del gen *rfbO157*¹² (Tabla1).

La sensibilidad a los antimicrobianos se evaluó mediante la prueba de difusión en agar⁴, para amikacina, ampicilina, ciprofloxacina,

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para tamizaje y aislamiento

Primer	Secuencia	Amplicón(bp)	Referencia
<i>stx 1 a</i> *	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	19
<i>stx 1 b</i> *	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx 2 a</i> *	TTAACCACACCCACCGGGCAGT	346	12
<i>stx 2 b</i> *	GCTCTGGATGCATCTCTGGT		
<i>rfbO157 f</i> **	CGGACATCCATGTGATATGG	259	12
<i>rfbO157 r</i> **	TTGCCTATGTACAGCTAATCC		
<i>ehxA</i> F**	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	17
<i>ehxA</i> R**	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
<i>eaeA</i> F**	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	17
<i>eaeA</i> R**	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
<i>saa f</i> **	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	18
<i>saa r</i> **	ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
VT2-c***	AAGAAGATGTTTATGGCGGT	285	22
VT2-d***	CACGAATCAGGTTATGCCTC		

* primers utilizados en el tamizaje.

** primers utilizados en el estudio de factores de virulencia y grupo O157.

***PCR-RFLP.

cloranfenicol, estreptomina, gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, sulfametoxazol/trimetoprim y tetraciclina, según el método y los patrones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁵.

Caracterización de los factores de virulencia y subtipificación

Los aislamientos se caracterizaron mediante múltiple PCR para determinar la presencia de marcadores de virulencia adicionales *eaeA*, *saa* y *ehxA* (Tabla1)^{17,18}. Se subtipificaron las variantes de Stx2 analizando el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) de la subunidad B amplificada por PCR descrita por Tyler²², utilizando los primers VT2-c y VT2-d, (Tabla1) y digestión con *HaeIII*, *RsaI*, *NciI* (Fermentas). La citotoxicidad y su título (DC₅₀) se determinó en células vero evaluado por la incorporación de rojo neutro, y lectura de la absorbancia a 550 nm²⁴.

Estudio de persistencia

Los 36 puntos de venta fueron estudiados respecto a la persistencia de la contaminación por cepas STEC en carne. Se evaluó sospecha y confirmación por aislamiento, identidad serológica, factores de virulencia y subtipo entre las cepas identificadas en ambos muestreos.

Análisis estadístico

Las fichas epidemiológicas fueron procesadas con el programa Epi Info 2002 (CDC-OMS). Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante test exacto de Fisher y el test para diferencia de proporciones (Statistix).

RESULTADOS

Mediante la metodología descrita se detectaron 14 muestras sospechosas de contaminación por STEC de las 36 en el primer muestreo (38,9%) y 12 en el segundo

muestreo (33,4%). Se aisló STEC O157 en 5 de las 72 muestras (6,9%), 2 cepas en octubre y 3 en diciembre. Se aisló STEC no-O157 en otras 6 muestras del total procesado (8,3%), correspondiendo 3 a cada ronda de muestreo. Los perfiles de *stx* detectados se detallan en la Tabla 2.

Todos los aislamientos fueron identificados como *E. coli*. El 100% de las cepas aisladas fueron sensibles a ciprofloxacina, cloranfenicol y sulfametoxazol/trimetoprima. El 91% resultó ser sensible a gentamicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína y amikacina y el 81.8% a ampicilina. Se detectó resistencia a amikacina y a tetraciclina en 9.1% de las cepas aisladas.

La mayor resistencia se observó frente a estreptomycin, en 81.8% de las cepas evaluadas.

La citotoxicidad (DC50) fue alta ($\geq 10^4$) en 6 cepas; intermedia (10^3) en 3; y baja ($\leq 10^2$) en 2 de las 11 cepas aisladas.

Los genes de virulencia detectados en cada cepa relacionados al nivel socioeconómico del muestreo se detallan en la Tabla 3.

La distribución por nivel socioeconómico de las 26 muestras sospechosas fue: 10 de la zona B (38.5%), 10 de M (38.5%) y 6 de la zona A (23%). Se aislaron 11 cepas de las 26 muestras sospechosas a STEC (45.6%), correspondiendo 5 a la zona B (45,45%), 4 a la zona M (36,4%)

Tabla 2. Número y porcentaje de muestras contaminadas por *stx1* / *stx2* al tamizaje y aislamiento en cada muestreo.

Factor	1º Muestreo (n = 36)				2º Muestreo (n = 36)			
	Sospechoso		Positivo		Sospechoso		Positivo	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>stx1</i>	1	2,8	0	0	0	0	0	0
<i>stx1/stx2</i>	5	13,9	1	2,8	1	2,8	0	0
<i>stx2</i>	8	22,2	4	11,1	11	30,6	6	16,7
Total	14	38,9	5	13,9	12	33,4	6	16,7

Tabla 3. Perfiles genotípicos de las cepas aisladas, según nivel socioeconómico

Nivel	n	<i>rfbO157</i>	<i>ehxA</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>saa</i>	Subtipo <i>stx2</i>
B	1	+	+	+	-	+	-	<i>stx2</i>
	1	-	+	+	-	+	-	<i>stx2</i>
	1	+	+	+	-	+	-	<i>stx2</i> + <i>stx2ha</i>
	1	-	-	+	-	+	-	<i>stx2</i> + <i>stx2ha</i>
	1	-	+	-	-	+	+	<i>stx2</i> + <i>stx2hb</i>
M	1	-	-	-	-	+	-	<i>stx2</i>
	3	+	+	+	-	+	-	<i>stx2</i> + <i>stx2ha</i>
A	1	-	+	-	+	+	+	<i>stx2</i>
	1	-	-	-	-	+	-	<i>stx2</i> + <i>stx2ha</i>

Referencias: B: nivel medio – bajo y bajo. M: nivel medio. A: nivel medio – alto y alto

y 2 a la zona A (18,2%). En el presente estudio la mayoría de las muestras sospechosas y positivas provinieron de carnicerías de las zonas M y B. La persistencia de contaminación a nivel de sospecha se observó en 1/12 (8,3%) de los establecimientos en la zona B y en 3/13 (23,1%) en la zona M. De los 4 establecimientos con sospecha de persistencia solo se aisló STEC en ambas muestras de un establecimiento de la zona B, dichas cepas presentaron perfiles genéticos diferentes. El grado de contaminación en función del nivel socioeconómico mediante el test de diferencia de proporciones no indicó diferencias significativas entre las zonas M y B respecto a la A ($p > 0,05$). Su ponderación ($n.10^2$), señala diferencias significativas en las proporciones de sospecha y aislamiento entre las zonas M y B respecto a la zona A. La zona A presentó una proporción menor. No se observó asociación estadística significativa entre las características del local y condiciones de venta evaluados y la sospecha o confirmación de la presencia de STEC en las muestras estudiadas ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se aisló STEC O157 en 7% de las muestras evaluadas. Estos son valores superiores a las referencias locales previas de 3,9%^{3,21}. Si bien diferencias climáticas, geográficas y el tamaño muestral podrían determinar estas variaciones, es preciso señalar la alta exposición de la población a este patógeno. Las cepas O157 aisladas portaron los genes *eaeA* y *ehxA*, necesarios para causar enfermedad severa en el hombre, y se destaca que 4 de ellas presentaron la combinación *stx2* + *stx2ha* descrito como altamente citotóxico y prevalente en Argentina. En el presente estudio se evaluaron factores higiénico – sanitarios de las carnicerías y su relación con la contaminación de carne por STEC, en un modelo estratificado por nivel socioeconómico, tales como higiene del manipulador y del establecimiento, la presencia de carne molida en bandeja expositora o molienda a pedido, estado de la picadora, presencia de insectos. Si bien trabajos previos señalan cierta asociación de estos factores², el

presente estudio no lo refleja ($p > 0,05$). El modelo permite inferir diferencias por estrato social mediante la ponderación de los resultados ($n.10^2$) entre las zonas M y B respecto a la A, ($p = 0,05$), las que deberían ser contrastadas con un muestreo más numeroso a fin de considerar su extrapolación.

El presente estudio permitió demostrar que el agente presenta mayor circulación en las áreas B y M, en las cuales la población susceptible estaría más expuesta al contacto con el agente. Se ha señalado al SUH como secuela del primer episodio diarreico en niños. Las diarreas infantiles leves, se asocian frecuentemente a cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC)²⁰. EPEC comparte mecanismos de patogenicidad con STEC y genera inmunidad cruzada de poca duración respecto a STEC. Nuestros resultados indicaron que en áreas B y M la exposición al patógeno es frecuente, y podría relacionarse con un estado inmunitario reactivo que impide o disminuye la frecuencia de enfermedades severas como el SUH en los niños.

El alto nivel de contaminación basado en aislamiento de STEC (15.3%) con diversidad de cepas de perfil altamente virulento, determinan la circulación del patógeno en el área a través del tiempo. Pese a ello, la persistencia de STEC en los establecimientos, medida a través de su persistencia en la contaminación de la carne, no fue comprobada.

Los trabajos regionales estiman una prevalencia del serogrupo O157 menor al 4%^{3,21}. En el presente estudio se determinó que el 7% de las muestras estaban contaminadas con O157, y el 8.3% con no-O157. El serogrupo O157 detectado mantiene los factores de virulencia del prototipo de la cepa STEC, y coincide con el serogrupo de mayor incidencia en cuadros de SUH en nuestro país¹⁵. El grado de contaminación observado es un alerta respecto a la virulencia de los patógenos circulantes en las áreas urbanas.

CONCLUSIONES

El 82% de los aislamientos de STEC fueron de muestras provenientes de las zonas

M y B, su análisis ponderado señaló diferencias significativas tanto para las proporciones de sospecha, como las de aislamiento, entre las zonas M y B respecto a la zona A. Este es el primer estudio que permite estimar el impacto de la contaminación de la carne molida en los diferentes estratos socioeconómicos de la población. Su análisis *in extenso* podrá validar los resultados obtenidos.

En concordancia con estudios previos las variables que se repitieron con mayor frecuencia fueron la carne molida conservada en bandeja expositora y la ineficiente higiene del establecimiento y del carnicero^{2, 21}. A pesar de ello resultaron ser estadísticamente no significativos.

Se observó un elevado grado de contaminación con STEC en la carne molida, de los cuales cerca de la mitad pertenecieron al serogrupo más prevalente en pacientes con SUH en Argentina, *E. coli* O157.

Los resultados obtenidos en el presente estudio refuerzan la necesidad de incorporar medidas de control del patógeno a lo largo de la cadena agroalimentaria para asegurar la calidad de los alimentos, y el control en el cumplimiento efectivo de las buenas prácticas. Se concluye que dado el elevado grado de contaminación por cepas STEC altamente virulentas en carne molida del área Metropolitana, el riesgo de adquirir alimentos contaminados no debe desestimarse. En consideración a ello es necesario implementar programas de control y educación para la salud sostenidos en el tiempo, destinados a la comunidad en general y a los manipuladores, alertando sobre los riesgos de este patógeno, sus vías de transmisión y las estrategias de prevención que deben aplicarse.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires V401. El Veterinario Miccio recibió una Beca estímulo UBACyT. Este trabajo se desarrolló con el apoyo de la Dra. A. Fernández Cirelli y Dra. E. Gentilini y la colaboración del personal no docente de la

Cátedra de Microbiología Veterinaria, FCV, UBA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bentancor, A.; Rumi, M.V.; Gentilini, M.V.; et al. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrome incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 267(2):37-41.
2. Calviño, F.; Ameal, A.; Bentancor, A. Grado de contaminación por STEC en carne molida a la vista. *XVI Jornadas De Jóvenes Investigadores. Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM)*. Montevideo, 27-29 Octubre, 2008. Ed. Universidad de la República, Uruguay. pp 2920-8.
3. Chinen, I.; Tanaro, J.D.; Miliwebsky, E.; et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot.* 2001, 64(9):1346-5.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2007. Performance Standards for Antimicrobial disk Susceptibility Test; Approved Standard – Ninth edition. 27(1): M2 – A9.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Zone Diameter Interpretive Standards and Equivalent Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for Enterobacteriaceae. Ninth edition. 27(1): M2 – A9. Guideline M100 - S17, Table 2A
6. Exeni, R.A. Síndrome urémico hemolítico. Manifestaciones Clínicas. Tratamiento *Medicina* (B Aires). 2006; 66(s3): 6-10.
7. Gianantonio, C.A.; Vitacco, M.; Mendilaharsu, F.; et al. The hemolytic uremic syndrome. *Neprhon.* 1973; 11(2): 174-92.
8. Instituto Nacional de Estadística y Censos -INDEC- Hallado en: <http://www.indec.mecon.ar/webcenso/index.asp>. Acceso el 10 agosto de 2006.
9. Iriarte, I. *Comercialización de ganados y carnes*. Cámara Argentina de Consignatarios de Ganado. Argentina, Buenos Aires, 2005.

10. Jelacic, J.K.; Damrow, T.; Chen, G.S.; *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis.* 2003; 188(5), 719-729.
11. Karmali, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1989; 2(1): 15-38.
12. Leotta, G.A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; *et al.* Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Arg Microbiol.* 2005; 37(1):1-10.
13. Mac Faddin. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.* Buenos Aires. Ed. Médica Panamericana. 1980; p.302.
14. Meichtri, L.; Miliwebsky, E.; Gioffré, A.; *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96 (2):189-98.
15. Miliwebsky, E.S.; Balbi, L.; Gomez, D.; *et al.* Síndrome urémico hemolítico en niños en Argentina: asociación con la infección por *E. coli* productor de la toxina Shiga. *Bioquímica y Patología clínica.* 1999;63: 113–21.
16. Ministerio de Salud de la Nación Argentina: En http://www.msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES%5CDocs_de_interes%5CSindrome%20Urémico%20Hemolítico%202004.ppt, consultado el 15 de julio de 2007.
17. Paton, A.W.; Paton, J.C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *E. coli* by using multiple PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO11*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(2): 598-602.
18. Paton, A.W.; Paton, J.C. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(1): 271-4.
19. Pollard, D.R.; Johnson, W.M.; Lior, H.; *et al.* Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(3): 540-5.
20. Regua-Mangia, A.H.; Gomes, T.A.; Vieira, M.A.; *et al.* Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infect.* 2004; 48(2): 161-7.
21. Rumi, M.V.; Gentilini, V.; Calviño, F.; *et al.* Contaminación de carne molida con cepas de *Escherichia coli* Shigatoxigenica según nivel socioeconómico de expendio. *Revista Argentina de Microbiología.* 2007; 39 (s1):135.
22. Tyler, S.D.; Johnson, W.M.; Lior, H.; *et al.* Identification of verotoxin type 2 variant B-subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29 (7):1339-43.
23. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat products. MLG 5.04. USA, 2008.
24. Valdivieso-García, A.; Clarke, R.C.; Rahn, K.; *et al.* Neutral red assay for measurement of quantitative vero cell cytotoxicity. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(6):1981-3.