

Artículo original

Primer aislamiento de *Escherichia coli* no O157 productor de toxina Shiga en carnes bovina y porcina en Venezuela

Lourdes Cardozo^a, Rosa Elena Martínez^{a,*}, Peter Feng^b, Luz Bettina Villalobos^a

^aPostgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente. Núcleo de Sucre, Venezuela. ^bAdministración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA).

Recibido 1 de febrero de 2012; aceptado 21 de junio de 2012

Resumen: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), es un patógeno transmitido por alimentos. El serotipo O157:H7 se considera clínicamente el más importante, pero un 50% de las infecciones por STEC corresponden a serotipos no O157. En Venezuela, la presencia de cepas STEC no O157 en productos cárnicos no ha sido reportada, lo que motivó este trabajo. Se analizaron 70 muestras de carne molida (35 bovinas y 35 porcinas). El aislamiento de *E. coli* se llevó a cabo en agar MacConkey sorbitol, suplementado con cefixima y la identificación bioquímica según pautas de la FDA. Se realizó la extracción del ADN y ensayos de PCR para la identificación de cepas STEC O157:H7 y STEC no O157. De 70 muestras analizadas, 50 (71,4%) resultaron positivas al aislamiento de *E. coli*, lográndose identificar 47 cepas sorbitol positivas y 3 cepas sorbitol negativas. La PCR demostró ausencia de STEC O157:H7 y presencia de STEC no O157 productor de toxina Shiga Stx1 y Stx2 en el 4,3% de las muestras analizadas. Se demuestra, por primera vez en el país, la circulación de cepas STEC no O157 en productos cárnicos, lo que permite sugerir el establecimiento de estrategias de prevención asociadas a este patógeno.

Palabras clave: STEC no O157, PCR, carne bovina, carne porcina, Venezuela.

First isolation of non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in bovine and porcine meats in Venezuela

Abstract: Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) is a food-transmitted pathogen. Serotype O157:H7 is considered the most clinically important, but 50% of STEC infections correspond to non-O157 serotypes. In Venezuela, presence of non-O157 STEC strains in meat products has not been reported, which was the reason for this study. Seventy ground meat samples were analyzed (35 bovine and 35 porcine). *E. coli* isolation was done in MacConkey sorbitol agar, supplemented with cefixim, and the biochemical identification was done according to FDA guidelines. DNA extraction and PCR assays were used for the identification of STEC O157:H7 and not O157 strains. Of the 70 samples analyzed, 50 (71.4%) were positive for *E. coli* isolation, and 47 sorbitol positive and 3 sorbitol negative strains were identified. PCR showed absence of STEC O157:H7 and presence of non-O157 STEC Shiga toxin Stx1 and Stx2 producers in 4.3% of the samples analyzed. This is the first time that the circulation of non-O157 STEC strains in meat products is demonstrated in this country, which suggests that prevention strategies associated to this pathogen should be established.

Keywords: non-O157 STEC, PCR, bovine meat, porcine meat, Venezuela.

* Correspondencia:

E-mail: rosamnazaret@hotmail.com

Introducción

Escherichia coli es un comensal que coloniza el intestino del hombre pocas horas después de su nacimiento y, aunque forma parte de la microbiota normal, existen algunas cepas que pueden ser patógenas, tal como ocurre con las *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC por sus siglas en inglés) [1]. En la actualidad se ha reconocido el carácter patógeno

de estas cepas, su transmisión a través de los alimentos y su responsabilidad en la generación de serias patologías en humanos, como la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (HUS por sus siglas en inglés) [2].

El serotipo STEC O157:H7, ha sido el más frecuentemente implicado en brotes de enfermedades de origen alimentario en todo el mundo. Su principal fuente de transmisión, son los alimentos o aguas contaminadas [3-5]. Sin embargo,

alrededor de 250 nuevos serotipos de STEC no O157, han sido aislados e identificados alrededor del mundo, con una frecuencia mayor que las cepas O157:H7 [6].

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos, pueden producir una o más citotoxinas que forman parte de la familia de las toxinas Shiga (Stxs). Estas citotoxinas tipo 1 (Stx1) y/o tipo 2 (Stx2), son el principal mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 junto con otros factores de virulencia. Sin embargo, otros 200 serotipos de STEC no O157 también han sido identificados como productores de estas toxinas, en forma conjunta o separada (Stx1 y/o Stx2) y han estado involucrados en enfermedades diarreicas en humanos, e incluso en cuadros de HUS [7]. Numerosos estudios han demostrado que la mayoría de los serotipos de STEC no O157, se encuentran principalmente en bovinos, cabras, cerdos y pollos, siendo su principal reservorio el intestino del ganado bovino [8-10].

La detección de cepas STEC y factores de virulencia accesorios, es de gran valor clínico y epidemiológico al momento de evaluar muestras de heces o alimentos contaminados. Sin embargo, el diagnóstico de estas cepas por el método de cultivo convencional presenta algunas dificultades. El serotipo O157:H7 es en general, sorbitol y β -glucuronidasa negativos, en cambio las cepas no O157, no muestran estos mismos marcadores bioquímicos, ya que han demostrado ser sorbitol y β -glucuronidasa positivos o negativos [5]. Estas dificultades han sido minimizadas mediante la combinación de procedimientos bacteriológicos y métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), considerada una alternativa altamente satisfactoria para la detección de las STEC no O157 [11-15].

STEC no O157, como patógeno de transmisión por alimentos, capaz de causar enfermedades severas y potencialmente fatales para el hombre, es en la actualidad un tema de discusión amplia a nivel mundial, debido a su potencial patogénico y a los brotes que se han venido describiendo en Asia, Sudafrica, Australia, Europa y en países suramericanos como Brasil y Argentina [6,9].

En Estados Unidos, el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) calcula que las STEC son la causa de aproximadamente 73.000 casos de enfermedad, 2.000 hospitalizaciones y 50 a 60 muertes cada año y, que, la prevalencia de STEC no O157 probablemente está subestimada, debido a que la mayoría de los laboratorios rutinariamente no realizan exámenes para detectar estos serotipos. En Europa continental, Latinoamérica y Australia, algunas evidencias sugieren que las infecciones por *E. coli* no O157 pueden ser más habituales en los humanos que la *E. coli* O157:H7 [16].

En Venezuela, son pocos los registros estadísticos y epidemiológicos sobre cepas STEC. Sólo se conocen tres trabajos que hacen referencia a la existencia de éstos, el primero de Bravo y Villalobos [17], quienes determinaron la presencia de *E. coli* enterohemorrágica, en carne molida y chorizos procedentes del mercado municipal de Cumaná,

estado Sucre, reportando la presencia del serotipo O157:H7 en un 3,1%. El segundo de Narváez y col. [18], donde reportan en muestras de heces de ganado bovino en el municipio Miranda, estado Zulia, el serotipo O157:H7 en un porcentaje de 1,9% y el tercero por Villalobos y col. [7], donde confirman una incidencia del 10% de STEC no O157, productoras de toxina Shiga tipo 1, en niños con cuadros diarreicos que acudieron a un ambulatorio en la ciudad de Cumaná.

La presencia de cepas STEC no O157 en alimentos aún no ha sido reportada en nuestro país, lo cual motivó la realización de este trabajo para investigar su presencia en carnes bovina y porcina expandidas en diferentes puntos de ventas del mercado municipal de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Materiales y métodos

Procesamiento de las muestras, aislamiento e identificación de E. coli: Se realizó un muestreo al azar de 35 carnicerías que operan en un mercado popular ubicado en la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Las carnicerías muestreadas presentaron como características: el no mantenimiento de la cadena de frío, poca higiene en los utensilios de cortar las carnes y las maquinas de moler. De cada carnicería se colectaron dos muestras de carne molida de 250 gramos cada una, de carne bovina y de carne porcina, para un total de 70 muestras (35 de carne bovina y 35 de carne porcina). Se tomaron 25 gramos de cada muestra por separado y fueron sometidos a un enriquecimiento previo en 225 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón suplementado con 30 μ g de cefixima (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA). Los caldos fueron incubados a 37 °C por 24 horas, se sembraron por estrías en superficie en placas de agar MacConkey sorbitol (Becton Dickinson) suplementado con cefixima [4,9]. Se incubaron a 37 °C por 24 horas, y se tomaron colonias fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol de cada muestra analizada. Cada colonia fue identificada como *E. coli* aplicando pruebas IMVIC (indol, rojo de metilo/Voges Proskauer, citrato) y fermentación de azúcares en el medio agar hierro triple azúcar (Merck) [19]. Las cepas aisladas e identificadas, fueron guardadas hasta el momento de la extracción del ADN genómico, a una temperatura de 20 °C, en agar conservación, medio a base de triptona, extracto de carne y agar agar.

Extracción de ADN: Para la extracción del ADN, las cepas identificadas como *E. coli*, se reconstituyeron en agar nutritivo por un período de 18 horas. Se tomaron 5 colonias y se obtuvo el ADN total de cada una de ellas, por el procedimiento estándar de extracción por lisis [20]. Esta extracción se le realizó también a cepas de *E. coli* certificadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos [21], CVCM 417 (*E. coli* O157:H7), CVCM (*E. coli* Stx₁⁺ y Stx₂⁺), CVCM 765 (*E. coli* Stx₁⁻ y Stx₂⁻), las cuales sirvieron de controles positivos y negativos respectivamente, para la presencia del gen que codifica la

producción de toxina Shiga.

PCR y condiciones de amplificación: Se llevaron a cabo dos ensayos de PCR. El primero, para descartar la presencia de cepas STEC O157:H7. Como secuencia molde para la síntesis de los oligonucleótidos se tomó la descrita por Leotta y col. [9], específica para amplificar el gen que codifica para el antígeno O157 (*rfbO157*) (Tabla 1). El segundo ensayo fue desarrollado para la detección de cepas de STEC no O157. Para ello se utilizaron oligonucleótidos que detectan ambas toxinas, la *Stx*₁ y la *Stx*₂. Como molde para la síntesis de estos oligonucleótidos se tomaron en consideración las secuencias utilizadas y descritas por Monday *et al.* [14].

positiva se aislaron 1 o 2 colonias, dependiendo si solo hubo crecimiento de colonias sorbitol positiva, sorbitol negativa ó ambos tipos de colonias. La evaluación macroscópica de las colonias desarrolladas arrojó como resultado 47 cepas fermentadoras de sorbitol (30 procedentes de la carne de res y 17 de la carne de cerdo) y 3 cepas no fermentadoras de sorbitol, aisladas de muestras de carne de cerdo.

La capacidad de no fermentación del sorbitol como marcador fenotípico, era la primera característica con base en la cual se hacía la preselección de cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga cultivadas en agar MacConkey sorbitol [22-23]. En la actualidad, se sabe que éste no es un marcador fenotípico confiable, ya que se ha demostrado

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores en la técnica de PCR para la detección del gen *rfbO157* y el gen que codifica la expresión de la toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*).

Oligonucleotidos	Secuencia	Tamaño de la banda	Ref. bibliográfica
O157a O157b	CGGACATCC ATGTGATATGG TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259 pb	Leotta y col. (2005)
<i>stx1/stx2</i>	<i>Stx1</i> ^b . 5' CTGGATTTAATGTCGCATAGTGG <i>Stx2</i> ^b . 5' CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTG	313bp	Monday et al. (2006)
<i>SRM129</i>	SRM ^b . TGATGATGACAAATTCAGTATAACTGCCAC		

b: Mezcla de estos oligonucleótidos permiten la detección de *Stx1* y *Stx2*.

Cada ensayo fue desarrollado en un volumen total de 50 µL de mezcla de reacción que contenía buffer *Taq* polimerasa 1X (QIAGEN, Valencia, CA), 3 mM MgCl₂, 400 µM de desoxinucleotidos trifosfatos, 200 nM de cada primer, 5 µL de ADN, y 2.5 U de *Taq* polimerasa (HotStarTaq QIAGEN). Las condiciones de amplificación para el *rfbO157* fueron: 94 °C por 5 minutos para la desnaturalización, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg y 72 °C por 2 min y una extensión final a 72 °C por 5 min. Para los genes que codifican las toxinas Shiga (*Stx*₁ y *Stx*₂), las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 15 minutos para la desnaturalización inicial, 10 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 65 °C por 20 segundos y 72 °C por 30, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos 60 °C por 20 segundos, 72 °C por 30 segundos y un paso de extensión final de 72 °C por 7 minutos. Los ensayos de PCR fueron realizados en un termociclador Gene Amp Perkin-Elmer Applied Biosystems 9700, USA, y los productos de la PCR fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio al 5%, y corridos a 80 voltios por 1 hora y 30 min. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1.500 pb (Promega, USA) y los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el sistema de fotodocumentación modelo Gel Doc (BioRad, USA).

Resultados y discusión

De un total de setenta muestras de carne molida evaluadas (35 de res y 35 de cerdo), 50 (71,4%) mostraron positividad al aislamiento e identificación de *E. coli*. En función de la capacidad de fermentación o no del sorbitol, de cada muestra

que no todas las cepas de *E. coli* productoras de toxinas shiga, poseen esta característica bioquímica distintiva. Así lo han demostrado varios estudios realizados [5,7,9], donde se evidencian que aparte del serotipo STEC O157:H7, no fermentadora de sorbitol, otros serotipos de STEC, son capaces de fermentarlo, producir o no el HUS. Estos serotipos han sido reconocidos como STEC no O157, y están, en la generalidad de los casos, asociadas con cuadros de diarrea y enterocolitis y, la mayoría de sus serotipos, se encuentran principalmente en bovinos, cabras, cerdos y pollos, siendo el principal reservorio el intestino delgado del ganado bovino [9,10]. En consecuencia, en esta investigación, no se descartaron las cepas de *E. coli* fermentadoras de sorbitol como sospechosas de STEC.

Las cepas *E. coli* sorbitol positivas y sorbitol negativas aisladas e identificadas mediante cultivo, fueron sometidas a ensayos de PCR una vez obtenido el ADN genómico. Un primer ensayo fue realizado para descartar la posible presencia de la cepa STEC O157:H7. La corrida electroforética de los productos de amplificación por PCR, demostró ausencia de amplificación de secuencias específicas del gen que codifica para el antígeno O157 (*rfbO157*) característico del serotipo O157:H7, indicando la ausencia de este patógeno en las muestras de carne molida de res y porcina evaluadas.

El segundo ensayo de PCR reveló que la combinación de los oligonucleótidos (*Stx1*/SRM129, *Stx2*/SRM129), es aplicable en el diseño de esta técnica molecular para la detección de cepas STEC en productos cárnicos. La corrida electroforética de los productos amplificados por PCR, mostraron que al igual que el control positivo (línea 3), la

cepa 2 (línea 5), cepa 6 (línea 9) y cepa 9 (línea 12), fueron confirmados por producir ambas toxinas Stx (tipo 1 y tipo 2), por los productos específicos de 313 bp observados en el gel de agarosa (Figura 1). Estos resultados, permiten confirmar que de un total de 50 muestras positivas al aislamiento e identificación de *E. coli*, solo 3 muestras (4,3%) (2 de carne bovina y 1 de porcina), mostraron contaminación por STEC no O157.



Figura 1. Productos de amplificación por PCR con los primers *stx1*, *stx2* y *SRM129*, para la detección del gen *stx* en las *E. coli* aisladas de carne molida bovina y porcina. Línea 1: marcador lambda. Línea 2: control negativo *E. coli stx₁⁻ y stx₂⁻*. Línea 3: control positivo *E. coli stx₁⁺ y stx₂⁺*. Líneas 5, 9: cepas STEC no O157 aisladas de carne molida bovina. Línea 12: cepa STEC no-O157 aislada de carne molida porcina. Líneas 4, 6, 7, 8, 10, 11: muestras negativas.

El porcentaje de detección hallado en este estudio, no coincide con los reportados por Blanco *et al.* [24] y Jure y col. [25], quienes detectaron 12% de STEC no O157 en muestras de carne cruda en España y 13,2% en carne molida fresca en Argentina, respectivamente.

No obstante, este bajo porcentaje de detección es significativo para nuestro país, ya que deja en evidencia que cepas de STEC productor de toxina Shiga Stx1 y Stx2, están circulando en productos cárnicos tales como la carne molida bovina y porcina, y además abre la posibilidad de que la población venezolana y en especial la de la ciudad de Cumaná, estén expuestas a contraer infecciones por este microorganismo, lo que puede representar un riesgo, ya que se ha demostrado que este patógeno tiene una baja dosis infectiva. Sólo 100 bacterias pueden producir la infección conllevando a cuadros de diarrea, enterocolitis o producir complicaciones como HUS, en niños, ancianos o poblaciones inmunocomprometidas [5,26].

Aunque en Venezuela, en la mayoría de los casos, no se exige el cumplimiento de normas de control de calidad por parte de expendios de productos cárnicos, y en especial de aquellos destinados al sector popular, el reporte de circulación de cepas STEC no O157 productoras de toxina Shiga 1 y 2 en carne de res y porcina, permite sugerir la necesidad de implementar un sistema de monitoreo y vigilancia de estos productos, tanto los de origen nacional como los que ingresan por importación, ya que está claramente establecido en la epidemiología de esta bacteria, que los mecanismos de transmisión están relacionados con el consumo de carne bovina, porcina o productos lácteos contaminados, bien sea en el mismo momento del sacrificio del animal en el matadero o por la manipulación

inapropiada por parte de los expendedores de los distintos puntos de ventas de estos productos, y en especial, los asociados a los mercados populares [27]. Además se debe reforzar la necesidad de realizar futuros estudios sobre otros genes asociados a la patogénesis de las STEC, dado que la heterogeneidad genética entre los subtipos y factores de virulencia, pueden generar diferencias en la patogenicidad de diferentes poblaciones de STEC, en humanos.

Conclusiones

La carne molida bovina y porcina que se expende en el Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná, Venezuela, mostraron baja contaminación por STEC no O157.

Las cepas identificadas como STEC no O157 resultaron ser sorbitol positivas, lo que evidencia la respuesta variable de estas cepas ante la prueba de fermentación de sorbitol.

Referencias

- Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 2002; 44:464-75.
- Fratamico P, Bagi L, Bush E, Solow B. Prevalence and characterization of Shigatoxin producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the national animal health monitoring system swine 2000 study. Appl Environ Microbiol. 2004; 70:7173-8.
- Ohara T, Kojio S, Taneike I, Nakagawa S, Gondaira F, Tamura Y *et al.* Effects of azithromycin on Shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:3478-83.
- Zhou Z, Nishikawa Y, Zhu P, Hong S, Hase A, Cheasty T *et al.* Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork and cattle fecal samples in Changehun, China. J Vet Med Sci. 2002; 64:1041-4.
- Gómez D, Miliwebsky E, Silva A, Deza N, Zotta C, Cotella O y col. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un brote de gastroenteritis en un jardín maternal de la ciudad de Mar del Plata. Rev Argent Microbiol. 2005; 37:176-81.
- Eklund M, Scheutz F, Siitonen A. Clinical isolates of non-O157 Shigatoxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. J Clin Microbiol. 2001; 39:2829-34.
- Villalobos L, Martínez R, Blanco A, Maldonado A, Bastardo J. Detección molecular de *Escherichia coli* productor de Shiga toxina (Stx1) y rotavirus en heces de niños con diarrea. Invest Clin. 2008; 49:387-95.
- Brooks J, Sowers E, Wells J, Greene K, Griffin P, Hoekstra R. Non-O157 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis. 2005; 192:1422-9.
- Leotta I, Chinen S, Epszteyn E, Miliwebsky I, Melamed M, Motter M y col. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga. Rev Argent Microbiol. 2005; 37:1-10.
- Marzocca M, Marucci P, Sica M, Álvarez E. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y

- hamburguesas congeladas. Rev Argent Microbiol. 2006; 38:38-40.
11. Paton A, Paton J. Direct detection and characterization of Shigatoxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx*, *stx*, *eae*, *ehxA* and *saa*. J Clin Microbiol. 2002; 40:271-4
 12. Heller L, Davis R, Peak K, Wingfield D, Cannons P, Cattani J. Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. Appl Environ Microbiol 2003; 69:1844-6.
 13. Shima K, Terajima J, Sato T, Nishimura K, Tamura K, Watanabe H *et al.* Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for the epidemiological analysis of Shigatoxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 2004; 42:5205-13.
 14. Monday S, Keys C, Hanson P, Shen Y, Whittam T, Feng P. Produce isolates of *Escherichia coli* Ont:H52 serotype that carry both Shigatoxin 1 and stable toxin genes. Appl Environ Microbiol. 2006; 72:3062-5.
 15. Monday S, Beisaw A, Feng P. Identification of Shigatoxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. Mol Cell Probes. 2007; 21:308-11.
 16. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. 2008. Division of Foodborne, Bacterial and Mycotic Diseases [DFBMD]. *Escherichia coli* [online]. En: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html. Acceso 24 de mayo de 2012.
 17. Bravo V, Villalobos L. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2002; 22:119-21.
 18. Narváez C, Carruyo G, Moreno M, Rodas A, Hoet A, Wittum T. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. Rev Cient. 2007; 17:239-45.
 19. Food and Drug Administration (FDA). Manual of operations. Part I. US. Dept of health and human services. Washington, D.C. USA. 1992.
 20. Rivas M, Leotta G, Chinen I. Manual de procedimientos diagnósticos y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 2007.
 21. Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. 1996.
 22. March S, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J Clin Microbiol. 1986; 23:869:72.
 23. Bielaszewska M, Schmidt H, Karmali M, Khakhria R, Janda J, Blahova K *et al.* Isolation and characterization of sorbitol-fermenting Shigatoxin-producing *Escherichia coli* O157H strains in the Czech Republic. J Clin Microbiol. 1998; 36:2135-7.
 24. Blanco P, Kruger A, Blanco J, Gonzalez E, Dahbi G, Mora A *et al.* Virulence genes and intimin types of shiga-toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. Int Microbiol. 2004; 7:269-76.
 25. Jure A, Condorí S, Leotta G, Chinen I, Miliwebsky E, Allori C y col. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán. Rev Argent Microbiol. 2010; 42:284-7.
 26. Rivero M, Padola N, Etcheverría A, Parma A. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. Medicina (B Aires) 2004; 64:352-6.
 27. Cicuta M, Deza N, Roibón W, Pereyra D, Benitez M, Arzú R y col. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. Rev Vet. 2006; 17:20-5.