

27. Agroalimentos.

Título: **Prevalencia de *Escherichia coli* O157:H7/NM y cuantificación de riesgo de transmisión en carnicerías del municipio de Tafí Viejo.**

Moreno Mochi, María Paula; paumorenomochi@hotmail.com; Vargas, Juan Martín; juan.martin.vargas@hotmail.com. Orientadora: Jure, María Angela; magejure@gmail.com
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia
Universidad Nacional de Tucumán

RESUMEN

En Argentina, *Escherichia coli* O157:H7/NM es el serotipo prevalente asociado con el síndrome urémico hemolítico (SUH), que es endémico en el país con más de 400 casos por año. El ganado vacuno es uno de los principales reservorios y las estrategias para evitar la transmisión de estos microorganismos se concentran en la planta de matanza. En la provincia de Tucumán-Argentina la carne picada se vende en carnicerías. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia *E. coli* O157:H7/NM, cuantificar el riesgo de transmisión de este patógeno emergente en la línea de producción/comercialización de carne bovina destinada a consumo minorista y evaluar la virulencia y la relación epidemiológica de las cepas aisladas mediante ensayos moleculares. Se cuantificó el riesgo de contaminación del proceso de producción de la carne picada fresca evaluando las condiciones sanitarias de las carnicerías expendedoras de carne vacuna. Se tomaron 21 muestras de carne bovina picada fresca y 84 ambientales. Se aislaron 9 cepas de *E. coli* O157 no toxigénicas biotipo C y sensibles a lo antimicrobianos ensayados y se caracterizaron como *stx-/eae-/ehxA-*. La subtipificación por PFGE en nuestros aislamientos, demostró 5 patrones XbaI-PFGE. Si bien estas cepas resultaron no toxigénicas y no se asociaron a factores de virulencia implicados en el SUH, no existe una combinación de marcadores genéticos que definan la potencialidad de una cepa de *E. coli* O157 para causar enfermedad en el hombre. Nuestros hallazgos, sumado a la gran diversidad genética demostrada en estas cepas constituyen un aporte importante para evaluar el poder de diseminación y conocer las vías de transmisión brindando apoyo a los departamentos sanitarios locales.

Palabras claves: *Escherichia coli* O157, cuantificación de riesgo, relación epidemiológica.

Introducción.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los principales desafíos para la salud pública; la Organización Mundial de la Salud (OMS) describe que 15 al 70% de los casos, dependiendo de los países, son causados por alimentos que sufrieron contaminación biológica.

Escherichia coli O157:H7/NM es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos, puede causar diarrea, colitis hemorrágica y complicaciones extraintestinales como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (Karmali, 1989). La habilidad de estas cepas para causar enfermedad, está relacionada con su capacidad para secretar toxina Shiga 1 (Stx1), toxina Shiga (Stx2), y sus variantes, responsables del daño del endotelio vascular (Rivas, Miliwebsky, Chinen, Deza, Leotta, 2006). Además estas cepas pueden llevar un complejo conjunto de determinantes genéticos asociados con la virulencia, como adhesinas, proteasas, sistemas de captura de hierro,

lipopolisacarido, flagelos y otras toxinas, involucrados en la colonización, toxinas e inmunomoduladores que podrían contribuir en la patogénesis de las mismas (Paton y Paton, 1998; Morabito et al., 2003; Tozzoli et al., 2005; Imamovic et al., 2010; Guth et al., 2011).

El alerta clínico-epidemiológico y de laboratorio debe ser sistemático a fin de detectar aislamientos relacionados, que permitan encontrar la fuente de contaminación y tomar las acciones de control pertinentes. Un elemento clave para el reconocimiento de los patógenos es poder identificarlos en las probables fuentes de contaminación, hasta llegar, en lo posible, a establecer su reservorio y las vías de transmisión. Las metodologías de biología molecular, como subtipificación y electroforesis de campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]), permiten establecer la relación epidemiológica existente entre cepas aisladas de distintos orígenes y realizar una vigilancia de los clones circulantes en una región determinada. En nuestro país se ha establecido la relación clonal de cepas

provenientes de diferentes orígenes y los datos se encuentran en la Base de Datos Nacional de la Red Regional de Subtipificación para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (red PulseNet).

En Tucumán el SUH es endémico y *Escherichia coli* O157:H7/NM se detecta a partir de diferentes fuentes desde 1998 (Morabito S., Tozzoli R., Oswald E. and Caprioli A., 2003; Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC y Motter M, 2005). El expendio de carne picada y productos derivados a nivel minorista se realiza principalmente en carnicerías. No rigen controles sobre el control higiénico-sanitario de los locales ni controles respecto a la calidad microbiológica de la carne molida fresca que se comercializa a nivel de boca de expendio lo que nos llevó a implementar por primera vez en la provincia, en el municipio de Tafí Viejo, el programa Carnicerías Saludables. Este programa, comprende estudios sistemáticos con rigor científico que permiten detectar los riesgos en el proceso de triturado y envasado de la carne

bovina. Consideramos que el conocimiento de los puntos de contaminación de la carne picada fresca en la etapa de producción-comercialización contribuirá al desarrollo de estrategias de intervención a los efectos de mejorar su calidad microbiológica y disminuir el riesgo de infección.

Objetivo.

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia *E. coli* O157:H7/NM, cuantificar el riesgo de transmisión de este patógeno emergente en la línea de producción/comercialización de carne bovina destinada a consumo minorista y evaluar la virulencia y la relación epidemiológica de las cepas aisladas mediante ensayos moleculares.

Material y Métodos.

En el marco del programa “Carnicerías Saludables” implementado en la ciudad de Tafí Viejo y en conjunto con personal municipal, en el periodo Abril-Septiembre de 2017 se realizó una evaluación integral en 21 carnicerías representativas de todas las áreas geográficas para conocer el estado sanitario de cada establecimiento (planilla de

cuantificación del riesgo) y se tomaron muestras de carne bovina molida y ambientales para realizar análisis microbiológicos.

Cuantificación del riesgo de contaminación de la carne bovina picada fresca.

Se cuantificó el riesgo de contaminación del proceso de producción de la carne picada fresca evaluando las condiciones sanitarias de las carnicerías expendedoras de carne vacuna. La evaluación consistió en completar una planilla implementada y avalada por el Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina (IPCVA) y CONICET, en el marco del programa "CARNICERIAS SALUDABLES". Esta planilla (Check List), permitió cuantificar el riesgo de contaminación del producto en la boca de expendio, se analizaron variables agrupadas en 5 bloques y cuantificadas según la importancia y el impacto durante el proceso de producción: condiciones edilicias, equipamiento, personal y flujo de muestras. Se consideraron: Bloque 1: Situaciones y condiciones en que se encuentra la edificación de los locales, Bloque 2: Equipos y Herramientas de

Trabajo, Bloque 3: Personal del área de Manipulación y Venta, Bloque 4: Materias Primas/Producto para la Venta, Bloque 5: Flujo de producción/Manipulación /Venta y Control. Cada punto analizado se resolvió como SI, NO o No Aplicable (NA) según cumpliera, no cumpliera o no correspondiera lo detallado para la actividad auditada (OPS/OMS, 2001). Cada opción seleccionada (SI, NO o NA) correspondió con un número determinado según el ítem del que se tratase (OPS/OMS, 2001). Concluida la auditoria y según el resultado obtenido de la sumatoria de todos los bloques, el riesgo del establecimiento se clasificó como Alto (0-40), Moderado (41-70) y Bajo (71-100).

Toma de muestras. Se tomaron 21 muestras de carne bovina picada fresca (500 g) y 84 ambientales correspondientes a: 1) cuchillos y chairas, 2) picadora, 3) mesadas y 4) manos de operarios. Para estas muestras se utilizaron esponjas comerciales (3M) hidratadas con agua peptona bufferada estéril.

Determinación de la carga bacteriana en carne picada mediante el recuento de microorganismos indicadores. Se realizó

el recuento de mesófilos, coliformes totales y *E. coli* utilizando los dispositivos comerciales Petrifilm (3M), validados según las normas ISO 4833, ISO 16649-3, ISO 6888-1, respectivamente. Se determinó por cuenta viable la carga de *E. coli* en las muestras (esponjas diluidas en 25 ml de agua peptona bufferada). Se consideró como valor marginal un conteo de 500 UFC/g.

Detección y aislamiento de *E. coli* O157:H7/NM. Se siguieron las normas (ISO 16654:2001). Metodología: 1. Enriquecimiento en caldo soja modificado con novobiocina (TSBm+n) con incubación de 41,5°C durante 18 h. 2. Separación y concentración del microorganismo por medio de partículas inmunomagnéticas revestidas con anticuerpos anti *E. coli* O157 (SIM). 3. Aislamiento por subcultivo de las partículas inmunomagnéticas con la bacteria adherida en agar MacConkey Sorbitol con cefixima telurito (CT-SMAC) y en Chromoagar. 4. Confirmación de las colonias sorbitol negativas del CT-SMAC y las colonias con coloración típicas (malva) en Chromoagar. 5. Multiplex PCR para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*,

utilizando tres pares de oligonucleótidos iniciadores para amplificar un fragmento del gen correspondiente a la subunidad B de Stx1 esperando un amplicón de 130 pb, un fragmento del gen correspondiente a la subunidad A de Stx2 esperando un amplicón de 346 pb y un fragmento del gen *rfbO157* correspondiente al LPS O157 esperando obtener un amplicón de 259 pb (Leotta et al., 2005). Se incluyeron como control positivo *E. coli* EDL 933, O157:H7 Stx1/Stx2 y como control negativo *E. coli* ATCC 25922, atoxigénica.

Caracterización de aislamientos de *E. coli* O157:H7/NM mediante técnicas fenotípicas y genotípicas.

Caracterización fenotípica de los aislamientos. La caracterización fenotípica de los aislamientos de *E. coli* O157:H7/NM se realizó por identificación bioquímica, por medio de pruebas bioquímicas, biotipificación y antibiograma.

Identificación bioquímica de los aislamientos de *E. coli* O157:H7/NM. Se realizó con las siguientes pruebas: producción de indol, movilidad y producción de ácido sulfhídrico en agar indol movilidad sulfuro (Britania), fermentación de glucosa,

lactosa y producción de gas en agar triple azúcar hierro (Britania), descarboxilación de lisina en agar lisina hierro (Britania), fermentación ácido mixta en caldo rojo de metilo-Voges Proskauer (Britania), descarboxilación de ornitina en agar movilidad indol ornitina (Britania), utilización de citrato como única fuente de carbono en agar citrato de Simmons (Britania), fermentación de sorbitol, celobiosa, lactosa, sacarosa y glucosa (BioPack) en caldo rojo fenol (Difco, Becton- dickinson and Company, Francia) conteniendo un 1% del azúcar correspondiente, actividad β -glucoronidasa con disco con glucorónido MUG (Britania) y actividad β -galactosidasa con disco con ONPG (Britania).

Biotipo. Se determinó el biotipo de las cepas de *E. coli* O157:H7/NM según la capacidad de fermentar los azúcares rafinosa, dulcitol y ramnosa. Como control positivo se utilizó la cepa *E. coli* EDL933.

Antibiograma. Se realizó prueba de susceptibilidad a antimicrobianos por difusión con discos. Se ensayaron los siguientes antibióticos: Amicacina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Gentamicina, Acido Nalidíxico,

Nitrofurantoina, Tetraciclina y Colistin. Se utilizo medio Mueller Hinton Agar y las placas de Petri se sembraron con inóculos ajustados a 0,5 de Mac Farland.

Caracterización molecular de factores de virulencia. Se realizó PCR para la detección de genes de los factores de virulencia: *intimina* (*eae*), y enterohemolisina (*ehxA*) y el antígeno flagelar H7 (*fliCH7*). Según protocolos estandarizados, se prepararon las mezclas de reacción con los primers correspondientes para la amplificación de cada gen, previa extracción de ADN total a partir de boiling de colonia. Gen *eae*: metodología propuesta por Karch et al.(1993), cebadores que amplifican un fragmento de 864 pb de la región conservada del gen *eae* para *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Control positivo: *E. coli* 2348/69 *eae* + (EPEC) 7. Gen *ehxA*: metodología propuesta por Schmidt et al. (1995), cebadores que amplifican un fragmento de 1551 pb del gen *ehxA* que codifica para la enterohemolisina (EHEC-hly). Control positivo: *E. coli* E32511 O157:NM/stx2/EHEC-hly+ para

enterohemolisina (EHEC-ehxA)8. Gen *fliCh7*: metodología propuesta por Gannon et al. (1997), cebadores que amplifican un fragmento de 625 pb del gen *fliCh7*. Control positivo: *E. coli* EDL933.

Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Las cepas de *E. coli* O157:H7/NM, se analizaron por electroforesis en campo pulsado (PFGE) según protocolos estandarizados correspondientes a la Red PulseNet Internacional, desarrollado por Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, USA). Se utilizó un equipo CHEF-DR II (BioRad). Se determinó la relación clonal entre los aislamientos utilizando el software BioNumerics versión 8.0 (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium).

Para determinar la relación clonal de los aislamientos de *E. coli* O157:H7/NM se analizaron fragmentos de macrorrestricción de cada cepa, separados por PFGE siguiendo el protocolo estandarizado por la red PulseNet (PulseNet PFGE, 2013). Los fragmentos fueron obtenidos por la digestión del ADN total por la enzima de restricción XbaI (Promega, Biodynamics). Todas las cepas se sembraron inicialmente en TSA y se incubaron a 37°C, durante 14 a

18 h. Las bacterias de la zona de confluencia se recogieron con un hisopo estéril y se resuspendieron en 2 ml de buffer de suspensión celular (BSC, Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8) hasta alcanzar una DO=1 determinado con un espectrofotómetro. Los tacos de agarosa fueron preparados a partir de 400 µl de suspensión celular estandarizada con 400 µl de agarosa calidad biología molecular al 1% fundida (Biorad) y 20 µl de solución de Proteinasa K [20 mg/ml (Thermo Fisher, Buenos Aires, Argentina)]. Las células dentro de los tacos de agarosa se lisaron con un buffer de lisis celular [Tris 50 mM: EDTA 50 mM, pH 8; + Sarcosina (Sigma, Saint Louis, EEUU) 1% y Proteinasa K (0,1 mg/ml)], incubados a 54°C, durante 1,5-2 h con agitación (120 rpm) y luego los tacos se lavaron dos veces con agua de calidad molecular a 50°C, con agitación durante 10-15 min y 4 veces con buffer TE 1X estéril (Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8). Los tacos de agarosa se almacenaron en buffer TE 1X a 4°C hasta realizar la restricción enzimática. La digestión del ADN en los "plugs" se realizó con la endonucleasa de restricción XbaI (10 U/µl) en 200 µl del

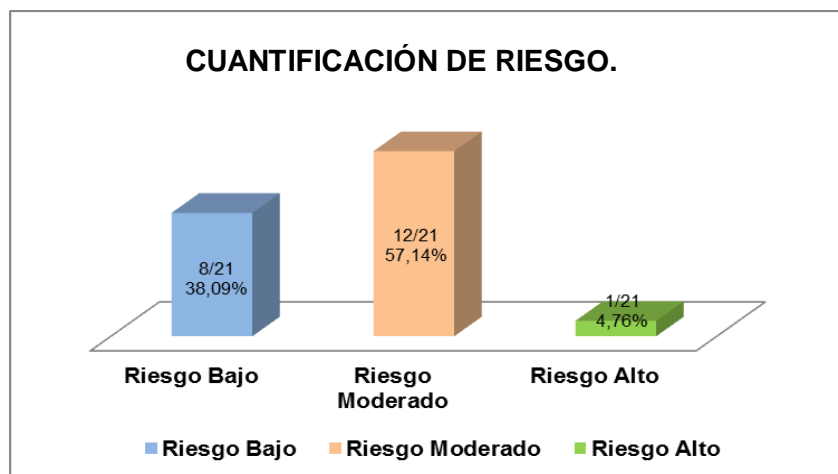
buffer de restricción 1X (provisto con la enzima) a 37°C, durante 4 h. Los tacos se colocaron en un gel de agarosa calidad biología molecular 1% (BioRad) en buffer TBE 0,5X [Tris 5,4 g; ácido bórico (Sigma) 2,75 g; 2,0 ml EDTA 0,5 M] en un molde (BioRad) de 100 ml de 15 calles. La corrida electroforética se realizó en el equipo CHEF DR II (BioRad) utilizando las siguientes condiciones: pulso inicial: 2,2 seg; pulso final: 54,2 seg; voltaje: 6 V/cm; ángulo: 120°; tiempo de corrida: 19 h; con temperatura de buffer de corrida (TBE 0,5X) de 14°C. Se colocó el ADN de una cepa de *Salmonella Braenderup* H9812, digerido por la misma enzima, en las calles 1, 5, 10 y 15, para permitir la normalización de las bandas entre los geles. Los geles fueron teñidos con Gel Red 0,1 µg/ml (Genbiotech), durante 20 a 30 min a temperatura

ambiente en un agitador orbital (60 rpm), y luego se destiñó mediante 3 lavados con 400 ml de agua destilada de calidad en las mismas condiciones. Para la documentación de los resultados los geles fueron fotografiados en un lector de geles (BioRad). Las imágenes fueron almacenadas en formato TIFF. La presencia de bandas se determinó visualmente y los patrones de PFGE obtenidos fueron analizados con el programa BioNumerics versión 8.0 (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium), utilizando el coeficiente de Dice y mediante UPGMA para generar un dendograma con 1,5% de valor de tolerancia.

Resultados.

La evaluación del status sanitario demostró un predominio de locales con riesgo moderado (Figura 1).

Figura 1: Cuantificación de riesgo y evaluación del status sanitario.



El recuento de *E. coli* <math><500\text{ UFC/g}</math> en las 21 muestras de carne picada analizadas; los resultados del recuento mesófilos fue <math><10^7\text{ UFC/g}</math> en las 8 muestras de carne picada analizadas (38%), mientras que las 13 muestras restantes mostraron un recuento >math>>10^7\text{ UFC/g}</math> (62%).

De las 21 muestras de carne picada fresca y 84 muestras ambientales analizadas, 4 (19%) muestras de carne

picada fresca y 2 (2%) muestras ambientales (picadora y mesada) resultaron positivas para *E. coli* O157. Se aislaron 9 cepas de *E. coli* O157 no toxigénicas biotipo C y sensibles a los antimicrobianos ensayados y se caracterizaron como *stx-1/eae-ehxA-* (Tabla 1).

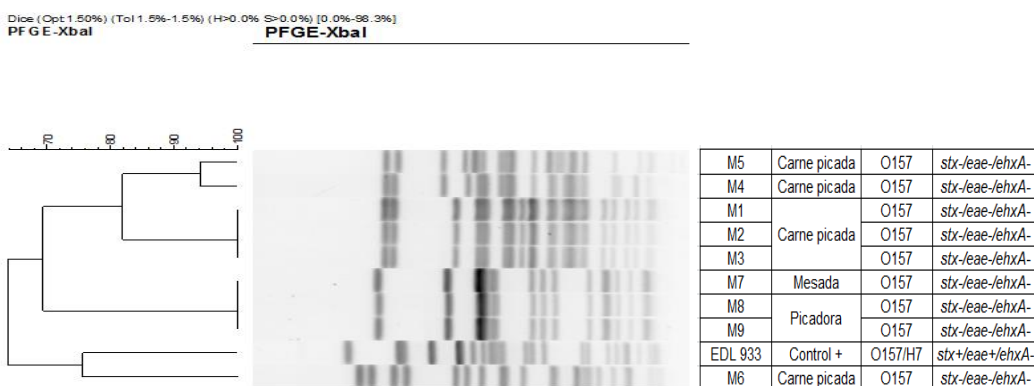
Tabla 1: Caracterización molecular de los aislamientos.

Numero de cepa	Tipo de muestra	SEROTIPO		FACTORES DE VIRULENCIA			
		<i>rfb O157</i>	<i>fliC h 7</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehx A</i>
M1	Carne	+	-	-	-	-	-
M2		+	-	-	-	-	-
M3		+	-	-	-	-	-
M4	Carne	+	-	-	-	-	-
M5	Carne	+	-	-	-	-	-
M6	Carne	+	-	-	-	-	-
M7	Picadora	+	-	-	-	-	-
M8	Picadora	+	-	-	-	-	-
M9	Mesada	+	-	-	-	-	-

Al realizar la subtipificación por PFGE en nuestros aislamientos, detectados 5 patrones XbaI-PFGE. Detectamos 2 patrones de restricción diferentes entre cepas aisladas (carne picada, mesada y picadora) en una misma carnicería; estos 2 patrones presentaron una similitud del 70%. Por otro lado el patrón de PFGE de una cepa aislada de carne picada fresca

perteneciente a una carnicería presentó una similitud de 95% con otra cepa aislada de carne picada en otra carnicería. En la figura 2 se presenta el dendrograma generado a partir de los resultados obtenidos por PFGE-XbaI. Se incluyó en el análisis de PFGE la cepa *E. coli* EDL 933, como control.

Figura 2: Relación Clonal. Origen de aislamiento, serotipo, genotipo y dendrograma.



Discusión.

Los organismos internacionales que pautan la seguridad alimentaria a nivel mundial, enfatizaron la necesidad de basar sus normativas de seguridad alimentaria y comercial, en evaluaciones objetivas de riesgo microbiológico. En Argentina, mediante Resolución Conjunta de la Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias del Ministerio de Salud y Ambiente, y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (79/2004 y 500/2004), se modificó el Artículo 255 del Código Alimentario Argentino que refiere a las especificaciones microbiológicas que debe cumplir la carne picada fresca. El porcentaje de aislamientos de *E. coli* O157 en productos cárnicos es variable en diferentes países. En Latinoamérica, Uruguay reporta 1,8 % de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga (STEC) en carne picada fresca (Varela, Chinen, Gadea, 2008). En Lima, en un estudio de 102 muestras de carne de bovino molida, Mora et al. (2007) encontraron un 22,55 % positivo para *E. coli* O157. Estudios realizados en Argentina demostraron la presencia de *E. coli*

O157:H7 en el 3,8% de carne picada y en el 4,8% de embutidos frescos colectados en carnicerías (Chinen et al., 2001). Etcheverría et al. (2010) demostraron que la contaminación por este patógeno en medias reses aumentó significativamente desde los frigoríficos hasta las carnicerías, sugiriendo que la manipulación en el lugar de venta es un punto importante de control. Entre los años 2001 y 2005, se analizaron 446 muestras de productos cárnicos a la salida del establecimiento elaborador y llegada a la boca de expendio en la Provincia de Buenos Aires. En los 5 años que comprendió el estudio se realizaron 4477 recuentos de microorganismos y se encontró un total de 3,2 % de recuentos positivos (142), de los cuales 19 correspondieron a productos cárnicos (0,4 % de recuentos positivos) y 123 a lácteos (2,7% de recuentos positivos). Del análisis de la contaminación total en productos cárneos (19 recuentos positivos) se encontró que el 15,79% correspondió a *E. coli*, el 15,79% a *E. coli* O157: H7 o NM, 15,79 % a *Salmonella* spp, (Michelena, 2008). En Tucumán, Jure et al. (2015),

reportaron *E. coli* O157 en 1,9% y 13,3% de las muestras de carne picada analizadas; y 8 % y 33% en embutidos. En media res reportaron sobre un total de 216 muestras de media res provenientes de 6 frigoríficos (2011/2013), *E. coli* O157 en 0,46% de las muestras. En nuestro país existen escasos estudios respecto de la incidencia y caracterización de cepas de *E. coli* O157:H7 a nivel de boca de expendio. En un estudio reciente, realizado por Brusa et al. (2013) en carnicerías de la ciudad de Berisso se reportó la presencia de *E. coli* O157:H7 en el 11,8% de muestras de carne picada fresca, 1,8% de mesadas, 2,7% de cuchillos, 5,5% de picadoras y 4,5 % de manos de carniceros. Estos resultados confirman que la carne faenada y distribuida a nivel de boca de expendio minorista puede estar contaminada con estas bacterias patógenas y que la contaminación aumenta (Brusa et al., 2013; 2016). En este trabajo *E. coli* O157:H7/NM se aisló en 19% de muestras de carne picada fresca y 2% de muestras ambientales. Si bien estas cepas resultaron no toxigénicas y no se

asociaron a factores de virulencia implicados en el SUH, Karmali et al. (2003) demostraron que no existe una combinación de marcadores genéticos que definan la potencialidad de una cepa de *E. coli* O157 para causar enfermedad en el hombre, la variabilidad en la virulencia, incidencia y severidad de la infecciones producidas es resultado de la dosis infectiva en los diferentes alimentos que actúan como vehículo y la interacción del patógeno con factores del hospedador y el ambiente.

Conclusión.

La carne picada es un alimento de consumo masivo y la inspección de los comercios expendedores en conjunto con el análisis microbiológico integral proporciona elementos racionales para establecer estrategias de prevención. Nuestros hallazgos, sumado a la gran diversidad genética demostrada en estas cepas constituyen un aporte importante para evaluar el poder de diseminación y conocer las vías de transmisión brindando apoyo a los departamentos sanitarios locales.

Bibliografía

1. Brusa V, Piñeyro PE, Galli L, Linares LH, Ortega EE, Padola NL. 2016. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ground beef using multiple combinations of enrichment broths and selective agars. *Food Path Dis* 13:163–70.
2. Brusa V., Aliverti V., Aliverti F., Ortega E., de la Torre J., Linares L., Sanz M., Etcheverría A., Padola N., Galli L., Peral García P., Copes J. and Leotta G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 18 January 2013 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00171>.
3. Chinen I, Tanaro JD, Milliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Tanaro JD, Milliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot* 2001; 64: 1346-51.
4. Etcheverría AI, Padola NL, Sanz ME, Polifroni R, Krüger A, Passucci J, Rodríguez EM, Taraborelli AL, Ballerio M, Parma AE. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Sci.* 2010; 86, 418–421.
5. Gannon VP, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K, Read S. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* 1997; 35 (3): 656-62.
6. Guth BEC, Prado V, Rivas M. Capítulo 5: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Torres AGT (Ed.). Bentam Science Publishers. April 2011, p. 65-83.
7. Imamovic L, Tozzoli R, Michelacci V, Minelli F, Marziano ML, Caprioli A, Morabito S. OI-57, a genomic island of *Escherichia coli* O157, is present in other seropathotypes of Shiga toxin-producing *E. coli* associated with severe human disease. *Infect Immun.* 2010; 78: 4697- 4704.

8. Jure MA, Castillo M, Aulet O, Micelli S, Sesma F, Ruiz Holgado A, et al. Association between hemolytic uremic syndrome and verotoxin-producing strains of *E. coli*. *Rev Latinoam Microbiol* 1998; 40: 1-8.
9. Jure MA., Condorí S., Pérez Terrazzino G., Catalán G., López Campo A., Zolezzi G., Chinen I., Rivas M. y Castillo M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Rev Argent Microbiol*. 2015;47(2):125-131.
10. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic Oisland 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and / or serious disease. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 4930-40.
11. Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 15-38.
12. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 1-10.
13. Micelli S, Jure MA, Saab O, Castillo M, Rojas S, Ruiz Holgado A, et al. Clinical and bacteriological study of children suffering from haemolytic uraemic syndrome in Tucumán, Argentina. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 33-7.
14. Michelena. Producción segura de cárneos y lácteos. Análisis de contaminación. Tesis de maestría en Salud Pública Orientación Sistemas de Salud 2008. Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia de Buenos Aires, La Plata.
15. Mora A, León SL, Blanco M, Blanco JE, López C, Dahbi G, Echeita A, González EA, Blanco J. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and

- vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol.* 2007;114:204-10.
16. Morabito S, Tozzoli R, Oswald E and Caprioli A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect Immun.* 2003; 71: 3343-3348.
17. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol.* 1998a; 36:598-602.
18. 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 (Buenos Aires)* 2006; 66 Supl.III: 27-32.
19. Tozzoli R, Caprioli A, Morabito S. Detection of *toxB*, a plasmid virulence gene of *Escherichia coli* O157, in enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4052-4056.
20. Varela G, Chinen I, Gadea P. Detección y caracterización de *E. coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev Argent Microbiol.* 2008;40: 93-100.

Agradecimientos.

Agradecemos a la Dirección de Bromatología del municipio de Tafí Viejo, Tucumán.