



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencias Veterinarias

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN INTRALABORATORIO DE UNA METODOLOGÍA
PARA LA DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE
TOXINA SHIGA EN CARNE BOVINA MOLIDA. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS
DE CONTROL.**

AUTOR: BRUSA, Victoria

DIRECTOR: LEOTTA, Gerardo Aníbal

LUGAR DE TRABAJO

Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional de La Plata.

**Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET, FCV-
UNLP-CONICET).**

2015

A Fran y a Rosarito, por su amor desmedido

AGRADECIMIENTOS

Casi sin darme cuenta llegó el momento de dar las gracias a todas las personas e instituciones, que con su colaboración y acompañamiento profesional y personal, permitieron la realización de esta tesis. Sin dudas este trabajo es el resultado de un esfuerzo colectivo.

Quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata por haberme brindado el espacio físico donde llevar adelante este trabajo.

A Gerardo, quiero darle las gracias porque un día me preguntó qué pensaba hacer de mi “futuro artístico”, e inmediatamente me abrió la puerta del mundo de la investigación. Por confiar en mí y acompañarme incansablemente. Por demostrarme que lo que parece imposible solo requiere un poco más de trabajo, y que siempre es más fácil si se hace en grupo.

Para mis amigos del LaMA: Lu, Ale, Magui, Ema, Juli y Lucho, tengo solo palabras de agradecimiento. Por los interminables días compartidos picando colonias hasta quedar con los ojos mareados, llegando incluso a pensar que era posible la generación espontánea de las placas. Les agradezco por las charlas, sobre todo por aquellas que nada tenían que ver con el trabajo. Le agradezco a Ema, por haber participado activamente de los muestreos en las carnicerías y de las capacitaciones para manipuladores. Quiero darle las gracias a Lu, por su buena predisposición para esclarecer mis dudas, casi siempre interrumpiendo su trabajo. También quiero expresar mi enorme agradecimiento a Ale y a Magui por su ayuda invaluable con PFGE.

A Julio Copes y a mis compañeros de la Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos, les agradezco el lugar que me dieron donde desarrollar esta Tesis. A Cristian Adriani, le agradezco por toda la colaboración y buena predisposición brindada desde la Municipalidad de Berisso, para que pudiera llevarse a cabo cada muestreo y cada capacitación. Quiero también agradecerle al Dr. Pablo Piñeyro por su aporte con el análisis estadístico del Capítulo I, y a la Ing. María Inés Urrutia que me guió con el análisis del Capítulo III. Al grupo de trabajo a cargo de la Dra. Nora Lía Padola quiero agradecerle haber realizado la serotipificación de los aislamientos, y al Dr. Juan Pedro Lirón por su aporte bioinformático.

A mi mamá y mi papá, les agradezco mi casa llena de amor y libertad, y su apoyo incondicional, que mucho tienen que ver con lo que soy hoy. Como no darle las gracias a Muni, por su aguante de hermana once años menor que siempre me dejó ponerme a la par. Si dos papás son buenos cuatro son aún mejor, por eso les agradezco a Cris y a Ale. Un abrazo eterno y un agradecimiento infinito para Coqui y Buba, por mi infancia increíblemente feliz. A mis amigas quiero decirles gracias por estar siempre con hombros y oídos listos.

Finalmente, un GRACIAS gigante para las personas a las que dedico esta Tesis, por haber gastado a cuenta parte del tiempo que les pertenecía. A Fran, quiero agradecerle por hacerme infinitamente feliz, y especialmente por bancarme siempre con la paciencia intacta y la comida caliente. Sin duda el agradecimiento más profundo y eterno es para Rosarito, por enseñarme que se puede rebalsar de amor, y porque su paz fue fundamental para que pudiera terminar de escribir esta Tesis.

**CITAS BIBLIOGRÁFICAS CORRESPONDIENTES A LAS PUBLICACIONES
PARCIALES DEL TRABAJO DE TESIS**

- Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, Sanz M, Etcheverría A, Padola NL, Galli L, Peral García P, Copes J, Leotta GA. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2:171. ISSN 2235-2988.
- Development and validation of two SYBR green PCR assays and a multiplex real-time PCR for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat. Brusa V, Galli L, Linares LH, Ortega EE, Lirón JP, Leotta GA. *Journal of Microbiological Methods*. 26; 119: 10-17. ISSN 0167-7012.
- Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from ground beef using multiple combinations of enrichment broths and selective agars. Brusa V, Piñeyro PE, Galli L, Linares LH, Ortega EE, Padola NL, Leotta GA. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13; 3. ISSN 1535-3141.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMEN.....	16
SUMMARY.....	18
1. INTRODUCCIÓN.....	20
1.1 - Enfermedades Transmitidas por Alimentos.....	20
1.2.- <i>Escherichia coli</i>	25
1.3.- <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga	27
1.4.- Seropatotipos de <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga.....	29
1.5.- Factores de virulencia y patogénesis.....	33
1.6.- Manifestaciones clínicas de la infección por STEC.....	42
1.7.- <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga a nivel mundial.....	46
1.8.- Situación actual en la Argentina.....	48
1.9.- Reservorios, fuentes de infección y vías de transmisión.....	50
1.10.- Legislación alimentaria sobre STEC.....	55
1.11.- Detección y aislamiento de STEC en alimentos. Protocolos Internacionales Estandarizados.....	60
2. OBJETIVOS.....	65
2.1.- Objetivo general.....	65
2.2.- Objetivos específicos.....	65
CAPÍTULO I.....	68
RESUMEN.....	68
1.- MATERIALES Y METODOS.....	70

1.1 - Evaluación de diferentes medios y condiciones de cultivo para el enriquecimiento de STEC no-O157.....	70
A - Muestras de carne bovina molida.....	70
B - Cepas bacterianas.....	70
C - Protocolo de contaminación.....	71
D - Protocolos de enriquecimiento.....	73
1.2 - Evaluación de medios y condiciones de cultivo para el aislamiento de STEC no-O157.....	73
1.3 - Análisis estadístico.....	75
2.- RESULTADOS.....	78
3.- DISCUSIÓN.....	79
4.- CONCLUSIONES PARCIALES.....	83
 CAPÍTULO II.....	 84
RESUMEN.....	84
1. - MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
1.1 - Cepas bacterianas.....	87
1.2 - Diseño de oligonucleótidos cebadores y sondas.....	87
1.3 - Extracción de ADN.....	88
1.4.- Validación de PCR SYBR-Green.....	88
1.5 - Validación de la PCR tiempo real.....	91
2.- RESULTADOS.....	94
2.1.- Rendimiento de PCR-SYBR.....	94
2.2 - Rendimiento de PCR-TR.....	94
3. - DISCUSIÓN.....	97
4. - CONCLUSIONES PARCIALES.....	100

CAPÍTULO III.....	102
RESUMEN.....	102
1. - MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
1.1 - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso y determinación de la contaminación por STEC.....	108
A - Toma de muestra.....	109
B - Detección y aislamiento de STEC O157:H7.....	110
C - Detección y aislamiento de STEC no-O157.....	112
1.2 - Diseño y aplicación de estrategias de mejora en las carnicerías y de información a la comunidad de la ciudad de Berisso.....	113
A - Realización de un ciclo de capacitaciones grupales para carniceros con base en los resultados obtenidos.....	113
B - Realización de un ciclo de capacitaciones individuales en cada carnicería con base en los resultados obtenidos.....	114
C - Implementación de una estrategia para informar a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA.....	114
1.3 - Verificación del éxito de las estrategias de mejora implementadas.....	115
A - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso.....	116
B - Toma de muestra.....	116
C - Detección y aislamiento de STEC O157:H7.....	116
D - Detección y aislamiento de STEC no-O157.....	116
E - Análisis estadístico.....	117
F - Caracterización de los aislamientos de STEC O157 y no-O157 mediante técnicas fenotípicas y genotípicas.....	117
F.1 - Caracterización fenotípica de los aislamientos.....	117

F.2 - Caracterización genotípica de las cepas STEC.....	119
F.3 - Subtipificación molecular de las cepas STEC.....	120
2.- RESULTADOS.....	123
2.1 - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso y determinación de la contaminación por STEC durante el período de estudio 2010-2011.....	123
A - Cuantificación del riesgo.....	123
B - Detección y aislamiento de STEC O157.....	124
C - Detección y aislamiento de STEC no-O157.....	125
2.2 - Diseño y aplicación de estrategias de mejora en las carnicerías de la ciudad de Berisso.....	126
A - Realización de un ciclo de capacitaciones grupales para carniceros con base en los resultados obtenidos.....	126
B - Realización de un ciclo de capacitaciones individuales en cada carnicería con base en los resultados obtenidos.....	128
C - Implementación de una estrategia para informar a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA.....	128
2.3 - Verificación del éxito de las estrategias de mejora implementadas.....	129
A - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso.....	129
B - Detección y aislamiento de STEC O157:H7.....	129
C - Detección y aislamiento de STEC no-O157.....	130
D - Caracterización de los aislamientos de STEC O157 y no-O157 mediante técnicas fenotípicas y genotípicas.....	131
D.1 - Caracterización fenotípica de los aislamientos.....	131
D.2 - Caracterización genotípica de las cepas STEC.....	132

D.3 - Subtipificación molecular de las cepas STEC.....	132
E.- Comparación de los resultados obtenidos durante la etapa descriptiva y la etapa de verificación.....	137
3. – DISCUSIÓN.....	138
4. - CONCLUSIONES PARCIALES.....	163
CONCLUSIONES FINALES.....	168
ANEXO.....	170
TABLAS.....	180
BIBLIOGRAFÍA.....	194

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y destrucción de microvellosidades (attaching and effacing)
ACV	Suplemento de acriflavina, cefsulodina y vancomicina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APB	Agua peptonada bufferada
APBm+p	Agua peptonada bufferada modificada con piruvato
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
ATS	Agar tripticasa de soja
CCC	Caldo cerebro corazón
CDT	Toxina distensora citoletal (cytolethal distending toxin)
CDC	Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)
Ct	Cycle threshold
CTS	Caldo tripticasa de soja
CTSm-8	caldo tripticasa de soja modificado con 8 mg L ⁻¹ de novobiocina y casaminoácidos
CTSm-16	caldo tripticasa de soja modificado con 16 mg L ⁻¹ de novobiocina y casaminoácidos
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (diffuse-adherent <i>E. coli</i>)
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreigénicos (diarrheagenic <i>E. coli</i>)
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativo (enteroaggregative <i>E. coli</i>)

EAST	Toxina estable al calor de <i>E. coli</i> enteroagregativo (enteroaggregative <i>E. coli</i> heat-stable toxin)
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ECm	caldo <i>Escherichia coli</i> modificado
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético (ethylene diamine tetra acetic acid)
EFSA	European Food Safety Authority
EE.UU.	Estados Unidos de Norteamérica
Efa	Factor de <i>E. coli</i> enterohemorrágico para la adherencia-1 (enterohemorrhagic <i>E. coli</i> factor for adherence)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágico (enterohemorrhagic <i>E. coli</i>)
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasivo (enteroinvasive <i>E. coli</i>)
EMB-L	Eosina Azul de Metileno Levine agar
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno (enteropathogenic <i>E. coli</i>)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénico (enterotoxigenic <i>E. coli</i>)
Esp	Proteína de secreción de <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> secreted proteins)
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patógena extraintestinal (extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i>)
FDA	Administración de Alimentos y Drogas de EE.UU. (U.S. Food and Drug Administration)
Gb3	Receptor globotriaosilceramida
H	Antígeno flagelar
HACCP	Análisis de peligros y puntos críticos de control
HeLa	Células en cultivo de tejido provenientes de epitelio uterino
Iha	Adhesina homóloga a IrgA (IrgA homologue adhesin)

K	Antígeno capsular
LEE	Locus de destrucción del enterocito (Locus for Enterocyte Effacement)
Lpf	Fimbria polar larga (long polar fimbriae)
LuSUH	Asociación de lucha contra el Síndrome Urémico Hemolítico
LPS	Lipopolisacárido
MC	agar MacConkey
NM	No móvil
NT	No tipificable
O	Antígeno somático
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONT	Antígeno somático no tipificable
PBS	Solución tamponada de fosfatos (phosphate-buffered saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PCR-SYBR	Reacción en cadena de la polimerasa SYBR-Green
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa Tiempo Real
PFGE	Electroforesis en campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis)
POES	Procedimientos operativos estandarizados de sanitización
RFLP	Fragmentos de restricción de largo polimórfico (restriction fragment length polymorphism)
Saa	Adhesina autoaglutinante de STEC (STEC autoagglutinating adhesin)
SSTT	Sistema de secreción tipo III
STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>)
SUH	Síndrome urémico hemolítico

Stx	Toxina Shiga (Shiga toxin)
TAE	Solución amortiguadora tris-acetato-EDTA
TBE	Solución amortiguadora tris-borato-EDTA
TBX	Tryptone Bile X-Glucoronide agar
Tir	Receptor translocado de intimina (translocated intimin receptor)
Tm	Temperatura de melting
UFC	Unidad formadora de colonia
VT	Verotoxinas (Verotoxins)
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigénico (Verotoxigenic <i>E. coli</i>)
v/v	Volumen en volumen
y col.	y colaboradores

Unidades de medida

°C	Grados centígrados
h	Horas
kDa	KiloDalton
pb	Pares de bases
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ng	Nanogramos
min	Minutos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar

μM	Micromolar
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
v	Voltios

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno asociado a ETA y la carne molida es uno de los alimentos involucrados en su transmisión. El objetivo del trabajo fue disminuir la contaminación con STEC en la carne bovina molida destinada a consumo minorista. El trabajo se desarrollo en tres etapas: 1) evaluación de diferentes medios de cultivo para el enriquecimiento y aislamiento de STEC en carne bovina molida, 2) desarrollo y validación de dos técnicas de tamizaje para la detección de los genes *stx* a partir del caldo de enriquecimiento, y 3) implementación de estrategias de mejora a nivel de boca de expendio minorista utilizando la metodología validada como herramienta analítica de verificación.

Se identificó la combinación más efectiva entre cuatro caldos de enriquecimiento selectivo y tres agares de cultivo para el aislamiento de todos los serogrupos de STEC en carne bovina molida. El enriquecimiento en caldo tripticasa de soya con 8 mg L⁻¹ de novobiocina y en caldo *Escherichia coli* modificado seguidos por el aislamiento en agar MacConkey fueron las combinaciones más efectivas.

Se desarrollaron y validaron dos PCR SYBR Green y una PCR tiempo real múltiple para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂. Todas las PCR obtuvieron un límite de detección de 1×10² UFC mL⁻¹ y 100% de inclusividad y exclusividad.

La metodología validada fue utilizada para determinar la frecuencia de STEC en carne bovina molida y ambiente de las carnicerías de Berisso, como instrumento para mejorar su calidad higiénico-sanitaria. El trabajo se desarrollo en tres etapas: **I) 2010-2011:** se cuantificó el riesgo en 110 carnicerías, 55 (50,0%) presentaron riesgo alto, 43 (39,0%) riesgo moderado y 12 (11%) riesgo bajo. **II) 2012:** se diseñó e implementó un plan de acciones de mejora para las 110 carnicerías y 500

carniceros. Se capacitaron los docentes de los 26 jardines de infantes de Berisso y se entregó información a 4506 niños de 3 a 5 años. **III) 2013:** Se verificó el éxito de las acciones de mejora en 86 carnicerías, de las cuales 19 (22,1%) presentaron riesgo alto, 42 (48,8%) riesgo moderado y 25 (29,1%) riesgo bajo. Al comparar los resultados de la primera etapa de muestreo (2010-2011) y la verificación (2013) se demostraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) respecto de las carnicerías cuantificadas de riesgo alto y bajo, y de muestras positivas al tamizaje para STEC O157 y no-O157.

Se aislaron 25 cepas de STEC O157:H7, 20 en la etapa I y 5 en la etapa II, las cuales fueron portadoras de los genes *rfb*_{O157}/*stx*₂/*eae*/*ehxA*/*fliC*_{H7}/*efa*/*toxBI*/*iha*, y 14 pertenecieron al clado 8. Por PFGE-*Xba*I se demostró que en la etapa I la presencia de STEC en el ambiente estaba asociada a la contaminación de la carne. Entre las 79 cepas de STEC no-O157 los serotipos más frecuentes fueron O178:H19, O8:H19, O174:H28, ONT:H7 y ONT:H19. Por PFGE-*Xba*I fue posible demostrar que los clones circulantes en varias carnicerías antes de aplicar las acciones de mejora tenían una variable en común: el origen de la carne.

El conocimiento adquirido permitió 1) diseñar y promover acciones de mejora con base en cuantificación de riesgo y resultados analíticos, 2) mejorar la calidad de la carne bovina molida a nivel de boca de expendio con el fin de reducir el impacto de las ETA en los consumidores, y 3) marcar un precedente para el resto de los locales expendedores de alimentos de Berisso y otros municipios de la Argentina.

Palabras clave: *E. coli* O157, STEC no-O157, carne bovina molida, aislamiento, PCR-SYBR, PCR-RT, carnicerías, ambiente, riesgo, control, acciones de mejora.

SUMMARY

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are a foodborne pathogen and ground beef is one of the foods involved in transmitting disease. The aim was to reduce STEC contamination in ground beef of retail stores. This work was divided into three stages: 1) evaluation of different growth media for enrichment and isolation of STEC in ground beef, 2) development and validation of two screening techniques for detection of *stx* genes from enrichment broth, and 3) implementation of strategies for improving the level of retail stores using the methodology validated as an analytical verification tool.

The most effective combination of four selective enrichment broth and three agars culture for isolation of all serogroups of STEC in ground beef was identified. The enrichment in trypticase soy broth with 8 mg L⁻¹ of novobiocin and *Escherichia coli* modified broth, followed by isolation on MacConkey agar were the most effective combinations.

We developed and validated two SYBR Green PCR and real-time multiplex PCR to detect *stx*₁ and *stx*₂ genes. All PCR obtained a detection limit of 1 × 10² CFU mL⁻¹ and 100% of inclusivity and exclusivity.

The methodology validated was used in order to determine the frequency of STEC in ground beef and environment in butchers of the City of Berisso as a tool to improve hygienic and sanitary quality. The work was done in three stages. **I) 2010-2011:** In Stage I the risk of 110 butchereries, 55 (50.0%), 43 (39.0%) and 12 (11%) had high, moderate and low risk, respectively. **II) 2012:** was designed and implemented an action plan for improvement 110 butchers and 500 manipulators. Teacher training for 26 kindergartens of Berisso was conducted, and information was given to 4506

children from 3-5 years. **III) 2013:** verify the success of improvement actions in 86 butchers, of which 19 (22.1%), 42 (48.8%) and 25 (29.1%) were quantified as high, moderate and low risk, respectively. When comparing the results of the first stage of sampling (2010-2011) and verification (2013), highly significant differences ($P < 0.01$) in the number of high and low-risk butchers, and the positive samples for screening of STEC O157 and non-O157, were reported.

Twenty-five STEC O157:H7 strains were isolated, 20 in stage I and 5 stage II, which were carriers of *rfb*_{O157}/*stx*₂/*eae*/*ehxA*/*fliC*_{H7}/*efal*/*toxBI*/*hha* genes, and 14 belonged to clade 8. *Xba*I-PFGE showed that in stage I the presence of STEC in the environment was associated with contamination of meat. Among the 79 strains of STEC non-O157 the most frequent serotypes were: O178:H19, O8:H19, O174:H28, ONT:H7 and ONT:H19. Using PFGE-*Xba*I was possible to demonstrate that circulating clones in several butchers before applying the improvement actions had variable in common: origin of meat.

The knowledge gained allowed 1) design and promote improvement actions based on risk quantification and analytical results, 2) improving the quality of ground beef in butchers in order to reduce the impact of foodborne disease in consumers, and 3) set a precedent for other store of food retail of Berisso and of other cities.

Keywords: *E. coli* O157, *E. coli* non-O157, ground beef, isolation, SYBR-PCR, RT-PCR, butchers, environment, risk, control, improvement actions.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 - Enfermedades Transmitidas por Alimentos

Según la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*) “la Seguridad Alimentaria existe cuando todas las personas tienen acceso en todo momento (ya sea físico, social y económico) a alimentos suficientes, seguros y nutritivos para cubrir sus necesidades nutricionales y las preferencias culturales para una vida sana y activa”. Esta definición plantea cuatro dimensiones primordiales de la seguridad alimentaria: la “disponibilidad física” de los alimentos, es decir la oferta en función de la producción y el comercio; el “acceso” a los alimentos, que requiere el diseño de políticas específicas orientadas en este sentido para garantizar la seguridad alimentaria a nivel de los hogares; la “utilización” de los alimentos, considerando que la ingesta de energía y nutrientes suficientes es el resultado de las buenas prácticas de salud y alimentación, de la correcta preparación de los alimentos, de la diversidad de la dieta y de la buena distribución de los alimentos dentro de los hogares; y la “estabilidad” en el tiempo de las tres dimensiones anteriores (FAO, 2011).

En el siglo XIX, el médico y patólogo alemán Rudolph Virchow, afirmaba que: “No existe ni debería existir línea divisoria entre la medicina humana y la animal”, proponiendo una visión integradora. Dado que más de la mitad de los patógenos que afectan al ser humano provienen de los animales, desde 2010, la FAO, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, *Office International des Epizooties*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se han unido bajo el concepto “una sola salud”, con el objetivo de gestionar los riesgos sanitarios en la interfaz hombre-

animal-medio ambiente, abarcando dentro de este concepto toda la cadena de producción de alimentos “de la granja a la mesa”.

La OMS define a las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) como: “El conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o productos alimenticios que contengan agentes biológicos o sustancias tóxicas en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de un grupo de personas”. Según la FAO, en 2013, se produjeron 3.708 millones de toneladas de alimentos para alimentación humana y animal (308 millones de toneladas de carne, 780 millones de toneladas de leche, 160 millones de toneladas de pescado y 2460 millones de toneladas de cereales). El desarrollo de nuevos productos alimenticios y nuevas tecnologías de procesamiento, el uso cada vez más difundido de sistemas de distribución rápida de alimentos, los cambios de hábitos y tendencias de consumo, la existencia de poblaciones especialmente susceptibles, como así también los cambios en las poblaciones microbianas, representan factores de riesgo desde el punto de vista de las ETA. Los sistemas tradicionales que controlan la inocuidad de los alimentos se basan en definiciones legales de alimentos no aptos, y en programas de cumplimiento de normas para retirar del mercado estos alimentos y sancionar a las partes responsables una vez que el problema fue detectado. La inspección tradicional es una fotografía instantánea de lo que ocurre en el establecimiento elaborador en el momento en el que se efectúa la inspección. En cambio, la inspección basada en el riesgo establece la premisa de que si se llevan a cabo todas las medidas de control necesarias, que por definición controlan todos los factores de riesgo de ETA asociados a un producto (contaminación cruzada, alimentos provenientes de fuentes

no inocuas, cocción inadecuada, temperatura de pasteurización insuficiente, equipos contaminados, falta de aseo personal, estado de salud de la persona que manipula los alimentos, calidad del agua, plagas), los riesgos se reducen al mínimo (FAO, 2008). Cuando el sistema de control de los alimentos se utiliza en todo momento y los productos son sistemáticamente inocuos, el muestreo se efectuará sólo con fines de verificación y no como una forma de garantizar la inocuidad. Para lograr el control y prevención de las ETA es fundamental la implementación de buenas prácticas agrícolas, buenas prácticas de manufactura (BPM) y procedimientos operativos estandarizados de sanitización (POES), a fin de adoptar un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, *Hazard Analysis and Critical Control Points*) y si es posible un sistema de gestión de calidad certificada. Fundamentadas en las recomendaciones de la Organización Mundial del Comercio y del Codex *Alimentarius*, las autoridades sanitarias de varios países comenzaron implementar procedimientos de la inspección oficial que utilizan los principios del HACCP contemplando los siguientes aspectos: la inspección de los procesos de producción; el desarrollo de diligencias para comprobar la veracidad de las informaciones obtenidas durante la inspección; la aplicación de cálculos matemáticos para asegurar que aditivos, coadyuvantes tecnológicos, parámetros de controles de puntos críticos, entre otros, están siendo utilizados de acuerdo con los límites de la legislación; la evaluación de resultados microbiológicos y físico-químicos de muestras de los productos; la revisión de los registros; y el análisis de lo encontrado en la inspección, de las informaciones obtenidas a través de los variados procedimientos ejecutados y el juicio final. Las planillas que se utilizan incluyen anotaciones claves para la ejecución de las actividades de auditoría. Generalmente

elaboradas bajo la forma de un formulario, cuestionario o planilla, estas listas son recordatorios para que el inspector siga una secuencia organizada de observaciones durante la ejecución de la auditoría (HACCP: Instrumento Esencial para la Inocuidad de Alimentos OPS/OMS).

La mejora en los sistemas de vigilancia y la pronta detección de los brotes de ETA se han establecido en todo el mundo como un objetivo fundamental en el área de salud pública (Gruber y col., 2015). La emergencia y reemergencia de enfermedades asociadas a los alimentos motivaron la revalorización del concepto “una sola salud”. El Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) trabaja en conjunto con médicos, ecologistas y veterinarios para supervisar y controlar las amenazas para la salud pública. El desarrollo de estrategias de prevención y control requiere un trabajo colaborativo entre el campo de la medicina humana y veterinaria, los organismos reguladores de la producción, la industria alimentaria, los sistemas de vigilancia epidemiológica y el desarrollo de redes de laboratorios y de informática, y sobre todo la educación de la comunidad sobre la seguridad alimentaria.

Según la OMS, las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados, como en los países en vías de desarrollo. Esta organización estima que cada año se producen 1.700 millones de episodios de diarrea que ocasionan enfermedad en 76 millones de personas, y provocan 3 millones de muertes en menores de 5 años. Se considera que, dependiendo de los países, del 15 al 70% de los casos son causados por alimentos que sufrieron contaminación biológica (OMS, 1997b). Según el CDC, en Estados Unidos (EE.UU) 1 de cada 6 personas sufre alguna ETA anualmente, que se traduce

en 48 millones de casos, 120.000 hospitalizaciones y 3000 muertes, con un costo para el sistema de salud que asciende los 16,5 billones de dolares por año. Estos datos comprenden los casos ocasionados por “agentes conocidos productores de ETA” y por “agentes inespecíficos productores de ETA”. Se estima que los agentes conocidos causan 9,4 millones de casos de enfermedad, 55.961 hospitalizaciones, y 1.351 muertes. Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, *United State Department of Agriculture*), los microorganismos patógenos que representan el mayor costo económico en EE.UU son: *Salmonella* (no tifoidea), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) O157 y no-O157, *Vibrio* (todas las especies no *cholera*), *Shigella*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* y Norovirus. Son considerados agentes inespecíficos productores de ETA: los agentes conocidos de los cuales no se cuenta con suficientes datos para estimar su incidencia, los agentes aún no reconocidos como productores de ETA, los microorganismos, productos químicos y otras sustancias que se reconocen pueden estar presentes en los alimentos pero cuya capacidad para producir enfermedad aun no fue comprobada, y los agentes aun no descriptos. Este grupo de agentes producen aproximadamente 38,4 millones de casos de enfermedad, 71.878 hospitalizaciones, y 1.686 muertes anualmente.

En la actualidad se reconocen más de 250 ETA cuya causa puede ser tóxica, infecciosa o toxo-infecciosa. Las intoxicaciones se producen como consecuencia de la ingestión de toxinas producidas por bacterias (*Staphylococcus aureus*, *C. botulinum*, *Bacillus cereus*), hongos (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp.), plantas o animales. Estas toxinas son sustancias de naturaleza generalmente

proteica que liberan los organismos durante su desarrollo, o compuestos químicos (plaguicidas, metales pesados, aditivos alimentarios, antibióticos, hormonas) que se incorporan a los alimentos en forma accidental o intencional, desde su producción hasta su consumo. Las ETA de origen infeccioso son aquellas que se producen cuando se ingieren alimentos que contienen patógenos vivos, como por ejemplo *Salmonella* spp., que se adhieren e invaden la mucosa intestinal. Por último, las ETA toxo-infecciosas se producen por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos vivos que se adhieren, colonizan e invaden la mucosa intestinal, produciendo exotoxinas. El síndrome urémico hemolítico (SUH) causado por STEC o la enteritis causada por *C. perfringens* son ejemplos de toxo-infecciones alimentarias.

En los últimos años se presentaron brotes ocasionados por patógenos emergentes y reemergentes que pusieron de manifiesto la fragilidad de los programas de protección de alimentos para prevenir y controlar las ETA. Esto aumentó los riesgos para la población y afectó el comercio nacional e internacional de alimentos (CDC, 2015). Entre los patógenos bacterianos emergentes se destacan: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* fagotipo 104 (DT 104), STEC, *L. monocytogenes*, *C. jejuni*, *Yersinia* spp., *S. dysenteriae* y *Cronobacter sakazakii*.

1.2.- *Escherichia coli*

El género *Escherichia* fue nombrado en honor al pediatra alemán Theodor von Escherich, quien describió por primera vez la especie tipo del género, *Escherichia coli*, en 1885. Este bacilo gram-negativo, pertenece a la Familia *Enterobacteriaceae* y es parte de la microbiota anaerobia facultativa del tracto intestinal del hombre y de

los animales, comprendiendo cerca del 1% del bioma fecal total de los humanos y de la mayor parte de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas son comensales pero algunas pueden causar enfermedad tanto en el hombre como en animales. Los aislamientos se pueden diferenciar serológicamente determinando los antígenos O (porción polisacárida del lipopolisacárido somático o LPS) y H (proteínas flagelares) (Nataro y Kaper, 1998), y se han identificado más de 10.000 combinaciones posibles entre estos (Kaper y Karmali, 2008).

Hasta el presente se reconocen seis categorías de *E. coli* asociadas a infecciones gastrointestinales (DEC, por sus siglas en inglés *diarrheagenic E. coli*) y aquellas causantes de infecciones urinarias, septicemia y meningitis (ExPEC, *E. coli* extraintestinales).

Los patotipos de DEC se clasifican según sus manifestaciones clínicas, patogenicidad y características epidemiológicas en:

- *E. coli* enteropatógeno (EPEC, por su siglas en inglés *enteropathogenic E. coli*).
- *E. coli* enterotoxigénico (ETEC, por su siglas en inglés *enterotoxigenic E. coli*).
- *E. coli* enterohemorrágico (EHEC, por su siglas en inglés *enterohemorrhagic E. coli*).
- *E. coli* enteroinvasivo (EIEC, por su siglas en inglés *enteroinvasive E. coli*).
- *E. coli* enteroagregativo (EAEC, por su siglas en inglés *enteroaggregative E. coli*).
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, por su siglas en inglés *diffuse-adherent E. coli*).

En el hombre, las cepas de ETEC, EPEC y EAEC colonizan el intestino delgado, mientras que las EIEC y EHEC colonizan el intestino grueso. Debido al gran número de cepas DAEC, la localización exacta para la colonización intestinal de

esta categoría no fue definida (Williams y col., 2011). La clasificación de *E. coli* en categorías se utiliza para intentar comprender su rol como agentes etiológicos de enfermedad en el hombre y en los animales. Sin embargo, las cepas agrupadas en diferentes categorías pueden intercambiar factores de virulencia (Donnenberg, 2013).

1.3.- *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos. Las cepas STEC se caracterizan por su habilidad de producir al menos un tipo de toxina perteneciente a una clase de potentes citotoxinas con capacidad de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas. Estas toxinas fueron denominadas en un primer momento Verotoxinas (VT, por sus siglas en inglés Verotoxins), por su efecto citotóxico en células Vero (Knowalchuk y col., 1977). Pocos años después, se observó que también producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual era neutralizado por anticuerpos anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (O'Brien y col., 1987), y se las denominó toxinas Shiga (Stx, por sus siglas en inglés Shiga toxins). Por lo tanto, la denominación de VTEC (por sus siglas en inglés Verotoxigenic *E. coli*) y STEC son equivalentes y definen a todas las cepas *E. coli* que producen una o más toxinas de la familia Stx (VT). Dentro del grupo STEC están incluidas las cepas pertenecientes a la categoría EHEC, asociadas a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH).

Las cepas de STEC se diferencian serológicamente por sus antígenos. La determinación del antígeno O está basada en la antigenicidad del lipopolisacárido de

membrana externa (LPS). El antígeno K es un polisacárido capsular, que puede ser separado en dos grupos, designados como grupo I y grupo II. Los antígenos del grupo I son polisacáridos capsulares mayores a 100 kDa que sólo se encontraron en cepas de los grupos O8, O9, O20 y O101, y los antígenos del grupo II son polisacáridos capsulares menores a 50 kDa que se encuentran principalmente en cepas de grupo O asociadas a enfermedades extraintestinales (Scheutz y Strockbine, 2005). Los antígenos H o flagelares constituyen el tercer grupo de antígenos serotificables. Hasta el presente se identificaron más de 180 antígenos O, 56 antígenos H y 80 antígenos K (EFSA, 2013; Scheutz, comunicación personal). Los antígenos O definen un serogrupo, y una combinación específica de antígenos O y H definen el serotipo de un aislamiento.

Dentro del grupo de las STEC, el serotipo O157:H7 es el que registra la tasa de mortalidad más alta en todo el mundo (Kaper y Karmali, 2008). Trabajos realizados por Wick y col. (2005) indican que serotipo O157:H7 evolucionó del la EPEC O55:H7. La adquisición secuencial del fago que codifica a la toxina Shiga 2 (Stx2), la conversión por el locus *rfb* del antígeno somático O desde O55 a O157, y las mutaciones cromosómicas adicionales de EPEC O55:H7 permitieron la evolución hacia O157:H7. *E. coli* O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de STEC que poseen los mismos marcadores de virulencia. Entre ellos, existen 5 serotipos (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM) que fueron reconocidos por la OMS por su potencial patogénico (OMS, 1997a).

1.4.- Seropatotipos de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

La clasificación de los serotipos de STEC en 5 seropatotipos fue propuesta por Karmali y col. (2003), con el objetivo de esclarecer las diferencias en la virulencia de las cepas STEC. La misma se basa en la incidencia de los distintos serotipos en enfermedad humana, y la asociación con brotes y enfermedad severa en el hombre. Este sistema de clasificación es una herramienta para evaluar los riesgos para la salud pública y clínica asociados con las diferentes cepas de STEC. El serotipo O157:H7 se clasifica en el grupo de A. Cinco serotipos de STEC no-O157, se encuentran dentro del grupo B. El Grupo C está compuesto por cepas EHEC que no han sido asociadas frecuentemente a brotes pero sí a casos esporádicos de SUH. El Grupo D esta formado por cepas que han sido asociadas a casos de diarrea, rara vez a asociadas a brotes y nunca a enfermedad severa. Dentro del grupo E se encuentran cepas aisladas de animales, no implicados en enfermedad humana. A pesar de presentar ciertas limitaciones, esta clasificación permite observar la relación de los diferentes serotipos con perfiles genéticos de virulencia característicos (Tabla A).

Tabla A. Clasificación de serotipos de STEC en seropatotipos

Seropatotipo	Incidencia Relativa	Fcia. en la ocurrencia de brotes	Asoc. con enfermedades severas	Serotipos
A	Alta	Común	Si	O157:H7, O157:NM
B	Moderada	No común	Si	O26:H11, 103:H2, O111:NM, O121:H19, 145:NM
C	Baja	Rara	Si	O91:H21, O104:H21, O113:H21; otros
D	Baja	Rara	No	Variados
E	Solo para no humana	No aplica	No aplica	Variados

Fuente: Karmali y col. (2003)

El esquema de seropatotipos ha sido de gran valor para definir los serotipos de STEC patógenos en los casos de infección humana (EFSA, 2007; Gyles, 2007; Coombes y col., 2011) y para los aislamientos obtenidos de animales (Gyles, 2007). Sin embargo, el aumento progresivo del número de casos y brotes reportados de STEC no-O157, como el producido en 2011 en Alemania, ha puesto la atención sobre la utilidad de esta clasificación (EFSA, 2013; Tozzoli y col., 2014).

La transferencia de genes entre cepas pertenecientes a diferentes categorías puede dar origen a nuevas cepas con un mayor potencial virulento, que no puede ser preestablecido. Un claro ejemplo es el brote producido en Alemania en el año 2011. El agente causal de este brote fue identificado como *E. coli* serotipo O104:H4 productor de Stx2a. Al caracterizar la cepa se determinó que era portadora de una combinación inusual de factores de virulencia, algunos presentes en cepas STEC

(*stx*₂) y otros típicos del grupo de EAEC (*aat/aggR/aap*). El serotipo O104:H4 identificado en la cepa productora de este brote había sido notificado previamente en casos aislados de SUH pero nunca reportado en alimentos ni en animales. Además de afectar a la población alemana, donde se reportaron los primeros casos, involucró a otros 12 países europeos, produciendo un total de 3.910 casos y 46 muertes. Este brote evidenció la imposibilidad de predecir la emergencia de un nuevo tipo patógeno de STEC restringiéndose solo en la presencia del gen *eae* o al serogrupo (EFSA, 2013).

Los datos epidemiológicos del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control*) coinciden, en términos generales, con la clasificación de Karmali y col. (2003), en cuanto a la presencia combinada de genes *stx*₂/*eae* en los aislamientos de pacientes enfermos. Esto se fundamenta en que más del 90% de los aislamientos obtenidos de casos de SUH, de los cuales se tiene información acerca de los factores de virulencia, fueron *stx*₂/*eae*. Sin embargo, aunque la presencia de *stx* es necesaria, no es suficiente para el desarrollo del SUH. Factores asociados al paciente (edad, estado del sistema inmunológico, antibioticoterapia previa a la infección) y a la dosis también son importantes para el desarrollo de la enfermedad (Todd y Dundas, 2001). Además, no existe una combinación de marcadores genéticos que definan la potencialidad de una cepa de STEC para causar enfermedad en el hombre.

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*), el esquema de seropatotipos no propone una lista exhaustiva de los serotipos patógenos, pero sí así lo hiciera, los problemas encontrados para serotipificar los aislamientos (disponibilidad de antisueros, cepas que no reaccionan

con los sueros disponibles, falta de recursos) dificultan en muchos casos la aplicación del modelo. Según datos de ECDC, el serotipo completo de los aislamientos humanos en Europa solo fue reportado en 6 brotes por STEC en el período 2007-2011, y únicamente el serotipo O157:H7 pudo ser clasificado según el esquema de Karmali y col. (2003). El resto de las cepas aisladas de brotes no pudieron ser incluidas en esta clasificación. En el mismo período, solo en el 15,2% de los casos confirmados de infección por STEC (N= 13.545) se pudo identificar el serotipo del aislamiento, correspondiendo el 51% al serototipo A, el 16% al B, el 1% al C, el 5% al D, el 0,7% al E y el 27% de los casos no pudieron ser clasificados. Estos aislamientos que no pudieron ser clasificados dejaron un saldo de 158 muertos, 92 hospitalizaciones, 71 casos de SUH y 60 casos de diarrea sanguinolenta. Por tal motivo, EFSA propone un esquema alternativo de clasificación, considerando no solo la presencia de *stx* sino también de los genes *aaIC* (proteína secretada por EAEC) y *aggR* (por sus siglas en inglés *plasmid-encoded regulator*). Dentro de este esquema queda incluida la cepa O104:H4 causante del brote de Alemania en 2011 (*stx+/eae*).

El nuevo esquema de clasificación propuesto por EFSA categoriza a las STEC de acuerdo al riesgo potencial que implican en la salud de los consumidores. Dentro de la categoría I (alto potencial del riesgo) se encuentran los serogrupos más frecuentemente asociados a enfermedad humana (O157, O26, O103, O145, O111), además de O104. En el grupo II y III (riesgo desconocido) se agrupan las cepas que poseen mecanismos de virulencia desconocidos y de las cuáles aun no existe evidencia de su asociación a SUH (grupo II) y a enfermedad (grupo III) (Tabla B).

Si bien esta propuesta evita los problemas asociados serotipificación, requiere una revisión periódica de la nueva información epidemiológica para verificar su aplicabilidad. Además, una rutina de vigilancia que incluya análisis moleculares para conocer los genes de virulencia junto con un reporte de la presentación clínica ayudaría a clasificar más eficientemente a las STEC de acuerdo al riesgo (EFSA, 2013).

Tabla B. Propuesta de EFSA para categorización de STEC

Grupo	Genes	Serotipos	Potencial de riesgo	
			D	SUH/CH
I	<i>eae</i> + o <i>aaiC/aggR</i> +	O157, O26, O103, O145, O111, O104	Alto	Alto
II	<i>eae</i> + o <i>aaiC/aggR</i> +	Cualquier otro	Alto	Desconocido
III	<i>eae</i> - o <i>aaiC/aggR</i> -	Cualquier otro	Desconocido	Desconocido

D: Diarrea, CH: colitis hemorrágica

Fuente: EFSA (2013)

1.5.- Factores de virulencia y patogénesis

Escherichia coli productor de toxina Shiga se diferencia de las cepas de *E. coli* comensales por la presencia de los genes *stx* y de un complejo conjunto de determinantes genéticos asociados con la virulencia, incluyendo aquellos factores involucrados en la colonización, toxinas e inmunomoduladores (Morabito y col., 2003; Tozzoli y col., 2005; Imamovic y col., 2010). Los genes de virulencia se encuentran heterogéneamente distribuidos entre las cepas de STEC y solo una sub-

población de estas cepas ha sido asociada con las formas más severas de enfermedad y contienen el conjunto completo de genes de virulencia. Otras cepas solo contienen una parte del genoma de virulencia y nunca o pocas veces han sido asociadas a enfermedad severa a pesar de poseer los genes *stx* (EFSA, 2013).

Las Stx son consideradas el principal factor de virulencia de STEC (Calderwood y Mekalanos, 1987; Krüger y Lucchesi, 2015), sin embargo otros componentes de virulencia presentes en estas bacterias como adhesinas, proteasas, sistemas de captura de hierro, LPS, flagelos y otras toxinas, podrían contribuir en la patogénesis de las mismas (Guth y col., 2011). Además de Stx, los serotipos de *E. coli* definidos como STEC pueden portar otros marcadores de virulencia accesorios, como factores de adherencia intestinal, citotoxinas y plásmido pO157 (Paton y Paton, 1998a).

Entre los factores de adherencia intestinal se encuentran la intimina, las adhesinas y la fimbria tipo 1 (P1). La intimina está codificada por el gen *eae* que se encuentra en la isla de patogenicidad LEE (*locus for enterocyte effacement*) del cromosoma. Ésta isla de 35,6 kb contiene 41 genes organizados en 5 operones y contiene todos los genes necesarios para la formación de la lesión A/E (*attaching and effacing*). Entre los genes presentes en LEE, además del que codifica para la intimina, se encuentran los que codifican para la síntesis del sistema de secreción de tipo III (SSTT), para la síntesis de las proteínas EspA, EspB y EspD y para la síntesis del co-receptor de la intimina (Tir) (Goffaux y col., 1999). La proteína Tir, codificada por el gen *tir*, es tranlocada por SSTT al interior de la célula, donde es fosforilada y se expone como receptor favoreciendo la unión íntima entre la bacteria y la célula. El SSTT está codificado por los genes *sep* (*Secretion E. coli protein*) y *esc* (*E. coli*

secretion). Este sistema es responsable de la secreción por la bacteria de los factores de virulencia como las proteínas Esp y Tir (De Grado y col., 1999). Existen varios genes *esp* (*espA*, *espB*, *espD*) que codifican para una “jeringa molecular” formada por las proteínas EspA, EspB y EspD, implicada en la traslocación de efectores en la membrana de la célula hospedadora. Una vez que el receptor se une a la intimina, nuclea actina en el interior de la célula hospedadora (Kenny y col., 1997). De esta manera se produce la unión íntima al enterocito y la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E. Esta lesión consiste en un reordenamiento del citoesqueleto de la célula hospedadora, resultando en la formación de una estructura rica en actina polimerizada con forma de pedestal (Frankel y col., 2001). Como consecuencia se produce una reducción de la superficie absortiva que causa diarrea sin sangre.

Algunos serotipos LEE positivos son altamente virulentos y se asocian con enfermedad severa en humanos (Paton y Paton, 1998b; Jenkis y col., 2003). Sin embargo, no sería indispensable la presencia de la región LEE para la patogénesis de la enfermedad, dado que muchas cepas de STEC implicadas en la enfermedad grave en el hombre (incluyendo SUH) no contienen el gen *eae* o no expresan una intimina funcional detectada por la prueba de tinción fluorescente para actina (Lindgren y col., 1993; Dytoc y col., 1994; Wieler y col., 1996; Keskimäki y col., 1997; Bonnet y col., 1998). En estas cepas la adhesión puede estar mediada por Saa (STEC *autoagglutinating adhesin*, identificada en cepas LEE negativas) o LPF (*long polar fimbriae*), entre otras adhesinas putativas (Bolton, 2011).

Fuera de la región LEE del cromosoma se encuentran codificadas adhesinas que tienen funciones relacionadas con la adherencia de las cepas STEC al

enterocito. Las adhesinas Iha (*iron regulated gene A homologue adhesin*) (Tarr y col., 2000), Efa1 (*EHEC factor for adherence*) (Nicholls y col., 2000) y LPF_{O157/O1-141}, LPF_{O157/O1-154} y LPF_{O113/O1-154} (Doughty y col., 2002; Torres y col., 2002), están codificadas en islas genómicas únicas de *E. coli* EDL933 o en el megaplásmido pO113 de las cepas STEC. Otras tres adhesinas, ToxB (proteína identificada en pO157) (Tatsuno y col., 2001), Saa (Paton y col., 2001) y Sfp (*sorbitol fermenting plasmid*) (Jenkis y col., 2003), están codificadas en plásmidos (Toma y col., 2004).

La proteína Iha de 67 kDa en *E. coli* O157:H7, codificada por el gen *iha*, se encuentra presente también en una amplia variedad de serotipos de cepas STEC e inclusive en cepas ExPEC.

El gen *efa-1* presente en cepas EPEC y STEC no-O157 (Nicholls y col., 2000), fue descrito al comparar la capacidad de adherencia de una cepa STEC silvestre y una mutante para este gen, observándose una capacidad de adherencia reducida de la cepa mutante pero el mismo el fenotipo de la lesión A/E. Las cepas *E. coli* O157:H7 poseen una versión truncada del gen cromosomal *efa-1*, y algunos estudios sugieren que la proteína Efa-1 truncada podría llegar a tener algunas propiedades tales como las observadas para la proteína de tamaño completo (Stevens y col., 2004).

Paton y col. (2001) publicaron la presencia de una gran fimbria polar (LPF) codificada por el operón *lpf*. *E. coli* O157:H7 puede presentar los operones *lpf1* y *lpf2* o ambos, y están asociados con el incremento de la adherencia, la habilidad de colonización y la persistencia de la infección. En el caso del operón *lpf2* se asoció con el desarrollo de diarreas severas (Osek y col., 2003). Doughty y col. (2002) y

Tarr y col. (2000) han sugerido que el gen *lpf*_{O113} tiene función de adhesina en los aislamientos de STEC LEE negativos.

La proteína ToxB, que contribuye a la adherencia bacteriana a las células epiteliales intestinales, exhibe un 28% de similitud aminoacídica con la proteína Efa-1, y es codificada por el gen *toxB* que se encuentra en el plásmido pO157 (Tatsuno y col., 2001).

El gen *saa*, presente en el megaplásmido pO113, codifica para la adhesina Saa, asociada especialmente a cepas no-O157 LEE negativas. Este gen ha sido asociado con el serotipo O113:H12 productor de SUH.

La P1 ha sido descrita como factor de adherencia en cepas comensales y patógenas y pueden encontrarse en la mayoría de las bacterias gram negativas, incluyendo *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. y *Vibrio cholerae*. P1 se expresa en la mayoría de las cepas de *E. coli* y su función es la de facilitar la colonización del tracto intestinal por medio de su intervención en la adherencia manosa sensible a las células epiteliales de los mamíferos. Su expresión es variable y se encuentra codificada por un pequeño fragmento de ADN que contiene un promotor, cuya función es dirigir la transcripción de los genes que codifican a las subunidades que componen la fimbria en una orientación (on). Estas fimbrias fueron las primeras en ser identificadas por su capacidad de aglutinar eritrocitos. Sin embargo, esta aglutinación puede ser inhibida por la presencia de manosa, fenómeno que se denominó aglutinación manosa-sensible o MSHA (por sus siglas en inglés *mannose-sensitive hemagglutination*) (Edwards y Puente, 1998).

Las toxinas Stx cumplen un rol importante en STEC ya que son su principal factor de virulencia. El mecanismo de acción de Stx es similar al de la ricina e

involucra inhibición de la síntesis proteica de los endotelios, principalmente del renal (Kaper y Karmali, 2008). La habilidad de las cepas de STEC 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 y col., 2006). El tipo de toxina Stx1 es altamente homogéneo y está formado por los subtipos Stx1a, Stx1c y Stx1d (Burk y col., 2003; Zhang y col., 2002). El heterogéneo grupo Stx2, está formado por más subtipos incluyendo: Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g (Scheutz y col., 2012). Stx2a, Stx2c y Stx2d, fueron identificadas en aislamientos humanos. Stx2e fue el primer subtipo de Stx2 descrito y está asociado a la enfermedad de los edemas del cerdo. Stx2f fue identificada en aislamientos humanos y de heces de paloma (Friesema y col., 2014; Ganon y col., 1990). A pesar de mostrar similitud en su estructura y función, cada uno de los subtipos miembros de la familia Stx presenta grandes diferencias en su toxicidad en tejidos celulares y en animales. Stx2 tiene una actividad citotóxica de 100 a 1000 veces superior a Stx1 (Boerlin y col., 1999). Las cepas productoras de Stx2 y específicamente el subtipo Stx2c han sido asociadas más frecuentemente a casos de SUH que aquellas que producen solamente Stx1 (Boerlin y col., 1999; Fürst y col., 2000; Friedrich y col., 2002; Bosilevac y Koohmaraie, 2011). A nivel de su estructura molecular, las Stx son heteropolímeros (AB₅) constituidos por una subunidad A (33 KDa) y por cinco subunidades B (7,5 KDa). La subunidad A tiene actividad N-glicosidasa sobre una adenosina del RNA ribosómico 28S, y de esta manera inhibe la síntesis proteica que conduce a la muerte celular (Sandvig y Van Deurs, 1994). Mientras que por la subunidad B se produce el "Binding" o unión al receptor Gb3 (α -galactosa (1-4) β -galactosa (1-4) glicosilceramida) (Obrig y col.,

1993). Las diferencias en la especificidad de Stx se deben a la variación en los genes que codifican para esta subunidad, por ser la responsable de la unión al receptor de la célula eucariota (Jacewicz y col., 1986; Lindberg y col., 1987). Luego que Stx es liberada se une, mediante el pentámero B, a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor Gb3 que se encuentra en la membrana apical. La toxina es luego internalizada en una vesícula endocítica y transportada al aparato de Golgi, donde la subunidad A es clivada proteolíticamente liberando el fragmento A1, enzimáticamente activo. Este fragmento A1 actúa sobre la subunidad ribosomal 28S removiendo una adenina, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas, provocando la muerte celular (Rivas y col., 2008a). La toxina puede también ser translocada desde la membrana apical a la superficie basolateral, con inducción de interleuquina-8 (IL-8), que contribuye a la acumulación de leucocitos en la pared intestinal. Así se produce un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta (Rivas y col., 2008a). Stx entra a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. En el riñón se encuentran altos niveles de Gb3, particularmente en la región cortical, donde se observan las principales lesiones en los pacientes con SUH. Las lesiones histopatológicas ocurren por interacción de la Stx con las células endoteliales de los vasos sanguíneos, éstas se hinchan y se desprenden a nivel del glomérulo. Simultáneamente, se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, hay oclusión de los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, causando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. También se observan

lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas (Rivas y col., 2008a).

La toxina CDT-V pertenece a la familia de las toxinas CDT (por sus siglas en inglés *cytolethal distending toxin*), y se asocia a cepas STEC O157 y no-O157 productoras de SUH (Janka y col., 2003; Bielaszewska y col., 2004). La toxina CDT-V daña el ADN eucariota, conduciendo a un arresto del ciclo celular en G2/M y muerte celular (Bielaszewska y col., 2005). El efecto directo de la proteína CDT-V sobre las células endoteliales podría contribuir al desarrollo de SUH.

La toxina denominada subtilasa (SubAB), perteneciente al grupo de toxinas de tipo AB₅. Se describió por primera vez en una cepa STEC O113:H21 causante de un brote de SUH en Australia (Paton y col., 2004). Esta toxina está compuesta por una subunidad A enzimáticamente activa, que es una serin-proteasa tipo subtilasa; y una subunidad B, que está relacionada a una posible proteína de exportación de *Yersinia pestis*. La inyección intraperitoneal de SubAB en ratones causa una extensiva trombosis de la microvasculatura, y necrosis de los riñones, el hígado y el cerebro (Paton y col., 2004). Estas lesiones son semejantes a las observadas en los pacientes con SUH, sugiriendo la contribución de esta toxina a la patogénesis de las cepas STEC.

El gen cromosomal y/o plasmídico *astA* codifica la síntesis de la toxina termoestable EAST1 (por sus siglas en inglés *enteroaggregative E. coli heat-stable toxin 1*) presente en las cepas EAEC. Esta proteína fue identificada por primera vez en una cepa EAEC aislada de un niño con diarrea en Chile (Savarino y col., 1991), pero también fue asociada con otros patotipos de *E. coli*, como STEC, ETEC, DAEC y EPEC; además de con *Salmonella*.

El plásmido pO157, de 90 Kb, contiene genes que codifican para diferentes factores de virulencia. Este plásmido se encuentra en la mayoría de las cepas de STEC O157:H7. En algunos serotipos de STEC no-O157 se identificaron plásmidos con una secuencia similar al pO157. Sin embargo, el rol preciso de los genes codificados en éstos aún no fue dilucidado (Rivas y col., 2008a). Algunos de los genes presentes en este plásmido son: *toxB*, *espP* (serina proteasa extracelular), *katP* (catalasa-peroxidasa), *ehxA* (enterohemolisina) y *etp* (sistema de secreción tipo II). En este plásmido también se encuentra el gen que codifica para la síntesis de una fimbria que podría estar involucrada en la colonización inicial de los enterocitos (Schmidt y col., 2000). La enterohemolisina es sintetizada por los serotipos de STEC con fenotipo hemolítico y sus cultivos pueden lisar eritrocitos por su capacidad de formación de poros (Cavalieri y col., 1984). Esta lesión celular rompe el equilibrio osmótico de las células atacadas produciendo su lisis y de este modo las bacterias extraen hierro de los glóbulos rojos liberados al intestino (Beutin y col., 1989).

Manning y col. (2008) postularon la emergencia de un grupo de STEC O157:H7 hipervirulento. Un brote atribuido al consumo de espinaca producido en 2006 fue lo que motivó a este estudio. Investigaron la diversidad de las cepas de *E. coli* O157:H7 por el análisis de SNP, para mejorar la apreciación en la dinámica evolutiva de *E. coli* O157 a nivel poblacional y para colocar a la cepa responsable del brote en un marco evolutivo. La tasa de hospitalizaciones producida por este brote, superior a la habitual, y el elevado número de casos de SUH avalaron la hipótesis de que la cepa involucrada tenía un potencial virulento mayor al de las cepas de O157 aisladas hasta ese momento. Este estudio muestra la emergencia de un clado hipervirulento de *E. coli* O157:H7, denominado 8, asociado con enfermedad

más severa. Las cepas del clado 8 fueron con mayor frecuencia portadoras simultáneamente de *stx*_{2a}/*stx*_{2c} que cepas de otros clados que solo portaban *stx*_{2c} (Manning y col., 2008). Sin embargo, esta combinación de genes por sí solos, no serían suficientes para la elevada tasa de hospitalización y SUH registrada por las cepas del clado 8 (Kaper y Karmali, 2008).

La variabilidad en la virulencia, incidencia y severidad de la infecciones producidas por los diferentes serotipos de STEC, no puede ser atribuido exclusivamente a la los factores de virulencia en ellos presentes, sino también resultado de la dosis infectiva, la expresión de los genes de virulencia en los diferentes alimentos que actúan de vehículo y la interacción del patógeno con factores del hospedador y el ambiente.

1.6.- Manifestaciones clínicas de la infección por STEC

Escherichia coli productor de toxina Shiga es un patógeno emergente asociado a ETA y fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica ocurridos en Oregon y Michigan, EE.UU., atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas (Riley y col., 1983). STEC produce una amplia variedad de afecciones humanas, pudiendo cursar con portación asintomática o presentándose en forma de casos esporádicos de diarrea leve auto limitante o brotes de diarrea, colitis hemorrágica, púrpura trombótica trombocitopenica o SUH. Los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65 años, son los individuos que se encuentran en mayor riesgo de infección.

Karmali y col. (1983), reportaron la asociación entre SUH y cepas de STEC, reconociendo a este patógeno como agente causal de la forma infecciosa de este Síndrome. En Argentina, el serotipo más prevalente de STEC asociado a enfermedad severa en humanos es O157:H7 (Boletín Integrado de Vigilancia N° 296). La dosis infectiva de STEC capaz de ocasionar enfermedad es de 10 a 100 bacterias (CDC, 1993). El período de incubación promedio es de 3 días (con un rango de 1-8 días). Luego de ese período, un alto porcentaje de pacientes presenta diarrea acuosa y aproximadamente el 30% (80% en Argentina) evoluciona a diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica en los días 5-6 posteriores, presentando evidencia de edema de la mucosa colónica y dolores abdominales severos. Además en algunos casos pueden presentarse vómitos e irritabilidad, aunque no es frecuente la aparición de fiebre. En el parénquima renal se producen lesiones microangiopáticas y trombóticas a nivel glomerular o necrosis cortical que llevan a la insuficiencia renal aguda. Se estima que aproximadamente un 10% de los pacientes infectados por STEC evolucionan a SUH (Rivas, 2007).

El SUH es una entidad clínica y anatomopatológica caracterizada por la aparición brusca de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda, como consecuencia de la destrucción intravascular de glóbulos rojos (microangiopatía) de localización predominantemente renal (Kaper y col., 2004). Si bien los riñones son el principal órgano afectado, ocasionalmente pueden producirse lesiones en páncreas, pulmones, corazón y sistema nervioso central (Obrig y col., 1993), y dependiendo la evolución del caso puede llevar a la muerte (Karmali y col., 2010). Estudios poblacionales sugieren que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea (Siegler y col., 1994). Aunque en la mayor

parte de los casos, el SUH es de origen infeccioso bacteriano (STEC, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, entre otras bacterias gram-negativas), otras etiologías también pueden producirlo. La forma atípica de este síndrome, que cursa sin diarrea, es desencadenada por varios factores, como drogas, trasplantes de órganos y el período post parto, entre otros. Cuando el SUH es producido por agentes infecciosos bacterianos el cuadro clínico se encuentra precedido de diarrea, generalmente sanguinolenta y también se puede presentar con fiebre, vómitos y dolor abdominal. Los niños constituyen el grupo más vulnerable, con una mayor incidencia de infecciones sintomáticas por STEC y riesgo alto de evolución a SUH (Siegler y col., 1994). El 50% de los pacientes que sufren SUH requieren diálisis por el resto de sus vidas y el 75% requieren transfusiones. Aún con la severidad de la complicación del SUH, la tasa de mortalidad es menor al 5% (Yousef y Carlstrom, 2003). En los últimos años, el diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia disminuyó la letalidad durante el período agudo. Sin embargo, el 5% de los niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años procedimientos dialíticos o trasplante renal. Otro 20% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal en lapsos variables que pueden llegar a décadas (Spizzirri y col., 1997). Entre los factores predictivos de evolución a SUH se incluyen: edades extremas, leucocitosis, tratamiento con agentes reductores de motilidad o antidiarreicos, fiebre, período prodrómico corto, y en algunos casos diarrea hemorrágica (Carter y col., 1987; Cimolai y col., 1994; Bell y col., 1997; Buteau y col., 2000). Además, el genotipo *stx* de la cepa virulenta también influye en la evolución a SUH (Ostroff y col., 1989).

En la Argentina el SUH es endémico y tiene una incidencia de 300 a 500 nuevos casos por año, con una tasa de incidencia anual promedio de 1 caso cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado de Vigilancia N°222). El SUH post-entérico en Argentina es considerado la segunda causa de insuficiencia renal crónica en niños. De acuerdo con la Base de Datos del Laboratorio Nacional de Referencia para la Vigilancia del SUH en Argentina, aproximadamente el 74,5% de las cepas aisladas de casos de SUH producidos entre 2004 y 2013 pertenecieron a STEC O157:[H7, NM], y el 25,4% a los serotipos O145:[H27, H-, HNT], O121:H19, O26:[H2, H11, HNT], O111:[H-, HNT], O103:[H2, H-, HNT] y O174:[H8, H21, H28, H-] (Kagkli y col., 2011; Rivas y col., 2011; Enfermedades Transmitidas por Alimentos Ficha Técnica N°8).

La colitis hemorrágica tiene un período de incubación de 2 a 10 horas. El comienzo de la enfermedad tiene como signos característicos fuertes espasmos abdominales seguidos de una diarrea acuosa sin sangre. Luego de 1 ó 2 días, en el 90% de los casos, evoluciona a diarrea sanguinolenta. En la mayoría de los casos la evolución es favorable y espontánea pero entre 5-10% de los pacientes sufren otras complicaciones como SUH y púrpura trombótica trombocitopénica.

La púrpura trombótica trombocitopénica es una afección que se presenta en adultos, sobre todo en ancianos. Se caracteriza por una anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fiebre, pudiendo llegar a producir trastornos neurológicos e insuficiencia renal aguda. La diarrea prodrómica está generalmente ausente. La duración de la enfermedad puede ser de unas horas hasta algunas semanas, dependiendo del estado del paciente. Si la enfermedad progresa al sistema nervioso central y a los riñones, se observan algunos signos neurológicos

como modificación en el comportamiento, confusión y delirio que pueden asociarse con crisis de epilepsia, y anomalías en el campo visual, pudiendo terminar en estado de coma y muerte (Doyle y col., 1997).

La eliminación intermitente de STEC por materia fecal puede perdurar varios meses después de que el proceso infeccioso haya finalizado, especialmente en niños pequeños (Report of the Health Protection Surveillance Centre, 2013). En un estudio realizado en niños luego de un brote ocurrido en una guardería se demostró una duración media de eliminación de 29 días, con un rango que fue de los 11 a los 57 días (Swerdlow y Griffin, 1993).

1.7.- *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a nivel mundial

Escherichia coli productor de toxina ha sido identificado como agente causal de ETA en todo el mundo (Tozzi y col., 2001). Los serogrupos O157, O26, O103, O111 y O145 son los más comúnmente reportados en América del Norte y Unión Europea (Duffy y col., 2002; Asper y col., 2011; Rotariu y col., 2012; Abdullah y col., 2014) pero existen variaciones en la incidencia y en la distribución geográfica de los serotipos reportados debido, en parte, a las diferencias en los sistemas de vigilancia de cada país (EFSA, 2013; Report of the Health Protection Surveillance Centre, 2013).

Según datos disponibles sobre EE.UU., se estima que los 31 microorganismos patógenos que cuentan con un sistema de vigilancia epidemiológico, causan 9,4 millones de casos de ETA por año en ese país. Del total, 3,6 millones de casos son atribuidos a bacterias patógenas, reportándose 63.150 casos de enfermedad por STEC O157 y 112.750 por STEC no-O157 (Guidance for

public health laboratories, 2012). *E. coli* O157:H7 es el serotipo de STEC más frecuentemente aislado. A pesar de la implementación de sistemas de vigilancia de patógenos asociados a las ETA y de contar con un estricto control de la producción de alimentos a partir del brote multi-estado ocurrido en 1993, las infecciones por STEC O157 continúan siendo un importante problema de salud pública en EE.UU. Según el reporte de la Red de Vigilancia Activa de Enfermedades de Transmisión Alimentaria (FoodNet, 2012), en 2012 en EE.UU., fueron confirmados por pruebas de laboratorio 533 (1,11 cada 100.000) casos de enfermedad por STEC O157 y 557 (1,16 cada 100.000) casos por STEC no-O157. De los 1090 casos, los aislamientos con serogrupo identificado, pertenecieron en un 49,0% a O157 y en un 51,0% a no-O157. Los 10 serogrupos de STEC no-O157 identificados con mayor frecuencia fueron: O26 (25,0%), O103 (21,5%), O111 (13,3%), O121 (7,4%), O145 (3,8%), O118 (3,6%), O45 (2,3%), O186 (1,6%), O5 (1,6%) y O71 (1,4%) (FoodNet, 2012).

A pesar de que la mayoría de los países de la Unión Europea informan más casos de enfermedad asociados a STEC O157, los serogrupos no-O157 son una preocupación emergente. Las tasas más altas de infección por STEC O157 son reportadas por Reino Unido e Irlanda, y las de no-O157 por Dinamarca. La existencia de diferentes enfoques diagnósticos según el país podrían explicar estas variaciones en las tasas reportadas (Report of the Health Protection Surveillance Centre, 2013). Según el ECDC, durante el período 2010-2012 se registró un total de 18.995 casos confirmados de infección por STEC, provenientes de 28 países europeos. La tasa de notificación global fue de 1,7 casos por cada 100.000 habitantes. El 50,2% de los casos confirmados en el período de estudio fueron aislados en 2011, debido a un gran brote ocurrido ese año, asociado con el consumo

de brotes de fenogreco crudos contaminados con STEC O104:H4. De total de casos registrados durante el período 2010-2012, solamente en el 11,0% el serotipo de la cepa pudo ser identificado. El 36,2% de los aislamientos correspondieron a O157 y el 63,8% a no-O157. Los 10 serotipos de STEC no-O157 más frecuentemente aislados fueron: O104:H4 (9,6%), O26:H11 (9,2%), O103:H2 (8,9%), O63:H6 (4,5%), O145:H- (4,0%), O117:H7 (3,7%), O91:H- (3,6%), O26:H- (3,6%), O146:H21 (2,9%) y O128:H2 (1,9%). Del total de casos de STEC reportados en 2011, los niños menores de 15 años representan en promedio el 40,6% de los pacientes afectados. Este valor, menor al esperado, se debe a que durante el brote de 2011 se produjo un aumento de entre 3 y 5 veces de las tasas de notificación en los grupos etarios mayores a 15 años. Más de la mitad (57,0%) de los aislamientos totales y $\geq 99\%$ de los aislamientos pertenecientes a los 5 serotipos más reportados fueron eae+. El mayor número de casos notificados en 2012 en comparación con el año 2010 puede explicarse por un aumento en la toma de conciencia de la enfermedad y por las mejoras en la detección y presentación de informes por los países como resultado del brote de 2011 (ECDC Surveillance Report, 2010-2012).

1.8.- Situación actual en la Argentina

En Argentina, se reportaron 1.094.273 (2.727,57 cada 100.000 habitantes), 1.075.503 (2.680,79 cada 100.000 habitantes) y 1.005.429 (2.506,12 cada 100.000 habitantes) episodios de diarrea durante 2013, 2014 y 2015, respectivamente. Las diarreas agudas sanguinolentas durante los años 2013, 2014 y 2015 fueron 3,24 (1303 episodios), 4,45 (1787 episodios) y 4,28 (1718 episodios) casos cada 100.000 habitantes (Boletín Integrado De Vigilancia N° 290). En este contexto, podemos

destacar que los alimentos involucrados en los brotes son muy variados, aunque siempre están presentes los productos cárnicos, como así también agua y alimentos manufacturados (SIRVETA).

En nuestro país, el SUH post-entérico asociado a la infección por STEC es endémico, y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda, la segunda de insuficiencia renal crónica, y es además responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Mead y Griffin, 1998). La enfermedad se distribuye en todo el país. En un estudio realizado en el Hospital Nacional de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” sobre “costo de la enfermedad y efectividad de las estrategias de intervención” se demostró que durante el año 2005 el costo para tratar 213 casos de SUH fue de \$ 6.554.841,65. Los argentinos poseen el consumo de carne bovina *per capita* más alto a nivel mundial y los niños comienzan a comer carne a edades tempranas. Se estableció que esta práctica es un factor de riesgo de transmisión de STEC en este grupo etario (Masana y col., 2010).

Si bien el principal serotipo de STEC vinculado a la mayoría de los casos de SUH a nivel mundial es O157:H7, en Argentina la incidencia es menor en comparación con otros países de América Latina y otros serotipos son aislados con mayor frecuencia en casos de SUH (Krüger y col., 2006). Se estima que el 58% de los casos de enfermedad por STEC en Argentina son por serotipos no-O157 (Asper y col., 2011). Los casos reportados por el Ministerio de Salud fueron 351, 450, 407, 358 y 412 durante 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, respectivamente (Boletín Integrado de Vigilancia N° 222). Hasta la semana epidemiológica N°45 de 2015, se registraron 266 casos de SUH, lo que corresponde a 71 casos menos que los registrados en la misma semana de 2014 (Boletín Integrado de Vigilancia N°286).

Diferentes serotipos de STEC no-O157 han sido aislados según la localización geográfica (Brooks y col., 2015; Stephan y col., 2008).

1.9.- Reservorios, fuentes de infección y vías de transmisión

Las infecciones causadas por cepas de STEC poseen carácter zoonótico. Diferentes estudios han demostrado la presencia de cepas pertenecientes a este grupo bacteriano en el tracto gastrointestinal de ovejas, cabras, búfalos, guanacos, cerdos, perros, gatos, roedores (Beutin y col., 1993; Bentancor 2006; Bentancor y col., 2007; Bentancor y col., 2012; Blanco Crivelli y col., 2012; Caprioli y col., 2005; Mercado y col., 2004; Oliveira y col., 2007; Rumi y col., 2012a; Rumi y col., 2012b), y en animales silvestres (Leotta y col., 2006). La mayoría de los animales a partir de los cuales se han aislado cepas de STEC, son portadores asintomáticos de la bacteria. Sin embargo, hay excepciones como es el caso de los neonatos bovinos en los cuales cepas O157:H7 pueden producir diarrea por enterocolitis (Dean-Nystrom y col., 1997), y de los cerdos que padecen una presentación sistémica denominada enfermedad de los edemas del cerdo, causada cepas de STEC *stx_{2e}*+ (Moredo y col., 2015).

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, son los principales reservorios de STEC (Caprioli y col., 2005; Fernandez y col., 2010). Tanto el ganado de carne como el ganado lechero son portadores asintomáticos de STEC. La colonización de esta bacteria en los animales tiene una duración menor a 2 meses y la portación fecal es más frecuente en el ganado joven (2 a 24 meses) que en el adulto. Los animales engordados en sistemas de cría intensiva tienen una prevalencia de STEC tres veces superior a la observada en animales alimentados

solo con pastura, probablemente debido a alteraciones de la microbiota normal, el pH y la concentración de ácidos grasos.

Las toxo-infecciones por STEC se producen al consumir alimentos contaminados con desechos o materia fecal de origen animal o humano. Distintos alimentos como carne molida y productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, productos frescos (vegetales de hoja, brotes de soja y alfalfa), y jugos de manzana no pasteurizados, fueron vehículo de STEC en casos esporádicos o brotes de ETA asociados a este microorganismo (Rivas y col., 2006). El consumo de agua contaminada, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo con los animales y persona-persona también han sido asociados a casos de SUH (EFSA, 2013).

En Argentina, Tanaro y col. (2010, 2012), analizaron 288 muestras de hisopado rectal bovino y aislaron STEC O157 y no-O157 del 3,8% y del 29,6% de las muestras, respectivamente. Parma y col. (2000), determinaron la prevalencia de STEC en terneros con diarrea, en terneros sanos, en animales adultos en playa de faena y en animales adultos en pastoreo era del 23,0%, 29,0%, 44,0% y 22,0%, respectivamente. Postularon que a pesar de la baja prevalencia de O157:H7 en el ganado argentino, EHEC puede jugar un rol importante en la alta incidencia de colitis hemorrágica y SUH, y proponen establecer estrictas reglas de higiene en los frigoríficos y en la industria de alimentos. Padola y col. (2002), demostraron que los animales de *feedlot* de Argentina pueden ser portadores de EHEC O145:H- (Padola y col., 2002). A partir de 59 animales engordados en un *feedlot*, Padola y col. (2004), recuperaron 27 (45,8%) aislamientos de STEC portadores de *stx*₂, 3 (5,1%) de *stx*₁ y

7 (11,9%) de *stx*₁ y *stx*₂. En este estudio se identificaron 10 serogrupos diferentes (O2, O15, O25, O103, O145, O146, O157, O171, O174, O175) y 6 antígenos H (H2, H7, H8, H19, H21, H25). Durante el procesamiento de las medias reses de los animales portadores de STEC, la transferencia desde los cueros contaminados con materia fecal o el contacto directo de materia fecal con la carcasa del animal durante el eviscerado, puede facilitar la contaminación de la carne (Elder y col., 2002; Edwards y Fung, 2006). Estudios realizados en EE.UU. reportaron una prevalencia de STEC no-O157 de entre 19,0% y 30,0% en materia fecal (Barkocy-Gallagher y col., 2003; Renter y col., 2005) y de 56,3% en cueros de ganado sano (Barkocy-Gallagher y col., 2003). En un estudio realizado en 9 frigoríficos exportadores de la Argentina se obtuvo una prevalencia de STEC O157 del 4,1% en materia fecal y 2,6% en carcasa (Masana y col., 2010). En el mismo muestreo la prevalencia de STEC no-O157 fue de 22,3% en materia fecal y de 9,0% en carcasa (Masana y col., 2011).

Etcheverría y col. (2010), determinaron la prevalencia de STEC a lo largo de la cadena de producción de carne en provincia de Buenos Aires. En este estudio STEC fue detectada en el 12,3% de las reses en frigorífico y en el 18,6% de las reses que llegaban a la cabina de control sanitario. Además, el 25,0% de los cortes de carne en carnicería fueron *stx*₊, obteniendo diferencias significativas según el corte de carne analizado (paleta: 12,1%, asado: 12,1%, carne bovina molida: 40,7%). Otro trabajo realizado en carnicerías de provincia de Buenos Aires reportó la detección del gen *stx* en el 18,4% de 98 muestras de carne bovina molida (Srednik y col., 2013). Llorente y col. (2014), detectaron un 36,1% (91/252) de muestras de carne bovina molida *stx* ₊, y aislaron STEC no-O157 en el 18,2% de las muestras.

En otro trabajo realizado en la Argentina, se determinó una prevalencia de 3,8% de STEC O157:H7 en carne bovina molida (Chinen y col., 2001). Durante un muestreo con remuestreo en 36 locales de venta minorista de carne, Miccio y col., (2011), aislaron STEC O157 y no-O157 del 6,9% y 8,3% de las muestras de carne bovina molida, respectivamente. Estudios realizados en Francia, Australia y EE.UU. determinaron una prevalencia de STEC en carne bovina molida de aproximadamente 16,0% (Bohaychuk y col., 2006), mientras que Mora y col. (2007) reportaron en España una prevalencia del 12,0%.

En la Argentina, se detectó STEC no-O157 en el 8,4% de hamburguesas supercongeladas (Gómez y col., 2002). Chinen y col. (2009), aislaron STEC O157 del 10,1% y 3,3% de las muestras de hamburguesas de carne bovina crudas y cocidas locales de comidas rápidas de Argentina, respectivamente.

STEC es resistente a los ácidos y puede sobrevivir en alimentos fermentados y vegetales frescos. Aunque el 52% de los brotes ha sido atribuido al consumo de carne bovina (Rangel y col., 2005), a nivel internacional se ha registrado un aumento en el número de notificaciones asociadas al consumo de alimentos de origen vegetal (Report of the HPSC Sub-Committee on Verotoxigenic *E. coli* Chapter 1: Clinical Features and Epidemiology of VTEC). La contaminación de los vegetales se debe a la fertilización de los cultivos con materia fecal animal, o por contaminación durante la cosecha o procesamiento de los mismos, ya que se observó la presencia de los microorganismos incluso en el interior del producto. Un gran brote asociado al consumo de rábanos contaminados se registró en 1996 en Japón y afectó a 8.000 personas (Watanabe y col., 1996).

El tratamiento térmico es el método recomendado para asegurar la eliminación de STEC de los alimentos. La temperatura de pasteurización de la leche (72 °C durante 16,2 seg) es un método efectivo para eliminar 10^4 células de *E. coli* O157:H7 por mililitro. En los alimentos cárnicos una temperatura interna de 63 °C, constituye un punto crítico de control para asegurar la inactivación de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA, *Food and Drug Administration*) recomendó incrementar la temperatura de cocción de las hamburguesas a 68,3 °C después de un brote que involucró a cinco Estados y afectó a más de 700 personas (Griffin y col., 1994).

En EE.UU. se demostró que la pasteurización de la leche realizada según los tiempos y temperaturas recomendadas por FDA, no reduce la actividad biológica de Stx2. Sin embargo, el tratamiento a 100 °C durante 5 min inactiva la toxina. Estos datos demuestran que Stx2 no es inactivada por la pasteurización convencional (Rasooly y col., 2010).

La contaminación fecal del agua puede deberse a la descarga de materia fecal en aguas de recreación o agua de bebida sin tratamiento previo. En Argentina se aisló *E. coli* O157:H7 en el Río de La Plata, en áreas cercanas a las tomas de agua para consumo humano (López y col., 1998). En el año 2000 en Canadá ocurrió el mayor brote hídrico de ETA causado por STEC O157, que afectó a 2.300 personas y produjo la muerte de 7 (O'Connor, 2002).

E. coli O157:H7 puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el agua, especialmente a bajas temperaturas, y se ha sugerido que incluso puede entrar en un estado de “viable pero no cultivable” pero es susceptible al agua clorada (Wang y Doyle, 1998). El adecuado tratamiento con cloro del agua de las piscinas es

fundamental. Entre 1982 y 2002, en EE.UU., se registraron 7 brotes por *E. coli* O157 asociados con el uso de piscinas (Rangel y col., 2005).

1.10.- Legislación alimentaria sobre STEC

Los organismos internacionales que pautan la seguridad alimentaria a nivel mundial como el CODEX, y aquellos que regulan el comercio internacional como la OMC, enfatizaron la necesidad de basar sus normativas de seguridad alimentaria y comercial, en evaluaciones objetivas de riesgo microbiológico. La carencia de datos dificulta la implementación de medidas efectivas de control y vigilancia. Por lo tanto, es necesario evaluar la condición actual del proceso de producción de alimentos para luego poder acceder a posteriores etapas de control.

A partir de junio de 2012, EE.UU. implementó medidas relacionadas a mitigar los riesgos sanitarios de las carnes bovinas por cepas STEC patógenas para el hombre. USDA-FSIS adoptó regulaciones aplicables a las carnes frescas destinadas a la producción de carnes molidas. En la UE, también a partir de esa fecha, se comenzaron a aplicar controles en frontera a cortes de carnes frescas rechazando mercadería sin la debida confirmación del riesgo para los consumidores.

Estados Unidos. USDA/FSIS introdujo en Junio de 2012 una nueva normativa *FSIS NOTICE 27th April 2012: FSIS Verification Testing NON-O157 Shiga Toxin Producing Escherichia coli (NON-O157 STEC) in imported product under the MT51 Sampling Program*, donde se determinan los siguientes serogrupos: O26, O45, O103, O111, O121, O145 (“*big six*”) como adulterantes para productos destinados a molienda.

En esta metodología se determina que para que una mercadería sea rechazada debe confirmarse la presencia de STEC por aislamiento. FSIS considera

que un resultado positivo al *screening* de *stx*, *eae* y de al menos uno de los 6 serogrupos, inhabilita la utilización de ese lote de carne para la producción de carne molida. A partir de las regulaciones de EE.UU., en el mercado estadounidense y europeo se adoptaron medidas relacionadas a mitigar los riesgos sanitarios de la carne bovina por STEC.

Unión Europea. En 2012, se comenzaron a aplicar controles en frontera a cortes de carne fresca rechazando lotes implementando el criterio de “tolerancia cero”, inclusive ante la detección del gen *stx*. Las normativas en las cuales se basa la certificación de los productos exportados a la UE son las siguientes: Reglamento UE 2073/2005 y Reglamento UE 1441/2007. En la UE la situación es compleja, ya que se basan jurídicamente en el Reglamento (CE) nº 178/2002- Capítulo IV y en el Reglamento (CE) Nº 882/2004 – Capítulo 2 para sostener la posición de los rechazos. Ambos reglamentos determinan que es necesario adoptar medidas encaminadas a garantizar que los productos que se comercializan no resultan perjudiciales para la salud, sin establecer claramente cuáles son los criterios microbiológicos que deben considerarse, con ellos cada Estado Miembro se encuentra libre para aplicar sus propios criterios. La situación desde el inicio de los controles fue confusa y con ciertas irregularidades, hasta hoy no existe legislación específica sobre STEC (O157:H7 y no-O157), y por lo tanto tampoco existe una normativa aprobada para su análisis en alimentos. Entre 2012 y 2013, con sólo la detección de los genes *stx* se rechazaban lotes aduciendo contaminación con *E. coli* STEC, incluyendo a las plantas elaboradoras en el RASFF para controles reforzados que, en caso de reiterar hallazgos positivos, pasaban a control sistemático, procedimiento que consiste en el control del 100% de los envíos conforme a lo

establecido en los Artículos 24 y 25 de la Directiva 97/78/CE y al Artículo 53 del Reglamento (CE) nº 178/2002. Sin embargo, las autoridades de la UE no establecían las condiciones para que una planta bajo control sistémico deje de estarlo.

En 2012, entró en vigencia la Norma ISO 13136 para la detección, aislamiento y caracterización de STEC (O157, O111, O26, O103 y O145). En la introducción de esta metodología microbiológica se define como potencialmente patógenos a todos los serotipos de STEC. Este concepto no tiene sustento científico y condiciona a las autoridades de los puertos de frontera a tomar una decisión extrema (tolerancia cero) a cualquier alimento, sin contemplar el riesgo para el consumidor. Cabe aclarar que una norma ISO no es una herramienta legal sino técnica. Hasta el presente no existe un marco legal vigente sobre STEC (O157:H7 y no-O157) en alimentos.

Actualmente, la UE está evaluando la incorporación de un criterio microbiológico para aquellos productos considerados de alto riesgo (alimentos listos para el consumo, vegetales crudos y mínimamente procesados, carne molida y cortes destinados a consumo crudo). El criterio microbiológico en evaluación establecería que ante la detección de los genes *stx* + *eae*, *aggR* y *aaiC*, se debe realizar el aislamiento y la caracterización del microorganismo. Si se identifica un serotipo de *E. coli* (*stx* positivo + *eae*, *aggR* o *aaiC*) asociado con enfermedades severas (colitis hemorrágica y SUH) se procede al rechazo del lote. En este contexto, no se realizan controles reforzados, ni sistemáticos. Tampoco se rechazan lotes por presencia de los genes *stx*, sino que los rechazos se fundamentan mediante aislamiento confirmatorio. Por lo tanto, la situación actual en la UE

demuestra que las medidas implementadas en 2012 y 2013 fueron exageradas, confirmando que no estuvieron basadas en análisis de riesgo.

Mecosur. En Uruguay vista la nueva normativa el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca de dicho país a través de la DGSG/DIA resolvió aplicar controles oficiales en todas las producciones de carne bovina cruda, recortes (*trimming*) y/o carne que pueda destinarse a preparar carne picada. Esta misma normativa establece que las empresas productoras de dichos productos deben establecer procedimientos de autocontrol para exportar a EE.UU. Estas medidas adoptadas por el gobierno y la industria uruguaya pueden servir como experiencia para el resto de los países del Mercosur en la certificación de sus productos. Tanto la nueva regulación del FSIS como las decisiones fuera de los reglamentos adoptados por la DG-SANCO y las autoridades sanitarias de algunos Estados Miembros de la UE obligan a los países proveedores a diseñar una estrategia para responder a cada mercado.

Marco regulatorio y estado de situación en la República Argentina.

En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica. Además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Se producen alrededor de 500 casos nuevos por año con un importante subregistro, acumulándose más de 15.000 casos desde 1965 hasta el presente. Generalmente los niños afectados son menores de 5 años, fundamentalmente entre 6 y 36 meses, de ambos sexos y cualquier condición social. Sin embargo, en los últimos años también han reportado casos en adolescentes. Se encontraron evidencias de

infección por STEC en el 75% de los casos, siendo O157:H7 el serotipo más frecuente.

SENASA dispone dos circulares, una refiere a O157:H7 (3834) y la otra a un monitoreo de STEC no-O157 (4032).

En la República Argentina, en mayo de 2004, se modificó el Artículo 255 del Código Alimentario Argentino (CAA), y en 2012 se modificaron o incluyeron los artículos 156tris, 286bis, 302 y 925quater. Estos refieren a las especificaciones microbiológicas que deben cumplir la carne picada fresca, comida preparada lista para consumo, salazones cocidas, chacinados frescos, y las frutas y hortalizas, respectivamente. Todas estas categorías de alimentos deben cumplir con un criterio microbiológico, que entre otros parámetros se incluye la ausencia de *E. coli* O157:H7 en 5 muestras de 65 g cada una, o ausencia en 5 muestras de 25 g cada una (Art 925quater). Para el análisis de estos alimentos se recomiendan las metodologías USDA/FSIS, ISO y BAM-FDA que refieren específicamente para *E. coli* O157:H7.

La vigilancia de STEC no-O157 en alimentos no se realiza en forma generalizada, debido a que no existe reglamentación que incluya la búsqueda de STEC no-O157 en alimentos. La detección de STEC no-O157 se limita a determinados lugares con capacidad analítica, como por ejemplo la Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. En este contexto, al igual que algunos Estados Miembro de la UE, las autoridades sanitarias aplicaron el criterio de “tolerancia cero” para STEC en hamburguesas congeladas, de acuerdo a lo que estipula el artículo 6 inciso 6a del CAA, como consecuencia de la ausencia de un marco regulatorio específico. En el período 2004-2010 (n=1245), el Sistema de Vigilancia del Ministerio de Salud de la

Nación reportó la siguiente frecuencia en STEC no-O157:H7 aislados de casos clínicos: O145:[H27, NM, NT] (13,6%), O121:H19 (2,2%), O26:[H2, 11, NT] (1,4%), O174:[H8, 21, 28, NM] (1,0%), O111:[NM, NT](0,8%), O103:[H2, NM, NT] (0,6%), O8:[H16, 19] (0,4%), O91:[H21, NM, NT] (0,4%), O113:[H4, 19, 21] (0,3%), ONT:[H6, 7, 11, 12, 49, NT] (3,1%) y OR:[H11, NM, NT] (0,6%).

En 2015, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) aprobó la inclusión en los criterios microbiológicos de los Artículos 156tris, 255, 302 y 925quater los serogrupos O145, O121, O26, O111 y O103, debido a que además de ser los serogrupos más prevalentes en salud pública existen diferentes alternativas técnicas validadas para su confirmación.

1.11.- Detección y aislamiento de STEC en alimentos. Protocolos Internacionales Estandarizados

La elevada prevalencia de brotes y casos asociados a los serotipos O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 en carnes y otros alimentos, motivó a que las agencias de control de la seguridad alimentaria, tales como el USDA, FDA o ISO focalicen sus esfuerzos de control en la detección de estos serotipos mediante técnicas oficiales para alimentos seleccionados como los productos cárnicos. Las metodologías oficiales para la búsqueda de STEC en alimentos se basan, en líneas generales, en los siguientes pasos: 1) enriquecimiento en caldo de cultivo selectivo, 2) tamizaje, 3) concentración inmunomagnética, 4) aislamiento en medios selectivos y diferenciales, 5) confirmación por pruebas bioquímicas y serológicas, y 6) determinación de factores de virulencia.

A diferencia de las muestras clínicas de pacientes infectados, en las cuáles STEC constituye la principal población bacteriana, la detección y el aislamiento de este patógeno en matrices alimentarias representa un importante desafío. Además de encontrarse estresada por los procesos tecnológicos y de conservación aplicados sobre el alimento, la presencia de microbiota competitiva acompañante determina la aplicación de pasos de enriquecimiento y aislamiento con medios de cultivo que estimulen el desarrollo de STEC e inhiban la proliferación de otros grupos bacterianos.

El amplio grupo STEC se distingue de otras *E. coli* principalmente por sus características genotípicas de virulencia, y el conocimiento de éstas características ha sido utilizado para el desarrollo de metodologías de detección molecular. El metabolismo y las características de resistencia antimicrobiana típicas de las cepas de STEC O157 permitieron el desarrollo de normas para la detección y el aislamiento de este serogrupo. Por ejemplo, la norma ISO 16654:2001 describe un método para el aislamiento de *E. coli* O157, basado en características específicas de este serogrupo (capacidad para crecer en presencia de novobiocina, cefixima y telurito de potasio e incapacidad de fermentar sorbitol). Sin embargo, los esfuerzos para identificar rasgos que caractericen el crecimiento STEC no-O157, y que permitan distinguir entre los distintos serogrupos y con cepas de *E. coli* comensales, no han sido suficientes para lograr el desarrollo de una metodología para la detección y el aislamiento de todos los serogrupos no-O157.

Las mayoría de los serogrupos de STEC que han sido asociadas más frecuentemente con enfermedad grave en el hombre poseen además los genes *stx* y *eae*. Estas características son la base de las metodologías de tamizaje para

muestras de alimentos (EFSA, 2013). Sin embargo, no alcanza con la detección de los genes de virulencia en el alimento para determinar que una muestra está contaminada con STEC. El aislamiento de la bacteria y la confirmación de todo perfil virulento en una misma cepa, descartando la presencia de ADN libre o fagos *stx* libres en el caldo de enriquecimiento, son necesarios para confirmar una muestra con tamizaje positivo. Este paso puede retrasar la confirmación del alimento sospechoso debido a la carencia de medios de cultivo específicos y diferenciales orientados a la identificación de STEC (EFSA, 2013; Kase y col., 2015).

USDA dispone de las normas MLG 5.09 y MLG 5B.05 para el análisis de STEC O157:H7 y para los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 en productos cárnicos, respectivamente. Ambas normas realizan un paso de enriquecimiento en caldo Tripticasa Soya modificado (mTSB) seguido por una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) en Tiempo Real (TR) con kit comercial para la detección de O157:H7 en el caso de MLG 5.09, y para los genes *stx* y *eae* en el caso de MLG 5B.05. Aquellas muestras con señal *stx/eae* son sometidas a otro tamizaje por PCR-TR para detección de serogrupo. Si la muestra resulta positiva para O157:H7 (MLG 5.09) o para *stx/eae* y para alguno de los 6 serogrupos no-O157 (MLG 5B.05), se procede al aislamiento por SIM con siembra en agar Rainbow modificado.

La FDA propone un protocolo para aislar DEC, incluyendo las STEC O157:H7 y no-O157 implicadas en ETA (Feng y col., 2011). Sin embargo este protocolo está validado para el análisis de productos que contengan carne pero no para muestras de carne exclusivamente.

La especificación técnica CEN ISO/TS 13136 incluía la detección de genes *stx* seguida, en las muestras positivas, de la detección del gen *eae*. Todas las muestras *stx/eae+* debían ser luego sometidas a la detección del serogrupo específico y al aislamiento mediante SIM. A partir del brote de Alemania de 2011, CEN ISO/TS 13136 fue modificada para adaptarla a la nueva realidad europea. Según a nueva versión (ISO/TS 13136:2012), cualquier STEC es considerada patógena para el hombre y podría causar enfermedad severa dependiendo del perfil de riesgo del alimento (alimentos listos para consumo, alimentos que sufren cocción o pasteurización) y del estado del individuo que lo consuma. Además, dado la gran plasticidad genómica de esta especie bacteriana, es posible que modificaciones en los factores de virulencia puedan generar nuevas cepas patógenas pertenecientes a otros serogrupos. Sugiere también que serogrupos patógenos pueden surgir a partir de la adquisición del gen *stx* por cepas no STEC (ISO/TS 13136:2012). ISO/TS 13136:2012 es un método horizontal para la detección y determinación de STEC perteneciente a los serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145. Esta norma propone la utilización de mTSB con 16 mg L⁻¹ de novobiocina y casaminoácidos, agua peptonada bufferada (APB) o APB modificada con piruvato, acriflavina, cefsulodina y vancomicina como caldos de enriquecimiento, según el tipo de matriz a analizar, seguido de un tamizaje por PCR-TR para la detección de los genes *stx* y *eae*, y el aislamiento en agar TBX aplicando la técnica de SIM en caso que exista para el serogrupo identificado.

En este contexto, es necesario contar con metodologías para la detección y confirmación de STEC validadas que puedan ser utilizadas para la verificación de los procesos de elaboración de los alimentos a lo largo de la cadena de producción, en

particular de la cadena cárnica bovina, y cumplir dos grandes metas: 1) mejorar la inocuidad de los productos cárnicos que se consumen en Argentina, 2) satisfacer las exigencias de los principales mercados internacionales.

2. OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general

El objetivo del trabajo fue disminuir la contaminación con STEC en la carne bovina molida destinada a consumo minorista, como instrumento para mejorar su calidad microbiológica y reducir los problemas de importancia ligados a la salud pública en nuestro país, como por ejemplo el SUH. Para ello se dividió el trabajo en tres etapas: 1) evaluación de diferentes medios de cultivo para el enriquecimiento y aislamiento de STEC en carne bovina molida, 2) desarrollo y validación de dos técnicas de tamizaje para la detección de los genes *stx* a partir del caldo de enriquecimiento, y 3) implementación de estrategias de mejora a nivel de boca de expendio minorista utilizando la metodología validada como herramienta analítica de verificación.

2.2.- Objetivos específicos

- 1) Identificar la mejor combinación de caldos de enriquecimiento y agares para el aislamiento de STEC no-O157 en carne bovina molida
 - a) Evaluar diferentes medios y condiciones de cultivo para el enriquecimiento de STEC no-O157
 - b) Evaluar medios y condiciones de cultivo para el aislamiento de STEC no-O157
 - c) Comparar diferentes condiciones de cultivo, caldos de enriquecimiento y medios sólidos para el aislamiento de STEC no-O157 en una etapa intra-laboratorio
- 2) Diseñar y validar dos estrategias de PCR para la detección de los genes *stx* a partir del enriquecimiento de carne bovina molida en una etapa intra-laboratorio

- a) Diseñar oligonucleótidos cebadores y sondas
 - b) Desarrollar y validar dos técnicas de PCR SYBR-Green para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂
 - Definir las condiciones de PCR
 - Determinar límite de detección y robustez
 - Determinar inclusividad y exclusividad
 - Analizar muestras de carne bovina molida contaminadas artificialmente
 - c) Desarrollar y validar una técnica de PCR en tiempo real múltiple para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂
 - Definir las condiciones de RT-PCR
 - Determinar rango dinámico y eficiencia
 - Determinar límite de detección y robustez
 - Determinar inclusividad y la exclusividad
 - Analizar muestras de carne bovina molida contaminadas artificialmente
- 3) Implementar estrategias de mejora en carnicerías de Berisso utilizando la metodología validada como herramienta de verificación
- a) Cuantificar el riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso y determinar la contaminación por STEC
 - Cuantificar el riesgo de cada local
 - Identificar todos los locales de venta de carne bovina molida de la ciudad de Berisso, provincia de Buenos Aires, y diseñar un esquema de visitas
 - Determinar la contaminación de carne bovina molida y muestras ambientales con STEC O157 y no-O157

- b) Establecer y aplicar estrategias de mejora en las carnicerías y de información a la comunidad de la ciudad de Berisso
 - Realizar un ciclo de capacitaciones grupales para carniceros con base en los resultados obtenidos
 - Realizar un ciclo de capacitaciones individuales en las carnicerías con base en los resultados obtenidos
 - Implementar una estrategia para informar a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA
- c) Verificar el éxito de las estrategias de mejora implementadas
 - Cuantificar el riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso
 - Determinar la contaminación de carne bovina molida y muestras ambientales con STEC O157 y no-O157
 - Caracterizar los aislamientos de STEC O157 y no-O157 mediante técnicas fenotípicas y genotípicas
 - Determinar la relación clonal de los aislamientos mediante técnicas de subtipificación molecular

Organización de la presente tesis doctoral

Con el objeto de lograr una mejor comprensión de este trabajo se procedió a dividir las etapas del desarrollo en 3 capítulos. Estos contienen los materiales y métodos utilizados para lograr cada uno de los objetivos planteados, además de los resultados de mayor relevancia, la discusión de los mismos y conclusiones parciales. Por último se incluyen las conclusiones finales del trabajo.

CAPÍTULO I

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga es un patógeno transmitido por alimentos. El objetivo de este capítulo fue identificar la combinación más efectiva de caldos de enriquecimiento selectivo y agares de cultivo para el aislamiento de todos los serogrupos de STEC en muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente. Un total de 192 muestras de carne bovina molida fueron contaminadas experimentalmente con cepas de STEC y no-STECS, y procesadas utilizando todas las combinaciones posibles entre 4 caldos de enriquecimiento y 3 agares para aislamiento. Se calculó la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo positivo de cada combinación. El protocolo de enriquecimiento utilizando caldo tripticasa de soya con 8 mg L⁻¹ de novobiocina y el caldo *Escherichia coli* modificado seguidos por el aislamiento en agar MacConkey fueron las combinaciones más sensibles para el aislamiento de STEC a partir de muestras contaminadas experimentalmente. Considerando que no existe una metodología ideal para el aislamiento de todas las STEC a partir de la carne bovina molida y que el rendimiento de los protocolos para su aislamiento es deficiente, es necesario maximizar el uso de las técnicas disponibles para la detección y aislamiento de STEC en alimentos.

Objetivo específico a alcanzar:

- 1) Identificar la mejor combinación de caldos de enriquecimiento y agares para el aislamiento de STEC no-O157 en carne bovina molida**
 - a) Evaluar diferentes medios y condiciones de cultivo para el enriquecimiento de STEC no-O157
 - b) Evaluar medios y condiciones de cultivo para el aislamiento de STEC no-O157
 - c) Comparar diferentes condiciones de cultivo, caldos de enriquecimiento y medios sólidos para el aislamiento de STEC no-O157 en una etapa intra-laboratorio

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 - Evaluación de diferentes medios y condiciones de cultivo para el enriquecimiento de STEC no-O157

A - Muestras de carne bovina molida

La carne bovina molida fue provista por la empresa Marfrig-Group y provenía de un mismo lote. Se confirmó la ausencia de genes *stx* en el lote de carne mediante el análisis de 15 muestras del mismo por PCR MK (Leotta, 2006).

Para la PCR MK se utilizó un par de oligonucleótidos cebadores (MK1 y MK2) que amplifican un fragmento de 224/227 pb de la región conservada del gen *stx* para *Stx1* y *Stx2* (Karch y Meyer, 1989), y un Control Interno de Amplificación Competitivo (CIAC) (Tabla 1). Las cepas control utilizadas en cada PCR se detallan en la Tabla 2 y las condiciones de la corrida electroforética y la adquisición de imágenes en el punto 3 del Anexo.

El lote de carne bovina molida fue fraccionado en 196 muestras de 10 g cada una y conservado en bolsas de muestreo estériles (Whirl-Pak, Nasco, EE.UU.).

B - Cepas bacterianas

Se utilizaron 12 cepas de STEC y 24 no-STECS, pertenecientes a la colección del IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout"; UNLP-CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP). Todas las cepas fueron incubadas en 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (CCC) (Biokar, Zac de Ther, France). Luego de la incubación, una ansada del cultivo fue sembrada en estría por agotamiento en agar tripticasa de soya (ATS) (Biokar, Zac de Ther, France). Una colonia aislada de cada cepa pura se repicó en 5 ml de CCC. Todos

los tubos y placas fueron incubados a 37°C durante 18 a 24 h. El número de identificación, origen y características relevantes de las cepas bacterianas utilizadas se encuentran detalladas en la Tabla 3.

C - Protocolo de contaminación

A partir del cultivo en CCC se realizaron diluciones seriadas de las cepas STEC y no-STECS en 9 ml de agua peptonada bufferada (APB) (Biokar, Zac de Ther, France). Un ml de los tubos correspondientes a las diluciones 10^2 y 10^3 se utilizó para contaminar las muestras de carne bovina molida. La carga bacteriana utilizada para la contaminación experimental fue verificada mediante recuento en agar plate count (APC) (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina) e incubación a 37°C por 18 a 24 h.

Ocho muestras por cepa fueron contaminadas experimentalmente con cada una de las 12 cepas de STEC (n=96), y cuatro muestras por cepa con 24 cepas no-STECS diferentes (n=96), mediante la adición de 1ml del inóculo correspondiente a la dilución 100 UFC ml^{-1} y 1000 UFC ml^{-1} , respectivamente (Figura 1).

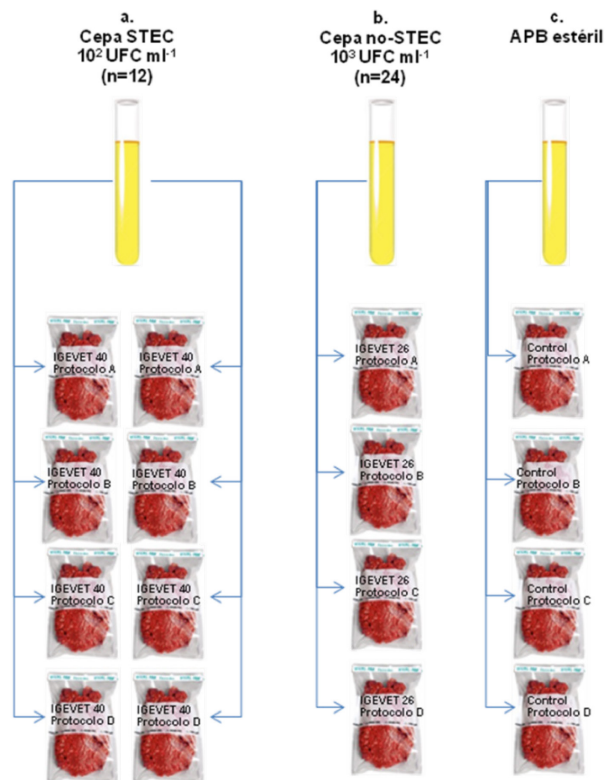


Figura 1. Esquema de contaminación utilizado para evaluar los protocolos de enriquecimiento y aislamiento para STEC no-O157. En este esquema se utilizan las cepas IGEVET 40 e IGEVET 26 para ejemplificar el protocolo de contaminación de la carne bovina molida con cepas STEC y no-STECC, respectivamente.

Luego de la contaminación experimental, las muestras se reagruparon de forma diferente para proceder al enriquecimiento. Se confeccionaron 4 grupos de 49 muestras cada uno, conteniendo cada grupo (1/4): 24 muestras contaminadas con las 12 cepas STEC diferentes por duplicado, 24 muestras cada una contaminada con una cepa diferente de las 24 no-STECC y 1 muestra control sin contaminar. Cada uno de los 4 grupos se procesó con un protocolo de enriquecimiento diferente.

D - Protocolos de enriquecimiento

Cada uno de los grupos (1/4) de 49 muestras de carne bovina molida fue enriquecido con un protocolo diferente. Los cuatro protocolos utilizados fueron:

- Protocolo A: caldo tripticasa de soya modificado con 16 mg L⁻¹ de novobiocina y casaminoácidos (CTSm-16) (Acumedia Manufacturers, EE.UU.), incubado a 37±1°C por 20 h según el borrador de la norma ISO/TS 13136;
- Protocolo B: caldo tripticasa de soya modificado con 8 mg L⁻¹ de novobiocina y casaminoácidos (CTSm-8) (Acumedia Manufacturers, EE.UU.), incubado a 42±1°C por 20 h según la norma USDA MLG 5B.05;
- Protocolo C: caldo *Escherichia coli* modificado (ECm) (Acumedia Manufacturers, EE.UU.), incubado a 42±1°C por 20 h;
- Protocolo D: APB modificada con piruvato (APBm+p) (Biokar, Zac de Ther, France), incubada a 37±1°C por 5 h, seguida del agregado de un suplemento de acriflavina, cefsulodina y vancomicina (ACV) (Biokar, Zac de Ther, France) incubado a 42±1°C por 18 h según FDA-BAM Chapter 4A:2011 (Feng y col., 2011).

Para obtener la dilución 1:10, 90 ml de caldo de enriquecimiento fueron adicionados a cada muestra de 10 g de carne en todos los protocolos.

1.2 - Evaluación de medios y condiciones de cultivo para el aislamiento de STEC no-O157

Todas las muestras fueron procesadas para el aislamiento de STEC no-O157. Los agares utilizados para el aislamiento fueron: 1- Eosina Azul de Metileno Levine (EMB-L) (Biokar, Zac de Ther, France), 2- MacConkey (MC) (Becton

Dickinson Co., Sparks, MD, EE.UU.), y 3-Tripton Bile X-Glucoronide (TBX) (Biokar, Zac de Ther, France). El protocolo de aislamiento se describe a continuación.

Se rotularon 3 tubos tipo eppendorf con el número de identificación de cada muestra *stx*-positiva. En cada tubo se colocó 1 ml de caldo de enriquecimiento de la muestra correspondiente. Todos los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 min y luego se desechó casi la totalidad del sobrenadante, manteniendo en el tubo el pellet bacteriano y aproximadamente 10 µl de caldo que se utilizó para re-suspender el pellet con pipeta. El sedimento de cada tubo de una misma muestra se sembró por agotamiento en 3 placas de EMB-L, MC o TBX (Figura 2). Las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h. A partir de la estría inicial en la primera placa se procedió a realizar la extracción de ADN como se describe en el punto 2 del Anexo. Este extracto de ADN se utilizó como molde para la detección de los genes *rfb*_{O157}, *stx*₁ y *stx*₂ mediante una técnica de PCR múltiple validada por Leotta y col. (2005). Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos cebadores, un par para amplificar un fragmento del gen *stx*₁, correspondiente a la subunidad B de la toxina Stx1, otro par amplifica un fragmento del gen *stx*₂, correspondiente a la subunidad A de Stx2 y el tercer par de cebadores que amplifican un fragmento del gen *rfb*_{O157} correspondiente a una proteína involucrada en la síntesis del LPS O157 (Tabla 1). Las cepas control utilizadas en cada PCR se detallan en la Tabla 2 y las condiciones de la corrida electroforética y la adquisición de imágenes en el punto 3 del Anexo.

Se consideraron negativas a las muestras con resultado negativo a *stx*₁ o *stx*₂ por PCR múltiple a partir de la zona de crecimiento confluyente.

A partir de aquella placa cuya zona de confluencia mostró bandas de amplificación para alguno de los genes *stx* por PCR múltiple, se repicaron 50

colonias del triplete de placas, las cuales fueron sembradas en una placa grillada de ATS (Figura 2). Todas las placas fueron incubadas a 37°C durante 18 h. Luego de la incubación se armaron 5 pooles de 10 colonias cada uno, a los que se les realizó la extracción de ADN por ebullición en buffer Tritón (punto 2 del Anexo). Los extractos de ADN de los pooles fueron analizados por PCR múltiple (Leotta y col., 2005) para la detección de los genes *stx*. Para la identificación de la colonia *stx*-positiva, se analizó cada colonia del pool positivo por PCR múltiple (Figura 2).

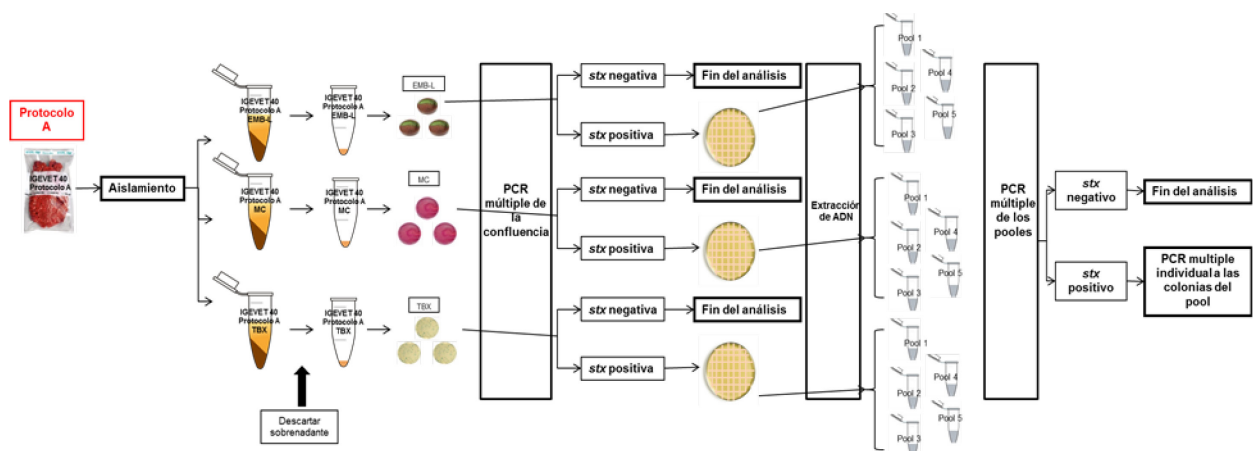


Figura 2. Flujograma de trabajo para evaluar medios y condiciones de cultivo para el enriquecimiento y aislamiento de STEC no-O157, ejemplificado con el protocolo A.

1.3 - Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a partir de los resultados obtenidos de la combinación de un protocolo de enriquecimiento seguido de la siembra en un agar (E+A); y también de la combinación de un protocolo de enriquecimiento seguido de la siembra en los 3 agares (E+3A) probados (Figura 3). El aislamiento de al menos 1 colonia *stx* fue el criterio utilizado para determinar un resultado positivo. Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y los intervalos de confianza (IC) del 95%, para cada combinación E+A y E+3A. El test exacto de Fisher y el test Chi cuadrado con corrección de Yates, se utilizaron para

comparar la proporción de resultados positivos obtenidos con cada combinación de E+A y de E+3A. Para calcular la frecuencia de cada E+3A se utilizó el test Chi-cuadrado de Pearson. El valor $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo y todos los test fueron de dos colas. Para determinar la concordancia entre E+A y E+3A se aplicó el coeficiente kappa de Cohen (k) con un IC del 95%, y fue interpretado como: pobre (menor a 0.20); justo (0.20-0.39); moderado (0.40-0.59); bueno (0.60–0.79); y excelente (0.80 o más). El análisis estadístico se realizó utilizando el software JMP 11.0.

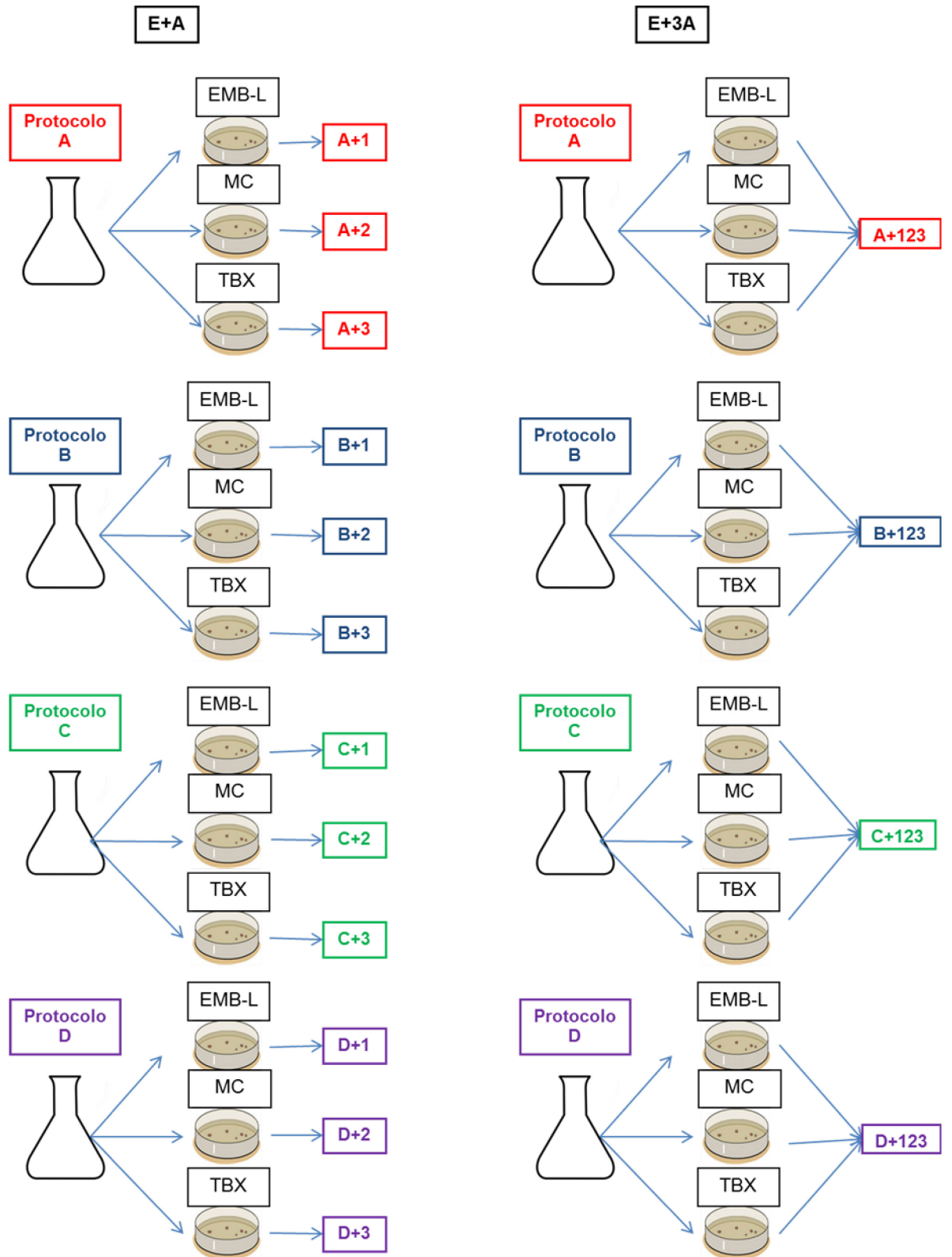


Figura 3. Esquema de las dos formas en que se analizaron los resultados para el análisis estadístico. E+A: combinación de un protocolo de enriquecimiento seguido de la siembra en un agar. E+3A: combinación de un protocolo de enriquecimiento seguido de la siembra en los 3 agares.

2. RESULTADOS

Con la finalidad de desarrollar una metodología para detectar y aislar STEC no-O157 en productos cárnicos se probaron todas combinaciones posibles entre 4 protocolos de enriquecimiento y 3 agares de cultivo para el aislamiento.

La sensibilidad y el valor predictivo para cada combinación de E+A y E+3A se presentan en la Tabla 4. La especificidad para todas las combinaciones de E+A y E+3A fue de 100% (IC 95%, 85.62%-100%).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de aislamientos obtenido con la mayoría de las combinación de E+A ($p > 0.05$), excepto para protocolo A+TBX y protocolo B+MC, D+EMB-L, D+MC y D+TBX (Tabla 5).

La proporción de resultados positivos con las diferentes combinaciones de E+3A mostró diferencias estadísticamente significativas (χ^2 19.06; DF= 3; p 0.001). La correlación entre las combinaciones de E+A y de E+3A se muestra en la Tabla 5.

El coeficiente Kappa de Cohen mostró buena concordancia entre las siguientes combinaciones de protocolos: A+TBX y A+3A, C+MC y C+3A, y C+TBX y C+3A; y excelente concordancia entre B+MC y B+3A, D+EMB-L y D+3A, y D+MC y D+3A (Tabla 5). La concordancia obtenida entre los protocolos A+3A, B+3A y C+3A fue buena (valor k 0.647, 95% CI, 0.013-1), mientras que la obtenida entre A+3A y C+3A fue pobre (valor k 0.032, 95% CI, -0.22-0.291).

3. DISCUSIÓN

Los alimentos son matrices analíticas complejas que pueden dificultar el desarrollo de STEC y su posterior detección por las técnicas de tamizaje. Actualmente se encuentran disponibles varios protocolos para la detección, aislamiento y caracterización de STEC O157:H7 (ISO 16654:2001; USDA MLG 5.09), como así también para los serogrupos más prevalentes identificados en infecciones clínicas (O26, O45, O103, O104, O111, O121, O145 y O157) (Gill y col., 2014; USDA MLG 5B.05; ISO/TS 13136:2012). Sin embargo, estos protocolos no son efectivos para otros serogrupos, y su aislamiento continúa siendo un desafío.

La principal limitación para la detección de STEC no-O157 es la falta características fisiológicas diferenciales para distinguir entre los más de 400 serogrupos de STEC no-O157 y las cepas de *E. coli* no patógenas (Coombes y col., 2008; Mathusa y col., 2010; Mingle y col., 2012). El enriquecimiento es necesario para estimular el desarrollo de células potencialmente estresadas, aumentar su número, y además diluir los efectos de los inhibidores y la microbiota competitiva que pueda estar presente en la muestra (Wang y col., 2013). Se han descrito varios protocolos suplementados con diferentes compuestos para inhibir la microbiota competitiva en muestras de alimentos durante el enriquecimiento (Vimont y col., 2006; Wang y col., 2013). Es importante considerar que los agentes selectivos y los inhibidores deben encontrarse en cantidades adecuadas que frenen la proliferación de la microbiota competitiva pero permitan el desarrollo de las células de STEC que eventualmente podrían encontrarse estresadas (Pathogenic *Escherichia coli* Network, 2006). Además, la heterogeneidad de STEC determina que los caldos de enriquecimiento selectivos para algunos serogrupos puedan inhibir el desarrollo de

otros (Drysdale y col., 2004; Feng y col., 2011). Una alternativa para evitar posibles inhibiciones sería el uso de ABP a 37°C, pero el paso de aislamiento podría verse afectado por la proliferación de la microbiota competitiva (Drysdale y col., 2004).

En nuestro trabajo evaluamos el desempeño de 4 protocolos de enriquecimiento en combinación con 3 agares selectivos para el aislamiento de todos los serogrupos de STEC, en muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente.

La norma ISO/TS 13136:2012 es un método horizontal validado para la detección y el aislamiento de STEC de los serogrupos O157, O111, O26, O103 y O145 en alimentos. Debido a la emergencia de cepas portadoras de los genes *stx* y asociadas a enfermedad severa, como la cepa de *E. coli* enteroagregativa O104:H4, se estableció en esta norma que todas las cepas *stx* positivas deben ser consideradas patógenas (Frank y col., 2011). ISO/TS 13136:2012 propone 3 caldos de enriquecimiento diferentes basados en el tipo de matriz alimentaria a analizar, seguido por el aislamiento en agar TBX. Nuestro ensayo fue realizado con carne bovina molida, por tal motivo para el enriquecimiento seleccionamos de la norma ISO/TS 13136:2012 al CTSm-16 incubado a 37±1°C por 20 h. Este protocolo de enriquecimiento seguido del aislamiento en agar TBX obtuvo una sensibilidad significativamente mayor que cuando se utilizó agar EMB o MC para el aislamiento. La tasa de recuperación de cepas aumentó significativamente (91,6%) cuando fue calculada con el uso de los 3 agares simultáneamente. Esto pudo deberse al aumento en la cantidad de muestra sembrada, ya que se sembró el pellet correspondiente a 1 ml de caldo en cada triplete de placas, lo que da un total de 3 ml sembrados; a la mayor cantidad de colonias aisladas, ya que se sembraron nueve

placas, aumentando las chances de obtener aislada la colonia de STEC; a la mayor cantidad de colonias picadas, ya que se picaron 50 colonias por cada triplete, dando un total de 150 colonias; y a las características selectivas diferenciales de los agares, que usados en simultáneo podrían mejorar las chances de aislar cepas con algunos requerimientos de crecimiento diferentes.

La norma USDA MLG 5B.05 describe el procedimiento para detectar y aislar STEC no-O157 de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, a partir de productos cárnicos. Esta norma requiere la utilización de Separación Inmuno-magnética (SIM) a las muestras positivas para alguno de los genes Ag-O detectados en el tamizaje, seguida por la siembra en agar Rainbow. Con el objetivo de detectar no solo los serogrupos para los que está validada la norma USDA, sino todos los serogrupos de STEC no-O157, la sensibilidad y especificidad fueron evaluados sin la utilización de SIM ni de agar Rainbow. La sensibilidad del aislamiento fue mayor cuando se utilizó agar MC en comparación con agar EMB y TBX. No se observó una mejora significativa en la sensibilidad cuando se calculó utilizando los tres agares simultáneamente.

El protocolo propuesto por FDA para la detección y aislamiento de las DEC incluye a las STEC O157:H7 y no-O157 implicadas en casos ETA (Feng y col., 2011). Si bien este protocolo no fue diseñado para productos cárnicos exclusivamente, se recomienda para analizar alimentos listos para consumo que contengan carne. Este protocolo fue el menos efectivo para detectar y aislar STEC. A pesar de las mejoras significativas observadas en la sensibilidad del aislamiento al utilizar los tres agares simultáneamente (58,3%) en lugar de uno solo, este protocolo de enriquecimiento demostró un valor de sensibilidad significativamente menor que

el de todos los otros métodos evaluados en nuestro trabajo. Varios autores describieron el protocolo FDA para el enriquecimiento de STEC no-O157:H7 a partir de alimentos (Feng y col., 2011; Baranzoni y col., 2014; Kase y col., 2015). Sin embargo, en este estudio se demostró que el protocolo de enriquecimiento recomendado por FDA fue el menos sensible para el análisis de STEC no-O157 a partir de carne bovina molida.

El caldo ECm ya ha sido utilizado para la detección de STEC no-O157 en carcasas bovinas a nivel de frigorífico (Masana y col., 2011). Durante nuestro estudio, la sensibilidad observada al utilizar caldo ECm seguido del aislamiento en agar MC o en TBX fue buena (91,6%), y similar a los valores observados con los métodos estandarizados. Además, la sensibilidad (95,8%) aumentó significativamente cuando el aislamiento se realizó utilizando los tres agares simultáneamente.

Antes de la existencia de las normas oficiales para el aislamiento de STEC no-O157, el agar MC era uno de los agares utilizado con el objetivo de evaluar y comparar la eficiencia de los caldos ECm y CTSm para el enriquecimiento de STEC (Kanki y col., 2009). Varios estudios demostraron la eficacia de este agar para aislar STEC a partir de alimentos (Drysdale y col., 2004; Auvray y col., 2009; Masana y col., 2011). En este trabajo, el agar MC fue el más eficiente de los tres agares utilizados. El MC obtuvo 95,8%, 91,6%, y 45,8% de sensibilidad luego del protocolo de enriquecimiento B, C y D, respectivamente. El protocolo de enriquecimiento A obtuvo la mayor sensibilidad cuando se combinó con el aislamiento en TBX (83,3%).

A pesar de que una amplia gama de nuevos agares selectivos y diferenciales desarrollados para el aislamiento de STEC, la variedad en la portación de

marcadores y los diferentes requisitos de crecimiento de todos los serogrupos de STEC (incluso de cepas de un mismo serogrupo), imposibilita el desarrollo de un medio de cultivo ideal, que sea eficiente para la diferenciación entre serogrupos de *E. coli* patógenas y comensales.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

Existen varios protocolos para el aislamiento de STEC en alimentos. Con base en los resultados del presente capítulo, se concluye que no se dispone de una metodología o una combinación de métodos de aislamiento capaces de identificar todos los serogrupos de STEC. Por lo tanto, podría ser necesario no solo la utilización de herramientas bacteriológicas combinadas para el aislamiento, sino también la adecuación de los protocolos teniendo en cuenta la prevalencia regional de STEC en humanos, con la finalidad de maximizar el uso de las técnicas disponibles para la detección y aislamiento de STEC en alimentos.

CAPÍTULO II

RESUMEN

Escherichia coli productor de toxina Shiga es un patógeno transmitido por alimentos. Desarrollamos y validamos dos PCR SYBR Green (PCR-SYBR) y una PCR tiempo real múltiple (PCR-TR) para detectar los genes *stx*₁ y *stx*₂ en muestras de carne bovina molida. Para cada gen *stx* diseñamos un par de cebadores y una sonda de hidrólisis. Además, para la PCR-TR se utilizó un Control Interno de Amplificación No competitivo. Todas las validaciones intralaboratorio de las PCR se realizaron utilizando cepas puras y muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente. Se utilizaron 50 cepas de STEC y 30 no-STEAC. Todas las PCR obtuvieron un límite de detección de 1×10^2 UFC mL⁻¹ y 100% de inclusividad y exclusividad. Los resultados obtenidos cuando diferentes analistas realizaron las PCR en días alternativos fueron idénticos. Se desarrollaron y validaron dos estrategias de PCR, obteniendo un excelente rendimiento con muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente. La combinación de un enfoque basado en la identificación del perfil genotípico de virulencia de STEC, podría ser útil para mejorar el aislamiento.

Objetivo específico a alcanzar:**1) Diseñar y validar dos estrategias de PCR para la detección de los genes *stx* a partir del enriquecimiento de carne bovina molida en una etapa intra-laboratorio**

- a) Diseñar oligonucleótidos cebadores y sondas
- b) Desarrollar y validar dos técnicas de PCR SYBR-Green para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂
 - Definir las condiciones de PCR
 - Determinar límite de detección y robustez
 - Determinar inclusividad y exclusividad
 - Analizar muestras de carne bovina molida contaminadas artificialmente
- c) Desarrollar y validar una técnica de PCR en tiempo real múltiple para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂
 - Definir las condiciones de RT-PCR
 - Determinar rango dinámico y eficiencia
 - Determinar límite de detección y robustez
 - Determinar inclusividad y la exclusividad
 - Analizar muestras de carne bovina molida contaminadas artificialmente

1. MATERIALES Y METODOS

La demanda de métodos de análisis rápidos y estandarizados para la detección de STEC en alimentos, como los ensayos basados en PCR tiempo real (PCR-TR), requieren de apropiados procesos de validación (Kagkli y col., 2011). El límite de detección, permite predecir la capacidad de la técnica para identificar muestras con baja carga bacteriana inicial (AOAC International, 2012). El rango dinámico, es el rango de concentraciones bajo las cuales el método funciona de manera lineal y con aceptables niveles de exactitud y precisión y permite establecer la eficiencia de la PCR, considerada como aceptable cuando se encuentra entre 90-110% (Kagkli y col., 2011). Los estudios de robustez aseguran la confiabilidad del método durante el uso normal, cuando pequeñas pero deliberadas variaciones son aplicadas en los parámetros de método (AOAC International, 2012). La inclusividad es calculada con las cepas del analito target que el método debe detectar (AOAC International, 2012). Según Scheutz y col. (2012), al determinar la inclusividad de una PCR para detección de *stx* se debe incluir la mayor cantidad de subtipos (*stx*_{1a}, *stx*_{1c}, *stx*_{1d} y *stx*_{2a} a *stx*_{2g}). El valor de exclusividad es calculado con las cepas no target del ensayo, que podrían generar reacción cruzada y que no deben ser detectadas por el método (AOAC International, 2012). Todos los protocolos de validación deben incluir la evaluación de estos parámetros, además de un estudio de matriz (AOAC International, 2012).

En el presente capítulo llevamos a cabo el diseño de dos técnicas de PCR SYBR-Green (PCR-SYBR), una para la detección del gen *stx*₁ (PCR-SYBR₁) y otra para el gen *stx*₂ (PCR-SYBR₂); y una PCR-TR múltiple con control interno de

amplificación no competitivo (CIAN) para la detección simultánea de ambos genes, a partir del caldo de enriquecimiento de carne bovina molida.

1.1 - Cepas bacterianas

Todas las cepas utilizadas para las validaciones pertenecen a la colección del IGEVET. Las cepas se incubaron en 5 ml de CCC. Luego de la incubación, una ansada del cultivo fue sembrada en estría por agotamiento en ATS. Una colonia aislada de cada cepa pura se repicó en 5 ml de CCC. Todos los tubos y placas fueron incubados a 37°C durante 18 a 24 h. El número de identificación, origen, características relevantes de las cepas bacterianas que fueron utilizadas para el ensayo se detallan en la Tabla 6.

1.2 - Diseño de oligonucleótidos cebadores y sondas

Para el diseño de oligonucleótidos cebadores y sondas se recogieron secuencias de ADN de los genes *stx*₁ (Números de acceso: X07903 M19437, AJ132761, M19473, 16625, M23980 M21947, L04539, Z36899, Z36900, Z36901, AY170851) y *stx*₂ (Números de acceso: X07865, Z37725, L11078, AF043627, M59432, AB015057, DQ235774, X65949, L11079, AF479828, AF479829, X61283, DQ059012, DQ235775, M36727, M21534, AJ567998, X81417, M29153, AJ010730, AY286000, AB048227, M19437.1, AF329817.1) de cepas de STEC, de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Las secuencias fueron alineadas usando el programa PrISM y se seleccionó una región conservada en base a múltiples alineamientos de los genes utilizando el programa Primer Express 3.0. Un par de oligonucleótidos cebadores y una sonda de hidrólisis fueron

diseñados para cada gen *stx*. Las secuencias de los oligonucleótidos cebadores y sondas de hidrólisis diseñadas (5'→3') son: *stx1F-T* (GCAGATAAATCGCCATTTCG), *stx1R-T* (TGTTGTACGAAATCCCCTCTG), *stx2F-T* (CATGACAACGGACAGCAGTTA), *stx2R-T* (TCTGGATGCATCTCTGGTCA), *stx1-CY5* (CY5-AGAGCGATGTTACGGTTTGTACTG-IABKFQ), y *stx2-FAM* (FAM-AATGCAAATCAGTCGTCACACTCAC-IABKFQ). Las dos sondas de hidrólisis fueron sintetizadas con doble quencher utilizando IABKFQ-ZEN para disminuir el ruido de fondo. Todos los oligonucleótidos fueron de Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa 52241, EE.UU.).

1.3 - Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de 1 ml del CCC de las cepas puras o del caldo de enriquecimiento de las muestras, como se describe en el punto 1 del Anexo. Para determinar el rango dinámico de la PCR-TR, la extracción y purificación de ADN de la cepa utilizada se realizó con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.4.- Validación de PCR SYBR-Green

Para cada PCR-SYBR diseñada (PCR-SYBR₁ y PCR-SYBR₂) se utilizaron los 2 pares de oligonucleótidos cebadores *stx1F-T*, *stx1R-T*, *stx2F-T* y *stx2R-T* previamente descritos. La concentración óptima de cada par de cebadores se definió probando diferentes concentraciones dentro de un rango de 0,1 µM a 1 µM. Para cada PCR-SYBR se seleccionó la concentración que ofreció amplificación con baja proporción de dímeros. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 µL,

conteniendo: 10 μL de PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Biosciencias, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), 0,8 μM del par de oligonucleótidos cebadores para *stx*₁ (PCR-SYBR₁) o *stx*₂ (PCR-SYBR₂), 5,6 μL de agua grado biología molecular y 4 μL del extracto de ADN. El perfil térmico utilizado fue: 95°C por 10 min y 40 ciclos a 95°C por 10 seg y 56°C por 30 seg. El protocolo de la curva de melting fue 95°C por 1 min, 55°C por 30 seg, y luego un aumento progresivo de a 0,5°C durante 30 seg, desde los 55°C hasta los 95°C. La temperatura de melting (T_m) se determinó experimentalmente utilizando la cepa de referencia *E. coli* EDL933. Las cepas control utilizadas en cada corrida de PCR se detallan en la Tabla 2. Las muestras fueron consideradas positivas cuando generaban la misma T_m que el control positivo. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Agilent Mx 3005P qPCR System (Agilent Technologies, Waldbroonn, Alemania).

Para PCR-SYBR₁ y PCR-SYBR₂ se calcularon los siguientes parámetros: límite de detección, robustez, inclusividad y exclusividad. Además se realizó un estudio de matriz con muestras contaminadas experimentalmente.

Para establecer el límite de detección se utilizaron los extractos de ADN de los tubos correspondientes a las concentraciones 10^1 a 10^5 UFC ml^{-1} de 6 cepas de STEC portadoras del gen *stx*₁ para PCR-SYBR₁ y del gen *stx*₂ para PCR-SYBR₂. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se construyeron las curvas estándar de cada PCR-SYBR con los valores de C_t obtenidos con cada cepa a las diferentes concentraciones probadas.

Para determinar la robustez se utilizaron los extractos de ADN de los tubos correspondientes a la concentración 10^5 UFC ml^{-1} de las mismas cepas utilizadas

para establecer el límite de detección. Los ensayos se realizaron en 3 días distintos por 3 operarios diferentes.

Para los ensayos de inclusividad se utilizaron los extractos de ADN de los tubos correspondientes a la concentración 10^4 UFC ml^{-1} de 19 cepas de STEC portadoras del gen *stx*₁ para PCR-SYBR₁, y 44 portadoras del gen *stx*₂ PCR-SYBR₂.

Para determinar la exclusividad para ambas PCR-SYBR se utilizaron los extractos de ADN de los tubos correspondientes a la concentración 10^5 UFC ml^{-1} de 30 cepas no-STECC.

Para realizar el estudio de matriz con muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente se utilizaron tres y siete cepas de STECC portadoras del gen *stx*₁ y *stx*₂ para PCR-SYBR₁ y PCR-SYBR₂, respectivamente; y una cepa no-STECC para ambas PCR-SYBR. La carne bovina molida fue provista por la empresa Marfrig-Group y provenía de un mismo lote. Se confirmó la ausencia de genes *stx* en el lote de carne mediante el análisis de 15 muestras de éste por PCR MK (Leotta, 2006) (Tabla 1).

En la contaminación experimental se utilizaron porciones de 25 g de carne bovina molida. Cada muestra se contaminó con una cepa de STECC o no-STECC diferente, de concentración conocida. Un ml de los tubos correspondientes a las concentraciones 10^0 (rango: 1-4 UFC), 10^1 (rango: 9-15 UFC) y 10^2 (87-145 UFC) UFC ml^{-1} de cada cepa de STECC y 10^8 UFC ml^{-1} de la cepa no-STECC, se utilizó para la contaminación experimental. Además, a dos muestras de carne bovina molida se les adicionó 1 ml de APB estéril, para ser utilizados como controles sin contaminar. Considerando que el caldo ECm utilizado a $42\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 h (Protocolo C), fue uno de los dos protocolos de enriquecimiento que obtuvieron el mejor rendimiento

durante el desarrollo del Capítulo I de esta tesis, optamos por utilizarlo como protocolo para todas las muestras del presente Capítulo.

1.5 - Validación de la PCR tiempo real

Se diseñó una PCR-TR con CIAN para la detección de ambos genes *stx* en un mismo tubo de reacción a partir del caldo de enriquecimiento. Se utilizaron los 2 pares de oligonucleótidos cebadores (*stx1F-T*, *stx1R-T*, *stx2F-T* y *stx2R-T*) y las 2 sondas de hidrólisis (*stx1-CY5* y *stx2-FAM*), previamente descritos. Se definió como concentración óptima de cada par de oligonucleótidos y sonda, a aquella que obtuvo la mejor eficiencia con la menor concentración utilizada, determinada a partir del rango dinámico. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μL , conteniendo: 12,5 μL de Kapa Probe Fast ABI (BioSystems, Boston, Massachusetts, United States), 0,5 μM de cada cebador para *stx*₁, 0,125 μM de cada cebadores para *stx*₂, 0,125 μM de cada sonda *stx1-CY5* y *stx2-FAM*, 2,5 μL de 10x Exogenous Internal Positive Control Mix (Applied Biosystems by Life Technologies, Austin, Texas, EE.UU.), 0,5 μL de 50x Exogenous Internal Positive Control DNA (Applied Biosystems by Life Technologies, Austin, Texas, EE.UU.) y 4 μL del extracto de ADN. El perfil térmico utilizado fue el siguiente: 50°C por 2 min, desnaturalización a 95°C por 10 min, 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15 seg y a 59°C por 1 min. En todos los tubos de reacción se incorporó TaqMan[®] Exogenous Internal Positive Control Reagents (Applied Biosystems by Life Technologies, Austin, Texas, EE.UU.) como CIAN. Las cepas control utilizadas en cada corrida de PCR se detallan en la Tabla 2. Las muestras fueron consideradas positivas cuando obtuvieron un $C_t \leq 30$.

Todas las reacciones se realizaron en el termociclador Agilent Mx 3005P qPCR System.

Para la PCR-TR se calcularon los siguientes parámetros: rango dinámico, límite de detección, robustez, inclusividad y exclusividad; y se realizó un estudio de matriz con muestras contaminadas experimentalmente.

Una serie de diluciones de concentraciones conocidas debieron ser utilizadas para generar la curva estándar y para poder evaluar la eficiencia de la PCR. La curva se confeccionó en un eje cartesiano, donde el eje X estuvo representado por cada concentración conocida de una serie de diluciones y el eje Y representó a los valores de C_t para cada concentración. Para establecer el rango dinámico se utilizó el extracto purificado de ADN de la cepa EDL933. Se determinó la concentración de ADN con el equipo NanoVue (HealthCate bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). El número de copias se calculó con la herramienta on-line de Life Technologies (<https://www.lifetechnologies.com/us/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>). A partir del extracto de ADN se realizaron 7 diluciones seriadas en base 10. Cada dilución fue ensayada por triplicado. Se estableció el rango dinámico y se construyeron las curvas estándar. Se utilizó la ecuación eficiencia ($\text{eficiencia} = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1$), para determinar la eficiencia de amplificación de cada uno de los cebadores. Se consideró una buena eficiencia, cuando la curva arrojó un valor entre 90% y 110%, lo que corresponde a una pendiente de entre -3,58 y -3,10. Otro parámetro crítico para la evaluación de la eficiencia de la PCR es el Coeficiente de correlación (R^2). Este coeficiente es el ajuste de los datos a la recta de regresión o curva estándar, y determina si el

protocolo es reproducible. Idealmente, $R^2 = 1$, aunque en general el valor máximo que puede alcanzar es 0,999. Un valor de $R^2 > 0,99$ proporciona una buena confianza en la correlación de X e Y.

El límite de detección se determinó con los extractos de ADN de los tubos correspondientes a las concentraciones 10^1 a 10^5 UFC ml^{-1} de 12 cepas de STEC (Tabla 6). Los ensayos se realizaron por triplicado. Se construyeron las curvas estándar para el par de cebadores y sonda correspondiente, a partir de los valores de C_t obtenidos con cada cepa a las diferentes concentraciones probadas.

Para la Robustez, se utilizaron los extractos de ADN de los tubos correspondientes a la concentración 10^5 UFC ml^{-1} de las mismas cepas utilizadas para determinar el Límite de Detección (Tabla 6). Los ensayos se realizaron 3 días distintos por 3 operarios diferentes.

Para los ensayos de Inclusividad, se utilizaron los extractos de ADN de los tubos correspondientes a la concentración 10^4 UFC ml^{-1} de 50 cepas de STEC y para los de Exclusividad, los de los tubos correspondientes a la concentración 10^5 UFC ml^{-1} de 30 cepas no-STECS (Tabla 6).

Para el estudio de matriz con muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente, se utilizaron 9 cepas de STEC y 1 cepa no-STECS (Tabla 6). Todas las muestras provenían de un mismo lote de carne previamente analizado por PCR MK (Leotta, 2006), para asegurar la ausencia de genes *stx* (Tabla 1). El protocolo de contaminación y enriquecimiento fue el mismo que el descrito previamente para las PCR-SYBR.

2. RESULTADOS

2.1 - Rendimiento de PCR-SYBR

Las PCR-SYBR₁ y PCR-SYBR₂ obtuvieron idénticos valores para todos los parámetros calculados. Los resultados de estos ensayos se detallan a continuación. El límite de detección fue de 1×10^2 UFC mL⁻¹, y todas las cepas ensayadas fueron detectadas positivas cuando se utilizó la concentración 1×10^3 UFC mL⁻¹. El gen *stx*, presente en todas las cepas de STEC analizadas por ambas PCR-SYBR fue correctamente detectado en el ensayo de inclusividad, obteniendo un valor de 100%. Ninguna de las cepas no-STECS utilizadas para determinar la exclusividad mostró señal de amplificación y este parámetro tomó un valor de 100%. Durante el estudio de matriz con muestras contaminadas experimentalmente, las muestras *stx* positivas fueron detectadas positivas, y las *stx* negativas fueron detectadas negativas, para todos los ensayos realizados. Al introducir variables en forma deliberada (diferentes operarios en diferentes días de trabajo) durante el estudio de robustez, todas las muestras probadas fueron correctamente identificadas.

2.2 - Rendimiento de PCR-TR

El primer parámetro determinado fue el rango dinámico y para esto se utilizó ADN purificado de la cepa de referencia *E. coli* EDL933. Se ensayó un rango de copias de ADN que fue de $3,7 \times 10^2$ a $3,7 \times 10^8$ por reacción. La eficiencia de cada par de cebadores se calculó a partir del rango dinámico obtenido en cada reacción. El par de cebadores para amplificación de *stx*₁ obtuvo 106,4% de Eficiencia, mientras que el de *stx*₂ alcanzó 100,6%, con una pendiente y R² de -3,178 y 0,992; y -3,308 y 0,994, respectivamente (Figura 1). El límite de detección fue de 1×10^2 UFC mL⁻¹, y

todas las muestras fueron detectadas correctamente cuando se utilizó una concentración de 1×10^3 UFC mL⁻¹. Los genes *stx* presentes en todas las cepas de STEC analizadas fueron correctamente detectados en el ensayo de inclusividad, alcanzando éste parámetro un valor de 100% (Figura 2). Ninguna de las cepas no-STECS utilizadas para determinar exclusividad mostraron señal de amplificación, y este parámetro tomó un valor de 100%. Durante el estudio de matriz con muestras contaminadas experimentalmente, las muestras *stx* positivas fueron detectadas positivas, y las *stx* negativas fueron detectadas negativas, para todos los ensayos realizados. El CIAN mostró señal positiva en todos los tubos de reacción, excepto en los tubos de “control de no amplificación”. Al introducir variables en forma deliberada durante el estudio de robustez, todas las muestras probadas fueron correctamente identificadas.

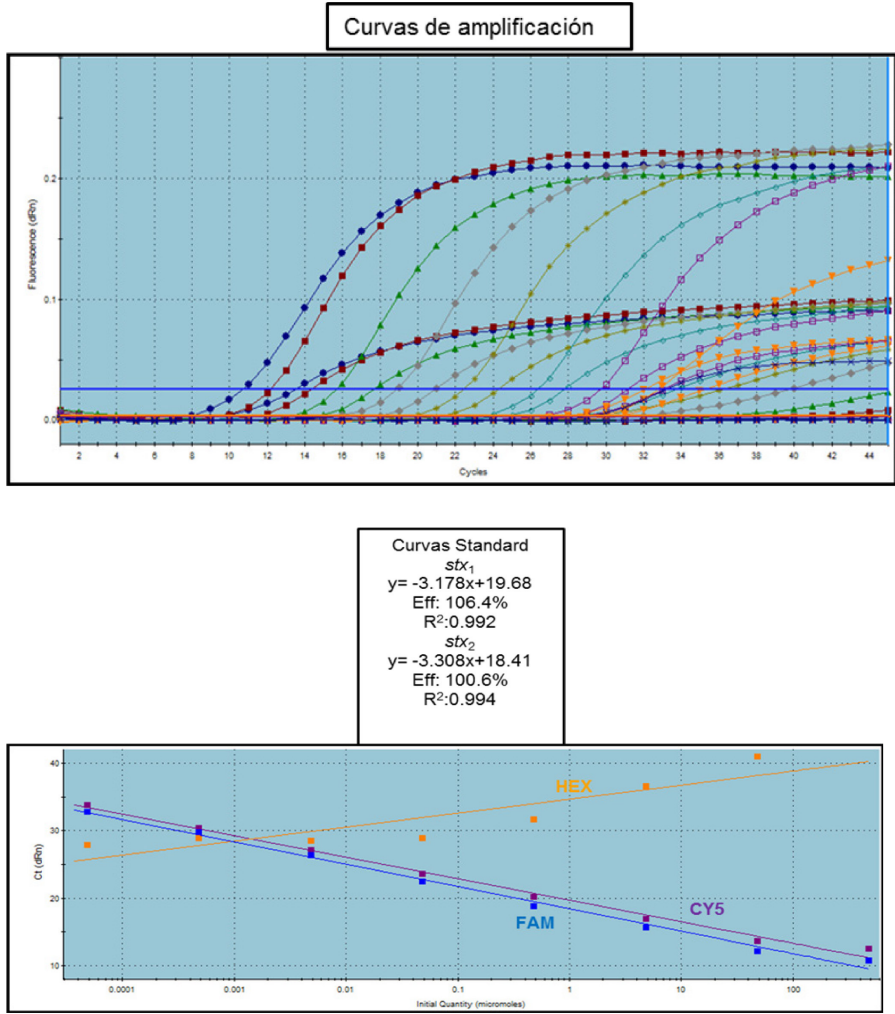


Figura 1. Curvas de amplificación y curvas standard de PCR-TR con los cebadores y sondas para amplificación de *stx*₁ (CY5) y *stx*₂ (FAM), obtenidas a partir de 3 réplicas de cada concentración de la cepa EDL 933 (Rango: $3,7 \times 10^8$ a $3,7 \times 10^1$ copias por reacción). La curva HEX corresponde al CIAN.

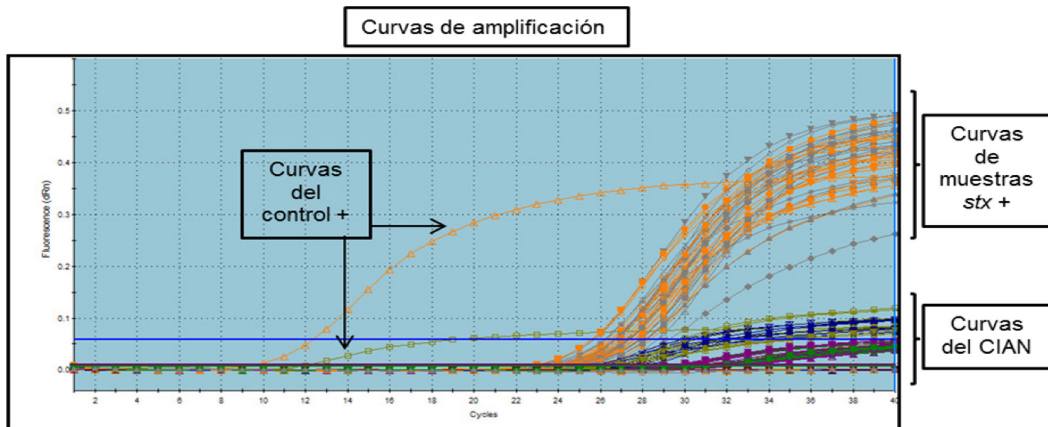


Figura 2. Curvas de amplificación de las cepas analizadas en el ensayo de inclusividad.

3. DISCUSIÓN

En Argentina se realizaron varios estudios para determinar la prevalencia de STEC en ganado y muestras de carne utilizando PCR convencional como método de tamizaje (Meichtri y col., 2004; Varela y col., 2008; Masana y col., 2010; Masana y col., 2011; Llorente y col., 2014). Las PCR automatizadas prescinden de algunos de los pasos necesarios en las PCR convencionales como por ejemplo la preparación de geles de agarosa, la siembra de los amplificadores de ADN, la tinción de geles con intercalantes de ADN como bromuro de etidio o Sybr-Safe, el análisis de los geles y la captura de imagen. Actualmente las PCR automatizadas y las PCR-TR permiten detectar los productos de PCR utilizando estrategias que pueden ser inespecíficas, como por el uso de intercalantes de ADN (SYBR-Green), o específicas con sondas marcadas, como sondas de hidrólisis, molecular beacons o scorpion (Jothikumar y col., 2002; Kagkli y col., 2011; Kagkli y col., 2012).

Los resultados obtenidos utilizando cepas puras y muestras de carne experimentalmente contaminadas para validar las PCR, reflejan una situación ideal en cuanto a la detección y aislamiento de los genes *stx*. El bajo límite de detección obtenido y el correcto reconocimiento de los genes *stx* en todas las muestras de carne contaminadas experimentalmente con un mínimo de 1 UFC, son algunos de los puntos destacados de esta situación ideal. Estos resultados están en línea con los requerimientos regulatorios de la industria alimentaria para las técnicas de tamizaje (Anklam y col., 2012; Conrad y col., 2014). Kagkli y col. (2011) describen al rango dinámico, la eficiencia de PCR y la robustez como parámetros esenciales para establecer el buen desempeño de una técnica de PCR. En el trabajo de Kagkli y col. (2011) se desarrollaron y validaron técnicas de PCR que obtuvieron una eficiencia

mayor a 80% utilizando once cepas STEC para determinar la especificidad de su método. El uso de cepas portadoras de varios subtipos *stx* y pertenecientes a 39 serotipos diferentes, incluyendo O26, O103, O111, O121, O145, y O157, permitieron demostrar la habilidad de las PCR que desarrollamos para identificar un amplio espectro de cepas de STEC.

La relación filogenética entre las cepas STEC y las cepas no-STEC analizadas, y el uso de cepas no-STEC que pueden encontrarse habitualmente en las muestras de carne, demostró el excelente desempeño de estas técnicas con respecto a la exclusividad.

Los resultados obtenidos por todas las PCR desarrolladas indican que son apropiadas para la detección de genes *stx* en muestras de carne. Sin embargo, la PCR-TR presenta algunas ventajas con respecto a las PCR-SYBR. Debido al sistema de detección múltiple, la PCR-TR permite establecer en un mismo tubo de reacción la misma cantidad de determinaciones que si se realizaran las dos PCR-SYBR. Otro importante punto para considerar a la PCR-TR más apropiada como técnica de tamizaje, es la incorporación de un CIAN, que asegura la identificación de resultados falsos negativos (ISO 22119:2011; Lin y col., 2011; Verstraete y col., 2014).

La PCR-TR debería ser considerada como primera opción para obtener resultados confiables cuando se quiere realizar el tamizaje para *stx* en la cadena de producción de carne. Además de ser apropiada para su aplicación en los laboratorios de investigación, resulta por varios motivos una técnica muy útil para los laboratorios de la industria alimentaria. Luego que la PCR es puesta a punto y validada, no requiere personal altamente capacitado para realizarla y demanda

menos equipamiento que la PCR convencional, ya que solo es necesario un termociclador conectado a una computadora. Además, elimina la necesidad de contar con una habitación destinada exclusivamente al uso de geles con bromuro de etidio, como así también las camas, peines, cubas y buffers para preparación de geles.

No resulta apropiado determinar la prevalencia de STEC en de alimentos mediante la detección de los genes *stx*, sin confirmar su presencia por aislamiento. Este tipo de resultados obtenidos por tamizaje a partir de un caldo de enriquecimiento solo puede considerarse como resultado presuntivo. El paso de aislamiento es necesario para confirmar las muestras con resultado de tamizaje positivo. Sin embargo, la dificultad para aislar STEC debido a la ausencia de caracteres fenotípicos diferenciales entre las cepas de *E. coli*, hacen de éste un débil gold estándar para evaluar la capacidad de detección de una técnica de tamizaje. Además, la presencia de células estresadas, la baja carga inicial de STEC, la existencia de células no viables y los altos niveles de microbiota competitiva acompañante, deben ser considerados por ser factores que afectan el aislamiento (Auvray y col., 2009; Ju y col., 2012).

El concepto de "One Health" que reconoce que la salud humana está conectada con la animal y ambiental, hace necesario trabajar a lo largo de toda la cadena de producción de alimentos para obtener un producto final de calidad. Los protocolos de monitoreo de los alimentos durante el proceso de elaboración, demandan métodos de tamizaje que ayuden a agilizar los controles. En este sentido, varios métodos basados en PCR-TR fueron desarrollados y validados para la detección de *stx* en alimentos (ISO/TS 13136:2012; Kagkli y col., 2011). Numerosos

métodos de PCR-TR que utilizan enfoques similares al protocolo FSIS fueron utilizados para la detección de STEC a partir del enriquecimiento de carne bovina molida, cortes de carne, esponjados de carcasa y otros alimentos como jugo de manzana y quesos elaborados con de leche cruda (Wang y col., 2013). Las PCR-TR comerciales fueron diseñadas para detectar los serogrupos de STEC con mayor impacto en salud pública (Choreh y col., 2013). Estos métodos están basados en la detección de los genes *stx*, *eae* y genes específicos de Ag-O (Qualicon-DuPont, GDS-BioControl, GeneDisc-Pall Corporation). Las modificaciones de la norma ISO/TS 13136:2012, que considera a todas las STEC como patógenas causó el rechazo de muchos contenedores de carne exportados desde varios países hacia la UE desde 2012. Por lo tanto, consideramos importante contar con más alternativas validadas para el tamizaje de *stx*, como las PCR-SYBR y PCR-RT desarrolladas y validadas en esta tesis, con el objetivo de verificar la ausencia de *stx* en la carne, para luego continuar con la etapa de aislamiento en caso de detectarse algún gen *stx* en la muestra.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

Es necesario contar con técnicas moleculares para detectar STEC y verificar los procesos de producción de alimentos, particularmente de aquellos que incluyan carne molida. Se desarrollaron y validaron dos estrategias de PCR para la detección de genes *stx* utilizando 39 serotipos de STEC y 7 variantes de *stx* diferentes. Para el análisis de muestras de carne bovina molida contaminadas experimentalmente se utilizó uno de los protocolos con mejor performance en el Capítulo I de esta tesis. Se demostró un rendimiento del 100% con ambas estrategias de PCR. Sin embargo, la

utilización de estas estrategias no es suficiente para arribar a resultados confirmatorios. Es necesario evaluar diferentes posibilidades metodológicas que incluyan planes de muestreo más exigentes (cantidad y tamaño) y nuevas técnicas moleculares para identificar un perfil más amplio de genes de virulencia, métodos microbiológicos rápidos (inmunoconcentración, medios cromogénicos) y técnicas de bacteriología tradicional (medios de cultivo, temperatura y tiempo de incubación).

CAPÍTULO III

RESUMEN

La metodología desarrollada y validada para la detección y aislamiento de STEC fue utilizada para conocer la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y STEC no-O157 en carne bovina molida y muestras ambientales en las carnicerías la ciudad de Berisso (Provincia de Buenos Aires), como instrumento para mejorar la calidad higiénico-sanitaria de los locales de expendio. El trabajo fue realizado en tres etapas: I) descripción del estado de situación de las carnicerías. Cuantificación del riesgo en el local. Análisis microbiológico de carne picada fresca y muestras ambientales (mesada, picadora, manos y cuchillos), II) aplicación de acciones de mejora con base en los resultados obtenidos, III) verificación de las acciones de mejora.

En la etapa I se cuantificó el riesgo en 110 carnicerías de la ciudad de Berisso, 55 (50,0%), 43 (39,0%) y 12 (11%) presentaron riesgo alto, moderado y bajo, respectivamente. Se aislaron 20 cepas de STEC O157:H7, 13 (11,8%) de carne y 7 (1,6%) de muestras ambientales. Sobre un total de 110 muestras de carne, 51 (46,3%) fueron *stx* positivas y en 11 (10,0%) se confirmó la presencia de STEC no-O157 por aislamiento. Sobre un total de 432 muestras ambientales, 204 (47,2%) fueron *stx* positivas y en 29 (6,7%) se confirmó la presencia de STEC por aislamiento.

En la etapa II (2012), se diseñó e implementó un plan de acciones de mejora para las 110 carnicerías y 500 carniceros. Asimismo, se realizó un ciclo de capacitación docente para los 26 jardines de infantes de la ciudad de Berisso y se entregó información a 4506 niños de 3 a 5 años.

En la etapa III (2013) fue posible verificar el éxito de las acciones de mejora en 86 carnicerías, de las cuales 19 (22,1%), 42 (48,8%) y 25 (29,1%) fueron cuantificadas como de riesgo alto, moderado y bajo, respectivamente. Se aisló STEC O157:H7 en cinco (5,8%) locales. Sobre 86 muestras de carne, 33 (38,4%) fueron *stx* positivas y en 11 (12,8%) se confirmó la presencia de STEC por aislamiento. Sobre un total de 336 muestras ambientales, 115 (34,2%) fueron *stx* positivas y 23 (6,8%) fueron confirmadas por aislamiento. Las 25 cepas de STEC O157:H7 aisladas en este trabajo (etapas I y III) fueron *rfb*_{O157}/*stx*₂/*eae*/*ehxA*/*fliC*_{H7}/*efa*/*toxBI*/*iha*, y 14 pertenecieron al clado 8. Por PFGE-*Xba*I se definieron 16 patrones de restricción, demostrando que en la etapa I la contaminación ambiental estaba asociada a la contaminación de la carne.

Entre las 79 cepas de STEC no-O157 los serotipos más frecuentes fueron O178:H19, O8:H19, O174:H28, ONT:H7 y ONT:H19. Estas cepas fueron portadoras de los genes *stx*₂ (74,7%), *stx*₁/*stx*₂ (20,2%) y *stx*₁ (5,1%). Además, se identificaron los siguientes genes *lpf*_{O113} (100,0%), *ehxA* (68,3%), *subAB* (64,5%), *saa* (63,3%), *cdt-V* (8,9%), *astA* (7,6%), *eae* (2,5%), *efa* (2,5%), *toxB* (2,5%) e *iha* (2,5%). Por PFGE-*Xba*I se definieron 59 patrones de restricción, 10 de los cuales agruparon 21 cepas. Fue posible demostrar que los clones circulantes en varias carnicerías antes de aplicar las acciones de mejora (período 2010-2011) tenían un origen en común, y que las acciones implementadas permitieron reducir su presencia tanto en carne picada como en ambiente.

Al comparar los resultados de la primera etapa de muestreo y la verificación se registraron diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en el número de carnicerías cuantificadas de riesgo alto y bajo, y de muestras positivas al tamizaje

para STEC O157 y no-O157. El conocimiento adquirido permitió 1) diseñar y promover acciones de mejora con base en cuantificación de riesgo y resultados analíticos, 2) mejorar la calidad de la carne bovina molida a nivel de boca de expendio con el fin de reducir el impacto de las ETA en los consumidores, y 3) marcar un precedente para el resto de los locales expendedores de alimentos.

Objetivo específico a alcanzar:**1) Implementar estrategias de mejora en carnicerías de Berisso utilizando la metodología validada como herramienta de verificación**

- a) Cuantificar el riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso y determinar la contaminación por STEC
 - Cuantificar el riesgo de cada local
 - Identificar todos los locales de venta de carne bovina molida de la ciudad de Berisso, provincia de Buenos Aires, y diseñar un esquema de visitas
 - Determinar la contaminación de carne bovina molida y muestras ambientales con STEC O157 y no-O157
- b) Establecer y aplicar estrategias de mejora en las carnicerías y de información a la comunidad de la ciudad de Berisso
 - Realizar un ciclo de capacitaciones grupales para carniceros con base en los resultados obtenidos
 - Realizar un ciclo de capacitaciones individuales en las carnicerías con base en los resultados obtenidos
 - Implementar una estrategia para informar a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA
- c) Verificar el éxito de las estrategias de mejora implementadas
 - Cuantificar el riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso
 - Determinar la contaminación de carne bovina molida y muestras ambientales con STEC O157 y no-O157
 - Caracterizar los aislamientos de STEC O157 y no-O157 mediante técnicas fenotípicas y genotípicas

- Determinar la relación clonal de los aislamientos mediante técnicas de subtipificación molecular

1. MATERIALES Y MÉTODOS

A partir del mes de Octubre de 2010, se comenzó a implementar en la ciudad de Berisso, provincia de Buenos Aires, Argentina, un programa piloto denominado “Carnicerías Saludables”. La ciudad de Berisso tiene un tamaño de 135 km² y 83.123 habitantes (http://www.censo2010.indec.gov.ar/preliminares/cuadro_resto.asp). Se identificaron 110 carnicerías y todas fueron invitadas a participar voluntariamente del programa. El muestreo se realizó semanalmente y la elección de los locales visitados en cada semana fue al azar cubriendo todas las áreas geográficas de la ciudad. En cada visita se realizó una evaluación integral y se completó una planilla de cuantificación del riesgo. Además, se tomaron 5 muestras por carnicería para realizar la detección y aislamiento de STEC O157 y no-O157. Las muestras que se tomaron fueron: carne bovina molida, esponjado de mesada, esponjado de cuchillas, esponjado de picadora y esponjado de manos de manipulador. Los resultados fueron entregados al responsable de cada carnicería. Luego de la etapa de evaluación, se diseñó e implementó un plan de entrenamiento para los carniceros, y los resultados obtenidos en la primera etapa fueron utilizados como base para instaurar las acciones de mejora. Además se informó a los consumidores acerca de la prevención de las ETA. Los maestros de todos los Jardines de Infantes de la ciudad recibieron talleres de capacitación, y el material didáctico desarrollado por la Asociación de lucha contra el Síndrome Urémico Hemolítico (LuSUH) para trabajar junto con los niños de entre 3 y 5 años. En la etapa final, se verificó el éxito de las medidas de intervención implementadas en las carnicerías utilizando la misma planilla de cuantificación del riesgo y los mismos análisis bacteriológicos que los del primer muestreo.

1.1- Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso y determinación de la contaminación por STEC

Los sistemas de inspección alimentaria tradicionales sólo son capaces de identificar los problemas visibles en el momento de la inspección, y los resultados sólo pueden ser correlacionados con el momento en que ésta se realiza. Además no siempre reflejan la realidad de los establecimientos productores de alimentos ya que no evidencian la totalidad de las condiciones de los productos e instalaciones. Este tipo de inspección tradicional utiliza un método “correctivo”, que busca determinar si las empresas elaboradoras de alimentos cumplen con una serie de reglamentaciones. Luego que es detectado el incumplimiento de una norma, el establecimiento recibe una multa exigiendo medidas correctivas. El análisis de los factores de riesgo como herramienta para determinar si el sistema de gestión de la calidad e inocuidad de la empresa elaboradora es adecuado o no, asegura que la inspección está basada en el riesgo y que cumple con su objetivo: proteger la salud del consumidor.

Para la cuantificación del riesgo se utilizó una planilla que incluía bloques de evaluación de la situación y condiciones edilicias, equipos y herramientas, manipuladores, materiales crudos y productos a la venta, y flujo de producción (OPS/OMS, 2001). 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). La planilla utilizada se encuentra en el punto 4 del Anexo.

A - Toma de muestra

Entre Octubre de 2010 y Julio de 2011 se visitaron 110 carnicerías. Los muestreos se realizaron semanalmente y al azar, cubriendo todas las áreas geográficas de la ciudad (Figura 1). Cada semana se visitaron 3 carnicerías. Con el objetivo de obtener una evaluación integral durante las visitas, se completó una planilla para la cuantificación del riesgo y se tomaron muestras de carne bovina molida y ambiente. Se colectó un total de 110 muestras de carne bovina molida y 432 de ambiente (108 de cada tipo), de las 108 carnicerías y los 2 supermercados que participaron de esta etapa. Excepto en el caso de los supermercados en los cuales la carne ya se encontraba envasada, la muestra de 1 kg de carne bovina molida era colocada por el carnicero en una bolsa de polietileno, en las mismas condiciones que eran obtenidas por los consumidores. Además, en el caso de los supermercados no se tomaron muestras ambientales ya que la carne era picada en otro establecimiento. Las muestras de ambiente se tomaron de las superficies en contacto con la carne: mesada, cuchillas, picadora y manos de manipulador, utilizando una esponja estéril (Whirl-Pak speci-sponge, Nasco, EE.UU.) embebida en APB para cada muestra, siguiendo el protocolo descrito a continuación. Para la muestra de mesada, la esponja se pasó sobre 3 áreas de 400 cm². La muestra de cuchilla consistió en esponjar toda la hoja y el mango, incluyendo la intersección entre ambas superficies. En el caso de la picadora de carne, ésta fue desarmada antes del muestro, para poder esponjar el contenedor de carne, el gusano y la rosca

de la máquina. Las esponjados de las manos de los manipuladores se tomaron de ambas manos completas, incluyendo las uñas, con una misma esponja. Todas las muestras fueron refrigeradas en hielo y enviadas al laboratorio para ser analizadas inmediatamente.



Figura 1. Las líneas azules dividen las zonas I, II y III en que se dividió a la ciudad de Berisso para el muestreo.

B - Detección y aislamiento de STEC O157:H7

Las muestras fueron analizadas siguiendo la norma USDA MLG 5.05. En bolsas de muestreo estériles (Whirl-Pak, Nasco, EE.UU.) por separado, se colocaron 65 g de carne bovina molida, y la mitad de cada esponja de ambiente, y se les adicionó 585 ml y 100 ml de CTSm-20, respectivamente. Todas las muestras fueron homogenizadas en stomacher antes de proceder a la incubación a $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15-22 h.

Luego de la incubación, se realizó el tamizaje utilizando el test inmunocromatográfico (IC) RapidCheck® *E. coli* O157 (incluyendo H7) Test Kit siguiendo las indicaciones del fabricante (SDIX, Newark, EE.UU.).

Para el aislamiento, se realizó la inmunoconcentración específica para O157 por SIM (Dynal Biotech, Oslo, Noruega), y la siembra en agar SD-39 (Acumedia Manufacturers, EE.UU.) y agar MC sorbitol con cefixime y telurito (Oxoid, Hampshire, UK) (CT-SMAC), y se incubaron a 37°C durante 20 h. Todas las muestras de carne fueron sometidas a SIM. Con respecto a las ambientales, solo se le realizó SIM a las pertenecientes a carnicerías con al menos una muestra positiva por IC. Luego de la incubación, a partir de la zona de confluencia de las placas, se realizó la extracción de ADN como se detalla en el punto 2 del Anexo, y PCR múltiple (Leotta y col., 2005), para confirmar la presencia de los genes *rfb*_{O157}, *stx*₁ y *stx*₂ (Tabla 1 y 2). A partir de aquellas placas cuyas zonas de confluencia fueron positivas por PCR múltiple, se repicaron al menos 20 colonias características a una placa grillada de CT-SMAC. Las colonias fueron analizadas por PCR múltiple (Leotta y col., 2005) primero en pools, y luego las de los pools positivos de forma individual para identificar la colonia positiva (Figura 2). Una vez aislada y confirmada como STEC O157 se conservó para su posterior caracterización fenotípica y genotípica en CCC con 30% y 40% de glicerol, a -20°C y a -70°C, respectivamente.

La eficiencia de aislamiento se calculó como la cantidad de muestras con cepa aislada en relación a las muestras con PCR positiva de la confluencia de la placa luego de la SIM.

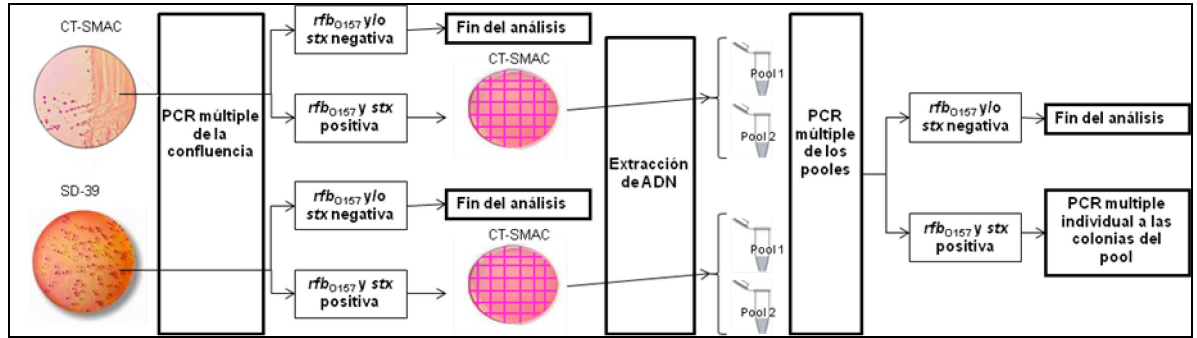


Figura 2. Flujograma de trabajo para el aislamiento STEC O157 luego de la SIM.

C - Detección y aislamiento de STEC no-O157

En bolsas de muestreo estériles, por separado, se colocaron 25 g de carne bovina molida y la mitad de cada esponja, y se les adicionaron 225 ml y 100 ml de ECm, respectivamente. Todas las muestras fueron homogenizadas en stomacher antes de proceder a la incubación a $42 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15-22 h.

Luego de la incubación, se realizó el tamizaje por PCR MK (Leotta, 2006), y por PCR-SYBR₁, PCR-SYBR₂ y PCR-TR previamente validadas en el Capítulo II (Tablas 1 y 2). La extracción de ADN del caldo de enriquecimiento de cada muestra se realizó como se describe en el punto 1 del Anexo.

A partir de aquellas muestras positivas para *stx* por alguna de las PCR de tamizaje se procedió al aislamiento. Un ml del caldo de enriquecimiento de las muestras positivas se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, y el pellet bacteriano se sembró por agotamiento en agar MC. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h. A partir de la estría inicial en agar MC se realizó la extracción de ADN como se describe en el punto 2 del Anexo. De las placas con confluencia *stx* por PCR múltiple (Leotta y col., 2005), se repicaron en placa de ATS al menos 50 colonias y se incubaron a 37°C durante 18 a 24 h (Figura 3). Del mismo modo que se describió para STEC

O157, luego de la incubación las colonias fueron analizadas para su aislamiento primero en pools y luego individualmente, y conservadas para su posterior caracterización.

La eficiencia de aislamiento se calculó como la cantidad muestras con cepa aislada en relación a las muestras con PCR de tamizaje positiva.

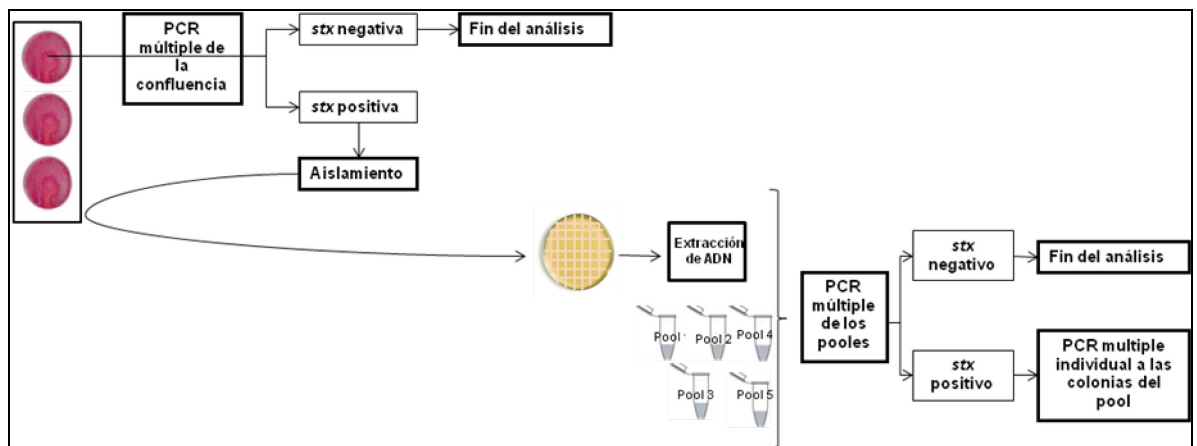


Figura 3. Flujograma trabajo para el aislamiento STEC no-O157.

1.2 - Diseño y aplicación de estrategias de mejora en las carnicerías y de información a la comunidad de la ciudad de Berisso

A - Realización de un ciclo de capacitaciones grupales para carniceros con base en los resultados obtenidos

Los contenidos abordados en las capacitaciones colectivas realizadas para los carniceros se ordenaron en 5 grandes temáticas: 1) Establecimiento; 2) Formación y hábitos del carnicero; 3) Buenas Prácticas de Manufactura (BPM); 4) Control de residuos y plagas; y 5) Las carnicerías y el Código Alimentario Argentino. Se expusieron los resultados totales del análisis de laboratorio de las muestras de carne bovina molida y ambiente, y se consensuaron medidas tendientes a mejorar y

optimizar las buenas prácticas higiénico-sanitarias destinadas a asegurar la inocuidad de los alimentos comercializados.

B - Realización de un ciclo de capacitaciones individuales en cada carnicería con base en los resultados obtenidos

En las visitas individuales a las carnicerías se informó acerca de BPM y buenas prácticas de higiene recomendadas para aplicar según la situación particular del comercio, y se entregó al responsable del establecimiento una lista de proveedores para que pueda disponer de los utensilios, y productos de limpieza y desinfección necesarios según las características de cada local. Se hizo entrega del informe con los resultados de la cuantificación del riesgo y de laboratorio obtenidos a partir de las muestras de carne y ambiente del establecimiento. El modelo de informe entregado a cada carnicero se presenta en el punto 5 del Anexo. Además de los resultados de STEC O157 y no-O157, el informe contenía los resultados de otros análisis realizados sobre las muestras pero no descritos en la presente tesis. En esta etapa se sostuvo el concepto de “auditor” y se trabajó en conjunto con los carniceros para resolver los inconvenientes identificados.

C - Implementación de una estrategia para informar a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA

Se realizaron jornadas de capacitación docente, se transfirieron a la comunidad los resultados obtenidos durante los muestreos y se entregó folletería con información sobre la prevención de las ETA.

En las jornadas de capacitación docente participaron maestros de todos los Jardines de Infantes, públicos y privados, y comunicadores sociales de la ciudad Berisso. Se expusieron contenidos de la regulación alimentaria, se abordó la problemática asociada a las ETA en general y aquellas transmitidas por el consumo de carne en particular, y se dieron recomendaciones para prevenir este tipo de enfermedades en el hogar y en la escuela. Los docentes que participaron de las jornadas de capacitación, utilizaron una caja didáctica diseñada por la ONG LuSUH, para capacitar a los niños de los Jardines de Infantes (<http://www.lusuh.org.ar/>). Junto con la caja didáctica se entregó folletería informativa sobre la prevención de las ETA para que sea distribuida entre las familias de los alumnos.

1.3 - Verificación del éxito de las estrategias de mejora implementadas

Para evaluar el éxito de las medidas de prevención e intervención aplicadas luego de la primera etapa de muestreo, se realizó un análisis comparativo de los resultados de la cuantificación del riesgo y del tamizaje y aislamiento de STEC O157 y no-O157 de 86 establecimientos muestreados durante 2011 y 2013. Veinticuatro de los 110 locales analizados en la Sección 1.1 -, no pudieron ser verificados a pesar de haber participado del programa de capacitación, ya que 3 se negaron a seguir participando del estudio y 21 cambiaron de firma.

Se consideraron “Saludables” a las carnicerías que cumplieron con todas las especificaciones técnicas y microbiológicas establecidas en el CAA, y que además las muestras ambientales hayan negativas para *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, STEC no-O157, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Estas carnicerías fueron

identificadas con una calcomanía oficial emitida por la Municipalidad de Berisso (punto 6 del Anexo).

A - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso

La cuantificación del riesgo se realizó del mismo modo que se describió en la Sección 1.1 -.

B - Toma de muestra

Desde Marzo hasta Septiembre de 2013 se colectaron muestras en 86 de las 110 carnicerías muestreadas en la Sección 1.1-A-. El procedimiento de muestreo, el tipo y cantidad de muestras colectadas por carnicería, ya fueron descritos en la Sección 1.1-. La única diferencia en esta etapa es que semanalmente se tomaron muestras de 5 carnicerías.

C - Detección y aislamiento de STEC O157:H7

El procedimiento utilizado fue el mismo que se describió en la Sección 1.1-B-, con excepción que el caldo de enriquecimiento fue modificado, utilizándose en esta etapa CTSm-8, con base en la actualización de la norma USDA MLG 5.06 para STEC O157.

D - Detección y aislamiento de STEC no-O157

El procedimiento utilizado fue el mismo que se describió en la Sección 1.1-C-, con excepción de que el tamizaje se realizó exclusivamente por la PCR-TR descrita en el Capítulo II.

E - Análisis estadístico

Se utilizó el Test de diferencia de proporciones para realizar el análisis comparativo de las mismas carnicerías analizadas en el período 2010-2011 y en 2013. Se compararon los resultados de la cuantificación del riesgo y del tamizaje para STEC O157 (PCR múltiple de la confluencia) y no-O157 de 86 carnicerías de las 110 que participaron originalmente por los motivos expuestos en la Sección 1.3 del presente capítulo. Los valores $P < 0.05$ y $P < 0.01$ fueron considerados estadísticamente significativo y altamente significativo, respectivamente. Para todas las comparaciones se utilizó el programa Statgraphics (Statpoint Technologies, Virginia, EE.UU.).

F - Caracterización de los aislamientos de STEC O157 y no-O157 mediante técnicas fenotípicas y genotípicas

Todas las cepas de STEC, aisladas y confirmadas por PCR en las Secciones 1.1– y 1.3– fueron caracterizadas por pruebas fenotípicas y genotípicas.

F.1 - Caracterización fenotípica de los aislamientos

La caracterización fenotípica de los aislamientos de STEC se realizó por identificación bioquímica, por medio de pruebas bioquímicas, producción de enterohemolisina, y serotipificación.

La identificación bioquímica de los aislamientos de STEC se realizó con las siguientes pruebas: producción de indol, movilidad y producción de ácido sulfhídrico en agar indol movilidad sulfuro (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina), fermentación de glucosa, lactosa y producción de gas en agar triple azúcar hierro

(Laboratorios Britania), descarboxilación de lisina en agar lisina hierro (Laboratorios Britania), fermentación ácido mixta en caldo rojo de metilo-Voges Proskauer (Laboratorios Britania, Los Patos, Argentina), descarboxilación de ornitina en agar movilidad indol ornitina (Laboratorios Britania, Los Patos, Argentina), utilización de citrato como única fuente de carbono en agar citrato de Simmons (Laboratorios Britania, Los Patos, Argentina), fermentación de sorbitol, celobiosa, lactosa, sacarosa y glucosa (BioPack, Zárate, Argentina) en caldo rojo fenol (Difco, Becton-dickinson and Company, Francia) conteniendo un 1% del azúcar correspondiente, actividad β -glucoronidasa con disco con glucorónido MUG (Laboratorios Britania, Los Patos, Argentina) y actividad β -galactosidasa con disco con ONPG (Laboratorios Britania, Los Patos, Argentina). Las pruebas se realizaron siguiendo las técnicas como indica MacFaddin (3° Ed.) o en algunos casos el fabricante del medio de cultivo. Se diferenció *E. coli* genérico, el serotipo O157:H7/NM y *E. hermanii* de acuerdo con la clasificación del manual de procedimiento para la detección de STEC O157 en Alimentos (Rivas y col., 2008a). Se determinó el biotipo de las cepas de *E. coli* O157:H7/NM según la capacidad de fermentar los azúcares rafinosa, dulcitol y ramnosa.

Para la determinación de las cepas productoras de enterohemolisina (EHEC-Hly) se siguió la técnica propuesta por Beutin y col. (1989), para lo cual se emplearon placas con agar base triptosa (Difco, Becton-Dickinson and Company, Francia) (ABT) suplementado con 10 mM de Cl_2Ca (Sigma, Missouri, EE.UU.) y 5% de sangre de oveja desfibrinada lavada con PBS estéril, pH 7,2 (placa ensayo). Como control se emplearon placas de ABT con 5% de sangre desfibrinada de oveja sin lavar y sin el agregado de Cl_2Ca (placa control). Se sembraron ambas placas en

paralelo con cultivos jóvenes de las cepas a investigar y a las tres horas de incubación a 37°C se realizó una primera lectura para la detección de α -hemólisis (α -Hly) y se volvió a incubar hasta 18 h para una segunda lectura de hemólisis para EHEC-Hly. El aislamiento se consideró no productor de EHEC-Hly si después de 3 h de incubación se observó hemólisis parcial en la placa de ensayo y en la placa control. Las placas sin hemólisis luego de 3h de incubación, se incubaron 18 h más y fueron consideradas productoras de EHEC-Hly si se observaba una fina hemólisis sólo en la placa de ensayo. Cuando la hemólisis apareció en ambas placas, se consideró que la cepa era productora de α -Hly. La cepa *E. coli* ATCC 32511 y *E. coli* ATCC 25922 fueron utilizadas como control positivo y negativo en cada placa, respectivamente.

La detección del antígeno somático O se realizó en placa con el kit de antisueros (O1 - O186), y la del antígeno flagelar H se realizó por microaglutinación en tubo con 56 antisueros H producido por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (Lugo, España), según Blanco y col. (1997).

F.2 - Caracterización genotípica de las cepas STEC

Se completó la caracterización genotípica con la detección de otros factores de virulencia, además los genes *stx*₁, *stx*₂ y *rfb*_{O157} previamente identificados por PCR. El gen *eae* que codifica para la Intimina, fue investigado como describe Karch y col. (1993). Para la detección del gen *ehxA*, se siguieron las condiciones utilizadas por Schmidt y col. (1995). La detección del antígeno flagelar se realizó para amplificar el gen *fliC*_{H7} (Flagelina H7) según las condiciones descritas por Gannon y col. (1997). El gen *aggR*, que codifica para el activador transcripcional de la fimbria

de adherencia agregativa (AAF/I) y el gen putativo de virulencia *aaiC*, que lo hace para una proteína secretora fueron amplificados con los cebadores descritos por el Laboratorio de Referencia Europeo (EU Reference Laboratory for *E. coli*, 2013). Además se detectaron los genes *saa* (Adhesina Aglutinante de STEC), *iha*, *toxB*, *efa* y *lpfAO113* utilizando las condiciones descritas por Toma y col. (2004), y los genes *astA*, *subAB* y *cdt-V* con las descritas por Yamamoto y col. (1996), Paton y col. (2004) y Cergole-Novella y col. (2007), respectivamente. Las secuencias y concentraciones de los cebadores, programa de amplificación y tamaño de los amplicones de cada PCR se detallan en la Tabla 1, las cepas control utilizadas se presentan en la Tabla 2 y las condiciones de la corrida electroforética y la adquisición de imágenes en el punto 3 del Anexo.

F.3 - Subtipificación molecular de las cepas STEC

Se determinaron las variantes de toxina Shiga y se analizaron fragmentos de macrorrestricción separados por electroforesis en campo pulsado (PFGE, "*pulsed-field gel electrophoresis*"), de todas las cepas de STEC, para determinar la relación clonal de los aislamientos. Además, se realizó el análisis de SNPs ("*Single Nucleotide Polymorphism*") de 20 cepas de STEC O157.

Las variantes de *stx*₁ se determinaron de acuerdo con Scheutz y col. (2012). Las variantes de *stx*₂ se determinaron por PCR-RFLP ("*restriction fragment length polymorphism*") de acuerdo con Tyler y col. (1991). Las secuencias y concentraciones de los cebadores, programa de amplificación y tamaño de los amplicones de cada PCR se detallan en la Tabla 1, las cepas control utilizadas se

presentan en la Tabla 2 y las condiciones de la corrida electroforética y la adquisición de imágenes en el punto 3 del Anexo.

Para el análisis de SNPs se utilizó el ensayo de genotipado GoldenGate (Illumina, California, EE.UU.). Se evaluaron 23 de los 32 SNPs identificados previamente capaces de diferenciar los genotipos originales de los SNPs. Para representar los genotipos originales identificadas por Manning y col. (2008), se utilizaron como controles las secuencias específicas de 30 cepas. Los clados se identificaron a partir de estas cepas control previamente definidas. Los 23 SNPs se concatenaron en MEGA6 y la historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining (Tamura y col., 2008; Saitou y Nei, 1987). La identificación de clados se realizó mediante el test de bootstrap utilizando 1000 réplicas, y las distancias evolutivas se presentaron como el número de diferencias de SNP por sitio (Riordan y col., 2008).

Para determinar la relación clonal de los aislamientos de STEC O157 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 *Xba*I (Fermentas, Lituania). Cuando las cepas resultaron 100% relacionadas al corte con *Xba*I, una segunda enzima de restricción, *Bln*I (Fermentas, Lituania), fue utilizada bajo las mismas condiciones que *Xba*I.

Todas las cepas se sembraron inicialmente en ATS 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 turbidez de 0,35-0,4 determinado

en MicroScan (Dade Berhing, Atlanta, EEUU). Los tacos de agarosa fueron preparados a partir de 400 µl de suspensión celular estandarizada con 400 µl de agarosa SeaKen Gold 1% fundida (SeaKen, FMC Bioproducts, Maine, EEUU) y 20 µl de solución de Proteinasa K [20 mg/ml (PB-L, Bernal, 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 *Xba*I (30 U) en 200 µl del buffer de restricción 1X (provisto con la enzima), a 37°C, durante 1,5 a 2 h. La enzima *Bln*I se utilizó en una segunda etapa, procediendo de manera análoga, luego de obtenerse los patrones de PFGE-*Xba*I, a fin de confirmar la identidad de las cepas que resultaron idénticas con la primera enzima.

Los tacos se colocaron en un gel de agarosa SeaKem Gold 1% 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 150 ml de 15 calles. La corrida electroforética se realizó en el equipo CHEF DR III (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* serovar Braenderup H9812, digerido por las mismas enzimas, en dos

calles externas y una central en cada gel, para permitir la normalización de las bandas entre los geles. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 0,1 µg/ml, 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 tridestilada en las mismas condiciones. Para la documentación de los resultados los geles fueron fotografiados en un transiluminador de UV (Slider Imager, Maestrogen, Nevada, EEUU). Las imágenes fueron registradas utilizando una cámara fotográfica (Canon PowerShot G16, Tokio, Japón) y almacenadas en formato TIFF. La presencia de bandas se determinó visualmente y los patrones de PFGE obtenidos fueron analizados con el programa BioNumerics versión 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando el coeficiente de Dice y mediante UPGMA para generar un dendograma con 1,5% de valor de tolerancia.

Para la separación por PFGE de las cepas de STEC no-O157 se utilizó el mismo protocolo que se describió para las cepas de STEC O157, con excepción del pulso inicial y final de corrida que fueron 6,76 y 35,38 seg, respectivamente (PulseNet PFGE, 2013).

2. RESULTADOS

2.1 - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso y determinación de la contaminación por STEC durante el período de estudio 2010-2011

A- Cuantificación del riesgo

Noventa (81,8%) de 110 locales muestreados fueron carnicerías, 18 (16,4%) supermercados con carnicería y 2 (1,8%) fueron supermercados corporativos que

vendían la carne envasada en bandeja. Cincuenta y cinco (50,0%), 43 (39,0%) y 12 (11%) de 110 locales fueron cuantificadas como de riesgo alto, moderado y bajo, respectivamente.

B- Detección y aislamiento de STEC O157

En 14 (12,7%) de 110 carnicerías analizadas se obtuvo aislamiento de STEC O157. En 13 locales se confirmó que la carne estaba contaminada por este patógeno y en uno se aisló STEC O157 solo de muestras ambientales (mesada, cuchilla y manos). Además, en 2 de los 13 locales de cuya carne se aisló STEC O157, también se confirmó en picadora y en mesada, picadora y manos.

De 110 muestras de carne analizadas, 3 (2,7%) fueron detectadas como *E. coli* O157 por IC a partir del caldo de enriquecimiento. Se realizó la SIM a todas las muestras de carne, y 18 (16,3%) de las confluencias fueron STEC O157 por PCR múltiple. La eficiencia de aislamiento fue de 72,2%.

De 432 muestras ambientales (108 de cada tipo), 11 (2,5%) fueron detectadas como *E. coli* O157 por IC a partir del caldo de enriquecimiento. Se realizó la SIM a todas las muestras ambientales pertenecientes a carnicerías con algún resultado positivo al test IC, y 32 (7,4%) muestras fueron detectadas como STEC O157 por PCR de la confluencia. La eficiencia de aislamiento fue de 21,9%.

Se aislaron 20 cepas de STEC O157:H7, 13 a partir de las muestras de carne (11,8%), 2 de mesada (1,8%), 2 de picadora (1,8%), 2 de manos (1,8%), y 1 de cuchilla (0,9%).

Los resultados obtenidos en esta sección se presentan por tipo de muestra en la Tabla 7.

C - Detección y aislamiento de STEC no-O157

Se detectó STEC no-O157 en 30 (27,3%) de 110 locales muestreados. En 22 (73,3%) de los 30 establecimientos solo se obtuvo aislamiento de una muestra, correspondiendo en 6 locales a la muestra de carne, en 6 a la mesada, en 5 a la picadora, en 4 a la cuchilla y en 1 a las manos. En 7 (23,3%) de los 30 locales se aisló a partir de 2 muestras diferentes (en 3 de carne y mesada, en 2 de cuchilla y picadora, en 1 de carne y picadora y en 1 de mesada y cuchilla) y en 1 (3,3%) de 4 muestras diferentes (carne, mesada, cuchilla y manos).

De 110 muestras de carne analizadas, 51 (46,3%) fueron *stx* positivas por tamizaje del caldo de enriquecimiento y se confirmó por aislamiento en 11 (10,0%). La eficiencia de aislamiento fue de 21,6% (11/51).

De 432 muestras ambientales, 204 (47,2%) fueron *stx* positivas y se confirmó en 29 (6,7%). La eficiencia de aislamiento fue de 14,21% (29/204).

Del análisis de 110 carnicerías se aislaron 42 cepas de STEC no-O157 de 40 muestras distintas. De una muestra de carne se aislaron 3 cepas diferentes. Once (10,0%), 11 (10,2%), 8 (7,4%), 8 (7,4%) y 2 (1,8%) muestras de carne, mesada, cuchilla, picadora y manos fueron confirmadas como STEC no-O157, respectivamente.

Los resultados obtenidos en esta sección se presentan por tipo de muestra en la Tabla 8.

2.2 - Diseño y aplicación de estrategias de mejora en las carnicerías de la ciudad de Berisso

A - Realización de un ciclo de capacitaciones grupales para carniceros con base en los resultados obtenidos

Del 25 de Marzo al 10 de Octubre de 2011 se realizaron 12 capacitaciones colectivas para cada una de las cuales se convocó a 20 manipuladores, que representaron al 71% de las carnicerías.

A continuación se detallan algunos de los contenidos expuestos durante las capacitaciones.

Establecimiento. En este punto se dieron las recomendaciones a cerca del diseño y organización del local: suelos, paredes y pilares, uniones entre las paredes y entre paredes y piso, techos, ventanas y otras aberturas, iluminación natural y artificial del local, lavamanos, dispositivos para desinfección de cuchillas, recipientes para eliminación de residuos, maquinarias, mesadas y bandejas en contacto con la carne y productos cárnicos, materiales no aptos y frecuencia y procedimiento de sanitización.

Se expusieron las características de las áreas que debe tener cualquier establecimiento en el cual se manipulan y elaboran alimentos. Se detallaron las características de diseño, muebles apropiados (cámaras frías, freezer, heladeras para alimentos frescos y espacios para materias primas que no necesitan ser conservadas en frío), y propósito de cada área.

Se explicó el concepto de sanitización y la implementación de una rutina correcta, incluyendo frecuencia y momento óptimo. Se hizo referencia a la sanitización de pisos, heladera mostrador, mesadas, cuchillas y chairas, picadora,

bandejas, manos y cámaras, y al almacenado y rotulado de detergentes y sustancias sanitizantes.

Formación y hábitos del carnicero. Se explicó cómo pueden contaminarse los alimentos por parte de manipuladores enfermos y portadores asintomáticos. Se hizo hincapié en la importancia de contar con la libreta sanitaria actualizada y de establecer como requisito interno solicitar análisis periódicos para asegurar su estado de salud. Se dieron recomendaciones a cerca de la vestimenta del personal (indumentaria mínima necesaria, características, frecuencia de cambio, objetos que debe evitarse usar). Se abordaron las reglas de higiene que debe tener el manipulador y se explicó la rutina para un correcto lavado de manos.

Buenas Prácticas de Manufactura. Se explicaron conceptos básicos de BPM en las diferentes etapas de elaboración (recepción, elaboración y comercialización).

Control de residuos y plagas. Se expusieron recomendaciones sobre: drenajes y canaletas, rejillas, recipientes de descarte de residuos, flujo de evacuación de residuos y su manejo según el movimiento de las materias primas, proliferación de plagas (insectos, mamíferos, y aves) y su relación con las condiciones edilicias del establecimiento y con la forma de disponer los desechos, y medidas basadas en el uso de sustancias químicas y físicas para el manejo de plagas.

Las carnicerías y el Código Alimentario Argentino. Se expusieron los principales conceptos del CAA sobre los productos cárnicos: definiciones, condiciones para la venta, características del establecimiento y obligaciones de los manipuladores.

B - Realización de un ciclo de capacitaciones individuales en cada carnicería con base en los resultados obtenidos

Entre Marzo a Diciembre de 2012 se realizaron 110 capacitaciones individuales en las carnicerías, de las cuales participaron 500 manipuladores. Se abordaron conceptos prácticos sobre la aplicación de BPM e higiene según la situación particular de cada carnicería. Se analizaron los resultados obtenidos en forma individual mediante el análisis microbiológico y la cuantificación de riesgos. Se propusieron acciones de mejora para implementar en cada una de las carnicerías participantes, las cuales fueron aplicadas en colaboración con el equipo de trabajo CONICET-UNLP.

C - Implementación de una estrategia para informar a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA

Durante el segundo semestre de 2012 se realizaron 2 jornadas de capacitación de las que participaron 52 docentes que luego transfirieron la información a los 26 Jardines de Infantes de la ciudad de Berisso. Esto permitió abordar la problemática de las ETA con 4506 niños de 3 a 5 años de edad y a través de ellos, a sus familias.

El resultado del trabajo realizado fue transferido a la comunidad de Berisso por medios de difusión masivos, locales y regionales, tales como medios gráficos, radio y televisión.

2.3 - Verificación del éxito de las estrategias de mejora implementadas

A - Cuantificación del riesgo asociado a las carnicerías de la ciudad de Berisso

Durante el 2013 se muestrearon 86 locales, de los cuales 66 (76,7%) fueron carnicerías, 18 (20,9%) supermercados con carnicería y 2 (2,3%) fueron supermercados corporativos que vendían la carne envasada en bandeja. De 86 carnicerías analizadas, 19 (22,1%), 42 (48,8%) y 25 (29,1%) fueron cuantificadas como de riesgo alto, moderado y bajo, respectivamente.

B - Detección y aislamiento de STEC O157:H7

Durante 2013 se analizaron 86 carnicerías y en 5 (5,8%) de ellas se obtuvo aislamiento de STEC O157. En 3 locales se confirmó que la carne estaba contaminada por este patógeno, en uno se aisló STEC O157 solo de la picadora y en otro solo de las manos.

De 86 muestras de carne analizadas, 4 (4,6%) fueron detectadas como *E. coli* O157 por IC a partir del caldo de enriquecimiento. Se realizó la SIM a todas las muestras de carne, y 6 (7%) de las confluencias fueron STEC O157 por PCR múltiple. La eficiencia de aislamiento fue de 50%.

De 336 muestras ambientales (84 de cada tipo), 5 (1,5%) fueron *E. coli* O157 por IC, de las cuales 2 (0,6%) fueron detectadas como STEC O157 por PCR de la confluencia. La eficiencia de aislamiento fue de 100%.

Los resultados obtenidos en esta sección se presentan por tipo de muestra en la Tabla 9.

C - Detección y aislamiento de STEC no-O157

Durante 2013 se analizaron 86 carnicerías y se confirmó la contaminación con STEC no-O157 en 23 (26,7%). En 15 (65,2%) de los 23 establecimientos solo se obtuvo aislamiento de una muestra, correspondiendo en 6 locales a la muestra de carne, en 5 a la mesada, en 1 a la cuchilla, en 1 a la picadora y en 2 a las manos. En 6 (26,1%) de los 23 locales se aisló a partir de 2 muestras diferentes (en 2 de carne y picadora, en 2 de mesada y cuchilla, en 1 de carne y manos y en 1 de picadora y manos). En 1 (4,3%) local se aisló STEC no-O157 de 3 muestras (carne, mesada y picadora) y en otro (4,3%) de 4 muestras distintas (carne, mesada, cuchilla y manos).

Del análisis de 86 carnicerías se aislaron 37 cepas de STEC no-O157 de 34 muestras distintas. De 2 picadoras y de una carne se aislaron 2 cepas distintas por muestra. Once (12,8%), 9 (10,7%), 4 (4,8%), 6 (7,1%) y 4 (4,8%) muestras de carne, mesada, cuchilla, picadora y manos fueron confirmadas como STEC no-O157, respectivamente.

De 86 muestras de carne analizadas, 33 (38,4%) fueron *stx* positivas por tamizaje del caldo de enriquecimiento y se confirmó por aislamiento en 11 (12,8%). La eficiencia de aislamiento fue de 33,3% (11/33).

De 336 muestras ambientales, 105 (31,2%) fueron *stx* positivas por tamizaje del caldo de enriquecimiento y 23 (6,8%) fueron confirmadas por aislamiento. La eficiencia de aislamiento fue de 21,9% (23/105).

Los resultados obtenidos en esta sección se presentan por tipo de muestra en la Tabla 10.

D - Caracterización de los aislamientos de STEC O157 y no-O157 mediante técnicas fenotípicas y genotípicas

D.1 - Caracterización fenotípica de los aislamientos

Por caracterización bioquímica se determinó que todos los aislamientos analizados en el presente capítulo (período 2010-2011 y verificación) fueron identificados como *E. coli*.

Todos los aislamientos de STEC O157 fueron sorbitol, celobiosa, β -glu y ONPG negativos. Veintitrés (92,0%) de 25 aislamientos fueron biotipo C, mientras que 2 (8,0%) pertenecieron al biotipo D. Veintiún (84,0%) aislamientos fueron productores de Enterohemolisina y todos fueron serotificados como O157:H7.

Con respecto a los aislamientos de STEC no-O157, 59/79 (70,9%) fueron β -glu positivo y 54/79 (68,3%) productores de enterohemolisina. Entre las cepas estudiadas, se identificaron 26 serotipos diferentes (O y H), que comprendieron 21 serogrupos O (8, 8/60, 21, 26, 41, 44, 49, 64, 79, 89, 91, 109, 113, 116, 130, 141, 163, 171, 174, 178, 181) y 11 antígenos H (7, 8, 11, 14, 18, 19, 20, 21, 25, 28, 49). Veinte cepas fueron O no-tipificables (ONT) y 1 cepa O-rugoso (OR). Tres cepas fueron no tipificables para el antígeno flagelar y otras 3 fueron no móviles. Los serotipos más prevalentes fueron: O178:H19 (8 cepas), O8:H19 (6 cepas), O174:H28 (6 cepas), ONT:H7 (5 cepas) y ONT:H19 (5 cepas).

D.2 - Caracterización genotípica de las cepas STEC

Las 25 cepas de STEC O157:H7 fueron portadoras de los genes *rfb*_{O157}, *stx*₂, *eae*, *ehxA*, *fliC*_{H7}, *efa*, *toxB* e *iha*. El gen *stx*₁ en combinación con *stx*₂ estuvo presente en 3 (12,0%) de 25 de cepas. La misma frecuencia obtuvo el gen *subAB*. La caracterización genotípica de los aislamientos se presenta en la Figura 4.

Sobre un total de 79 cepas de STEC no-O157, se identificaron diferentes genotipos *stx*. La presencia de los genes *stx*₂, *stx*₁/*stx*₂ y *stx*₁ fueron detectados en 59 (74,7%), 16 (20,2%) y 4 (5,1%), respectivamente. El gen *ehxA* fue detectado en 54 (68,3%), de las cuales en 48 también se detectó el gen *saa*. El gen *saa* fue detectado en una (4,0%) de 25 cepas *ehxA*-negativas; y *eae* en 2 (8,0%). Setenta y siete (97,5%) cepas fueron *toxB* y *efa* negativas. En la cepa identificada como O26:H11 se detectaron también los genes *eae*, *efa* y *toxB*. Todas las cepas fueron portadoras de *lpf*_{O113} y 77 (97,5%) del gen *iha*. La presencia de los genes *subAB*, *cdt-V* y *astA*, se confirmó en 51 (64,5%), 7 (8,9%) y 6 (7,6%) cepas, respectivamente. Todas las cepas *cdt-V*-positivas además fueron *subAB*-positivas. Todas las cepas fueron negativas para los genes *aggR* y *aaiC*. La caracterización genotípica de los aislamientos se presenta en la Figura 5.

D.3 - Subtipificación molecular de las cepas STEC

El perfil de variantes *stx* detectado en las cepas de STEC O157:H7 fue *stx*_{2a}+*stx*_{2c(vh-a)} (N= 21), *stx*_{1a}+*stx*_{2c(vh-a)} (N= 3) y *stx*_{2a} (N= 1) (Figura 4). Las combinaciones de variantes *stx* detectadas en las cepas de STEC no-O157 fueron: *stx*_{2v-hb} (N= 27), *stx*_{2a} (N= 27), *stx*_{1a}/*stx*_{2a} (N= 13), *stx*_{2a}+*stx*_{2v-hb} (N= 4), *stx*_{2c(v-ha)} (N=

4), *stx*_{1a} (N= 3), *stx*_{1a}+*stx*_{2a}+*stx*_{2v-hb} (N= 3), *stx*_{1a}+*stx*_{1c} (N= 1) y *stx*_{1a}+*stx*_{2v-hb} (N= 1) (Figura 5).

Por el análisis de SNPs de 20 de las 25 cepas STEC O157:H7, se determinó que 14 y 6 cepas pertenecieron a los clados 8 y 6, respectivamente.

Sobre un total de 25 cepas de STEC O157:H7 analizadas por PFGE-*Xba*I, se definieron 16 patrones de restricción con al menos 72,5% de similitud, los cuales presentaron bandas de 17,7 a 690,1 kb. Dieciséis cepas fueron agrupadas en 7 patrones, mientras que las 9 cepas restantes presentaron patrones de restricción únicos. Cuando un patrón estuvo conformado por cepas de diferentes carnicerías se buscaron variables comunes. El patrón 3 estuvo conformado por las únicas cepas biotipo D, IGEVET 746 y 564, aisladas de la muestra de carne de la carnicería 31 y 52, respectivamente. El patrón 5 estuvo conformado por las cepas IGEVET 686 y 682 aisladas de las manos de la carnicería 4 y de la carne de la carnicería 45 durante la primera etapa de muestreo. Los locales tenían el mismo frigorífico proveedor de carne. El patrón 7 correspondió a las cepas IGEVET 625 y 627 aisladas de mesada y manos de la carnicería 27 en el primer muestreo. El patrón 9 correspondió a las cepas IGEVET 543, 544 y 545 aisladas de carne y picadora de la carnicería 17 y de la carne de la carnicería 113 del primer muestreo, respectivamente. Estos locales también compartían el frigorífico proveedor. El patrón 10 agrupó a las cepas IGEVET 624 y 642 aisladas en la primera etapa de muestreo de la carne de la carnicería 94 y 97, respectivamente. El perfil fenotípico y genotípico de ambas cepas fue idéntico excepto por la presencia de la variante *stx*_{2c(v-ha)} en la cepa IGEVET 642. El patrón 14 correspondió las cepas IGEVET 683, 684 y 685, aisladas de carne, mesada y picadora de la carnicería 4 durante el primer muestreo,

respectivamente. La única diferencia encontrada entre ellas es la enterohemólisis negativa de la cepa IGEVET 683. El patrón 15 correspondió a las cepas IGEVET 799 y 845 aisladas de picadora de la carnicería 44 y de las manos de la carnicería 56 durante la etapa de verificación. Estos locales compartían el frigorífico proveedor. Los patrones 1, 2, 4, 6, 8, 11, 12, 13 y 16 correspondieron a cepas únicas. En la Figura 4 se presenta el dendrograma generado a partir de los resultados obtenidos por PFGE-*Xba*I.

Por corte con PFGE-*Bln*I de las 16 cepas de STEC O157:H7 que no pudieron ser diferenciadas por PFGE-*Xba*I (patrones 3, 5, 7, 9, 10, 14 y 15) solo las cepas IGEVET 746 y 564 pertenecientes al patrón 3 se diferenciaron mostrando un 84,8% de similitud.

Sobre un total de 79 cepas de STEC no-O157 analizadas por PFGE-*Xba*I, se definieron 59 patrones de restricción con al menos 57,4% de similitud, los cuales presentaron bandas de 19,2 a 650,0 kb. Veintiún aislamientos fueron agrupados en 10 patrones, mientras que 49 cepas presentaron patrones de restricción únicos y 9 fueron excluidas del análisis debido a que se degradó su ADN en 3 oportunidades, inclusive al utilizar tiourea en el buffer de corrida (Tabla 11). Del mismo modo que para STEC O157:H7, se buscaron variables comunes entre los locales con aislamientos pertenecientes a un mismo patrón. El patrón 4 correspondió a las cepas IGEVET 851 y 852 aisladas de la carne y picadora de la carnicería 85 de la primera etapa de muestreo. El patrón 6 agrupó las cepas IGEVET 774 y 877, aisladas de manos de la carnicería 5 y de la picadora de la carnicería 2 durante el primer muestreo, respectivamente. Estas cepas presentaron diferente serotipo y perfil genotípico, siendo la cepa IGEVET 744 O8:H19 (*saa/ehxA/iha/stx_{2a}*) y la cepa 877

O178:H19 (*iha/stx_{2c(v-ha)}*). El patrón 22 agrupó a las cepas IGEVET 878, 869 y 871, aisladas de la muestra de mesada de la carnicería 23, cuchilla de la carnicería 29 y mesada de la carnicería 57 del primer muestreo, respectivamente. Los 3 locales tenían un mismo frigorífico proveedor. El patrón 27 estuvo conformado por las cepas IGEVET 1009 (mesada) y 1008 (picadora) aisladas de la carnicería 61 en la primera etapa de muestreo. Estas cepas se diferencian por la presencia de *ehxA* en IGEVET 1009. En el patrón 34 se agruparon las cepas IGEVET 636 y 681 aisladas de mesada de la carnicería 27 y de la picadora de la 63 del primer muestreo y se diferencian solamente por la presencia de la variante *stx_{2a}* en la cepa IGEVET 636. Estos locales también recibían la carne de una misma planta faenadora. El patrón 36 correspondió a las cepas IGEVET 731 (carne) y 730 (mesada) aisladas de la carnicería 102 del primer muestreo. El patrón 37 correspondió a las cepas IGEVET 1013 (mesada) y 1007 (cuchilla) aisladas durante en la etapa de verificación de la carnicería 61. El patrón 40 agrupó a las cepas IGEVET 650 y 652 aisladas de la muestra de carne de la carnicería 20 y de la 88 el primer muestreo, respectivamente. En estos locales no se tuvo acceso a la información sobre los proveedores. El patrón 46 estuvo formado por las cepas IGEVET 819 y 883 pertenecientes a la carne de la carnicería 49 de la etapa de verificación. Estas cepas se diferenciaron por su Ag O y el *subAB*, siendo IGEVET 819 ONT y 883 O141 (*subAB* positivo). El patrón 48 se agrupó las cepas IGEVET 933 y 940 aisladas de la carne de la carnicería 81 y de la mesada de la 82 del primer muestreo, respectivamente. Los patrones 15 y 16 correspondieron a las cepas IGEVET 759 y 797 aisladas de la mesada y la cuchilla de la carnicería 76 de la primera etapa y mostraron un 97,1% de similitud. Se observó una banda de 107,3 kb en la cepa IGEVET 797. Debido a la relación

epidemiológica entre estas cepas podrían ser consideradas un mismo clon con origen común (Tenover y col., 1995). Los patrones 31 y 32 comprendieron las cepas IGEVET 1033 y 1036 aisladas de carne y picadora de la carnicería 70 de la etapa de verificación y mostraron una similitud de 94,1%. El resto de los patrones tuvieron un porcentaje de similitud inferior al 90%, por lo que no fueron agrupados en ningún patrón.

En la carnicería 20 se aislaron 3 cepas de la carne serotipificadas como O8/60:H19, ONT:H19 y O8:H19, con diferente genotipo y una similitud por PFGE-*Xba*I de 61,4%. También se identificó una cepa O8:H19 en la cuchilla y otra ONT:H18 en la picadora de la carnicería 29. De la carnicería 81 se aislaron 2 cepas ONT:H7 de la carne y la mesada no relacionadas (60,2% de similitud) por PFGE-*XBa*I. De la carnicería 59 se aisló una cepa ONT:H21 de la cuchilla y una ONT:H7 de la picadora que no presentaron relación fenotípica ni genotípica entre sí. De la carnicería 103 se aislaron cepas de la carne (O41:H14), cuchilla (O178:H19) y mesada (O178:H19) sin relación por PFGE-*XBa*I. De la carnicería 104 la cepa aislada de la carne fue O8:H19 y la de la mesada O49:H49 y no estuvieron relacionadas por PFGE-*XBa*I (63,77% de similitud). En la Figura 5 se presenta el dendrograma generado a partir de los resultados obtenidos por PFGE-*Xba*I.

Sobre un total de 21 cepas de STEC no-O157 que no pudieron ser diferenciadas por PFGE-*Xba*I (patrones 4, 6, 22, 27, 34, 36, 37, 40, 46 y 48), 4 presentaron diferencias al ser cortadas con PFGE-*Bln*I, pertenecientes a los patrones 6 y 27. Las cepas del patrón PFGE-*Xba*I 6 se diferenciaron por una banda presente en la cepa IGEVET 774. Las cepas del patrón 27 se diferenciaron por dos bandas presentes en la cepa IGEVET 1008.

E.- Comparación de los resultados obtenidos durante la etapa descriptiva y la etapa de verificación

Durante la etapa de verificación se registró una disminución del 33,7% (N= 29) en las carnicerías cuantificadas como de riesgo alto, y un aumento del 13,9% (N= 12) y 19,8% (N= 20) en las de riesgo moderado y bajo, respectivamente (Tabla 12). La diferencia encontrada en el análisis comparativo de la cuantificación del riesgo de las carnicerías en el período 2010-2011 *versus* 2013 resultó altamente significativa para el riesgo alto y bajo ($P<0.01$), y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de carnicerías cuantificadas de riesgo moderado ($P<0.05$) (Tabla 13).

En cada período se analizaron 422 muestras. En la etapa de verificación (2013) se demostró una disminución de 5,9% (N= 25) en las muestras positivas al tamizaje de STEC O157. Respecto del aislamiento de STEC O157:H7 se observó una disminución del 2,8% (N= 12) durante la etapa de verificación. La eficiencia de aislamiento de STEC O157:H7 aumentó un 10,5% en la etapa de verificación, respectivamente. Los resultados comparativos discriminados por tipo de muestra se presentan en la Tabla 14.

En la etapa de verificación (2013) se demostró una disminución del 15,9% (N= 67) en las muestras positivas al tamizaje para *stx* durante. Respecto al aislamiento de STEC no-O157 se registró un aumento del 1,1% (N= 5) en las muestras contaminadas con STEC no-O157 en la etapa de verificación. La eficiencia de aislamiento de STEC no-O157 aumentó un 10,5% en la etapa de verificación,

respectivamente. Los resultados comparativos discriminados por tipo de muestra se presentan en la Tabla 15.

El análisis comparativo de la proporción de muestras positivas al tamizaje para STEC O157 y no-O157 en el período 2010-2011 *versus* 2013 mostró diferencias altamente significativas para ambos patógenos ($P < 0.01$) (Tabla 13). Al observar estas diferencias hay que considerar que en la etapa de verificación no se tomaron muestras en el período de mayor prevalencia de STEC, ya que el muestreo se realizó de Marzo a Septiembre.

Con base en los resultados de todos los análisis realizados a las muestras, al finalizar la etapa de verificación se distinguieron 10 locales que fueron identificados como “Carnicerías Saludables” con la calcomanía emitida por la Municipalidad de Berisso.

3. DISCUSIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga es un patógeno emergente transmitido por alimentos que produce un amplia variedad de afecciones humanas, pudiendo cursar con portación asintomática o presentándose en forma de casos esporádicos de diarrea leve auto limitante o brotes de diarrea, colitis hemorrágica, trombocitopenia o SUH (Adamu y col., 2014; Karmali y col., 2010). Los niños menores de 5 años y los adultos mayores de 65 años, son los individuos que tienen mayor riesgo de infección.

En Argentina, el SUH es endémico y tiene una incidencia de 300 a 500 nuevos casos por año (Boletín Integrado de Vigilancia N° 240). Si bien en muchos países STEC O157 es el serotipo más prevalente asociado a enfermedad severa en

humanos (Adamu y col., 2014; Atkinson y col., 2012; EFSA, 2013), existe un grupo de STEC, conformado por los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145, que también se ha asociado frecuentemente a enfermedad severa en EE.UU y UE (Atkinson y col., 2012; EFSA, 2013).

Las cepas STEC se caracterizan por su habilidad para producir al menos un tipo de Stx con capacidad de inhibir la síntesis proteica en células eucariotas, mecanismo esencial para el desarrollo de la enfermedad humana (Calderwood y Mekalanos, 1987; Krüger y Lucchesi, 2015). Esta toxina y otros factores de virulencia involucrados en la colonización del hospedador, diferencian a STEC de las cepas de *E. coli* comensales.

Las infecciones causadas por STEC poseen carácter zoonótico, siendo los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, los principales reservorios. Aunque los vegetales fueron frecuentemente asociados con brotes de enfermedad en todo el mundo (EFSA, 2013), los alimentos cárnicos y lácteos derivados del ganado bovino son una de las principales causas identificadas como origen de enfermedades en el hombre (Hussein, 2007; Martin y Beutin, 2011; EFSA-ECDC, 2015). La contaminación fecal de las carcasas bovinas se produce durante la maniobra de cuereado y eviscerado en el frigorífico, y de este modo STEC llega a la carne que luego será consumida (Elder y col., 2000). Las toxo-infecciones por STEC se producen al ingerir alimentos contaminados con desechos o materia fecal de origen animal o humano. El consumo de agua contaminada, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos, el contacto directo con los animales y persona-persona también fueron asociados a casos de SUH (EFSA, 2013, Rivas y col., 2008b).

Además de los factores de virulencia de la cepa, el riesgo de contraer enfermedad por STEC está determinado por factores del huésped y del alimento. El nivel de contaminación, el grado de patogenicidad de la cepa, la dosis infectiva, la interacción del patógeno con factores del hospedador y el ambiente, los hábitos y conductas de los consumidores en la preparación y cocción de los alimentos, la cantidad de comida ingerida y el estado general de inmunocompetencia son algunas de las variables que pueden predisponer al desarrollo de la enfermedad por STEC (Brandal y col., 2015; Franz y col., 2015; Karpman y Ståhl., 2014; Rivas y col., 2008b). El consumo de carne, especialmente carne bovina molida e insuficientemente cocida, y tener contacto con animales de granja y con niños menores de 5 años con diarrea fueron propuestos factores de riesgo (Rivas y col., 2008b; Taylor y col., 2012; EFSA-ECDC, 2015).

En la mayoría de los países europeos el consumo promedio diario de carne y productos cárnicos por persona es de menos de 10 g, con excepción de Irlanda e Italia, donde el consumo es mayor a 60 g. En EEUU el consumo es de casi 120 g diarios, y en nuestro país, el consumo *per cápita* es de aproximadamente 163 g por día (CICRA, 2015). Las diferencias regionales en cuanto a los hábitos han determinado que, por ejemplo, en EEUU el principal alimento asociado a ETA por STEC O157:H7 hayan sido las hamburguesas, mientras que en Europa el consumo de hamburguesas no ha sido identificado como una fuente de infección (Gyles, 2007). El consumo de carne cruda, o ligeramente cocida, frecuente en EEUU y especialmente en Europa, y comer en restaurantes también fueron descritos como factores de riesgo para contraer enfermedad por STEC (Slutsker y col., 1998; Kassenborg y col., 2004; Shiferaw y col., 2004; Jones y Angulo, 2006).

La carne bovina molida es un alimento de consumo masivo y es considerada un producto de riesgo por factores asociados a su proceso de producción y a los hábitos de consumo. Este alimento se realiza con los recortes y cortes de bajo valor comercial que corresponden a partes de la media res con mayor probabilidad de contaminarse durante el eviscerado: a) por derrames de contenido intestinal, b) durante el lavado de las canales, porque el agua que arrastra la contaminación de toda la media res escurre sobre la zona donde se ubican estos cortes (<http://www.ipcva.com.ar/files/manualcarniceros.pdf>). Si la carne proviene de un matarife o de un frigorífico que no cumple con las normas sanitarias adecuadas, el riesgo de contaminación de estos cortes aumenta. Además, si la picadora que se utiliza está contaminada y la carne no, esta última se contamina y el problema se agrava (<http://www.ipcva.com.ar/files/manualcarniceros.pdf>). La acción directa del fuego en la superficie de un corte elimina todas las bacterias pero, aunque en nuestro país el consumo de carne molida cruda no es frecuente, es importante considerar que durante el procesamiento de la carne molida la contaminación superficial pasa al centro de la masa de carne haciendo que la cocción superficial no sea suficiente para eliminar las bacterias del centro del producto (Luchansky y col., 2012; Smith y col., 2013)

En Argentina existen diferentes estándares sanitarios para la faena de bovinos: frigoríficos exportadores, frigoríficos de tránsito federal, plantas de tránsito provincial, matarifes municipales, y faena artesanal. Cada estándar trabaja bajo la reglamentación determinada por el organismo de control que le corresponda, tales como SENASA, Ministerios provinciales o Municipios (Decreto 4238/68 de SENASA; Ley N° 22.375 de Presidencia de la Nación). Los frigoríficos exportadores además de

cumplir con lo dispuesto en el Decreto 4238/68 de SENASA, deben cumplir con las exigencias de sus clientes y trabajar de acuerdo a las demandas de los mercados internacionales, como el Reglamento (CE) 2073/2005 de la UE que exige la implementación de un programa de HACCP. Los frigoríficos de tránsito federal cumplen con el Decreto 4238/68, con la Ley N° 22.375 de Presidencia de la Nación y con la Resolución N° 205/2014 de SENASA por el cual deben tener un programa de HACCP. Los frigoríficos provinciales y los mataderos municipales que no se encuentran bajo la órbita de SENASA, sino que son auditados por las autoridades provinciales y municipales correspondientes, no tienen la exigencia de cumplir con un plan de HACCP. Además, se debe considerar la existencia de faena clandestina asociada a casos de abigeato (Giovambattista y col., 2001). Actualmente la carne de boca de expendio de la ciudad de Berisso proviene de frigoríficos exportadores, de tránsito federal y de tránsito provincial. Sin embargo, las carnicerías podrían abastecerse de cualquiera de las plantas que trabajan bajo diferentes exigencias sanitarias, llegando a los consumidores carne con distinta calidad microbiológica. Asimismo, es posible que la carne microbiológicamente apta pueda contaminarse en las carnicerías al contactar con carne contaminada. La carne con STEC puede contaminar las superficies del local que contactan con ella y transformar al ambiente en una posible fuente de contaminación para otros productos, para los manipuladores y para los clientes. Cuando a esto se suma la ausencia de BPM y POES, el problema se agrava favoreciendo que la contaminación persista en el tiempo. La contaminación de la carne bovina molida con STEC ha sido materia de estudio por investigadores en todo el mundo (Chapman y col., 2001; de Paula y col., 2014; Etcheverría y col. 2010; Kennedy y col., 2005; Llorente y col., 2014;

Samadpour y col., 2006; Srednik y col., 2013) sin embargo no ocurre lo mismo con las superficies que contactan con ella.

A partir de la información obtenida de la cuantificación del riesgo y la determinación de la contaminación con STEC en carne bovina molida y muestras ambientales de carnicerías de Berisso durante la primera etapa de muestreo, se capacitaron a los carniceros y se diseñaron e implementaron las mejoras adecuadas a cada carnicería. Cuando se aplican capacitaciones y acciones de mejora, los análisis microbiológicos son fundamentales para verificar el cumplimiento de los objetivos buscados en términos de seguridad alimentaria (CODEX *ALIMENTARIUS* CAC/RCP 58/2005). Por tal motivo, en una última etapa se verificó el éxito de las capacitaciones a los carniceros y de las mejoras implementadas a través del remuestreo de los locales.

Durante la etapa de verificación, la disminución del 33,7% (N= 29) y el aumento del 19,8% (N= 20) en las carnicerías cuantificadas como de riesgo alto y bajo, respectivamente, demostró la efectividad de las capacitaciones dirigidas a los carniceros y de las acciones de mejora implementadas en los locales. El conocimiento por parte de los manipuladores de los del concepto de sanitización y de las BPM, acompañado de la implementación de mejoras edilicias en los locales permitió obtener diferencias altamente significativas en el porcentaje de carnicerías cuantificadas de riesgo alto y bajo, durante la etapa verificación.

De las 110 muestras de carne analizadas en el período 2010-2011, aislamos STEC O157:H7 en 13 (11,8%). Chinen y col. (2001), aislaron STEC O157:H7 en el 3,8% de las muestras de carne bovina molida de boca de expendio de Gualeguaychú, Entre Ríos. En Buenos Aires, Llorente y col. (2014), confirmaron que

el 4,4% de las muestras de carne de boca de expendio eran portadoras de STEC O157. En San Pablo se colectaron 248 muestras de carne bovina molida, y se aisló STEC O157:H7 en el 0,4% de ellas (de Paula y col., 2014), prevalencia similar a la reportada en Italia (Conedera y col., 2004). Estudios realizados en muestras de carne bovina molida en EEUU, Escocia y Reino Unido registraron una prevalencia de STEC O157 del 0,3%, 0,75% y 0,8%, respectivamente (Chapman y col., 2001; Kennedy y col., 2005; Samadpour y col., 2006). El análisis de 1533 muestras de carne bovina molida analizadas en Irlanda, demostró una prevalencia de STEC O157 del 2,8% de las muestras (Cagney y col., 2004). En España, STEC O157:H7 se aisló del 1,0% de las carne bovina molida (Renter y col., 2005). En Egipto, Sallam y col. (2013), aislaron STEC O157 en el 15,0% de las muestras de carne bovina molida, hamburguesas crudas y cortes de carne. Muestreos realizados en Ciudad Autónoma de Buenos Aires y en Luján, informaron una prevalencia de 15,0% y 4,5% de STEC O157:H7 en muestras de carne bovina molida (Epsteyn, comunicación personal; López y col., 2015). Con excepción de Sallam y col. (2013) y Epsteyn (comunicación personal), la prevalencia de STEC O157:H7 registrada en nuestro trabajo fue superior a la de los otros autores. La comparación directa de investigaciones realizadas en diferentes localizaciones geográficas es compleja ya que los estudios suelen tener diferentes métodos de muestreo, técnicas de detección y metodologías de aislamiento. Todos estos factores pueden afectar significativamente los resultados obtenidos y explicar, en parte, la variabilidad de los resultados publicados.

Durante esta primera etapa de muestreo la identificación de clones circulantes en distintas muestras de una misma carnicería evidenció la contaminación cruzada

dentro de los locales. Un ejemplo de esto es el caso de las carnicerías 4, 17 y 27 en las que se identificó un mismo clon en la carne, mesada y picadora, en la carne y picadora, y en la mesada y manos, respectivamente. La formación de biofilm y la transferencia de bacterias patógenas, entre los equipos y utensilios, incluso los de acero inoxidable, y los alimentos ha sido demostrada con contaminaciones experimentales que explican de qué manera el ambiente actúa de fuente para la transmisión de patógenos en la cadena de producción de carne (Dewanti y Wong, 1995; Kennedy y col., 2005; Gounadaki y col., 2008; Pérez-Rodríguez y col., 2010; Papadopoulou y col. (2012), demostraron con inoculaciones experimentales de picadoras de carne con STEC, que éstas pueden ser fuente de contaminación para las carnes libres del patógeno. En otros trabajos se ha reportado que las manos de los manipuladores también actúan como vehículos asociados a contaminación cruzada de STEC O157:H7 (Todd y col., 2008; Phang y col., 2011). La presencia de material orgánico en las superficies en contacto con la carne y la temperatura ambiente favorecen la adherencia de STEC a las superficies (Dourou y col., 2011; Nesse y col., 2013). Los biofilms formados varían en su resistencia a los desinfectantes según el serotipo y cada cepa particular (Wang y col., 2012). La ausencia de un adecuado protocolo de sanitización de las mesadas, cuchillas, picadoras, heladeras e instalaciones, la mala utilización de detergentes y desinfectantes por no cumplir con las indicaciones del fabricante y la incorrecta rutina de lavado de manos, sumadas a temperaturas de refrigeración inadecuadas registradas en las carnicerías en la primera etapa de muestreo, podría haber favorecido el desarrollo de biofilm y el mantenimiento en el tiempo de la contaminación con STEC en el ambiente de la carnicería.

Durante la primera etapa de muestreo se encontraron cepas de STEC O157:H7 idénticas en diferentes locales. En algunos casos los locales tenían el mismo frigorífico proveedor de carne, por lo que el origen de la contaminación podría estar en la planta faenadora. Existen varios puntos en la cadena de producción en los cuales los alimentos pueden sufrir contaminación biológica y no existe una única medida que pueda garantizar su inocuidad. La implementación de un programa de HACCP mejora sustancialmente la calidad microbiológica de la carne (Petruccelli y col., 2016), y reduce las posibilidades de que actúe como fuente de contaminación con STEC en las carnicerías. Sin embargo, los frigoríficos proveedores de las carnicerías de Berisso no cuentan con un programa de HACCP. Insectos, roedores, perros, gatos y conejos, previamente reportados como portadores de STEC (Beutin y col., 1993; Bentancor 2006; Bentancor y col., 2007; Bentancor y col., 2012; Leclercq y Mahillon, 2003; Persad y LeJeune, 2014; Rumi y col., 2012a; Rumi y col., 2012b; Blanco Crivelli y col., 2012), fueron encontrados en varias carnicerías durante la primera etapa de muestreo, convirtiendo a estos vectores en otra posible fuente de contaminación. El agua también podría ser fuente de contaminación por STEC, sin embargo, en la ciudad de Berisso el 98% de los locales cuentan con agua potable, por lo que en nuestro trabajo se desestima esta fuente (López y col., 1998). Las manos de los manipuladores también actúan como vehículos de STEC O157, y la contaminación cruzada puede reducirse con la aplicación de una técnica correcta de lavado de manos y de adecuados hábitos higiénicos (Todd y col., 2008; Phangy col., 2011).

En coincidencia con las mejoras registradas en la cuantificación del riesgo durante la verificación, la diferencia en la proporción de muestras positivas para STEC O157 entre la etapa de muestreo (2010-2011) y verificación (2013), fue altamente significativa. Además, se registró una disminución del 2,8% en las muestras confirmadas positivas por aislamiento de STEC O157. Esto corrobora la eficiencia de las capacitaciones y las acciones de mejora implementadas. En la etapa de verificación se demostró que no hubo contaminación cruzada dentro de las carnicerías luego de implementar las acciones de mejora. La aplicación de POES y BPM fue fundamental para evitar contaminaciones cruzadas, mejorar la calidad microbiológica de la carne y su efectividad quedó demostrada por la ausencia de clones circulantes en un mismo local. Sin embargo, se aisló STEC O157:H7 en muestras 5 (5,8%) carnicerías, 3 a partir de la carne y 2 de ambiente, luego de la implementación de mejoras y capacitaciones. Las BPH y la implementación de POES en la carnicería disminuyen el riesgo de contaminación por esta bacteria. Consideramos que es necesario seguir trabajando para que las carnicerías cumplan con las especificaciones del CAA.

Durante la verificación, debido a la implementación de acciones mejora, POES y BPM, además de disminuir el número de muestras con aislamiento de STEC O157:H7, no se registró contaminación cruzada. El transporte, considerando tanto al transportista como al vehículo, y las prácticas dentro de los establecimientos faenadores son importantes para que la carne se obtenga en condiciones de calidad e higiene óptimas (<http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/archivos/Alimentacion/analisis-caracterizacion-bienestar-animal-plantas-faenadoras-provincia-Buenos-aires.pdf>).

Para obtener un enfoque más completo sería interesante realizar estudios en los frigoríficos de tránsito provincial que proveen carne a las carnicerías de la ciudad de Berisso.

El adecuado entrenamiento de los manipuladores a nivel de boca de expendio es fundamental para la producción de carne segura destinada al consumo humano (CODEX *ALIMENTARIUS* CAC/RCP 58/2005). Sin embargo, el riesgo de contaminación de los alimentos no sólo se ha asociado a los manipuladores y al medio ambiente de los locales de expendio de carne, sino también a las prácticas de higiene del hogar (<http://www.lusuh.org.ar/saludyhabitos.pdf>; <http://apresuh.org/suhprev.html>). Las campañas educativas y la comunicación acerca de los peligros emergentes asociados a los alimentos, dirigidas a los trabajadores de la industria alimentaria y a los consumidores son necesarias para prevenir las ETA (van de Venter, 2000; Pérez-Rodríguez y col., 2010; Bogard y col., 2013). En el período 2011-2012 se informó a la comunidad de Berisso acerca de la prevención de las ETA, trabajando con los niños de los jardines de infantes y a través de los medios de comunicación. Sin embargo, no fue posible verificar el impacto de estas estrategias de información implementadas ya que en Berisso no existe un registro sistematizado de casos ETA ni diarreas agudas.

A diferencia de las diarreas, el SUH es una enfermedad de notificación obligatoria. Los casos diagnosticados en la ciudad de Berisso son derivados al Hospital Interzonal de Agudos Especializados en Pediatría “Sor María Ludovica” como Unidad Centinela. Las cepas de STEC O157:H7 aisladas en la carne y del ambiente de las carnicerías de Berisso en las etapas de muestreo y verificación, fueron caracterizadas como *eae/ehxA/efa-1/toxB/iha*, y 20 (80,0%) fueron portadoras

de *stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}. Este perfil genotípico fue descrito en más del 90% de los casos de SUH post-entérico en nuestro país y en el resto del mundo (Eklund y col., 2002; Friedrich y col., 2002; Leotta y col., 2008). Sin embargo, en Berisso, no se registraron casos de SUH el período 2010-2013.

En Argentina se reportó la “casi exclusiva” circulación de cepas de STEC O157 del clado 8 (Boletín Integrado de Vigilancia N° 220; Pianciola y col., 2014) y también su presencia en el ganado (Mellor y col., 2012; Amigo y col., 2015). Las cepas de este clado son consideradas hipervirulentas y responsables de una presentación más severa de SUH, de progresión más rápida y con un porcentaje de hospitalización más elevado que otras cepas de STEC O157:H7 (Pianciola y col., 2014). Pianciola y col. (2014), adjudican la alta incidencia de SUH en Neuquén a la circulación de cepas de este clado. En nuestro trabajo, sobre un total de 20 cepas analizadas, 14 (70,0%) correspondieron al clado 8, de las cuales 11 (60,0%) portaron las variantes *stx*_{2a}/*stx*_{2c(vh-a)}. Estos resultados coinciden con lo publicado por Manning y col. (2008). Como se mencionó anteriormente, en el período 2010-2013 no se reportaron casos de SUH en la ciudad de Berisso. Por lo tanto la circulación de cepas de STEC O157:H7 del clado 8 en las carnicerías no es suficiente para explicar la tasa de SUH de una región. Deben considerarse otros factores dependientes del hospedador y del ambiente, como el estado de inmunocompetencia, la aplicación de BPH, POES, BPM y la correcta cocción de la carne por parte los consumidores.

Según CAA no es posible comercializar carne con STEC O157:H7. Sin embargo, la ciudad de Berisso no cuenta con un laboratorio municipal donde realizar análisis microbiológicos de alimentos ni con los recursos necesarios para derivar las muestras a laboratorios externos. Berisso, al igual que 91 partidos de la provincia de

Buenos Aires, no tiene un convenio de adhesión al CAA. De 135 partidos, solo en 5 rige el convenio y en 38 se encuentra en trámite (MAA, 2015 http://www.maa.gba.gov.ar/contralor/caa_mun.php). Este vacío legal permite que se comercialicen alimentos que no cumplen con las especificaciones del CAA.

Es importante que los municipios colaboraren y participen en este tipo de programas de muestreo y capacitación, y cuenten con laboratorios para el análisis de muestras de alimentos. Sin embargo, para poder efectuar desde el Estado los controles microbiológicos que aseguren la comercialización de alimentos inocuos es fundamental comenzar por la adhesión a través del convenio al CAA. Aunque es importante informar a los consumidores acerca de las ETA y su prevención en el hogar, no se los puede responsabilizar en forma absoluta y es el Estado el que debe asegurar que los alimentos que se comercialicen sean inocuos.

Con respecto a la determinación de STEC no-O157 durante la primera etapa de muestreo, 51 (46,3%) muestras de carne fueron detectadas *stx* positivas por al menos una de las técnicas de tamizaje utilizadas. La prevalencia de STEC no-O157 en productos cárnicos registrada por distintos autores oscila entre 2,4% y 30% (Husseini, 2007). Diferentes trabajos realizados en EEUU reportaron una detección de *stx* en carne bovina molida del 8,5%, 14,0%, 16,8% y 24,4% (Bosilevac y Koochmariaie, 2011; Ju y col., 2012; Samadpour y col., 2002; Wasilenko y col., 2014), siendo todas tasas de detección menores a la registrada en nuestro trabajo. Estudios realizados en Francia detectaron *stx* en el 11,0% de las muestras de carne bovina molida (Pradel y col., 2000). Etcheverría y col. 2010, determinaron la prevalencia de *stx* en carne en un distrito de la provincia de Buenos Aires, detectando este gen en el 25,0% de los cortes en carnicería y en el 40,7% de la

carne bovina molida, datos similares a los registrados en nuestro trabajo. También en provincia de Buenos Aires, Srednik y col. (2013) y Llorente y col. (2014), detectaron *stx* en el 18,4% y 36,1% de las muestras de carne bovina molida, respectivamente.

De 110 muestras de carne analizadas en el primer período de muestreo, 11 (10,0%) fueron confirmadas por aislamiento. En Canadá, Holanda y Suiza aislaron STEC no-O157 del 1,0%, 1,1% y 2,4%, de las muestras de carne bovina molida, respectivamente (Bohaychuk y col., 2006; Fantelli y Stephan, 2001; Heuvelink y col., 1999). Sin embargo, el 10,0% de aislamiento registrado en este trabajo coincide con el obtenido en España y es inferior al 16,0% y 18,2% registrado en Australia y Argentina, respectivamente (Barlow y col., 2006; Llorente y col., 2014; Mora y col., 2007). Se discutió previamente sobre la disparidad de resultados obtenidos entre muestreos realizados en diferentes zonas geográficas y estas diferencias son aún más contundentes cuando se analiza STEC no-O157. Esto puede deberse a la ausencia de un protocolo estandarizado para la detección y aislamiento de todos los serogrupos. Esto determina que cada laboratorio implemente una metodología diferente en base a la disponibilidad de equipos e insumos, a la experiencia y a la realidad de cada región. Además de la variabilidad en los medios de cultivo utilizados, la aplicación de diferentes protocolos genera una serie de variables medibles y no medibles que condicionan los resultados, como por ejemplo el volumen de muestra sembrada sobre cada placa, la cantidad de placas utilizadas por muestra y la cantidad de colonias seleccionadas de cada placa.

Durante la primera etapa de muestreo (período 2010-2011) se determinó que el ambiente de las carnicerías, además de estar contaminado con STEC O157:H7,

estaba contaminado con STEC no-O157. Doscientas cuatro (47,2%) muestras ambientales fueron detectadas *stx* positivas y 29 (6,7%) fueron confirmadas por aislamiento. La presencia de STEC en el ambiente se encuentra estrechamente relacionada con la ausencia de POES.

En esta etapa se encontraron clones de STEC no-O157 circulantes dentro de un mismo local, como las cepas aisladas de la carne y picadora de la carnicería 85. La picadora contaminada con la misma cepa que la carne evidencia la deficiencia del protocolo de sanitización de la máquina y pone en riesgo de contaminación a toda la carne que en ella se procese. En varios locales se registraron contaminaciones simultáneas con cepas diferentes en distintas muestras e incluso en una misma muestra, como ocurrió en la carnicería 20. La presencia de dos o más cepas diferentes en un mismo local podría representar múltiples fuentes de contaminación. Esta observación podría relacionarse con el elevado porcentaje de carnicerías identificadas de riesgo alto en esta primera etapa. Se observaron clones en diferentes locales, como el aislado de la mesada de la carnicería 23 y 57, y de la cuchilla de la carnicerías 29. Los 3 locales tenían un mismo frigorífico proveedor por lo que podría ser este el origen de la contaminación.

Con respecto a los serotipos de STEC no-O157 observados en los aislamientos de la carne y de las muestras ambientales de la primera etapa de muestreo, 24 (57,1%) correspondieron a O8:H19, O113:H21, O174:[H8, 21, 28, NM] y ONT:[H7, NT]. Estos serotipos fueron reportados en casos de enfermedad, considerando bajo este término a los casos de diarrea aguda, diarrea sanguinolenta y SUH, en nuestro país. Si bien la circulación de estas cepas en las carnicerías

podría representar un peligro para la salud pública, en el período 2010-2013 en Berisso no se registraron casos de SUH.

Cuando se tiene por objeto analizar STEC no-O157 a partir de muestras de alimentos es importante considerar que con los protocolos actualmente disponibles, el número de muestras detectadas *stx* positivas es mayor al de las confirmadas por aislamiento (Bosilevac y col., 2007; Bosilevac y Koohmaraie, 2011; Pradel y col., 2000). En esta primera etapa de muestreo la eficiencia de aislamiento de la carne fue de 21,6%. En EE.UU. y en Francia se reportaron eficiencias de aislamiento en carne bovina molida de 29,8% y 34,0%, respectivamente (Bosilevac y Koohmaraie, 2011; Pradel y col., 2000). Bosilevac y col. (2007), tuvieron una eficiencia de aislamiento de STEC de 20,0% a partir de carne bovina sin hueso de EE.UU., Australia y Nueva Zelanda, y de 56,0% a partir de la carne proveniente Uruguay. Al igual que la prevalencia de STEC en la carne, comparar la eficiencia de aislamiento de este patógeno obtenida por los distintos autores también se dificulta, debido a la variabilidad entre técnicas de tamizaje y protocolos de aislamiento. La complejidad del aislamiento de todos los serogrupos de STEC a partir de la carne está dada por diferentes factores como los procesos tecnológicos aplicados sobre el producto, la baja carga inicial del patógeno, la existencia de bacterias viables-no cultivables, el bajo límite de detección de los métodos de tamizaje y la alta carga de microbiota competitiva (Auvray y col., 2009; Ju y col., 2012). Otros elementos a considerar son la presencia de fagos portadores de *stx* que pueden ser detectados por algunas técnicas de tamizaje, la pérdida de *stx* durante el proceso de aislamiento y la presencia de otras bacterias portadoras de *stx* (Imamovic y col., 2009; Islam y col., 2008).

Al comparar la proporción de muestras *stx* positivas durante el primer período de muestreo y la verificación, la diferencia obtenida fue altamente significativa, registrando una disminución del 15,9% (67/422) en las muestras positivas al tamizaje. Estos resultados coinciden con las mejoras registradas en la cuantificación del riesgo durante la verificación. Sin embargo, se registró un aumento de 1,1% (5/422) en el número de aislamientos de STEC no-O157 respecto de la primera etapa de muestreo. Por los motivos previamente discutidos sobre los métodos de tamizaje para STEC no-O157, consideramos que para establecer su prevalencia real en alimentos es necesario aplicar un protocolo de aislamiento. Debido a la ausencia de una metodología estandarizada que garantice el aislamiento de todos los serogrupos de STEC y la diferencia altamente significativa en la eficiencia de aislamiento registrada entre ambos períodos de muestreo, consideramos más apropiado evaluar el éxito de las mejoras comparando los resultados del tamizaje. La diferencia altamente significativa en el número de muestras *stx* positivas entre ambos períodos de muestreo se podría adjudicar al éxito de las mejoras implementadas durante 2012

El CAA establece el criterio para el análisis de STEC O157:H7 en la carne bovina molida pero no hace referencia a las STEC no-O157. Además, no determina exigencias para el ambiente que contacta con los alimentos. En este contexto, durante la etapa de verificación se identificaron locales con contaminación cruzada entre el ambiente y la carne. Las cepas aisladas de la carne y de la picadora de la carnicería 70 mostraron entre sí una similitud de 94,12%. La contaminación cruzada con patógenos entre los alimentos y el ambiente en boca de expendio aumenta el riesgo de ETA (Sirsat y col., 2014). La aplicación de procedimientos de sanitización

que prevengan la adherencia y posterior formación de biofilm podrían evitar la persistencia de bacterias en los equipos, y la posterior contaminación de los alimentos. La completa y adecuada desinfección de las superficies en contacto con alimentos y equipos en los establecimientos expendedores de carne es esencial (Wang y col., 2014). Sin embargo, de acuerdo con el CDC, a pesar del uso de los protocolos de sanitización la contaminación de los alimentos STEC continúa siendo un problema.

La identificación de una muestra de carne negativa para STEC no-O157 es circunstancial si no se analiza el ambiente donde el alimento se elabora. La presencia de STEC en picadoras, cuchillos, mesadas o manos puede contaminar carne negativa a STEC. Por lo tanto, es fundamental la aplicación de POES en el ambiente de las carnicerías, con énfasis en las máquinas picadoras. Estos instrumentos deben ser sanitizados adecuadamente ya que pueden ser origen de contaminación de carne libre de STEC cuando en ella se procesa. Por ejemplo, la carne de la carnicería 74 fue negativa para STEC, pero se aisló una cepa a partir de las manos (O174:H21) y otra a partir de la picadora (OR:H19).

Durante la etapa de verificación se observó la presencia simultánea de diferentes cepas de STEC no-O157 en un mismo local. Por ejemplo, en la carnicería 44 se aislaron cuatro cepas diferentes, una a partir de la carne (O174:H28), dos a partir de la mesada (O8:H19 y ONT:H49) y una a partir de la picadora (ONT:H19). En la carnicería 61 se aisló un mismo clon a partir de la mesada y cuchilla (O178:H19), otro clon de la mesada y picadora (O171:H14), y una cepa no relacionada se aisló a partir de la carne (O178:H19). Como se mencionó

anteriormente, esto puede deberse a contaminaciones de distintos orígenes (frigorífico, transporte, manipuladador, vectores).

Con respecto a los serotipos de STEC no-O157 observados en los aislamientos de la carne y de las muestras ambientales en la etapa de verificación, 15 (37,1%) correspondieron a los serotipos O26:H11, O91:H21, O113:H21, O174:[H28, 21] y ONT:[H7, 49, NT]. Estos serotipos fueron reportados en casos de enfermedad en nuestro país. Aunque en la etapa de verificación (2013) se demostró una disminución del 20,0% en el número de cepas correspondientes a los serotipos asociados a enfermedad en Argentina. Su presencia en las carnicerías pone de manifiesto deficiencias en la sanitización de los locales y representa un problema potencial para salud pública. Sin embargo, durante el período en que se llevó a cabo la verificación, no se registraron casos de SUH en la ciudad de Berisso.

Durante ambos períodos de muestreo se aislaron 79 cepas de STEC no-O157, de las cuales 15 (19,0%) pertenecieron a seis serotipos descritos en el esquema de seropatotipos propuesto por Karmali y col. (2003). Una cepa aislada de la carne correspondió al seropatotipo B (O26:H11). Cinco cepas pertenecieron al seropatotipo C, tres de carne (O91:H21, O113:H21) y dos de ambiente (O91:H21, O113:H21). Una cepa aislada de la carne correspondió al seropatotipo D (O174:H8). Ocho cepas pertenecieron al seropatotipo E, cuatro de carne (O8:H19 y O163:NM) y cuatro de ambiente (O8:H19). Según el Sistema de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación, en el período 2004-2010 los serotipos O26:[H2, 11, NT], O91:[H21, NM, NT], O8:[H16, 19] y O113:[H4, 19, 21] fueron reportados en el 1,4%, 0,4%, 0,4% y 0,3% de los casos de enfermedad por STEC no-O157:H7 en Argentina. En este

contexto, el 16,4% de los aislamientos de STEC no-O157 aislados de las carnicerías de Berisso podría ser considerado potencialmente patógeno.

Los serotipos O174:[H21, H28, H-] no se encuentran clasificados en el esquema de Karmali y col. (2003). Sin embargo, en el período 2004-2010 en Argentina el 1,0% de los aislamientos de STEC no-O157 asociados a enfermedad fue causado por el serogrupo O174. En este trabajo de tesis, los serotipos O174:[H-, H8, H21, H28] representaron el 16,5% los aislamientos de STEC no-O157. Aunque, como se mencionó previamente, durante el período 2010-2013 no se registraron casos de enfermedad severa causados por STEC en Berisso.

El serotipo O178:H19 fue asociado con casos esporádicos de enfermedad en Alemania, Brasil, Bélgica y Argentina (Bielaszewska y col., 2006; De Toni y col., 2006; Giugno y col., 2007; Werber y col., 2008; Buvens y col., 2010). En nuestro trabajo se identificaron ocho (10,1%) cepas correspondientes a este serotipo, cinco (6,3%) durante la primera etapa de muestreo y tres (3,8%) durante la etapa verificación. Este serotipo es de alta prevalencia en el ganado bovino en América del Sur y Europa, y además ha sido reportado en mascotas (Aidar-Ugrinovich y col., 2007; Bentancor y col., 2012; Blanco y col., 2004; Cergole-Novella y col., 2007; Fernandez y col., 2010; Fernandez y col., 2013; Krüger y col., 2011; Masana y col., 2011; Oliveira y col., 2008; Tanaro y col., 2012). El origen de la contaminación de la carne de las carnicerías de Berisso podría deberse a contaminación de las medias reses con materia fecal, debido malas prácticas en el frigorífico durante el eviscerado. Asimismo, se debe considerar que en las carnicerías se observó la presencia de mascotas que podrían ser otra posible fuente de contaminación con STEC O178:H19 (Rumi y col., 2012).

Con excepción de once serotipos (O181:H49, O41:H14, O109:H25, O89:H19, O21:H21, O130:H21, O49:H49, O44:NT, O64:H20, O116:H49, O171:H14), todos los aislados de las carnicerías han sido recuperados a partir de carne bovina molida, carne destinada a la elaboración de carne bovina molida, y en carcasas bovina en frigorífico por otros autores en todo el mundo (Barlow y col., 2006; Bosilevac y col., 2007; Bosilevac y Koohmaraie 2011; Hussein, 2007; Llorente y col., 2014; Masana y col., 2011; Rivas y col., 2011). El serotipo O 181:H49 fue aislado de materia fecal bovina, de lechuga y de espinaca (García-Aljaro y col., 2005; Hornitzky y col., 2005; Feng, 2014), el O41:H14 de carne ovina (Bennett y Bettelheim, 2002), el O109:H25 de queso de pasta dura sin pasteurizar y de pacientes enfermos (Beutin y col., 2004; Vernozy-Rozand y col., 2005), el O 89:H19 de materia fecal bovina y una suina (García-Aljaro y col., 2005; Tseng y col., 2014), y el O21:H21 de materia fecal de ciervos (Stüber y col., 2012) y de 1 niño con diarrea (Franzolin y col., 2005). Los serotipos O130:H21, O49:H49, O44:ONT, O64:H20, O116:H49, O171:H14 nunca antes habían sido reportados.

Durante la etapa de verificación se aisló la única cepa O26:H11. Esta cepa fue genótipicamente *stx/eae/efa/toxB*, corroborando la estrecha asociación entre los genes *efa* y *toxB* y cepas intimina-positivas (Toma y col., 2004; Tatarczak y col., 2005; Cergole-Novella y col., 2007). La cepa O109:H25 también fue positiva al gen *eae*, resultado coincidente con aislamientos humanos descritos por Beutin y col. (2004). Varios autores describieron la producción de las toxinas CDT-V y SubAB y propusieron su posible rol en la patogénesis de las infecciones causadas por STEC (Bielaszewska y col., 2004; Talbot y col., 2005). En este estudio el 8,9% y el 64,5% de las cepas de STEC no-O157 presentaron los genes *cdt-V* y *subAB*,

respectivamente. Todas las cepas que presentaron simultáneamente ambos genes pertenecieron a serotipos asociados a enfermedad humana (O91:H21, O113:H21, O116:H21), por lo que su relevancia clínica debería ser considerada en los sistemas de vigilancia de salud pública.

Según EFSA (2013), no existe una combinación única de marcadores que defina a las cepas de STEC patógenas. Sin embargo, cepas *stx₂/eae* y *stx₂/aaiC/aggR* fueron asociadas con un riesgo potencial de causar enfermedad grave más alto que otras combinaciones de genes de virulencia (EFSA, 2013). De los 79 aislamientos solo la cepa O109:H25 presentó la combinación *stx₂/eae*, y todas fueron *aaiC* y *aggR* negativas. La propuesta impulsada por provincia de Buenos Aires incorpora la búsqueda de algunos serotipos de STEC no-O157 *eae* positivos en la carne. Solo las cepas de STEC O157:H7 (N=25) y O26:H11 (N=1) aisladas en nuestro trabajo entrarían en el rango de búsqueda del CAA al incorporar esta propuesta. El 97,6% (77/79) de las cepas de STEC no-O157 aisladas en las carnicerías, fueron *eae* negativas y correspondieron a 24 serotipos. El hallazgo de estas cepas en la carne picada no sería un impedimento para su comercialización, incluso luego de la incorporación de la propuesta de provincia de Buenos Aires.

Actualmente, la información disponible acerca de los marcadores de virulencia asociados a enfermedad por STEC no es concluyente. Es necesario continuar trabajando bajo el concepto holístico de “una sola salud” para obtener una idea precisa sobre las cepas de STEC no-O157 que afectan a la población, su prevalencia en la carne y la relación epidemiológica entre los pacientes y el alimento.

Se considera peligro a cualquier agente biológico, químico o físico o propiedad de un alimento que puede tener efectos adversos sobre la salud, y deben

ser definidos en primera instancia cuando se trata de hacer una evaluación de riesgos (Reglamento CE 178/2002). Para ello es necesario contar con la información acerca de las enfermedades que afectan a la población. El riesgo es función de la probabilidad de un efecto adverso y de la magnitud de ese efecto, como consecuencia de la presencia de un peligro (Reglamento CE 178/2002). La vigilancia epidemiológica que realizan las autoridades de salud establece una relación entre los casos de enfermedad y su origen, por lo tanto es clave para determinar los factores de riesgo de las ETA. Es insuficiente determinar la patogenicidad de una cepa de STEC no-O157 restringiendo el análisis al serotipo y a la clasificación de Karmali y col. (2003). Los problemas asociados a la serotipificación, como la necesidad permanente de contar con antisueros y la existencia de cepas que no reaccionan con los sueros disponibles, dificultan la aplicación de este esquema. Si bien fueron identificados los factores de virulencia asociados a cepas patógenas, no es posible predecir la aparición de nuevas cepas con mayor potencial virulento por transferencia de genes entre diferentes categorías de *E. coli*. Es necesario consolidar la vigilancia epidemiológica basada en análisis moleculares. Esto permitiría conocer los genes de virulencia y su implicancia clínica, y clasificar más eficientemente a las STEC de acuerdo al riesgo. Es necesario realizar revisiones periódicas de la nueva información epidemiológica y verificar que los análisis de STEC no-O157 en alimentos son apropiados para identificar las cepas que afectan a la población.

De acuerdo con el CAA, la carne bovina molida debe cumplir con el criterio microbiológico que establece la ausencia de *E. coli* O157:H7 en 5 muestras de 65 g cada una (CAA Art. 255). En este trabajo además se determinó la presencia de

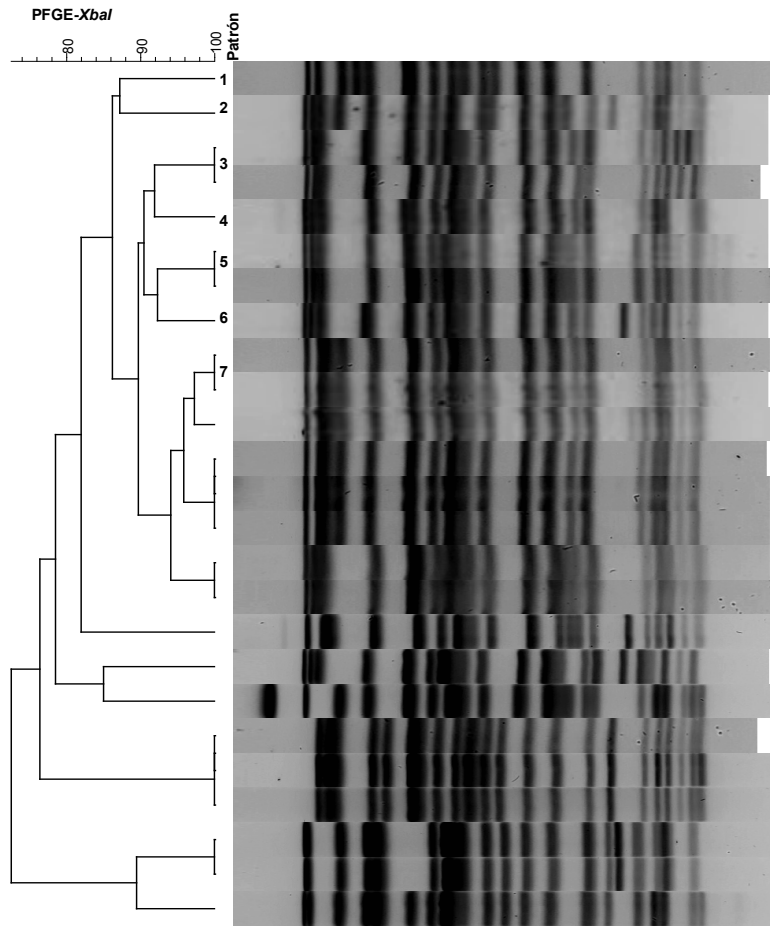
STEC no-O157 de todos los serotipos en la carne y en el ambiente de las carnicerías. Sin embargo, consideramos que establecer como criterio microbiológico la tolerancia cero para todos los serotipos STEC no-O157 en carne bovina molida sería una medida excesiva. En primer lugar es necesario demostrar el peligro que representan las STEC no-O157 de cualquier serotipo y perfil de virulencia para la población. Aunque existe un amplio grupo de cepas de STEC no-O157 altamente patógenas, muchas de estas nunca han sido asociadas a enfermedad. De acuerdo con el CODEX *Alimentarius*, para poder establecer un criterio microbiológico que tiene existir una necesidad concreta. Esta necesidad debe demostrarse con datos epidemiológicos que indiquen que cierto alimento puede representar un peligro para la salud humana y que establecer dicho criterio resulta significativo para proteger a los consumidores, o como resultado de una evaluación de riesgos (CODEX, 1997). Según el CODEX *Alimentarius*, el criterio debe poder conseguirse técnicamente aplicando buenas prácticas de manufactura, motivo por el cual los límites del criterio deberán basarse en datos microbiológicos obtenidos de establecimientos que trabajen con BPH y HACCP. Estudios realizados en frigoríficos exportadores que trabajan bajo un programa de HACCP reportaron la presencia de STEC no-O157 en carcasas (Masana y col., 2011). Las dificultades del aislamiento de STEC no-O157 son otro punto importante, ya que para poder realizar la verificación del cumplimiento del criterio es necesario contar con una metodología fiable. De acuerdo con el CODEX *Alimentarius*, podrán utilizarse solo aquellos métodos microbiológicos cuya fiabilidad se haya establecido estadísticamente en el laboratorio, teniendo preferencia por los métodos de referencia elaborados por organismos internacionales, y que además deben ser razonables en lo que atañe a la

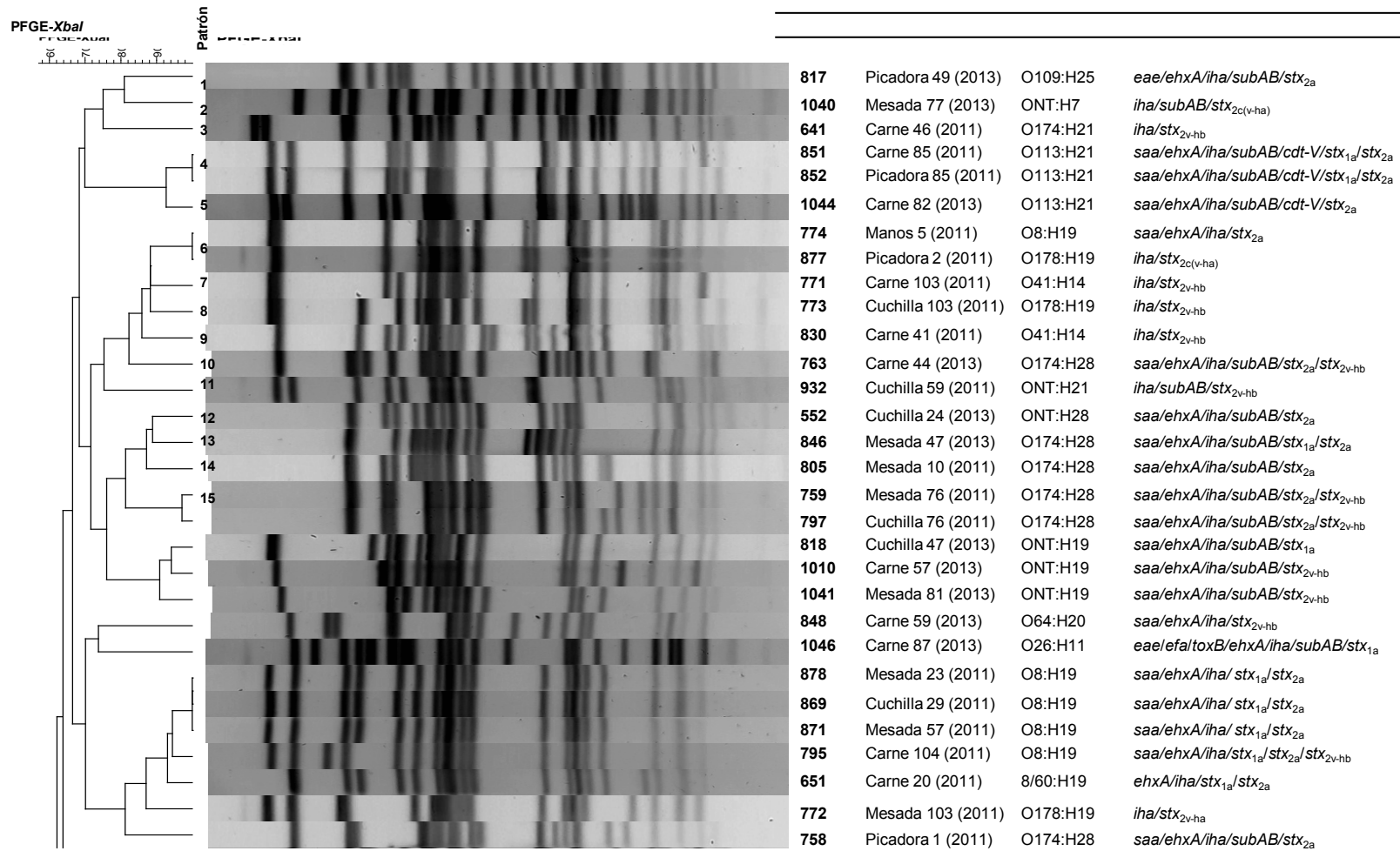
complejidad, disponibilidad de medios, equipos, facilidad de interpretación, tiempo requerido y costos (CODEX, 1997). En 2015, la CONAL aprobó la inclusión en los criterios microbiológicos de los Artículos 156tris, 255, 302 y 925quater los serogrupos O145, O121, O26, O111 y O103, debido a que además de ser los serogrupos más prevalentes en salud pública existen diferentes alternativas técnicas validadas para su confirmación.

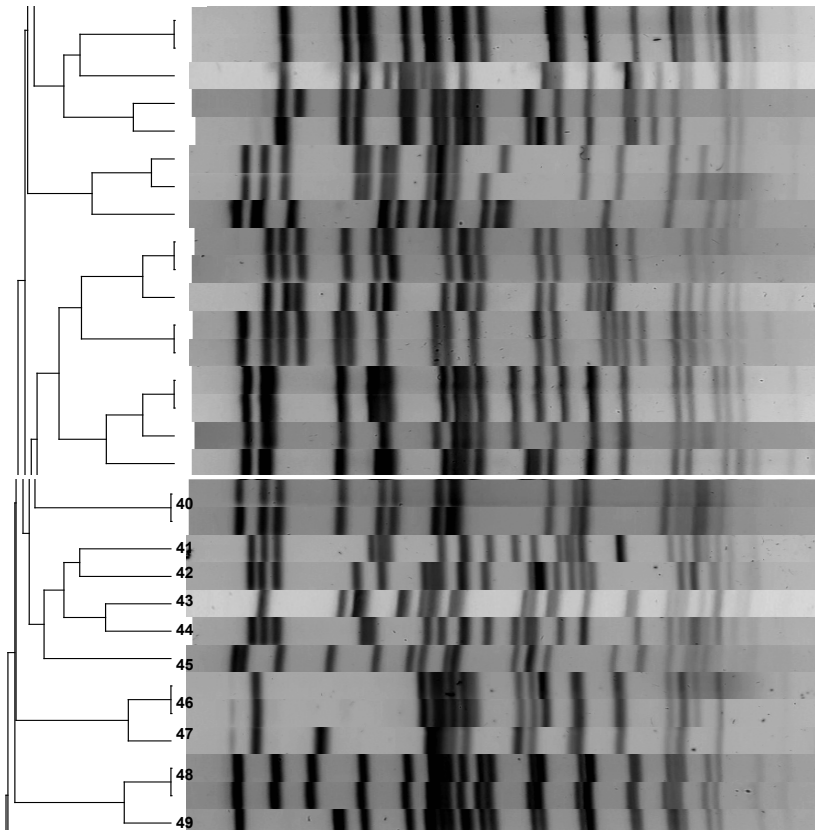
4. CONCLUSIONES PARCIALES

En una primera etapa se realizó un trabajo descriptivo, cuantificando el riesgo y determinado la prevalencia de STEC en 110 carnicerías de la ciudad de Berisso. Para la detección y el aislamiento de STEC no-O157 se utilizó el protocolo de enriquecimiento y aislamiento validado en el Capítulo I, y las PCR desarrolladas y validadas en el Capítulo II. Se diseñaron e implementaron capacitaciones para los manipuladores y estrategias de mejora en las carnicerías, y se informó a la comunidad sobre la prevención de las ETA. La verificación del éxito de las capacitaciones y mejoras implementadas se realizó a través de la cuantificación del riesgo y del análisis microbiológico, utilizando metodologías desarrolladas y validadas en Argentina. La aplicación de capacitaciones para manipuladores y mejoras en los locales, diseñadas estratégicamente con base en un análisis descriptivo inicial, fueron fundamentales para mejorar la calidad de la carne a nivel de boca de expendio. Se demostró una disminución significativa en la portación de STEC O157:H7 en las muestras de carne y de ambiente de las carnicerías. Se encontraron cepas de STEC no-O157 correspondientes a serotipos reportados en casos de enfermedad en nuestro país, pero la proporción de estas fue menor en la etapa de verificación y no se registraron casos de SUH en el período 2010-2013 en Berisso.

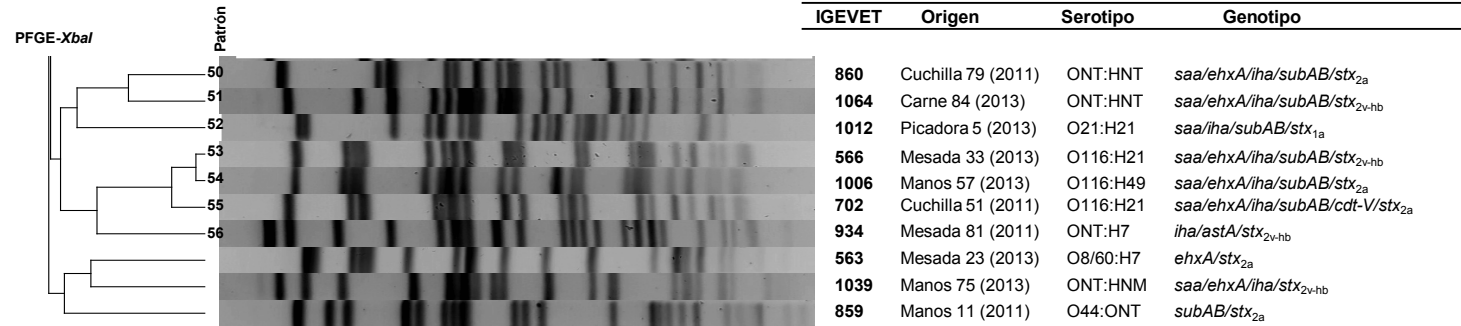
Figura 4. Origen de aislamiento, serotipo, genotipo y dendograma de relación genética de 16 patrone







IGEVET	Origen	Serotipo	Genotipo
1009	Mesada 61 (2013)	O171:H14	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>
1008	Picadora 61 (2013)	O171:H14	<i>saa/iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>
727	Picadora 32 (2011)	O178:H19	<i>iha/stx_{2c(v-ha)}</i>
796	Mesada 104 (2011)	O49:H49	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2a}</i>
786	Mesada 44 (2013)	ONT:H49	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2a}</i>
1033	Carne 70 (2013)	O91:H21	<i>saa/ehxA/iha/subAB/cdt-V/stx_{2a}</i>
1036	Picadora 70 (2013)	O91:H21	<i>saa/ehxA/iha/subAB/cdt-V/stx_{2a}</i>
861	Picadora 29 (2011)	ONT:H18	<i>saa/ehxA/stx_{1a}/stx_{2a}</i>
636	Mesada 27 (2011)	O79:H19	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2a}/stx_{2v-hb}</i>
681	Picadora 63 (2011)	O79:H19	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>
1043	Picadora 74 (2013)	OR:H19	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2a}</i>
731	Carne 102 (2011)	O181:H49	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2a}/stx_{2v-hb}</i>
730	Mesada 102 (2011)	O181:H49	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2a}/stx_{2v-hb}</i>
1013	Mesada 61 (2013)	O178:H19	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2a}</i>
1007	Cuchilla 61 (2013)	O178:H19	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2a}</i>
671	Carne 20 (2011)	ONT:H19	<i>saa/ehxA/iha/stx_{1a}/stx_{2a}</i>
1015	Carne 61 (2013)	O178:H19	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2a}</i>
650	Carne 20 (2011)	O8:H19	<i>ehxA/stx_{2a}</i>
652	Carne 88 (2011)	O8/60:H19	<i>ehxA/stx_{2a}</i>
536	Mesada 24 (2013)	O130:H11	<i>iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2a}</i>
729	Carne 36 (2013)	ONT:H28	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2a}</i>
740	Carne 100 (2011)	O178:H19	<i>iha/stx_{2v-hb}</i>
589	Cuchilla 62 (2011)	O130:H21	<i>saa/ehxA/iha/subAB/cdt-V/stx_{2a}</i>
637	Carne 95 (2011)	O174:H8	<i>iha/stx_{1a}/stx_{1c}</i>
819	Carne 49 (2013)	ONT:H49	<i>saa/ehxA/iha/stx_{2v-hb}</i>
883	Carne 49 (2013)	O141:H49	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>
1005	Mesada 63 (2013)	O141:H49	<i>saa/ehxA/iha/subAB/stx_{1a}/stx_{2v-hb}</i>
933	Carne 81 (2011)	ONT:H7	<i>iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>
940	Mesada 82 (2011)	ONT:H7	<i>iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>
909	Picadora 59 (2011)	ONT:H7	<i>iha/subAB/stx_{2v-hb}</i>



CONCLUSIONES FINALES

- Se evaluaron experimentalmente diferentes protocolos de enriquecimiento y aislamiento, obteniendo la mayor sensibilidad los protocolos de enriquecimiento con CTSm-8 y ECm, seguidos por el aislamiento en agar MC.
- Se desarrollaron y validaron tres técnicas de PCR para la detección de genes *stx*, obteniendo un límite de detección de 1×10^2 UFC mL⁻¹ y 100% de inclusividad y exclusividad, con muestras artificialmente contaminadas
- Se utilizó el protocolo de enriquecimiento-aislamiento validado en el Capítulo I, y las PCR desarrolladas y validadas en el Capítulo II para el análisis de muestras de carne y de ambiente en carnicerías.
- Se determinó la presencia de STEC O157 y no-O157 en carne bovina molida y muestras ambientales de boca de expendio minorista de la ciudad de Berisso, en el marco de un programa tendiente a mejorar la calidad de la carne bovina molida.
- Se realizó por primera vez en Argentina un programa piloto que incluyó el diseño estratégico y la aplicación de capacitaciones para manipuladores y mejoras en carnicerías, con base en cuantificación de riesgo y resultados analíticos. El éxito de las mejoras implementadas fue verificado utilizando metodologías desarrolladas y validadas en Argentina.
- Se demostró una disminución significativa en la portación de STEC O157:H7 en las muestras de carne y de ambiente de las carnicerías.

- Luego de implementar las acciones de mejora fue posible demostrar una disminución en la proporción de muestras contaminadas con serotipos de STEC no-O157 reportados en casos de enfermedad en nuestro país.
- No fue posible establecer un vínculo epidemiológico entre los aislamientos de STEC obtenidos en las carnicerías y casos de enfermedad severa en Berisso, debido a que no se registraron casos de SUH en el período de trabajo.

ANEXO

1- Protocolo de extracción de ADN utilizado a partir de caldo de cultivo

Para la extracción de ADN de la muestra a partir de caldo de cultivo, una alícuota de 1 ml se coloca en un tubo tipo eppendorf previamente identificado. Cada tubo se centrifuga a 10000 rpm durante 5 minutos y luego se desecha el sobrenadante. El sedimento celular se resuspende en 150 µl de buffer Tritón X-100 (USB Corporation, Ohio, EEUU) al 1% en buffer TE 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)]. Luego la mezcla se lleva a 100°C, durante 15 minutos. Posteriormente se centrifuga nuevamente a 10000 rpm durante 5 minutos para sedimentar los restos celulares (Leotta y col., 2005). De esta manera se obtiene un pellet correspondiente al debris bacteriano y un sobrenadante con el ADN. Este extracto de ADN se utiliza como molde en la reacción de PCR.

2- Protocolo de extracción de ADN utilizado a partir de placa

Se toma con ansa en punta material bacteriano del agar de cultivo (colonia aislada o crecimiento confluyente) y se coloca en un tubo tipo eppendorf previamente identificado, con 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X [10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)]. La mezcla se lleva a 100°C durante 15 minutos. Posteriormente, el tubo se centrifuga nuevamente a 10000 rpm durante 5 minutos para sedimentar los restos celulares (Leotta y col., 2005). De esta manera se obtiene un pellet correspondiente al debris bacteriano y un sobrenadante con el ADN. Este extracto de ADN se utiliza como molde en la reacción de PCR.

3- Condiciones de corrida de la PCR y adquisición de imágenes

Se agregó al ADN amplificado una solución de xilene cianol 0,25% y glicerol 30% en agua, a razón de 1:5 (solución: ADN), sembrándose 10 µl en un gel de agarosa (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) a la concentración recomendada por cada autor en buffer TAE 1X [40 mM tris-acético; 1mM EDTA (pH 8,0)] y adicionado con 0,5 g de bromuro de etidio/ml (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.). Para la corrida electroforética se utilizó una fuente de poder PowerPac (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Para documentar los geles se utilizó un transiluminador modelo 2000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) y el sistema Olympus C-5060, 5,1 MP (Olympus, Japón). El análisis de los geles se realizó con el programa DIGI Doc-It versión 2.4.0 (UVP, Upland, CA, EE.UU.).

4- Planilla para la cuantificación del riesgo

A.- IDENTIFICACIÓN: (Completar con letra clara)

1.- Razón Social:

2.- Establecimiento (Ubicación y Habilitación):

3.- Rubro:

4.- Establecimiento proveedor:

B – EVALUACION: Marcar para cada ítem analizado, en el casillero de “Clasificación”, SI, NO o No Aplicable (N.A) según corresponda que cumpla o no con lo detallada o bien, no corresponda para la actividad auditada.

B.1.- DESCRIPCIÓN

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	N.A
1	SITUACIÓN Y CONDICIONES DE LA EDIFICACIÓN			
1.1	Ausencia de basura, objetos en desuso, animales, insectos y roedores, en el área interna y en los alrededores.	4	0	4
1.2	Pisos adecuados: 1.2.1 No hay deterioro, se han efectuado las reparaciones necesarias, no hay grietas ni agujeros.	1	0	1
	1.2.2. Se encuentra en condiciones de limpieza (sin restos de comida, no resbaladizos, sin suciedad)	1	0	1
1.3	Cielo rasos y techos: 1.3.1. Sin, grietas, pintura descascarada, etc. (se realizaron las recomendaciones efectuadas),	1	0	1
	1.3.2. Sin suciedad, telas de araña, etc.	1	0	1
1.4	Paredes y divisorias: 1.4.1. Permanece el acabado liso, azulejado completo sin faltantes, no hay rajaduras ni grietas. (Se realizaron las recomendaciones efectuadas)	1	0	1
	1.4.2. Se encuentran limpias, sin suciedad, materia grasa adherida, manchas, etc	1	0	1
1.5	Puertas y ventanas: 1.5.1. Se encuentran en buen estado de conservación	1	0	1
1.6	Protección contra insectos y roedores: En todas las aberturas telas mosquiteras, cortinas o puertas con cierre a resorte u otro método indicado por la DIV	4	0	4
1.7	Iluminación: La adecuada según el sector, con protección y de acuerdo a las indicaciones de la DIV	1	0	1
1.8	Ventilación: Ambiente y temperatura adecuada, no hay olores desagradables.	1	0	1
1.9	Instalaciones sanitarias: 1.9.1.- Se ajustan a normas del CAA en cuanto a instalaciones. Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV	2	0	2

	1.9.2.- Limpieza y desinfección adecuada. Hay elementos de higiene personal adecuados. Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV	4	0	4
1.10	Vestuarios: 1.10.1.- Se ajustan a normas del CAA en cuanto a instalaciones y ubicación. Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV	1	0	1
	1.10.2.- Limpieza y desinfección adecuada. Hay armarios en cantidad y otros elementos adecuados. Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV	2	0	2
1.11	Lavatorios en el área de manipulación: 1.11.1.- En cantidad, ubicación y condiciones de instalación adecuadas. Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV.	2	0	2
	1.11.2.- Posee los elementos de higiene personal adecuados y se encuentra en buen estado de limpieza.	4	0	4
1.12.	Abastecimiento de agua potable.	8	0	8
1.13	Tanque de agua: 1.13.1.- Volumen y presión adecuada. Posee tapa. Libre de pérdidas y filtraciones	4	0	4
	1.13.2.- En buen estado de limpieza y desinfección cada 6 meses y documentado	8	0	8
1.14	Destino adecuado de los residuos 1.14.1.- Basura en el interior del establecimiento en recipientes con bolsa y tapa. Restos almacenados adecuadamente para su recolección posterior.	4	0	4
	1.14.2.- Residuos líquidos adecuadamente tratados y arrojados sin molestar ni dañar al ambiente	2	0	2
1.15	Sector de lavado de equipos y herramientas: Dotados con agua caliente y productos adecuados y que no contamina áreas de procesamiento de alimentos	2	0	2
<p>CB1= Calificación del Bloque 1; TS1= Total de las calificaciones "SI" obtenidas; TNA= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas; K1= 60 (Constante del Bloque 1); I 1= 10 Importancia del Bloque 1.</p> <p>Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS1 y TNA 1</p> $CB1 = (TS1 \times 10) / (60 - TNA1)$				

B.2.- EQUIPOS Y HERRAMIENTAS:

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	NA
2	EQUIPOS Y MAQUINARIA ADECUADOS (ARTEFACTOS)			
2.1	2.1.1.- Se mantiene el estado de conservación y funcionamiento de artefactos, utensilios y demás elementos.	2	0	2
	2.1.2.- Se encuentran limpios, sin suciedad, sin restos de alimentos u otras materias.	4	0	4
2.2.	Utensilios			
	2.2.1.- Se encuentran en buen estado de conservación y en cantidad suficiente.	2	0	2
	2.2.2.- Se encuentran limpios	4	0	4

2.3	Mobiliario			
	2.3.1.- En Cantidad suficiente, ajustado a normativa y en buen estado de conservación. (Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV)	2	0	2
	2.3.2.- En buen estado de limpieza	4	0	4
2.4	Equipos de refrigeración – congelación	8	0	8
	2.4.1.- En Cantidad suficiente, ajustado a normativa y en buen estado de conservación. Con termómetro - (Se realizaron las recomendaciones efectuadas por la DIV)			
	2.4.2.- En buenas condiciones de higiene	8	0	8
2.5	Limpieza y desinfección adecuadas Utiliza detergentes y desinfectantes aprobados	8	0	8
2.6	Colocación de herramientas y equipos en lugar apropiado, en forma ordenada y protegidos de la contaminación	8	0	8
<p>CB2= Calificación del Bloque 2; TS2= Total de las calificaciones “SI” obtenidas; TNA= Total de las calificaciones “No aplicable” obtenidas; K2= 50 (Constante del Bloque 2); I 2= 15 Importancia del Bloque 2. Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS2 y TNA 2. $CB1 = (TS2 \times 15) / (50 - TNA2)$</p>				

B.3.- PERSONAL:

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	NA
3	PERSONAL EN EL AREA DE PRODUCCIÓN/ MANIPULACIÓN/ VENTA			
3.1	Indumentaria	2	0	2
	3.1.1.- Ajustada a normativa y a las indicaciones de la DIV			
	3.1.2.- Limpia y adecuadamente conservada	8	0	8
3.2	Aseo personal: Se evidencia cumplimiento de normas y de indicaciones de la DIV	8	0	8
3.3	Hábitos personales: Adecuados y ajustados a las indicaciones de la DIV	4	0	4
3.4	Estado de salud: Libretas Sanitarias, ausencia de evidencia de enfermedades	10	0	10
<p>CB3= Calificación del Bloque 3; TS3= Total de las calificaciones “SI” obtenidas; TNA= Total de las calificaciones “No aplicable” obtenidas; K3= 32 (Constante del Bloque 3); I 1= 25 Importancia del Bloque 3. Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS3 y TNA3 $CB1 = (TS3 \times 25) / (32 - TNA3)$</p>				

B.4. MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS A LA VENTA:

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	NA
4	CONTROL			
4.1.	Se controla la recepción de la materia prima de acuerdo a las GMP y recomendaciones de la DIV (Envases, rótulos, procedencia, facturas, certificados)	4	0	4
4.2	Se controla la organolepsia y temperatura de las materias primas y productos terminados	8	0	8
4.3	Las materias primas y productos se conservan adecuadamente en refrigeradores, freezers, cámaras o	6	0	6

	depósitos de secos, evitando alteraciones. PEPS adecuado			
4.4	Embalaje, etiquetado e identificación ajustada a norma y a indicaciones de la DIV	6	0	6
<p>CB4= Calificación del Bloque 4; TS4= Total de las calificaciones "SI" obtenidas; TNA= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas; K4= 24 (Constante del Bloque 4); I 4= 20 Importancia del Bloque 4.</p> <p>Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS4 y TNA 4</p> $CB1 = (TS4 \times 20) / (24 - TNA4)$				

B.5. FLUJOS:

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	NA
5	FLUJO DE PRODUCCIÓN/MANIPULACIÓN/VENTA Y CONTROL			
5.1.	El flujo es lineal de un solo sentido, evitando la contaminación cruzada. Lugares de preparación previa (área sucia) aislados (la separación física es adecuada.	4	0	4
5.2	La manipulación de productos es mínima e higiénica y se previene la contaminación cruzada	8	0	8
5.3	Los alimentos están protegidos contra la contaminación (polvo, insectos, roedores)	4	0	4
5.4	Las sustancias químicas, tóxicas y peligrosas son almacenadas evitando la contaminación.	4	0	4
5.5	Almacenamiento	8	0	8
	5.5.1.- Alimentos perecederos a temperatura de congelación (-18 – 15°C), refrigerados a 0 – +7°C o por encima de los 65°C de acuerdo al producto			
	5.5.2.- Alimentos almacenados separados por tipo o grupos, sobre tarimas, plataformas o estantes, en lugar limpio y conservado.	4	0	4
5.6	Las sobras de alimentos se eliminan en forma inmediata	4	0	4
5.7	Características organolépticas del producto final, al servicio o venta adecuadas	4	0	4
5.8	Envoltura, identificación o empaque del producto terminado o a servir adecuado	2	0	2
5.9	Manejo de plagas – control tercerizado, documentado. Se siguen indicaciones de la DIV	4	0	4
5.10	El personal está calificado para realizar las tareas. Tiene curso aprobado	4	0	4
5.11	Transporte de los productos terminados hacia bocas de expendio, sector de servicio o venta es adecuado y se siguen las recomendaciones de la DIV	3	0	3
<p>CB5= Calificación del Bloque 5; TS5= Total de las calificaciones "SI" obtenidas; TNA= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas; K5= 53 (Constante del Bloque 5); I 5= 30 Importancia del Bloque 5.</p> <p>Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS5 y TNA 5.</p> $CB1 = (TS5 \times 30) / (53 - TNA5)$				

C.- CALIFICACIÓN: Concluida la Auditoria se sumarán todos los ítems, recordando que de 0 a 40 es de Riesgo Alto, de 41 a 70 es de Riesgo Moderado y más de 71 es de Riesgo Bajo.

$CB1+ CB2+ CB3+ CB4+ CB5 =$

D.- CONCLUSIONES: Se completarán los ítems según corresponda, con letra bien legible.

Calificación:

Igual / Mejor / Peor que la calificación anterior

Toma de muestras

SI Acta/s nº Producto/s muestreado/s:.....

Actas de Infracción nºMotivos.....

Actas de Intervención nº.....Motivos.....

Decomisos SI – NO, Actas nº Motivos.....

Cédulas de Notificación SI - NO, Motivos:

Está en condiciones de implementar SSOP – MIP? SI - NO

Está en condiciones de implementar GMP? SI - NO

E.- OTRAS OBSERVACIONES: Se colocarán en forma manuscrita y bien legible las observaciones que el funcionario considere pertinentes efectuar, además de las dispuestas en el Listado de Chequeo Rápido.

5- Modelo de Informe



LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

La Plata, 1 de Junio de 2013

Remitente:

Establecimiento:

Dirección:

Fecha toma de muestras:

Muestras: carne picada, esponjados de manos, picadora, cuchillo y mesada

Fecha inicio análisis:

Fecha fin análisis:

Determinaciones realizadas:

Recuento de mesófilos, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, *Escherichia coli* beta glucuronidasa positiva.

Detección de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* productor de toxina Shiga y *Listeria monocytogenes*

CARNE PICADA

Recuento de mesófilos: **5,0 x 10⁶ UFC/g**

Staphylococcus aureus coagulasa positiva: **<10 UFC/g**

Escherichia coli beta glucuronidasa positiva: **2,9 x 10³ UFC/g**

Detección de patógenos a partir de carne picada, manos, picadora, cuchillo y mesada

	carne	manos	picadora	cuchillo	mesada
<i>Salmonella</i> spp.	positivo	negativo	positivo	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Listeria monocytogenes</i>	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo

(-): determinación no realizada

RESULTADO según Código Alimentario Argentino:

CARNE PICADA NO APTA PARA CONSUMO

NO CUMPLE CON LAS MEDIDAS HIGIENICO SANITARIAS

RESULTADO CUANTIFICACIÓN DEL RIESGO:

CONSULTAS TELÉFONO XXXXXXXX (Municipalidad de Berisso)

Los resultados consignados en el presente informe se refieren exclusivamente a las determinaciones bacteriológicas de la muestra analizada

El Laboratorio no se responsabiliza del uso indebido del presente informe, el cual puede ser reproducido parcial o totalmente sólo con autorización escrita del Laboratorio de Microbiología de Alimentos FCV-UNLP

6- Calcomanía “Carnicerías Saludables”



Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos cebadores y sondas y condiciones de ciclado para las PCR realizadas en este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Fluoróforo	Blanco	Programa Amplificación	[μ M]	Tamaño Amplificación (pb)	Referencia
MK1	TTTACGATAGACTTCTCGAC						
MK2	CACATATAAATTATTTTCGCTC		<i>stx</i>	94°C, 5 min;	1	224-227	Karch y Meyer, 1989
CIAC	TTTACGATAGACTTCTCGACACCCCTCT TGAACATATATCTCAGGGGACACATC GGTGTCTGTTATTAACCACACCCACGG CAGTTATTTTGCTGTGGATATACGAGG GCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTTGA CCATCTTCGTCTGATTATTGAGCGAAAT AATTTATATGTG			94°C, 1 min, 53°C, 1 min, 72°C, 1 min (30 ciclos); 72°C, 2 min		176	Leotta, 2006
stxF-ISO	TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTA CG		<i>stx</i> ₁ y <i>stx</i> ₂		1,25		
stxR-ISO	CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC					131 y 128	
stx1-ISO-P	CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTAT GTAA	FAM	<i>stx</i> ₁	50°C, 2 min;	0,25		
stx2-ISO-P	TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	FAM	<i>stx</i> ₂	95°C, 2 min;			ISO/TS 13136:2012
eaeF-ISO	CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA			95°C, 15 seg, 59°C 1 min (45 ciclos)	0,75	102	
eaeR-ISO	CTCATGCGGAAATAGCCGTTM		<i>eae</i>				
eae-ISO-P	ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAAT ACC	MAXN			0,2		

stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG					
stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	<i>stx</i> ₁	94°C, 5 min;	2	130	
stx2a	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT					
stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	<i>stx</i> ₂	94°C, 30 seg, 58°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (30 ciclos);	0,4	346	Leotta y col., 2005
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG		72°C, 2 min			
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	<i>rfb</i> _{O157}		0,4	259	
SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC		95°C, 5 min;			
SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	<i>eae</i>	95°C, 30 seg, 54°C, 1 min, 72°C, 2 min (30 ciclos); 72°C, 2 min	0,4	864	Karch y col., 1993
hlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG		94°C, 5 min;			
hlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA	<i>ehxA</i>	94°C, 30 seg, 58°C, 90 seg, 72°C, 90 seg (30 ciclos); 72°C, 3 min	0,4	1.551	Schmidt y col., 1995
fliCH7-F	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC		94°C, 1 min;			
fliCH7-R	CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	<i>fliC</i> _{H7}	94°C, 15 seg, 60°C, 15 seg, 72°C, 75 seg (35 ciclos); 72°C, 5 min	0,2	625	Gannon y col., 1997
aggR FWD	GAATCGTCAGCATCAGCTACA	<i>aggR</i>	95°C, 5 min;	0,05	102	EU Ref. Lab.,

aggR REV	CCTAAAGGATGCCCTGATGA		95°C, 15 seg, 54°C, 15 seg, 72°C, 30 seg (35 ciclos); 72°C, 2 min			2013
aaiC FWD	CATTTACGCTTTTTTCAGGAAT	<i>aaiC</i>	Idem <i>aggR</i>	0,05	160	EU Ref. Lab., 2013
aaiC REV	CCTGATTTAGTTGATTCCCTACG					
SAADF	CGTGATGAACAGGCTATTGC		93°C, 5 min;			
SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	<i>saa</i>	93°C, 1 min, 55°C, 1 min, 72°C, 1 min (25 ciclos); 72°C, 2 min	0,5	119	Toma y col., 2004
iha-I	CAGTTCAGTTTCGCATTCACC	<i>iha</i>	Idem <i>saa</i>	0,5	1.305	Toma y col., 2004
iha-II	GTATGGCTCTGATGCGATG					
toxB.911F	ATACCTACCTGCTCTGGATTGA	<i>toxB</i>	Idem <i>saa</i>	0,5	602	Toma y col., 2004
toxB.1468R	TTCTTACCTGATCTGATGCAGC					
88T14	GAGACTGCCAGAGAAAG	<i>efa1</i>	Idem <i>saa</i>	0,2	479	Toma y col., 2004
88T9	GGTATTGTTGCATGTTTCAG					
lpfA-F	ATGAAGCGTAATATTATAG		94°C, 2 min;			
lpfA-R	TTATTTCTTATATTCGAC	<i>lpfA</i> _{O113}	94°C, 1 min, 52°C, 50 seg, 72°C, 1 min (30 ciclos); 72°C, 2 min	4	573	Toma y col., 2004

east11a	CCATCAACACAGTATATCCGA					
east11b	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT	<i>astA</i>	Idem <i>saa</i>	1	111	Yamamoto y col., 1996
subHCD F	TATGGCTTCCCTCATTGCC		95°C, 2 min;			
subSCD R	TATAGCTGTTGCTTCTGACG	<i>subAB</i>	95°C, 1 min, 65°C, 2 min, 72°C, 1,5 min (10 ciclos); 95°C, 1 min, 60°C, 2 min, 72°C, 1,5 min (25 ciclos)	0,5	556	Paton y col., 2004
cdt-V F	TTCATTGTTGCGCTCCTG					
cdt-V R	TTTATAAGCTGGTATCCTG	<i>cdt-V</i>	Idem <i>ee</i>	0,4	755	Cergole-Novella y col., 2007
stx1a-F1	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT					
stx1a-R2	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	<i>stx_{1a}</i>		0,4	478	
stx1c-F1	CCTTTCTGGTACAACACTGCGGTT		94°C, 3 min;			
stx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA	<i>stx_{1c}</i>	94°C, 50 seg, 64°C, 40 seg, 72°C, 1 min (35 ciclos);		252	Scheutz y col., 2012
stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTAC C		72°C, 3 min	0,2		
stx1d-R2	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	<i>stx_{1d}</i>			203	
VT2-c	AAGAAGATGTTTATGGCGGT		94°C, 5 min;			
VT2-d	CACGAATCAGGTTATGCCTC	<i>stx₂, stx_{2vh-a}, stx_{2vh-b}</i>	94°C, 30 seg, 55°C, 30 seg, 72°C, 30 seg (30 ciclos); 72°C, 2 min	0,6	285	Tyler y col., 1991

VT2v-1	CATTCAGAGTAAAAGTGGCC	<i>stx</i> _{2vh-a} ,	Ídem <i>stx</i> ₂ , <i>stx</i> _{2vha} , <i>stx</i> _{2vhb}	0,6	385	Tyler y col., 1991
VT2v-2	GGGTGCCTCCCGGTGAGTTC	<i>stx</i> _{2vh-b}				

Todas las sondas utilizadas fueron sintetizadas con doble quencher (IABKFQ-ZEN)

Tabla 2. Cepas utilizadas como controles positivos en las PCR

Cepa	Caracterización genotípica	Control de PCR
IGEVET 12	<i>aaiC/aggR</i>	<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>
IGEVET 40	<i>stx₁/stx₂/rfb_{O157}/eae/fliC_{H7}/ihalefa</i>	Múltiple (<i>stx₁</i> , <i>stx₂</i> , <i>rfb_{O157}</i>), MK, PCR SYBR1, PCR SYBR2, RT-PCR, <i>eae</i> , <i>fliC_{H7}</i> , <i>iha</i> y <i>efa</i> , PCR-RFLP variante <i>stx₂</i>
IGEVET 92	<i>exhA</i>	<i>exhA</i>
IGEVET 98	<i>stx_{2vh-b}</i>	PCR-RFLP variante <i>stx₂</i>
IGEVET 1070	<i>lpfA_{O113}/subAB/cdt-V</i>	<i>lpfA_{O113}</i> , <i>subAB</i> y <i>cdt-V</i>
IGEVET 1304	<i>stx_{1a}</i>	Variante <i>stx₁</i>
IGEVET 1305	<i>stx_{1c}</i>	Variante <i>stx₁</i>
IGEVET 1306	<i>stx_{1d}</i>	Variante <i>stx₁</i>
IGEVET 1148	<i>saa</i>	<i>saa</i>
IGEVET 1286	<i>astA</i>	<i>astA</i>
SML 2	<i>toxB</i>	<i>toxB</i>
ATCC 32511	<i>stx_{2vh-a}</i>	PCR-RFLP variante <i>stx₂</i>

Para todas las PCR se utilizó la cepa ATCC 25922 como control negativo y agua calidad biología molecular con control de reactivos

Tabla 3. Cepas utilizadas para la contaminación experimental de carne bovina molida para evaluar medios y condiciones de cultivo para el enriquecimiento y aislamiento de STEC no-O157

Bacteria	Identificación	Origen	Serotipo	Genotipo stx	
<i>E. coli</i>	IGEVET 85	C	O8:H2	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 33	H	O26:H11	+	-
<i>E. coli</i>	IGEVET 59	H	O91:H21	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 67	D	O103:H25	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 86	C	O112:H2	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 36	H	O111HNM	+	-
<i>E. coli</i>	IGEVET 1070	H	O113:H21	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 103	D	O121:H19	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 589	AB	O130:H21	+	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 63	H	O145:HNM	-	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 40	D	O157:H7	+	+
<i>E. coli</i>	IGEVET 727	AB	O178:H19	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	IGEVET 646	AL			
<i>E. coli</i>	IGEVET 26	D			
<i>E. coli</i> enteroagregativa	IGEVET 12	D			
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	IGEVET 14	D			
<i>E. coli</i> enteropatógena	IGEVET 19	D			
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	IGEVET 996	AN			
<i>E. hermanii</i>	IGEVET 393	D			
<i>Edwardsiella tarda</i>	IGEVET 6	AN			
<i>Enterobacter cloacae</i>	IGEVET 983	D			
<i>Morganella morgani</i>	IGEVET 21	D			
<i>Proteus mirabilis</i>	IGEVET 16	D			
<i>Proteus vulgaris</i>	IGEVET 18	D			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IGEVET 362	AG			
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 127	AN	Choleraesuis		
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 253	AL	Enteritidis		
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 256	D	Dublin		
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 384	AN	Typhimurium		
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 388	AN	Newport		
<i>Shigella boydii</i>	IGEVET 993	D			
<i>Shigella dysenteriae</i>	IGEVET 20	D	2		
<i>Shigella flexneri</i>	IGEVET 15	D	1		
<i>Shigella flexneri</i>	IGEVET 392	D			
<i>Staphylococcus aureus</i>	IGEVET 115	D			
<i>Y. enterocolitica</i>	IGEVET 2	D			

H: Humano; D: Desconocido; G: Ganado, AB: Ambiental; AN: Animal; AL: Alimentario, AG: Agua

Tabla 4. Sensibilidad y Valor Predictivo Positivo de las diferentes combinaciones de protocolos para la detección y aislamiento de STEC no-O157

Protocolo	Sensibilidad (%)	IC 95%	VP+	IC 95%
A+1	75	53.28-90.16	100.0	81.32-100.0
A+2	75	53.28-90.16	100.0	81.32-100.0
A+3	83.3	62.60-95.16	100.0	83.01-100.1
B+1	91.6	72.96-98.73	100.0	84.43-100.0
B+2	95.8	78.81-99.30	100.0	85.05-100.0
B+3	91.6	72.96-98.73	100.0	84.43-100.0
C+1	83.3	62.60-95.16	100.0	85.05-100.0
C+2	91.6	72.96-98.73	100.0	84.43-100.0
C+3	91.6	72.96-98.73	100.0	84.43-100.0
D+1	45.8	25.58-67.16	100.0	71.33-100.0
D+2	45.8	25.58-67.16	100.0	71.33-100.0
D+3	37.5	18.84-59.40	100.0	66.21-100.0
A+123	91.6	72.96-98.73	100.0	84.43-100.0
B+123	95.8	78.81-99.30	100.0	85.05-100.0
C+123	95.8	78.81-99.30	100.0	85.05-100.0
D+123	58.3	36.66-77.86	100.0	76.66-100.0

Las letras indican los diferentes protocolos de enriquecimiento: A: ISO/TS 13136:2012; B: USDA MLG 5.03; C: ECm; D: FDA-BAM 2011. Los números indican los diferentes agares selectivos y diferenciales: 1: EMB-L; 2: MC; 3: TBX. VP+: valor predictivo positivo. IC: intervalo de confianza

Tabla 5. Niveles de concordancia entre los diferentes protocolos (E+A versus E+3A) utilizados para el aislamiento de STEC no-O157

Protocolos	Valor P	k	IC 95%
A+1 vs A+123	0.054	0.428	0.009-0.848
A+2 vs A+123	0.054	0.428	0.009-0.848
A+3 vs A+123	<0.05	0.625	0.163-1.00
B+1 vs B+123	0.083	0.647	0.013-1.00
B+2 vs B+123	<0.05	1	1
B+3 vs B+123	0.083	0.647	0.013-1.00
C+1 vs C+123	0.166	0.357	-0.164-0.878
C+2 vs C+123	0.083	0.647	0.013-1.00
C+3 vs C+123	0.083	0.647	0.013-1.00
D+1 vs D+123	<0.001	0.753	0.500-1.00
D+2 vs D+123	<0.001	0.753	0.500-1.00
D+3 vs D+123	<0.01	0.600	0.314-0.885

Las letras indican los diferentes protocolos de enriquecimiento: A: ISO/TS 13136:2012; B: USDA MLG 5.03; C: ECm; D: FDA-BAM 2011. Los números indican los diferentes agares selectivos y diferenciales: 1: EMB-L; 2: MC; 3: TBX. Valor P se refiere al Test exacto de Fisher. K: coeficiente kappa de Cohen. IC: intervalo de confianza.

Tabla 6. Cepas utilizadas para la validación intralaboratorio de PCR-SYBR1, PCR-SYBR2 y PCR-TR

Bacteria	Identificación	Origen	Serotipo	Genotipo <i>stx</i>	LD y R			I	E	EM
					PCR-SYBR1	PCR-SYBR2	PCR-TR			
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1308	D	O8:H2	<i>stx</i> _{2d}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 85	G	O8:H2	<i>stx</i> _{2d}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 650	AL	O8:H19	<i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1311	D	O8:H31	<i>stx</i> _{2g}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 651	AL	O8/O60:H19	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 31	D	O11:HNM	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 47	G	O13:H16	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1012	AB	O21:H21	<i>stx</i> _{1a}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 33	H	O26:H11	<i>stx</i> _{1a}	*			*		*
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 34	G	O26:H11	<i>stx</i> _{1a}	*			*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1304	D	O26:H11	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 771	AL	O41:H14	<i>stx</i> _{2b}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1255	AL	O60:H16	<i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 848	AL	O64:H20	<i>stx</i> _{1b}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 636	AB	O79:H19	<i>stx</i> _{2+2b}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 59	H	O91:H21	<i>stx</i> _{2a} / <i>stx</i> _{2d}				*		*
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1033	AL	O91:H21	<i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1036	AB	O91:H21	<i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1323	AL	O91:H21	<i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 35	H	O103:H2	<i>stx</i> _{1a}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 67	D	O103:H25	<i>stx</i> _{2a}		*		*		*
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 817	AB	O109:H25	<i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 36	H	O111:HNM	<i>stx</i> _{1a}	*			*		*
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 86	G	O112:H2	<i>stx</i> _{2d}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 61	H	O113:H21	<i>stx</i> _{2a}		*		*		*
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 1044	AL	O113:H21	<i>stx</i> _{2only}				*		
<i>E. coli</i>	IGEVEVET 702	AB	O116:H21	<i>stx</i> _{2only}				*		

Bacteria	Identificación	Origen	Serotipo	Genotipo stx	LD y R			I	E	EM
					PCR-SYBR1	PCR-SYBR2	PCR-TR			
<i>E. coli</i>	IGEVET 345	G	EPEC						*	
<i>E. hermannii</i>	IGEVET 393	D							*	
<i>Enterobacter cloacae</i>	IGEVET 983	D							*	
<i>Hafnia alvei</i>	IGEVET 662	AB							*	
<i>Hafnia alvei</i>	IGEVET 663	AB							*	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	IGEVET 390	D							*	
<i>Morganella morganii</i>	IGEVET 752	AB							*	
<i>Proteus mirabilis</i>	IGEVET 16	D							*	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IGEVET 1	D							*	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IGEVET 13	D							*	
<i>Salmonella enterica</i>	IGEVET 8	AL	Meleagridis						*	
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 11	AL	Derby						*	
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 957	AL	Newport						*	
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 1051	AL	Typhimurium						*	
<i>Salmonella entérica</i>	IGEVET 1092	D	Enteritidis						*	
<i>Serratia marcescens</i>	IGEVET 984	D							*	
<i>Shigella</i>	IGEVET 993	D	Boydii						*	
<i>Shigella dysenteriae</i>	IGEVET 20	D	2						*	
<i>Shigella flexneri</i>	IGEVET 15	D	1						*	
<i>Shigella flexneri</i>	IGEVET 17	D							*	
<i>Shigella flexneri</i>	IGEVET 392	D							*	
<i>Staphylococcus aureus</i>	IGEVET 115	D							*	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IGEVET 2	D							*	

H: Humano; D: Desconocido; G: Ganado, AB: Ambiental; AL: Alimentario. LD y R: Limite de Detección y Robustez; I: Inclusividad; E: Exclusividad; Estudio de Matriz; *: Cepas utilizadas para determinar cada parámetro.

Tabla 7. Resultados del análisis de muestras de carne bovina molida y ambiente para STEC O157 analizadas en la primera etapa de muestreo (Período 2010-2011)

Muestra	N° Muestras	IC+	PCR múltiple +	Aislamientos STEC O157	Eficiencia de aislamiento
Carne	110	3 (2,7%)	18 (16,3%)	13 (11,8%)	72,2%
Mesada	108	2 (1,8%)	11 (10,2%)	2 (1,8%)	18,2%
Cuchilla	108	2 (1,8%)	9 (8,3%)	1 (0,9%)	11,1%
Picadora	108	2 (1,8%)	8 (7,4%)	2 (1,8%)	25%
Manos	108	5 (4,6%)	4 (3,7%)	2 (1,8%)	50%
Total	542	14 (2,6%)	50 (9,2%)	20 (3,7%)	40%

IC: Test inmunocromatográfico.

Tabla 8. Resultados del análisis de muestras de carne bovina molida y ambiente para STEC no-O157 analizadas en la primera etapa de muestreo (Período 2010-2011)

Muestra	N° Muestras	Muestras stx por PCR	Aislamientos de STEC no-O157	Eficiencia de aislamiento
Carne	110	51 (46,3%)	11 (10,0%)*	21,6%
Mesada	108	52 (47,2%)	11 (10,2%)	21,1%
Cuchilla	108	50 (45,5%)	8 (7,4%)	16,0%
Picadora	108	60 (54,5%)	8 (7,4%)	13,3%
Manos	108	42 (38,1%)	2 (1,8%)	4,8%
Total	542	255 (47,0%)	40 (7,4%)	15,7%

* En una muestra de carne se aislaron 3 cepas distintas pero aquí se consideró solo una

Tabla 9. Resultados del análisis de muestras de carne bovina molida y ambiente para STEC O157 durante la etapa de verificación (Año 2013)

Muestra	N° Muestras	IC+	PCR múltiple +	Aislamientos STEC O157	Eficiencia de aislamiento
Carne	86	4 (4,6%)	6 (7,0%)	3 (3,5%)	50%
Mesada	84	2 (2,3%)	0 (0,0%)	0 (0%)	-
Cuchilla	84	1 (1,2%)	0 (0,0%)	0 (0%)	-
Picadora	84	1 (1,2%)	1 (1,2%)	1 (1,2%)	100%
Manos	84	1 (1,2%)	1 (1,2%)	1 (1,2%)	100%
Total	422	9 (2,1%)	8 (1,9%)	5 (1,2%)	62,5%

IC: Test inmunocromatográfico

Tabla 10. Resultados del análisis de muestras de carne bovina molida y ambiente para STEC no-O157 durante la etapa de verificación (Año 2013)

Muestra	N° Muestras	Muestras stx por PCR	Aislamientos de STEC no-O157*	Eficiencia de aislamiento
Carne	86	33 (38,4%)	11 (12,8%)	33,3%
Mesada	84	21 (25,0%)	9 (10,7%)	42,8%
Cuchilla	84	31 (37,0%)	4 (4,8%)	12,9%
Picadora	84	28 (33,3%)	6 (7,1%)	21,4%
Manos	84	25 (29,8%)	4 (4,8%)	16,0%
Total	422	138 (32,7%)	34 (8,0%)	24,6%

*Considerando solo una cepa por muestra en aquellas con más de un aislamiento

Tabla 11. Origen de aislamiento, serotipo y genotipo de las 9 cepas de STEC no-O157 que no pudieron ser analizadas por PFGE

IGEVET	Origen	Serotipo	Genotipo
605	Picadora 40 (2011)	O174:H21	<i>ihA/astA/stx_{2v}-hb</i>
620	Cuchilla 93 (2011)	O174:H21	<i>ihA/astA/stx_{2v}-hb</i>
741	Manos 37 (2013)	ONT:H21	<i>ihA/stx_{2v}-hb</i>
784	Mesada 44 (2013)	ONT:H19	<i>saA/ehxA/ihA/subAB/stx_{2a}</i>
786	Mesada 44 (2013)	ONT:H49	<i>saA/ehxA/ihA/subAB/stx_{2a}</i>
794	Picadora 44 (2013)	ONT:H19	<i>saA/ehxA/ihA/subAB/stx_{2a}</i>
844	Manos 73 (2011)	O174:HNM	<i>ihA/stx_{2v}-hb</i>
1038	Manos 74 (2013)	O174:H21	<i>ihA/astA/cdt-V/stx_{2v}-hb</i>
1045	Cuchilla 85 (2013)	O174:H21	<i>ihA/astA/cdt-V/stx_{2v}-hb</i>
1148	Carne 17 (2011)	O163:HNM	<i>saA/ihA/subAB/stx_{2a}</i>

Tabla 12. Resultados del análisis comparativo de la cuantificación del riesgo de 86 carnicerías (Período 2010-2011 versus Verificación)

Riesgo	2011	2013	Diferencia
Alto	48 (55,8%)	19 (22,1%)	- 29 (33,7%)
Moderado	30 (34,9%)	42 (48,8%)	+ 12 (13,9%)
Bajo	8 (9,3%)	25 (29,1%)	+ 20 (19,8%)

Tabla 13. Test de diferencia de proporciones para la comparación estadística de la cuantificación del riesgo y el tamizaje de STEC O157 y no-O157 durante el período de muestreo 2010-2011 versus la verificación

2010-2011 vs 2013	Valor P	Z	IC 95%
Cuantificación del Riesgo			
Alto	0.000	4.375	0.191-0.483
Moderado	0.090	1.693	-0.286-0.008
Bajo	0.002	3.103	-0.316- -0.08
Tamizaje			
STEC O157	0.000	5.557	0.065-0.133
STEC no-O157	0.000	4.632	0.093-0.225

Z: Test de diferencia de proporciones. IC: intervalo de confianza.

Tabla 14. Resultados del análisis comparativo del tamizaje y aislamiento de STEC O157 de 86 carnicerías (Período 2010-2011 versus Verificación)

Muestra	Tamizaje			Aislamiento		
	2011	2013	Diferencia	2011	2013	Diferencia
Carne	15 (17,4%)	6 (7,0%)	- 9 (10,4%)	10 (11,6%)	3 (3,5%)	-7 (-8,1%)
Mesada	5 (5,8%)	0 (0%)	- 5 (5,8%)	2 (5,4%)	0 (0,0%)	-2 (-2,4%)
Cuchilla	3 (3,5%)	0 (0%)	- 3 (3,5%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)	-1 (-1,2%)
Picadora	6 (7,0%)	1 (1,2%)	- 5 (4,8%)	2 (2,4%)	1 (1,2%)	-1 (-1,2%)
Manos	4 (4,7%)	1 (1,2%)	- 3 (3,5%)	2 (2,4%)	1 (1,2%)	-1 (-1,2%)
TOTAL	33 (7,8%)	8 (1,9%)	-25 (-5,9%)	17 (4,0%)	5 (1,2%)	-12 (-2,8%)

Tabla 15. Resultados del análisis comparativo del tamizaje y aislamiento de STEC no-O157 de 86 carnicerías (Período 2010-2011 versus Verificación)

Muestra	Tamizaje			Aislamiento		
	2011	2013	Diferencia	2011	2013	Diferencia
Carne	39 (45,3%)	33 (38,4%)	- 6 (-6,9%)	6 (7,0%)	11 (12,8%)	5 (5,8%)
Mesada	47 (56,0%)	21 (25,0%)	- 26 (-31,0%)	8 (9,5%)	9 (10,7%)	1 (1,2%)
Cuchilla	40 (47,6%)	31 (37,0%)	- 9 (-10,6%)	6 (7,1%)	4 (4,8%)	-2 (-2,4%)
Picadora	47 (56,0%)	28 (33,3%)	- 19 (-22,7%)	8 (9,5%)	6 (7,1%)	-2 (-2,4%)
Manos	32 (38,1%)	25 (29,8%)	- 7 (-8,3%)	1 (1,2%)	4 (4,8%)	3 (2,6%)
TOTAL	205 (48,6%)	138 (32,7%)	- 67 (-15,9%)	29 (6,9%)	34 (8,0%)	+5 (+1,1%)

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdullah UYH, Al-Sultan IIA, Jassim HM, Ali YAH, Khorsheed RM, Baig AA. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections: an overview. *Clon Transgen*. 2014; 3: 125.
2. Adamu MT, Shamsul BMT, Desa MN, Khairani-Bejo S. A Review on *Escherichia coli* O157:H7-The Super Pathogen. *Health and the Environment Journal*. 2014; 5: 78-93.
3. Aidar-Ugrinovich L, Blanco J, Blanco M, Blanco J E, Leomil L, Dahbi G, Mora A, Onuma DL, Silveira WD, Pestana de Castro AF. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin- producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in SaoPaulo, Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2007; 115: 297-306.
4. Amigo N, Mercado E, Bentancor A, Singh P, Vilte D, Gerhardt E, Zotta E, Ibarra C, Manning SD, Larzábal M, Cataldi A. Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle in Argentina have Hypervirulent-Like Phenotypes. *PLoS One*. 2015; 10(6).
5. Anklam KS, Kanankege KST, Gonzales TK, Kaspar CW, Döpfer D. Rapid and Reliable Detection of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* by Real-Time Multiplex PCR. *J Food Prot*. 2012; 75: 643–650.
6. ANMAT. RENAPRA. Enfermedades Transmitidas por Alimentos Ficha Técnica N°8.
7. AOAC International. Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. 2012.
8. APRESUH. <http://apresuh.org/suhprev.html>
9. Asper DJ, Karmali MA, Townsend H, Rogan D, Potter AA. Serological Response of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Type III Secreted Proteins in Sera from Vaccinated Rabbits, Naturally Infected Cattle, and Humans. 2011; *Clin Vaccine Immunol*. 2011; 18 (7): 1052-7.

10. Atkinson RM, Besser JM, Bopp CA, Carlson C, Crandall C, George K, Gerner-Smidt P, Gladbach S, Hannah Gould L, Hartley CS, Maguire H, Monson TA, Rutledge D, Shea S, Somsel PA, Strockbine NA. Guidance for Public Health Laboratories on the Isolation and Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Clinical Specimens. 2012.
11. Auvray F, Lecureuil C, Dilasser F, Taché J, Derzelle S. Development of a real-time PCR assay with an internal amplification control for the screening of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48: 554-559.
12. Baranzoni GM, Fratamico PM, Rubio F, Glaze T, Bagi LK, Albonetti S. Detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104 from sprouts. *Int J Food Microbiol*. 2014; 173: 99-104.
13. Barkocy-Gallagher GA, Arthur TM, Rivera-Betancourt M, Nou XW, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M. Seasonal prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. *J Food Prot*. 2003; 66: 1978-1986.
14. Barlow RS, Gobius KS, Desmarchelier PM. Shiga toxin producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: results of a one-year study. *Int J Food Microbiol*. 2006; 111: 1–5.
15. Bell BP, Griffin PM, Lozano P, Christie DL, Kobayashi JM, Tarr PI. Predictors of hemolytic-uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *Pediatrics*. 1997; 100: E12.
16. Bennett J, Bettelheim KA. Serotypes of non-O157 Verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Meat in New Zealand. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2002; 25: 77–84.
17. Bentancor A. El rol epidemiológico de las mascotas en el ciclo de transmisión urbana de cepas de STEC. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 2006; 66: 37-41.
18. Bentancor A, Rumi MV, Carbonari C, Gerhardt E, Larzabal M, Vilte DA, Pistone-Creydt V, Chinen I, Ibarra C, Cataldi A, Mercado EC. Profile of Shiga toxin-producing

Escherichia coli strains isolated from dogs and cats and genetic relationships with isolates from cattle, meat and humans. *Vet Microbiol.* 2012; 156: 336-342.

19. Bentancor A, Rumi MV, Gentilini MV, Sardoy C, Irino K, Agostini A, Cataldi A. 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: 251-256.

20. Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2483-2488.

21. Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1099–1108.

22. Beutin L, Montenegro MA, Orskov I, Orskov F, Prada J, Zimmermann S, Stephan R. Close association of verotoxin (shiga like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2553-2561.

23. Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, Schmidt MA, Karch H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun.* 2004; 72:1812-1816.

24. Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schurk-Bulgrin R, Karch, H. Shiga toxin activatable by intestinal mucusin *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 1160-1167.

25. Bielaszewska M, Sinha B, Kuczus T, Karch H. Cytolethal distending toxin from Shiga-toxin *Escherichia coli* O157 causes irreversible G2/M arrest, inhibition of polifarantin, and death of human endothelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 552-562.

26. Blanco Crivelli X, Rumi MV, Carfagnini JC, Degregorio O, Bentancor AB. Synanthropic rodents as possible reservoirs of shigatoxigenic *Escherichia coli* strains. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2: 134.
27. Blanco M, Blanco JE, Gonzalez EA, Mora A, Jansen W, Gomes TA, Zerbini LF, Yano T, de Castro AF, Blanco J. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2958-2963.
28. Blanco M, Padola NL, Krüger A, Sanz ME, Blanco JE, González EA, Dahbi G, Mora A, Bernárdez MI, Etcheverría AL, Arroyo GH, Lucchesi PMA, Parma AE, Blanco J. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol.* 2004; 7: 269-276.
29. Boerlin P, McEven SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol.* 1999, 37: 497-503.
30. Bogard AK, Fuller CC, Radke V, Selman CA, Smith KE. Ground beef handling and cooking practices in restaurants in eight States. *J Food Prot.* 2013; 12: 2131-40.
31. Bohaychuk VM, Gensler GE, King RK, Manninen KI, Sorensen O, Wu JT, Stiles ME, McMullen LM. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail market place in Edmonton, Alberta, Canada. *J Food Prot.* 2006: 69, 2176-2182.
32. Boletín Integrado de Vigilancia N° 222 - SE 30 Agosto 2014
33. Boletín Integrado de Vigilancia N° 240 - SE 53 Diciembre 2014
34. Boletín Integrado de Vigilancia N° 286 - SE 47 Julio de 2015
35. Boletín Integrado De Vigilancia N° 290 – SE 51 Diciembre 2015
36. Boletín Integrado de Vigilancia N° 296 – SE 5. Febrero 2016

37. Bolton DJ. Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) *Escherichia coli*: virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm. *Foodborne Pathog Dis.* 2011; 8: 357-365.
38. Bonnet R, Souweine B, Gauthier G, Rich C, Livrelli V, Sirot J, Joly B, Forestier C. Non-O157 Stx2-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome in adults. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 1777-80.
39. Bosilevac JM, Guerini MN, Brichta-Harhay DM, Arthur TM, Koochmaraie M. Microbiological Characterization of Imported and Domestic Boneless Beef Trim Used for Ground Beef. *J Food Prot.* 2007; 70: 440-449.
40. Bosilevac JM y Koochmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(6): 2103-12.
41. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. *J Infect Dis.* 2005; 192 (8):1422-9.
42. Brandal LT, Wester AL, Lange H, Lobersli I, Lindstedt BA, Vold L, Kapperud G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Norway, 1992-2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. 2015; 15: 324.
43. Brookes VJ, Del Rio Vilas VJ, Ward MP. Disease prioritization: what is the state of the art? *Epidemiol Infect.* 2015; 143 (14): 2911-22.
44. Buteau C, Proulx F, Chaibou M, Raymond D, Clermont MJ, Mariscalco MM, Lebel MH, Seidman E. Leukocytosis in children with *Escherichia coli* O157:H7 enteritis developing the hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr Infect Dis.* 2000; 19: 642-647.
45. Buvens G, Lauwers S, Pierard D. Prevalence of subtilase cyto- toxin in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and raw meats in Belgium. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 1395-1399.

46. Bürk C, Dietrich R, Açar G, Moravek M, Bülte M, Märtlbauer E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5): 2106-12.
47. Cagney C, Crowley H, Duffy G, Sheridan JJ, O'Brien S, Carney E, Anderson W, McDowell DA, Blair IS, Bishop RH. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. *Int J Food Microbiol.* 2004; 21: 203-212.
48. Calderwood SB y Mekalanos JJ. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *J Bacteriol.* 1987; 169: 4759-4764.
49. Caprioli A, Morabito S, Brugère H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 2005; 36: 289-311.
50. Carter AO, Borczyk AA, Carlson JA, Harvey B, Hockin JC, Karmali MA, Krishnan C, Korn DA, Lior H. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med.* 1987; 317: 1496-1500.
51. Cavalieri SJ, Bohach GA, Snyder IS. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1984; 48 (4): 326-43.
52. CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014.
53. CDC, 2015. <http://www.cdc.gov/onehealth/>
54. Cergole-Novella MC, Nishimura LS, Dos Santos LF, Irino K, Vaz TM, Bergamini AM, Guth BEC. Distribution of virulence profiles related to new toxins and putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diverse sources in Brazil. *FEMS Microbiol Lett.* 2007; 274: 329-334.
55. Chapman PA, Cerdán Malo AT, Ellin M, Ashton R, Harkin. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. *Int J Food Microbiol.* 2001; 64: 139-150.

- 56.** Chase-Topping M, Gally D, Low C, Matthews L, Woolhouse M. Super-shedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6: 904-12.
- 57.** Chinen I, Epszteyn S, Melamed CL, Aguerre L, Martínez Espinosa E, Motter MM, Baschkier A, Manfredi E, Miliwebsky E, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol.* 2009; 132 (2-3): 167-71.
- 58.** Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi GM, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J. Food Prot.* 2001; 64, 1346-1351.
- 59.** CICCRA 2015. http://www.ipcva.com.ar/files/ciccra/ciccra_2014_05.pdf
- 60.** Cimolai N, Basalyga S, Mah DG, Morrison BJ, Carter JE. A continuing assessment of risk factors for the development of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol.* 1994; 42: 85-89.
- 61.** Circular SENASA N° 3834 del 19 de Noviembre de 2008 sobre prevención y control de *E. coli* O157:H7.
- 62.** Circular SENASA N° 4032 A. Monitoreo de *E. coli* verotixigénica shigatoxigénica en establecimientos faenadores de rumiantes domésticos (bovinos, ovinos, cabras).
- 63.** CODEX ALIMENTARIUS CAC/RCP 58/2005. Code of Hygienic Practice for Meat.
- 64.** CODEX CAC/GL-21 (1997). PRINCIPIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO Y LA APLICACIÓN DE CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LOS ALIMENTOS. <http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s04.htm>
- 65.** Código Alimentario Argentino. <http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/marco2.php>
- 66.** Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, Loffredo G, Morabito S, Ottaviani D, Paterlini F, Pezzotti G, Pisanu M, Semprini P, Caprioli.

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96: 67-73.

67. Conrad CC, Stanford K, McAllister TA, Thomas J, Reuter T. Further development of sample preparation and detection methods for O157 and the top 6 non-O157 STEC serogroups in cattle feces. *J Microbiol Methods.* 2014; 105: 22–30.

68. Coombes BK, Gilmour MW, Goodman CD. The evolution of virulence in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2011; 2: 1-3.

69. Coombes BK, Wickham ME, Mascarenhas M, Gruenheid S, Finlay BB, Karmali MA. Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74 (7): 2153-60.

70. De Grado M, Abe A, Gauthier A, Steele-Mortimer O, DeVinney R, Finlay BB. Identification of the intimin binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 1999; 1: 7-17

71. de Paula CMD, Sopeña Casarin L, Tondol CE. *Escherichia coli* O157:H7 — emerging food pathogen. 2014. *Vig Sanit Debate.* 2014; 2(04):23-33.

72. De Toni F, deSouza EM, Pedrosa FO, Klassen G, Irino K, Un RL, Steffens MBR, Fialho OB, Farah SMSS, Fadel-Picheth CMT. A prospective study on Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Parana State, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 48: 645-647.

73. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC Jr, Moon HW. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun.* 1997; 65: 1842-1848.

74. Decreto 4238/68. SENASA.

75. Dewanti R y Wong AC. Influence of culture conditions on biofilm formation By *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Food Microbiol.* 1995; 26: 147-164.

76. Directiva 97/78/CE

- 77.** Doughty S, Sloan J, Bennet-Wood V, Robertson M, Robins-Browen RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement- negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 2002; 70:6761-9.
- 78.** Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, Nychas GJ, Sofos JN. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int J Food Microbiol.* 2011; 149 (3): 262-8.
- 79.** Doyle MP, Zhao T, Meng J, Zhao S. Capítulo 10: *Escherichia coli* O157:H7. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*. 1ra Edición. Washington, USA, Ed ASM Press, 1997.
- 80.** Drysdale M, MacRae M, Strachan NJC, Reid TMS, Ogden ID. The detection of non-O157 *E. coli* in food by immunomagnetic separation. *J Appl Microbiol.* 2004; 97: 220-224.
- 81.** Dytoc MT, Ismaili A, Philpott DJ, Soni R, Brunton JL, Sherman PM. Distinct binding properties of eaeA-negative verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of serotype O113:H21. *Infect. Immun.* 1994; 62: 3494-3505.
- 82.** ECDC. Surveillance Report. Surveillance of seven priority food- and waterborne diseases in the EU/EEA. 2010–2012. Stockholm, 2015.
- 83.** Edwards JR y Fung DY. Prevention and decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 on raw beef carcasses in commercial beef abattoirs. *J Rapid Method.* 2006; 14: 1-95.
- 84.** Edwards RA, Puente JL. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 282-287.
- 85.** EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal.* 2013; 11:3138. [106 pp.].

- 86.** EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. EFSA Journal. 2007; 579: 1-61.
- 87.** EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal. 13, 3991, 162 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991.
- 88.** Eklund M, Leino K, Siitonen A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. J Clin Microbiol. 2002; 40: 4585-4593.
- 89.** Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, Barkocy-Gallagher GA, Koohmaraie M, Laegreid WW. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97: 2999-3003.
- 90.** *Escherichia coli*: Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Michael Donnenberg (Editor). USA, Academic Press, 2013.
- 91.** 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.
- 92.** EU Reference Laboratory for *E. coli*, Department of Veterinary Public Health and Food Safety Unit of Foodborne Zoonoses. Istituto Superiore di Sanità. Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of *aggR* and *aaiC* genes. 2013. http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_005_Rev_0.pdf.
- 93.** Fantelli K y Stephan R. Prevalence and characteristics of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. Int J Food Microbiol. 2001; 70: 63-69.
- 94.** Friesema I, van der Zwaluw K, Schuurman T, Kooistra-Smis M, Franz E, van Duynhoven Y, van Pelt X. Euro Surveill. Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin

- 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. 2014; 19(17):26-32.
- 95.** Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JT, Beumer RR, de Boer E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Prot.* 1999; 62 (10): 1115-22.
- 96.** FAO. La Seguridad Alimentaria: información para la toma de decisiones Guía práctica Una introducción a los conceptos básicos de la seguridad alimentaria. 2011.
- 97.** FAO. Manual de Inspección de Alimentos basada en el riesgo. 2008
- 98.** Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condrón R, De Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Miszczycha S, Moussiégt S, Verstraete K, Cerf O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production *Internat J Food Microbiol.* 2013; 162: 190-212.
- 99.** Feng P. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Produce—A Food Safety Dilemma. *Microbiol Spectr.* 2014; 2 (4): EHEC-0010-2013.
- 100.** Feng P, Weagant SD, Jinneman K; FDA-BAM. Chapter 4A Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Bacteriological Analytical Manual.* 2011.
- 101.** Fernández D, Irino K, Sanz ME, Padola NL, Parma AE. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Lett Appl Microbiol.* 2010; 5: 377-382.
- 102.** Fernández D, Krüger A, Polifroni R, Bustamante AV, Sanso AM, Etcheverría A, Lucchesi PM, Parma AE, Padola NL. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 3:9.
- 103.** Fernández D, Rodríguez E, Arroyo GH, Padola NL, Parma AE. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J Appl Microbiol.* 2009; 106: 1260-7.

- 104.** Food Safety Authority of Ireland. Public Health Laboratory SWAHB. The Centre for Food Safety U. A surveillance study of *E. coli* O111 and *E. coli* O26 in minced beef on retail sale in Ireland. 2004.
- 105.** Frank C, Faber MS, Askar M, Bernard H, Fruth A, Gilsdorf A, Hohle M, Karch H, Krause G, Prager R, Spode A, Stark K, Werber D. Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 16. 2011.
- 106.** Frankel G, Phillips A.D, Trabulsi L.R, Knutton S, Dougan G, Matthews S.E. Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(S)?. Trends Microbiol. 2001; 9:214-8.
- 107.** Franz E, van Hoek AH, Wuite M, van der Wal FJ, de Boer AG, Bouw EI, Aarts HJ. Molecular hazard identification of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). PLoS One. 2015; 10 (3).
- 108.** Franzolin MR, Barbosa Alves RC, Keller R, Tardelli Gomes TA, Beutin L, Lima Barreto M, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Rachid Trabulsi L. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(4): 359-363.
- 109.** Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis. 2002; 185 (1): 74-84.
- 110.** FSIS NOTICE 27th April 2012: FSIS Verification Testing NON-0157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* (NON-O157 STEC) in imported product under the MT51 Sampling Program
- 111.** Fürst S, Scheef J, Bielaszewska M, Rüssmann H, Schimdt H, Karch H. Identification and characterization of *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serogroups containing three distinct Shigatoxin genes. J Med Microbiol. 2000; 49: 383-386.

- 112.** 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.
- 113.** Gannon VP, Teerling C, Masri SA, Gyles CL. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J Gen Microbiol.* 1990; 136: 1125-35.
- 114.** García-Aljaro C, Muniesa M, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Jofre J, Blanch AR. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 246 (1): 55-65.
- 115.** Gill A, Huszczyński G, Gauthier M, Blais B. Evaluation of eight agar media for the isolation of shiga toxin—Producing *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods.* 2014; 96, 6-11.
- 116.** Giovambattista G, Ripoli MV, Lirón JP, Kienast ME, Villegas Castagnaso EE, Dulout FN, Peral García P. Aplicación de las técnicas de polimorfismo de DNA en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad. *Analecta Vet.* 2001; 21: 5 -11.
- 117.** Giugno SM, Bibiloni N, Rahman R, Miliwebsky E, Chinen I, Rivas M. Association between uremic hemolytic syndrome and infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2007; 41: 27-33.
- 118.** Goffaux F, China B, Janssen L, Pirson V, Mainil J. The locus for enterocyte effacement (LEE) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from dogs and cats. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 473: 129-36.
- 119.** Gómez D, Miliwebsky E, Fernandez Pascua C, Baschkier A, Mamfredi E, Zotta M, Nario F, Piquin A, Sanz M, Etcheverria A, Padola N, Parma A, Rivas M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hamburguesas superongeladas y quesos de pasta blanda. *Rev Arg Microbiol.* 2002; 34: 66-71.
- 120.** Griffin PM, Bell BP, Cieslak PR, Tuttle J, Barret TJ, Doyle MP, et al. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in the Western United States: the big picture. En: Karmali MA,

Goglio AG. Recent advances in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Amsterdam, Holanda, Ed Elsevier, 1994. p. 7-12.

121. Gounadaki AS, Skandamis PN, Drosinos EH, Nychas GJ. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiol.* 2008; 25: 313–323.

122. Gruber JF, Bailey JE, Kowalcyk BB. Evaluation of U.S. Poison Center Data for Surveillance of Foodborne Disease. *Foodborne Pathog Dis.* 2015; 12(6):467-78.

123. 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.

124. Gyles CL, 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci.* 85: E45-E62.

125. Hornitzky MA, Mercieca K, Bettelheim KA, Djordjevic SP. Bovine Feces from Animals with Gastrointestinal Infections Are a Source of Serologically Diverse Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains That Commonly Possess Intimin. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71 (7): 3405-12.

126. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. *J Anim Sci.* 2007; 85: 63-72.

127. Imamovic L, Jofre J, Schmidt H, Serra-Moreno R, Muniesa M. Phage-Mediated Shiga Toxin 2 Gene Transfer in Food and Water. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 1764-1768.

128. 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.

129. IPCVA. <http://www.ipcva.com.ar/files/manualcarniceros.pdf>

130. Islam MA, Mondol AS, de Boer E, Beumer RR, Zwietering MH, Talukder KA, Heuvelink AE. Prevalence and Genetic Characterization of Shiga Toxin-Producing

Escherichia coli Isolates from Slaughtered Animals in Bangladesh. Appl Environ Microbiol. 2008; 74: 5414-5421.

131. ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.

132. ISO 22119:2011. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions.

133. ISO/TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feed. Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens. Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.

134. Jacewicz M, Clausen H, Nudelman E, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. Pathogenesis of Shigella diarrhea. XI. Isolation of a Shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa-cells and its identification as globotriaosylceramide. J Exp Med. 1986; 163 (6): 1391-404.

135. Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: Characterization and evolutionary considerations. Infect Immun. 2003; 71: 3634-3638.

136. Jenkis C, Willshaw GA, Evans J, Cheasty T, Chart H, Shaw DJ, Dougan G, Frankel G, Smith HR. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogrup O157 associated with disease in the United Kingdom. J Med Microbiol. 2003; 52:941-47.

137. Jones TF y Angulo FJ. Eating in restaurants: a risk factor for foodborne disease? Clin Infect Dis. 2006; 43: 1324-1328.

138. Jothikumar N, Griffiths MW. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 3169-3171.

- 139.** Ju W, Shen J, Li Y, Toro MA, Zhao S, Ayers S, Najjar MB, Meng J. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail ground beef and pork in the Washington D.C. area. *Food Microbiol.* 2012; 32: 371-377.
- 140.** Kagkli DM, Folloni S, Barbau-Piednoir E, Van den Eede G, Van den Bulcke M. Towards a pathogenic *Escherichia coli* detection platform using multiplex SYBR®Green Real-time PCR methods and high resolution melting analysis. *PLoS One.* 2012; 7(6):e39287.
- 141.** Kagkli DM, Weber TP, Van den Bulcke M, Folloni S, Tozzoli R, Morabito S, Ermolli M, Gribaldo L, Van den Eede G. Application of the Modular Approach to an In-House Validation Study of Real-Time PCR Methods for the Detection and Serogroup Determination of Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 6954-6963.
- 142.** Kanki M, Seto K, Sakata J, Harada T, Kumeda Y. Simultaneous Enrichment of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and O26 and *Salmonella* in Food Samples Using Universal Preenrichment Broth. *J Food Prot.* 2009; 72, 2065-2070.
- 143.** Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1200-1205.
- 144.** Karch H y Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989; 27: 2751-2757.
- 145.** Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2: 123-140.
- 146.** Kaper JB y Karmali MA. The continuing evolution of a bacterial pathogen. *PNAS.* 2008; 105 (12).
- 147.** Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 2010; 140: 360-370.
- 148.** 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.
- 149.** Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet. 1983;1 (8325): 619-20.
- 150.** Karpman D y Ståhl AL. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pathogenesis and the Host Response. Microbiol Spectr. 2014; 2 (5)
- 151.** Kase JA, Maounounen-Laasri A, Son I, Lin A, Hammack TS. 1 Comparison of eight different agars for the recovery of clinically relevant non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from baby spinach, cilantro, alfalfa sprouts and raw milk. Food Microbiol. 2015; 46, 280-287.
- 152.** Kassenborg HD, Hedberg CW, Hoekstra M, Evans MC, Chin AE, Marcus R, Vugia DJ, Smith K, Ahuja SD, Slutsker L, Griffin PM. Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. Clin Infect Dis. 2004; 38: 271-278.
- 153.** Kaufmann, M, Zweifel C, Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Beutin L, Stephan R. *Escherichia coli* O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fecal samples of finished pigs at slaughter in Switzerland. J Food Prot. 2006; 69: 260-266.
- 154.** Kennedy J, Jackson V, Blair IS, McDowell DA, Cowan C, Bolton DJ. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. J Food Prot. 2005; 68: 1421–1430.
- 155.** Kenny B, Devinney R, Stein M, Reincheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell. 1997; 91: 511-20.
- 156.** Keskimäki M, Ikäheimo R, Kärkkäinen P, Scheutz F, Ratiner Y, Puohiniemi R, Siltonen A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype OX3:H21 as a cause of hemolytic-uremic syndrome. Clin. Infect. Dis. 1997; 24: 1278-79.

- 157.** Knowalchuk J, Speir JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977; 18: 775-779.
- 158.** Krüger A, Lucchesi PMA. Shiga toxins and stx-phages: highly diverse entities. *Microbiology*. 2015; 161: 451-62.
- 159.** Krüger A, Lucchesi PM, Parma AE. Verotoxins in bovine and meat verotoxin-producing *Escherichia coli* isolates: type, number of variants, and relationship to cytotoxicity. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77: 73-79.
- 160.** Krüger A, Padola NL, Parma AE, Lucchesi PMA. Intraserotype diversity among Argentinian verocytotoxigenic *Escherichia coli* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Med Microbiol*. 2006; 55: 545-549.
- 161.** Lin A, Sultan O, Lau HK, Wong E, Hartman G, Lauzon CR. O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiol*. 2011; 28: 478-483.
- 162.** Lindberg AA, Brown JE, Stromberg N, Westlingryd M, Schultz JE, Karlsson KA. Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type-1. *J Biol Chem*. 1987; 262: 1779-1785.
- 163.** Lindgren SL, Melton AR, O'Brien AD. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infect Immun*. 1993; 61: 3832-42.
- 164.** Leclercq A, Mahillon J. Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7, *Vet. Rec*. 2003; 152: 723-724.
- 165.** Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Arg Microbiol*. 2005; 37: 1-10.
- 166.** Leotta GA, Deza N, Origlia J, Toma C, Chinen I, Miliwebsky E, Iyoda S, Sosa-Estani S, Rivas M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Vet Microbiol*. 2006; 118: 151-157.

- 167.** Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, Robins-Browne RM, Rivas M. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. BMC Microbiology. 2008; 8:46.
- 168.** LEY N° 22.375. Ley Federal de Carnes. Régimen de habilitación y funcionamiento de los establecimientos donde se faenen animales, se elaboren y depositen productos de origen animal.
- 169.** Llorente P, Barnech L, Irino K, Rumi MV, Bentancor A. Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Ground Beef Collected in Different Socioeconomic Strata Markets in Buenos Aires, Argentina. BioMed Research International. 2014; Art ID 795104.
- 170.** López F, Isequilla PE, Kaplan D. Enfermedades de transmisión hídrico en el Río de La Plata, Diagnóstico de situación Enero-Junio 1998. Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. 1998.
- 171.** López OCF, Duverne LB, Maizeres J, Leotta G. Implementación del programa Carnicerías Saludables en el Partido de Luján, Provincia de Buenos Aires. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Noviembre de 2015. Buenos Aires, Argentina.
- 172.** Luchansky JB, Porto-Fett ACS, Shoyer BA, Call JE, Schlosser W, Shaw W, Bauer N, Latimer H. Fate of Shiga toxin-producing O157:H7 and non-O157:H7 *Escherichia coli* cells within blade-tenderized beef steaks after cooking on a commercial open-flame gas grill. J Food Prot. 2012; 75: 62-70.
- 173.** LuSUH. La salud y nuestros hábitos. <http://www.lusuh.org.ar/saludyhabitots.pdf>
- 174.** MAA, 2015. http://www.maa.gba.gov.ar/contralor/caa_mun.php
- 175.** Martin A y Beutin L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. Int J Food Microbiol. 2011; 46: 99-104.

- 176.** Manning SD, Motiwala AS, Springman AC, Qi W, Lacher DW, Ouellette LM, Mladonicky JM, Somsel P, Rudrik JT, Dietrich SE, Zhang W, Swaminathan B, Alland D, Whittam TS. Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157:H7 associated with disease outbreaks. *Proc Natl Acad Sci.* 2008; 105:4868-4873.
- 177.** Masana MO, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Del Castillo LL, Carbonari C, Leotta GA, Vilacoba E, Irino K, Rivas M. Genotypic Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Beef Abattoirs of Argentina. *J Food Protect.* 2011; 74: 2008-2017.
- 178.** Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodríguez HR, Rivas M. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J Food Protect.* 2010; 73: 649-656.
- 179.** Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz LJ. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *Food Prot.* 2010; 73 (9): 1721-36.
- 180.** Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1998; 352:1207-12.
- 181.** Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BEC, Masana MO, Cataldi A, Rodríguez HR, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96: 189–198.
- 182.** Mello GE, Sim EM, Barlow RS, D'Astek BA, Galli L, Chinen I, Rivas M, Gobius KS. Phylogenetically related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 isolates are distinguished by virulence clades and alternative Shiga toxin 1 and 2 prophages. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78 (13): 4724-31
- 183.** Mercado EC, Rodríguez SM, Elizondo AM, Marcoppido G, Parreño V. Isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from a South American camelid (*Lama guanicoe*) with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (10): 4809-11.

- 184.** Miccio L, Rumi MV, Llorente P, Bentancor AB. Contaminación de carne molida con cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénico (STEC) provenientes de comercios minoristas de San Martín, Buenos Aires, categorizados según nivel socioeconómico. In Vet. 2011; 13.
- 185.** Mingle LA, Garcia DL, Root TP, Halse TA, Quinlan TM, Armstrong LR, Chiefari AK, Schoonmaker-Bopp DJ, Dumas NB, Limberger RJ, Musser KA. Enhanced identification and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a six-year study. Foodborne Pathog Dis. 2012;9 (11): 1028-36.
- 186.** Ministerio de Asuntos Agrarios. Dirección Provincial de Ganadería - Dirección de Producción Láctea. Departamento Competitividad Agroalimentaria. Análisis y Caracterización del Bienestar Animal en Plantas Faenadoras de Bovinos de la Provincia de Buenos Aires. <http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/archivos/Alimentacion/analisis-caracterizacion-bienestar-animal-plantas-faenadoras-provincia-Buenos-aires.pdf>
- 187.** Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, López C, Justel P, Alonso MP, Echeita A, Bernárdez MI, González EA y Blanco J. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003. BMC Microbiol. 2007; 7:13.
- 188.** 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.
- 189.** Moredo FA, Cappuccio JA, Insarralde L, Perfumo CJ, Quiroga MA, Leotta GA. Genotypic characterization of toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea (PWD) and edema disease. Rev Argent Microbiol. 2012;44 (2): 85-8.
- 190.** Moredo FA, Piñeyro PE, Márquez GC, Sanz M, Colello R, Etcheverría A, Padola NL, Quiroga MA, Perfumo CJ, Galli L, Leotta GA.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles. *Foodborne Pathog Dis.* 2015; 12 (8): 704-11.

191. Nataro JP y Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 199; 11 (2): 403.

192. Nesse LL, Sekse C, Berg K, Johannesen KC, Solheim H, Vestby LK, Urdahl AM. Potentially pathogenic *E. coli* can produce biofilm under conditions relevant for the food production chain. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 80: 2042-2049.

193. Nicholls L, Grantn TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2000; 35: 275-88.

194. Obrig TG, Louise CB, Lingwood CA, Boyd B, Barleymaloney L, Daniel TO. Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem.* 1993, 268: 15484-88.

195. Oliveira MG, Brito JRF, Carvalho RR, Guth BEC, Gomes TAT, Vieira MAM, Kato MAMF, Ramos II, Vaz TMI, Irino K. Water buffaloes (*Bubalus bubalis*) identified as an important reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 5945-5948.

196. Oliveira MG, Brito JR, Gomes TA, Guth BE, Vieira MA, Naves ZV, Vaz TM, Irino K. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *Int J Food Microbiol.* 2008; 127: 139-146.

197. OMS. Consultation on prevention and control of enterohemorrhagic (EHEC) infections. In: World Health Organization. Proceedings of the Report of a WHO. Consultation, Geneva, Switzerland. 1997a.

198. OMS. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva, 1997b.

- 199.** OPS /OMS. HACCP: Instrumento Esencial para la Inocuidad de Alimentos. INPPAZ Unidad de Salud Pública Veterinaria.
- 200.** Osek J, Weiner M, Hartland EL. Prevalence of the IpfO113 gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. *Vet Microbiol.* 2003; 96: 259-266.
- 201.** Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis.* 1989; 160: 994-998.
- 202.** O'Brien AD, La Veck GD, Thompson MR, Formal SB. Production of Shigella dysenteriae type-1- like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1982; 146: 763-769.
- 203.** O'Connor. Ontario Ministry of the Attorney General. Report of the Walkerton Inquiry: The Events of May 2000 and Related Issues. Ontario, Toronto. Queen's Printer, 2002.
- 204.** Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverría AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. Serotypes and virulence genes of shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol.* 2004; 100: 3-9.
- 205.** Padola NL, Sanz ME, Lucchesi PM, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverría AI, Arroyo GH, Parma AE. First isolation of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O145:H- from cattle in feedlot in Argentina. *BMC Microbiology.* 2002; 2:6.
- 206.** Papadopoulou OS, Chorianopoulos NG, Gkana EN, Grounta AV, Koutsoumanis Kp, Nychas GJ. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Sci.* 2012; 90(3): 865-9.
- 207.** 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. *Eur J Epidemiol.* 2000; 16(8):757-62.
- 208.** Pathogenic *Escherichia coli* Network. Methods for Detection and Molecular Characterisation of Pathogenic *Escherichia coli*. O'Sullivan J, Bolton DJ, Duffy G, Baylis C, Tozzoli R, Wasteson Y, Lofdahl S (Editores). 2006.

- 209.** 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.
- 210.** Paton AW, Srimanote P, Talbor UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB5 cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med.* 2004; 200: 35-46.
- 211.** Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun.* 2001; 69: 6999-7009.
- 212.** Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998b; 11: 450-79.
- 213.** Persad AK y LeJeune JT. Animal Reservoirs of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 2014; 2(4): 0027-2014.
- 214.** Phang HS y Bruhn CM. Burger preparation: what consumers say and do in the home. *J Food Prot.* 2011; 74 (10): 1708-16.
- 215.** Pianciola LCI, Mazzeo M, Zolezzi G, González G, D'Astek B, Deza N, Navello M, Rivas M. Hypervirulent *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina. 8th International Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections 2012. Amsterdam, Holanda.
- 216.** Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Cattle, Food, and Children during a One-Year Prospective Study in France. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1023-1031.
- 217.** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Jean F. MacFaddin. 3ed. Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana 2003.

- 218.** Pruijboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA, Moon HW. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 10325-9.
- 219.** Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis. 2005; 11:603-9.
- 220.** Rasooly R. Shiga toxin Stx2 is heat-stable and not inactivated by pasteurization. Int J Food Microbiol. 2010; 136(3): 290-4.
- 221.** Reglamento UE 1441/2007
- 222.** Reglamento UE 2073/2005
- 223.** Reglamento (CE) N° 178/2002
- 224.** Reglamento (CE) N° 882/2004
- 225.** Renter DG, Morris JG, Sargeant JM, Hungerford LL, Berezowski J, Ngo T, Williams K, Acheson DW. Prevalence, risk factors, O serogroups, and virulence profiles of Shiga toxin-producing bacteria from cattle production environments. J. Food Prot. 2005; 68, 1556-1565.
- 226.** Report of the Health Protection Surveillance Centre Sub-Committee on Verotoxigenic *E. coli* Chapter 1: Clinical Features and Epidemiology of VTEC. 2013.
- 227.** Resolución N° 205/2014. SENASA
- 228.** Riley LW, Remis RS, Helgerson, McGee HB, Wells JG, Davis BR, , Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. N Engl J Med. 1983; 308: 681-5.
- 229.** Riordan JT, Viswanath SB, Manning SD, Whittam TS. Genetic differentiation of *Escherichia coli* O157: H7 clades associated with human disease by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2008; 46(6), 2070-2073.

- 230.** Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HA, Masana M. Epidemiology of Argentinean STEC. En: Walk S, Feng P Bacterial Population Genetics: A Tribute to Thomas S. Whittam, ASM Press, 2011, 109-132.
- 231.** Rivas M, Leotta G, Chinen I. Manual de Procedimientos. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. WHO Global Salm Surv. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 2008a.
- 232.** 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.
- 233.** Rivas M. Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En Boletín N° 178. Asociación Argentina de Microbiología; 2007.
- 234.** Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti, MG, Vallés, P, Roldán CD, Balbi L, Marsano de Mollar MC, Amoedo D, Miliwebsky E, Chinen I, Hoektra RM, Mead P, Griffin PM. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. Emerg Infect Dis. 2008b; 14 (5): 763–771.
- 235.** Rotariu O, Ogden ID, MacRitchie L, Forbes KJ, Williams AP, Cross P, Hunter CJ, Teunis PF, Strachan NJ. Combining risk assessment and epidemiological risk factors to elucidate the sources of human *E. coli* O157 infection. Epidemiol Infect. 2012; 140 (8): 1414-29.
- 236.** Rumi V, Blanco Crivelli X, Calviño M, Regalía A, Cueto G, Degregorio O, Bentancor A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Animals related to Cases of Bloody Diarrhea or Hemolytic Uremic Syndrome and Prevalence in Rodents in the City of Buenos Aires. Revista Argentina de Salud Publica. 2012b; 3: 23-29.

- 237.** Rumi MV, Irino K, Deza N, Huguet MJ, Bentancor AB. First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin -producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. *J Infect Dev Ctries.* 2012a; 6 (4): 358-63.
- 238.** Saitou N y Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 406–425
- 239.** Sallam KI, Mohammed MA, Ahdy AM, Tamura T. Prevalence, genetic characterization and virulence genes of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H- and *E. coli* O157:H7 isolated from retail beef. *Int J Food Microbiol.* 2013; 165 (3): 295-301.
- 240.** Samadpour M, Barbour MW, Nguyen T, Cao TM, Buck F, Depaiva GA, Mazengia E, Yang P, Alfi D, Lopes M, Stopforth JD. Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts and mushrooms. *J Food Prot.* 2006; 69: 441-443.
- 241.** Samadpour M, Kubler M, Buck FC, Depavia GA, Mazengia E, Stewart J, Yang P, Alfi D. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* inground beef and cattle feces from King County, Washington. *J Food Prot.* 2002; 65 (8): 1322-1325.
- 242.** Sandvig K y Van Deurs B. Endocytosis and intracellular sorting of ricin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 1994, 346: 99-102.
- 243.** Savarino SJ, Fasano A, Robertson DC, Levine MM. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vivo rabbit intestinal model. *J Clin Invest.* 1991; 87: 1450-1455.
- 244.** Scheutz F, Strockbine NA. Genus I. *Escherichia*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2°ed. 2005. Springer. USA p 607-624.
- 245.** Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (9): 2951-63.

- 246.** Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. *Infect Immun.* 1995; 63:1055-1061.
- 247.** Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A New Shiga Toxin 2 Variant (Stx2f) from *Escherichia coli* Isolated from Pigeons. *Appl Env Microbiol.* 2000; 66: 1205-8.
- 248.** Smith BA, Fazil A, Lammerding AM. A risk assessment model for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and beef cuts in Canada: Evaluating the effects of interventions. *Food Control.* 2013; 29: 364-381.
- 249.** Shiferaw B, Chaves SS, Ryan PA, Medus C, Vugia DJ, Zansky SM, Jones TF, Angulo FJ, EIP FoodNet Working Group. Is eating outside the home associated with gastrointestinal illness? 4th International Conference on Emerging Infectious Diseases, 2004, Atlanta.
- 250.** Siegler RL, Pavia AT, Christofferson RD, Milligan MK. A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics.* 1994; 94: 35-40.
- 251.** Sirsat SA, Kim K, Gibson KE, Crandall PG, Ricke SC, Neal JA. Tracking microbial contamination in retail environments using fluorescent powder a retail delicatessen environment example. *J Vis Exp.* 2014; 5 (85).
- 252.** SIRVETA Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Vigilancia Epidemiológica de la Organización Mundial de la Salud.
- 253.** Slutsker L, Ries AA, Maloney K, Wells JG, Greene KD, Griffin PM. A nationwide case-control study of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the United States. *J Infect Dis.* 1998; 177: 962-966.
- 254.** Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol.* 1997; 11: 156-60.

- 255.** Srednik ME, Rumi MV, Bentancor A. Inocuidad de carne molida y presencia de cepas de *Escherichia coli* causantes de lesiones de adherencia y esfacelación. InVet. 2013; 15: 123-130.
- 256.** Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-Shigella-Salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>.
- 257.** Stevens MP, Roe AJ, Vlisidou I, Van Diemen PM, La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Gally DL, Wallis TS. Mutation of *tox*B and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. Infect Immun. 2004; 72: 5402-5411.
- 258.** Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. J Dairy Sci. 2008; 91 (7): 2561-5.
- 259.** Stüber E, Bonke R, Drees N, Heurich M, Fredriksson-Ahomaa M, Beutin L, Märtlbauer E. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Bavarian roe deer population over different periods of time. VTEC 2012. Amsterdam.
- 260.** Swerdlow DL, Griffin PM. Duration of faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 among children in day-care centres. Lancet. 1997; 349 (9054): 745-746.
- 261.** Talbot UM, Paton JC, Paton AW. Protective Immunization of Mice with an Active-Site Mutant of Subtilase Cytotoxin of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. Infect Immun. 2005; 73(7): 4432-4436.
- 262.** Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013; 30: 2725–2729.
- 263.** Tanaro JD, Galli L, Lound LH, Leotta GA, Piaggio MC, Carbonari CC, Irini K, Rivas M. Non-O157:H7 Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in bovine rectums and surface water streams on a beef cattle farm in Argentina. Foodborne Pathog Dis. 2012; 9; 878-884.

- 264.** Tanaro JD, Leotta GA, Lound LH, Galli L, Piaggio MC, Carbonari CC, Araujo S, Rivas M. *Escherichia coli* O157 in Bovine Feces and Surface Water Streams in a Beef Cattle Farm of Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(4):475-7.
- 265.** Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun.* 2000; 68: 1400-07.
- 266.** Tatarczak M, Wieczorek K, Possé B, Osek J. Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet Microbiol.* 2005; 110: 77-85.
- 267.** Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun.* 2001; 69: 6660-69.
- 268.** Taylor EV, Holt KG, Mahon BE, Ayers T, Norton D, Gould LH. Ground beef consumption patterns in the United States, FoodNet, 2006 through 2007. *J Food Prot.* 2012; 75 (2): 341-6.
- 269.** Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-9.
- 270.** Todd WCD J, Greig JD, Bartleson CA, Michaels B. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 4. Infective Doses and Pathogen Carriage. *J Food Prot.* 2008; 71: 2339-2373.
- 271.** Todd WTA y Dundas S. The management of VTEC O157 infection. *Int J Food Microbiol.* 2001; 66: 103-110.
- 272.** Toma C, Martínez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. Distribution of putative adhesins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* of different seropathotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2004 ;42, 4937-4946.

- 273.** Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2002; 70: 5416-27.
- 274.** Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Manzinger D, Funk JA. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiol Infect.* 2015; 143 (3): 505-14.
- 275.** Tozzi AE, Goriotti S, Caprioli A. Epidemiology of Human Infections by *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin-Producing *E. coli*. En: Duffy G, Garvey P, McDowell D. Verocytotoxigenic *E. coli*. Connecticut, USA, Food & Nutrition Press, Inc., 2001, 161-180.
- 276.** 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.
- 277.** Tozzoli R, Grande L, Michelacci V, Ranieri P, Maugliani A, Caprioli A, Morabito S. Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: a world in motion. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:80.
- 278.** Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. 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: 1339-43.
- 279.** USDA. MLG 5.06. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products.
- 280.** USDA. MLG 5.09. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.
- 281.** USDA. MLG 5B.05. Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges.
- 282.** Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota MI, González S, González G, Gugliada MJ, Carbonari CC, Aalgorta G, Bernadà M, Sabelli R, Pardo L, Rivas M, Schelotto

- F. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. Rev Argent Microbiol. 2008; 40: 93-100.
- 283.** Vernozy-Rozand C, Montet M P, Berardin M, Bavai C, Beutin L. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milkcheeses in France. Lett Appl Microbiol. 2005; 41: 235-241.
- 284.** Verocytotoxigenic *E. coli*. Duffy G, Garvey P, McDovell D, editors. Trumbull, Food & Nutrition Press, 2002.
- 285.** Verstraete K, Van Coillie E, Werbrouck H, Van Weyenberg S, Herman L, Del-Favero J, De Rijk P, De Zutter L, Joris MA, Heyndrickx M, De Reu K. A qPCR Assay to Detect and Quantify Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) in Cattle and on Farms: A Potential Predictive Tool for STEC Culture-Positive Farms. Toxins. 2014; 6, 1201-1221.
- 286.** Vimont A, Vernozy-Rozand C, Delignette-Muller ML. Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. Lett Appl Microbiol. 2006; 42, 102-108.
- 287.** Wang F, Yang Q, Kase JA, Meng J, Clotilde LM, Lin A, Ge B. Current Trends in Detecting Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food. Foodborne Pathog Dis. 2013; 10, 665-677.
- 288.** Wang G, Doyle MP. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. J Food Prot 1998; 61(6): 662-667.
- 289.** Wang R, Bono JL, Kalchayanand N, Shackelford S, Harhay DM. Biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 strains and their tolerance to sanitizers commonly used in the food processing environment. J Food Prot. 2012; 75 (8): 1418-28.
- 290.** Wang R, Kalchayanand N, King D, Luedtke B, Bosilevac JM, Arthur T. Biofilm Formation and Sanitizer Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from “High Event Period” Meat Contamination. J Food Prot. 2014; 77 (11): 1982-1987.

- 291.** Wasilenko JL, Fratamico PM, Sommers C, DeMarco DR, Varkey S, Rhoden K, Tice G. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145, and *Salmonella* in retail raw ground beef using the DuPont™BAX®system. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 81.
- 292.** Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet.* 1996; 348: 831-832.
- 293.** Werber D, Beutin L, Pichner R, Stark K, Fruth A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in food and patients, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1803-1806.
- 294.** Wick LM, Qi W, Lacher DW, Whittam TS. Evolution of genomic content in the stepwise emergence of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 2005; 187: 1783-1791.
- 295.** Wieler L H, Vieler E, Erpenstein C, Schlapp T, Steinrück H, Bauerfeind R, Byomi A, Baljer G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 2980-84.
- 296.** Williams ND, Torres AG, Lloyd SJ. Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. En: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America.* Torres AG (Ed). Bentham Books. Abril 2011. pp. 8-24.
- 297.** Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun.* 1996; 64: 1441-1445.
- 298.** Yousef AE, Carlstrom C. *Food Microbiology: A Laboratory Manual.* Wiley-Interscience. USA; 2003
- 299.** Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T, Karch H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(4): 1441-6.