

Universidad Nacional de San Martín
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán”
Maestría en Microbiología Molecular: 9na Cohorte.

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de:

MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

Detección, caracterización y análisis genotípico de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en muestras de cuero y carcasa de bovinos en frigoríficos de consumo interno

Autora: Vet. Mariana Cap

Directora de tesis: Mg. Marta Rivas

Co-directora: Mg. Isabel Chinen

*Tesis realizada en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos,
Instituto de Tecnología de Alimentos – INTA, Castelar.*

Buenos Aires, Julio 2016

Dedicado a Marcelo Masana

Confieso que esta tesis de maestría tuvo sus momentos frustrantes, obstáculos difíciles de sortear y sus momentos de tristeza. Sin embargo, lo más lindo que tuvo fueron las personas que formaron parte de ella.

Quiero agradecer muy especialmente...

...A Marcelo, a Marta y a Isabel por su infinita paciencia, por guiarme y por acompañarme en este aprendizaje.

... Al servicio de Fisiopatogenia ya que sin su solidaridad jamás hubiese podido finalizar la tesis.

... A mis compañeras del servicio de Fisiopatogenia y a mis compañeros del ITA porque no hay nada más lindo en la vida que trabajar rodeado de amigos.

...Al Pipi por las risas, por las cenas rápidas, por las peleas insignificantes y por su amor incondicional.

Y finalmente, a mi papá, a mi mamá y a mi hermana porque todo se los debo a ustedes. Gracias por enseñarme a luchar por lo que quiero, a disfrutar de la lucha y temerle a nada.

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. <i>Escherichia coli</i>	12
1.2. <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga (STEC).....	12
1.3. Marcadores de virulencia	13
1.3.1. Citotoxina	13
1.3.2. Plásmido pO157.....	13
1.3.3. Factores de adherencia intestinal codificados en la región LEE (del inglés, <i>locus enterocyte effacement</i>).....	14
1.3.4. Factores de adherencia intestinal fuera de la región LEE	14
1.4. Serotipos.....	14
1.5. Seropatotipos	15
1.6. Patogenia.....	16
1.7. Reservorio.....	17
1.8. Vías de transmisión.....	17
1.9. Transmisión en frigoríficos	18
1.9.1. Transporte y estabulación	18
1.9.2. El cuero como vehículo	18
1.9.3. Prevalencia en carcasas.....	19
1.9.4. Contaminación cruzada en planta de faena	19
1.10. Estudios de prevalencia en carcasa: técnicas de tamizaje y aislamiento..	20
1.11. Legislaciones nacionales e internacionales	20
1.12. SUH en Argentina.....	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Equipos, reactivos, medios y cepas controles	24
3.1.1. Equipos	24
3.1.2. Reactivos	25
3.1.3. Medios	26

3.1.4. Cepas controles.....	26
3.2. Toma de muestra y enriquecimiento	26
3.2.1. Lugar y período de muestreo.....	26
3.2.2. Tamaño de la muestra	26
3.2.3. Obtención de la muestra	27
3.2.4. Enriquecimiento	28
3.4 Procedimientos para la detección y caracterización de STEC a partir de las muestras enriquecidas.....	28
3.4.1. Etapa 1. Tamizaje del gen <i>stx</i>	31
3.4.1.1. Metodología A – Tamizaje del gen <i>stx</i> en zona de crecimiento confluyente por PCR de punto final.....	31
3.4.1.2. Metodología B – Tamizaje del gen <i>stx</i> con PCR en tiempo real.....	32
3.4.1.3. Metodología C – Tamizaje del gen <i>stx</i> con PCR de punto final.....	32
3.4.2. Etapa 2. Tamizaje del gen <i>eae</i>	33
3.4.2.1. Metodología B – Tamizaje del gen <i>eae</i> con PCR en tiempo real	33
3.4.2.2. Metodología C – Tamizaje del gen <i>eae</i> con PCR de punto final	33
3.4.3. Etapa 3. Tamizaje de serogrupos.....	34
3.4.3.1. Metodología B - Tamizaje de serogrupos con PCR en tiempo real ..	34
3.4.3.2. Metodología C - Confirmación de serogrupo con PCR de punto final	34
3.4.4. Etapa 4. Aislamiento	34
3.4.4.1. Aislamiento de cepas <i>stx</i> -positivas detectadas por Metodología A.	35
3.4.4.2. Aislamiento de cepas <i>stx</i> -positivas y/o serogrupo-positivas por Separación inmunomagnética detectadas por Metodologías B y C	35
3.4.5. Etapa 5. Caracterización de las cepas aisladas	36
3.4.5.1. Identificación bioquímica.....	36
3.4.5.2. Serotipificación	37
3.4.5.3. Caracterización genotípica	37
3.4.5.4. Subtipificación de toxina Shiga	38
3.4.6. Etapa 6. Relación clonal por electroforesis de campo pulsado (PFGE) .	38
3.4.6.1. Preparación de suspensiones celulares	38
3.4.6.2. Preparación de “plugs” (bloques de agarosa) y lisis de las células	39
3.4.6.3. Digestión del ADN en los bloques de agarosa con la enzima <i>Xba</i> I..	39
3.4.6.4. Preparación del gel y siembra de las muestras	39

3.4.6.5. Electroforesis de campo pulsado	40
3.4.6.6. Tinción y documentación de los resultados	40
3.4.6.7. Análisis de los patrones	40
3.5. Análisis estadístico.....	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Etapa 1 – Tamizaje del gen <i>stx</i>	42
4.1.1. Metodología A- Tamizaje del gen <i>stx</i> en zona de crecimiento confluyente por PCR de punto final	42
4.1.2. Metodología B- Tamizaje del gen <i>stx</i> por PCR en tiempo real	42
4.1.3. Metodología C- Tamizaje del gen <i>stx</i> por PCR de punto final.....	42
4.1.4. Comparación de resultados entre las 3 metodologías.....	43
4.2. Etapa 2 - Tamizaje del gen <i>eae</i>	46
4.2.1. Metodología B - Tamizaje del gen <i>eae</i> por PCR en tiempo real	46
4.2.2. Metodología C - Tamizaje del gen <i>eae</i> por PCR de punto final	46
4.3. Integración de resultados (Etapa 1 + Etapa 2).....	46
4.3.1. Tamizaje de los genes <i>stx</i> y <i>eae</i> por PCR en tiempo real.....	46
4.3.2. Tamizaje de los genes <i>stx</i> y <i>eae</i> por PCR punto final	47
4.3.3. Comparación de resultados entre las metodologías.....	47
4.4. Etapa 3 - Tamizaje de serogrupos	50
4.4.1. Tamizaje de serogrupos con PCR en tiempo real	50
4.4.2. Confirmación de serogrupos con PCR de punto final serogrupo-específica	51
4.5. Etapa 4 - Aislamiento	53
4.5.1. Aislamiento de cepas <i>stx</i> -positivas recuperadas por Metodología A	53
4.5.2. Aislamiento de cepas <i>stx</i> y/o serogrupo positivas recuperadas por SIM – Metodologías B y C.....	54
4.6. Etapa 5. Caracterización	54
4.6.1. Identificación bioquímica.....	55
4.6.2. Serotipificación.....	55
4.6.3. Caracterización genotípica	55
4.6.3.1. PCR <i>eae</i>	55
4.6.3.2. PCR <i>ehxA</i>	55
4.6.3.3. PCR <i>saa</i>	55

4.6.3.4. PCR <i>aggR</i>	56
4.6.4. Subtipificación de la toxina Shiga	56
4.7. Etapa 6. Electroforesis de campo pulsado	57
4.7.1. Patrones <i>XbaI</i> -PFGE de cepas toxigénicas	57
4.7.2. Análisis e interpretación de los patrones por serogrupo.....	58
4.7.2.1. <i>XbaI</i> -PFGE serogrupo O121	58
4.7.2.2. <i>XbaI</i> -PFGE serogrupo O26	59
4.7.2.3. <i>XbaI</i> -PFGE serogrupo O45	60
4.7.2.4. <i>XbaI</i> -PFGE serogrupo O103	60
4.7.3. Comparación con la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> O157 ..	61
4.7.4. Comparación de los patrones <i>XbaI</i> -PFGE de las cepas toxigénicas con la	
Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-O157	61
4.7.4.1. <i>XbaI</i> -PFGE O103:H2 <i>stx</i> _{1a} / <i>eae/ehxA</i>	61
4.7.4.2. <i>XbaI</i> -PFGE O130:H11 <i>stx</i> _{1a} / <i>stx</i> _{2a} / <i>saa/ehxA</i>	62
4.7.4.3. <i>XbaI</i> -PFGE O171:H2 <i>stx</i> _{2c}	62
4.7.4.4. <i>XbaI</i> -PFGE O178:H19 <i>stx</i> _{2c}	63
4.7.4.5. <i>XbaI</i> -PFGE ONT:H7 <i>stx</i> _{2c}	63
4.8. Análisis estadístico.....	65
4.9. Integración de resultados.....	67
5. DISCUSIÓN.....	70
6. CONCLUSIONES.....	80
7. ANEXO	90
7.1. Tabla 1. Denominación y caracterización genotípica de las cepas utilizadas	
como control positivo y negativo de las PCRs.	90
7.2. Tabla 2. Secuencias de cebadores, condiciones de PCR y tamaño de	
fragmentos de amplificación (pb).....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de muestreo en cuero. Carcass Sampling Protocol, <i>US Meat Animal Reseach Center</i>	27
Figura 2. Zonas de muestreo en carcasas. Carcass Sampling Protocol, <i>US Meat Animal Reseach Center</i>	28
Figura 3. Bolsa de Stomacher con esponja sumergida en TSBm.....	28
Figura 4. Placa de Agar MacConkey sembrada con el caldo enriquecido.....	31
Figura 5. Placa de Agar MacConkey con grilla de 20 cuadrados sembrados con colonias aisladas.....	35
Figura 6. Captura de pantalla de los resultados del BAX STEC Screening.....	47
Figura 7. Relación clonal entre las 10 cepas <i>E. coli</i> O121 aisladas de muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).	59
Figura 8. Relación clonal entre las 6 cepas <i>E. coli</i> O26 aisladas de muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).	60
Figura 9. Relación clonal entre las 2 cepas <i>E. coli</i> O45 aisladas en muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).	60
Figura 10. Relación clonal entre las 5 cepas <i>E. coli</i> O103 aisladas de muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).	61
Figura 11. Relación clonal entre la cepa <i>E. coli</i> O157 aislada de cuero y una cepa <i>E. coli</i> O157 aislada de materia fecal cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> O157 (Etapa 6).	61
Figura 12. Relación clonal entre la cepa STEC O103:H2 aislada de carcasa y una cepa STEC O103 aislada de un caso de SUH, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-O157 (Etapa 6).....	62
Figura 13. Relación clonal entre la cepa STEC O130:H11 aislada de carcasa y una cepa STEC O130:H11 aislada de alimento, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-O157 (Etapa 6).....	62

Figura 14. Relación clonal entre la cepa STEC O171:H2 aislada de cuero y una cepa STEC O171:H2 aislada de alimento, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-0157 (Etapa 6).....	63
Figura 15. Relación clonal entre la cepa STEC O178:H19 aislada de cuero y cinco cepas STEC O178:H19 aislada de animales, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-0157 (Etapa 6).....	63
Figura 16. Relación clonal entre la cepa STEC ONT:H7 (carcasa N° 11) y cuatro cepas STEC ONT:H7 aislada de alimentos, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-0157 (Etapa 6).....	64
Figura 17. Relación clonal entre la cepa STEC ONT:H7 (carcasa N° 38) y una cepa STEC ONT:H7 aislada de alimento, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-0157 (Etapa 6).....	64
Figura 18. Relación clonal entre la cepa STEC ONT:H21 (carcasa N°49) y una cepa STEC ONT:H21 aislada de un caso de SUH, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de <i>E. coli</i> no-0157 (Etapa 6).....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propuesta molecular para la caracterización de STEC (EFSA, 2013).....	16
Tabla 2. Tamizaje de los genes <i>stx</i> ₁ y/o <i>stx</i> ₂ por PCR de punto final (mPCR) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 - Metodología A).....	42
Tabla 3. Tamizaje del gen <i>stx</i> por PCR en tiempo real (BAX) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 – Metodología B).....	42
Tabla 4. Tamizaje del gen <i>stx</i> por PCR de punto final (PCR MK) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 – Metodología C).....	43
Tabla 5. Tamizaje del gen <i>stx</i> por Metodologías A, B y C en muestras de cuero, detallado por muestra (Etapa 1).....	44
Tabla 6. Tamizaje del gen <i>stx</i> por Metodologías A, B y C en muestras de carcasa, detallado por muestra (Etapa 1).....	45

Tabla 7. Tamizaje del gen <i>eae</i> por PCR en tiempo real (BAX) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 2 – Metodología B).....	46
Tabla 8. Tamizaje del gen <i>eae</i> por PCR de punto final (PCR <i>eae</i>) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 2 – Metodología C).....	46
Tabla 9. Tamizaje de los genes <i>stx</i> y <i>eae</i> por PCR en tiempo real en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 y 2 – Metodología B).....	47
Tabla 10. Tamizaje de los genes <i>stx</i> y <i>eae</i> por PCR de punto final en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 y 2 – Metodología C).....	47
Tabla 11. Tamizaje de los genes <i>stx</i> y <i>eae</i> por Metodologías B y C en muestras de cuero, detallado por muestra (Etapas 1 y 2).	48
Tabla 12. Tamizaje de los genes <i>stx</i> y <i>eae</i> por Metodologías B y C en muestras de carcasa, detallado por muestra (Etapa 1 y 2).	49
Tabla 13. Detección de los serogrupos (SG) O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR en tiempo real (BAX Panel 1, 2 y O157:H7), en muestras de cuero positivos para <i>stx</i> y <i>eae</i> por Metodologías B y C (Etapa 3).	50
Tabla 14. Detección de los serogrupos (SG) O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR en tiempo real (BAX Panel 1, 2 y O157:H7), en muestras de carcasa, positivas para <i>stx</i> y <i>eae</i> por Metodologías B y C (Etapa 3).	51
Tabla 15. Confirmación de los serogrupos (SG) O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR serogrupo-específica de punto final en muestras de cuero positivos para <i>stx</i> y <i>eae</i> por Metodologías B y C (Etapa 3).	52
Tabla 16. Confirmación de los serogrupos (SG) O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR de punto final (PCR serogrupo-específica) en muestras de carcasa positivas para <i>stx</i> y <i>eae</i> por Metodologías B y C (Etapa 3).	53
Tabla 17. Aislamiento de cepas <i>stx</i> -positivas por mPCR <i>stx</i> ₁ y <i>stx</i> ₂ en muestras de cuero y carcasa (Etapa 4 – Metodología A).....	53
Tabla 18. Aislamiento de cepas <i>E. coli</i> toxigénicas y no toxigénicas serogrupo positivas por SIM a partir de muestras de cuero y carcasa <i>stx</i> y <i>eae</i> positivas (Etapa 4).....	54

Tabla 19. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas STEC aisladas de cuero y carcasa, detallado por muestra (Etapa 5).....	56
Tabla 20. Caracterización genotípica de las cepas NO toxigénicas aisladas de cuero y carcasa, detallado por muestra (Etapa 5).....	57
Tabla 21. Patrón <i>Xba</i> I-PFGE y caracterización genotípica de las cepas STEC aisladas de cuero y carcasa (Etapa 5 y 6).....	58
Tabla 22. ANOVA de la variable, valor Ct para el gen <i>stx</i> en muestras de cuero.....	65
Tabla 23. Comparación de medias entre lotes del frigorífico A y del frigorífico B para la variable, valor Ct para el gen <i>stx</i> en muestras de cuero (Test de Tukey).....	66
Tabla 24. ANOVA de la variable, valor Ct para el gen <i>stx</i> en muestras de carcasa.....	66
Tabla 25. Comparación de medias entre lotes de ambos frigoríficos para la variable, valor Ct para el gen <i>stx</i> en muestras de carcasa (Test de Tukey).....	67
Tabla 26. Caracterización y relación clonal de las cepas aisladas de cuero y carcasa, detallado por muestra (Etapa 5 y 6).....	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli es parte de la flora facultativa que coloniza el intestino humano y de otros animales de sangre caliente. Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* están asociadas a gastroenteritis y diarrea en humanos. La infección se transmite persona-persona por ruta fecal oral o por ingestión de alimentos contaminados. Los aislamientos se diferencian serológicamente por los antígenos somático (O), flagelar (H) y capsular (K). Hasta el presente se identificaron 182 antígenos O, 56 H y 80 K.

Con el nombre de *E. coli* diarreigénico (DEC) se denomina a un grupo heterogéneo de cepas que poseen distintos factores de virulencia y distinta interacción con la mucosa intestinal del hospedador, causan diferentes síndromes diarreicos y tienen distinta epidemiología. Las cepas DEC son causa importante de morbi-mortalidad en los países en vías de desarrollo. Las cepas causantes de enfermedad diarreica han sido clasificadas en seis patotipos: enteropatógeno (del inglés, enteropathogenic *E. coli*, EPEC), enterotoxigénico (del inglés, enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), enteroinvasivo (del inglés, enteroinvasive *E. coli*, EIEC), enteroagregativo (del inglés, enteroaggregative *E. coli*, EaggEC), productor de toxina Shiga (del inglés, Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC) y de adherencia difusa (del inglés, diffusely adherent *E. coli*, DAEC). Dentro del patotipo STEC se identifica un subgrupo denominado enterohemorrágico (del inglés, enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) que está asociado a cuadros más graves de enfermedad.

1.2. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC)

Knowalchuk y col., en 1977, fueron los primeros en informar que cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea y de cerdos con edema de pulmón producían una toxina a la que se denominó Verotoxina, debido al efecto citotóxico en células Vero. Pocos años después se aislaron cepas de *E. coli* que producían un efecto citotóxico en células HeLa, el cual podía ser neutralizado por un antisuero anti-toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 por lo cual, se las llamó “Shiga-like toxin” (O’Brien y col., 1982). En 1982, en Michigan y Oregon (EE.UU.) se produjeron dos brotes de colitis

hemorrágica (CH) causados por el consumo de hamburguesas, identificándose por primera vez el serotipo O157:H7 como patógeno humano (Riley y col., 1983). La asociación de síndrome urémico hemolítico (SUH) e infección por STEC fue demostrada por primera vez por Karmali y col., (1985) en Canadá y, posteriormente confirmada en distintos países.

1.3. MARCADORES DE VIRULENCIA

1.3.1. Citotoxina

La toxina Shiga (Stx) es el principal factor de virulencia de STEC (Calderwood y col., 1996), poseen estructura de subunidades AB₅ y están codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa, y la B (7,5 KDa) es la que se une al receptor celular específico Gb3 (globotriosilceramida). Stx se clasifica en dos tipos, Stx1 y Stx2, según la neutralización del efecto citotóxico en células Vero o HeLa con anticuerpos específicos, o por la detección de genes *stx* mediante técnicas de biología molecular. Dentro de cada tipo de Stx se describieron diferentes subtipos y variantes de acuerdo a su actividad biológica, reactividad serológica, unión con el receptor y por la capacidad de ser activada por la elastasa de la mucosa intestinal (Scheutz y col., 2012). La clasificación de las toxinas no es sólo taxonómica, ya que algunas variantes son clínicamente más importantes al estar asociadas a cuadros más severos de enfermedad humana. Hasta el momento se identifican 3 variantes para Stx1 (*stx1a*, *stx1c*, *stx1d*) y 7 variantes para Stx2 (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*).

1.3.2. Plásmido pO157

Contiene diversos genes que codifican para los siguientes factores de virulencia: serina proteasa extracelular (*espP*), catalasa-peroxidasa (*katP*), enterohemolisina (*ehxA*) y sistema de secreción tipo III (*etp*) (Schmidt y col., 1996).

1.3.3. Factores de adherencia intestinal codificados en la región LEE (del inglés, *locus enterocyte effacement*)

En la isla de patogenicidad denominada LEE se encuentra el gen *eae* que codifica para una proteína denominada intimina, responsable de la unión íntima de la bacteria al enterocito y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E (del inglés, *attaching and effacing*) (McDaniel y col., 1995). La región LEE codifica además reguladores transcripcionales, chaperonas, el sistema de secreción tipo III, entre otros. El patotipo EPEC se caracteriza por ser LEE-positivo pero *stx*-negativo.

1.3.4. Factores de adherencia intestinal fuera de la región LEE

Incluye a las adhesinas Iha (del inglés, *iron regulated gene A homologue adhesin*) (Tarr y col., 2000); Efa 1 (del inglés, *EHEC factor for adherence*) (Nicholls y col., 2000). LPF_{0157/01-141}; LPF_{0157/01-154} y LPF_{0113/01-154} (del inglés, *long polar fimbria*) (Torres y col., 2002; Doughty y col., 2002). Estas adhesinas están codificadas en islas genómicas únicas de *E. coli* EDL933. Otras tres adhesinas, ToxB, Saa (del inglés, *STEC autoagglutinating adhesin*, identificada en cepas LEE-negativas) (Paton y col., 2001) y Sfp (del inglés, *sorbitol fermenting plasmid*) (Jenkis y col., 2003) están codificadas en el megaplásmido de cepas STEC.

1.4. SEROTIPOS

Más de 100 serotipos de STEC fueron asociados a enfermedad humana (Paton y Paton, 2000). A pesar que *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuentemente asociado a diarrea sanguinolenta y SUH, el aislamiento de cepas STEC no-O157 a partir de casos clínicos, brotes o fuentes ambientales ha ido aumentando en los últimos años. Según datos publicados por Food Net, en EE.UU., entre 2000 y 2010 se registraron 2006 casos de infección por STEC no-O157 y 5688 casos de STEC O157. La incidencia de STEC no-O157 aumentó de 0,12 por cada 100000 habitantes, en 2000, a 0,95 por cada 100000 habitantes, en 2010. Mientras que la incidencia de STEC O157 disminuyó de 2,17 por cada 100000 habitantes, en el 2000, a 0,95 por cada 100000 habitantes en 2010. En el 85% de los casos se

pudo determinar el serogrupo, el más común fue el O26 (26%), seguido por el O103 (22%), O111 (19%), O121 (6%), O45 (5%) y O145 (4%). Los 6 serogrupos mencionados, representaron el 83% de las cepas STEC no-O157 (Gould y col., 2013). Basado en estos datos se aumentaron los esfuerzos para detectar los diferentes serogrupos de STEC, pero a diferencia de lo que ocurre con O157, estos serogrupos no poseen marcadores fenotípicos, ya que en general fermentan el sorbitol, y poseen actividad de β -glucuronidasa. Para su identificación y aislamiento se requiere la aplicación de estrategias más complejas.

1.5. SEROPATOTIPOS

Con el objeto de brindar una herramienta a las autoridades de Salud Pública que permita identificar las cepas STEC de mayor riesgo para el hombre, Karmali y col. (2003) crearon una clasificación empírica de cepas STEC en cinco seropatotipos. La misma se basa en la incidencia de los distintos serotipos en enfermedad humana, y la asociación con la ocurrencia de brotes y enfermedades severas en el hombre. A pesar de presentar ciertas limitaciones, esta clasificación permite observar la relación de los diferentes serotipos con perfiles genéticos característicos de factores de virulencia. El seropatotipo A, es el de mayor riesgo, la incidencia relativa es alta y la frecuencia de ocurrencia de brotes es común. Está asociado a enfermedades severas e incluye los serotipos: O157:H7 y O157:NM. El seropatotipo B presenta una incidencia relativa moderada, la frecuencia de ocurrencia de brotes no es común, está asociado a enfermedades severas e incluye a los serotipos: O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 y O145:NM. El seropatotipo C presenta baja incidencia relativa, baja frecuencia de ocurrencia de brotes, está asociado a enfermedades severas e incluye a los serotipos: O8:H19, O91:H21, O104:H21, O113:H21, entre otros. El seropatotipo D presenta baja incidencia, baja frecuencia de ocurrencia de brotes, no está asociado a enfermedades severas e incluye serotipos variados. Finalmente, el seropatotipo E presente incidencia nula en humanos, nula frecuencia de brotes, e incluye serotipos variados.

El brote ocurrido en Alemania en el año 2011 puso en evidencia las limitaciones de esta clasificación. Durante este brote se contabilizaron 3816 casos de diarrea, de

los cuales hubo 54 muertos y 845 casos de SUH (Frank y col., 2011). La cepa recuperada se caracterizó como STEC/EaggEC O104:H4 ya que presentaba los genes típicos de una EaggEC (*aaiC* del inglés, proteína secretada por EaggEC y *aggR* del inglés, plásmid encoded regulator) y el gen que codifica la toxina Shiga 2a (*stx_{2a}*). Los otros genes típicos de STEC tales como *stx₁*, *eae*, *ehxA* estaban ausentes. Este brote cobró mucha importancia por la cantidad de casos, la edad de los pacientes, mayormente adultos, que desarrollaron SUH y por las inusuales características de virulencia de la cepa. Por tal motivo, un grupo de expertos del European Food Safety Authority (EFSA), revisó la clasificación en serotipos de Karmali y col. (2003) y propuso un esquema alternativo de clasificación, considerando no sólo la presencia de *stx* sino también de los genes *aaiC* y *aggR*. Dentro de este esquema queda incluida la cepa O104:H4, causante del brote de Alemania en 2011.

Tabla 1. Propuesta molecular para la caracterización de STEC (EFSA, 2013)

Grupo	Genes	Serogrupo	Riesgo potencial	
			Diarrea	CH/SUH
I	<i>eae</i> -positivo o (<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>)-positivos	O157, O26, O103, O145 O111 y O104	Alto	Alto
II	<i>eae</i> -positivo o (<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>)-positivos	Cualquier otro	Alto	Desconocido
III	<i>eae</i> -negativo o (<i>aaiC</i> y <i>aggR</i>)-negativos	Cualquier otro	Desconocido	Desconocido

1.6. PATOGENIA

Las cepas STEC alcanzan el intestino y se adhieren a los enterocitos sin invadirlos. La adherencia bacteriana, mediada por fimbrias causa el alargamiento de las microvellosidades. Además, se produce la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión A/E y acumulación de filamentos de actina en el citoplasma. Esta reducción de la superficie absorptiva causa una diarrea sin sangre. La toxina Shiga liberada se une a la célula epitelial del intestino por interacción con el receptor globotriaosilceramida (Gb3) que se encuentra en la membrana apical. La toxina es luego internalizada e inhibe la síntesis proteica, provocando la muerte celular. 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. Se produce un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos provocando diarrea sanguinolenta. Stx entra

a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen el receptor Gb3. El LPS bacteriano y las citoquinas del huésped aumentan la sensibilidad a las Stxs incrementando la disponibilidad de dichos receptores. 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 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, se oclucionan los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. También se observan lesiones trombóticas, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas.

1.7. RESERVORIO

Los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular fueron descriptos como los principales reservorios de STEC (Arthur y col., 2002). En distintos países, entre los que se incluye a la Argentina, se realizaron numerosos estudios sobre la prevalencia de STEC que permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio (Masana y col., 2010, 2011; Padola y col., 2004). En Chile se demostró que el 34,5% del ganado faenado era portador de STEC (Ríos y col., 1999). En Argentina la frecuencia de detección en ganado bovino fue del 35-36,6% para STEC no-O157 (Meitchtri y col., 2004; Tanaro y col., 2012) y del 0,5% para STEC O157:H7 (Chinen y col., 2003; Fernández y col. 2009). Los serotipos más prevalentes en ganado bovino argentino fueron O178:H19, O8:H19 y O130:H11, y los perfiles genéticos *stx*₁/*stx*₂/*ehxA/saa* y *stx*_{2c}/*ehxA/saa* (Fernández y col., 2010; Masana y col., 2011;). Del bovino se han aislado una gran variedad de serotipos de STEC, pero solo una minoría pertenecen a los seropatotipos A y B.

1.8. VÍAS DE TRANSMISIÓN

La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o

insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, leche no pasteurizada, yogur, jugos de manzana no pasteurizados, brotes de soja, entre otros (Rivas y col., 2008; Chinen y col., 2009). La dosis infectiva es de 10 a 100 bacterias por gramo de alimento. La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces de los animales. Durante la faena se contamina la superficie de la res, y en el procesamiento se transfiere la contaminación bacteriana al interior de la carne, donde los microorganismos pueden resistir una cocción insuficiente. La frecuencia de aislamiento de cepas no-O157 a partir de muestras de alimentos ha sido superior a la de *E. coli* O157, con prevalencias que van desde 2,4 a 30% en carne cruda y de 1,7 a 58% en carcasas de bovino (Erickson y Doyle, 2007).

1.9. TRANSMISIÓN EN FRIGORÍFICOS

1.9.1. Transporte y estabulación

Las condiciones en las que los animales son transportados hasta el frigorífico aumenta la prevalencia de STEC, ya que favorece la contaminación cruzada entre animales. En un estudio realizado por Arthur y col. (2007) se evidenció que la prevalencia de STEC O157 en cueros aumentó de 50,3% a 92,4% desde que los animales fueron cargados en el camión hasta el desollado en la planta frigorífica. El estudio de Dewel y col. (2008) demostró que haciendas que se desplazaban largas distancias (>160,9 km) tenían el doble de riesgo de portar STEC que las que se trasladaban distancias más cortas, y que los animales guardados en corrales contaminados con STEC tenían tres veces más riesgo de portar la bacteria que los guardados en corrales limpios.

1.9.2. El cuero como vehículo

Diversos estudios evidencian que los cueros actuarían como fuente primaria de contaminación de las carcasas con STEC O157 y no-O157. La prevalencia de *E. coli* O157 en cueros varió de 4,7% a 75,5% en bovinos de feed-lot (Arthur y col., 2004). Posteriormente, Arthur y col. (2011) demostraron que la supervivencia de STEC O157 en cueros de animales vivos fue de aproximadamente 9 días, por lo cual si la

contaminación ocurriera en el traslado o en el corral, las cepas STEC llegarían viables a la planta de faena. Las similitudes encontradas entre los perfiles de macrorrestricción obtenidas por Electroforesis de campo pulsado (del inglés, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE), indicaron que el origen de las cepas aisladas de carcasas podía ser el cuero del propio animal o del cuero de otro animal faenado en la misma fecha.

1.9.3. Prevalencia en carcasas

La prevalencia reportada de *E. coli* O157 en carcasas post-tratamiento es baja (<3%) (Rhoades y col., 2009). Estudios más recientes también demostraron que la prevalencia de STEC de los serogrupos denominados “Big Six” (O26, O45, O103, O111, O121 y O145) también es baja. El Food Safety and Inspection Service (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), provee una lista de ingredientes seguros y adecuados para su uso en la producción de carne de vaca, pollo y huevo (Directive 7120.1), en ella se incluyen los antimicrobianos aprobados para su uso en cueros y carcasas. Los productos más frecuentemente utilizados son: ácido láctico, clorito de sodio acidificado, ácidos orgánicos, y cloro, entre otros. En la Unión Europea el ácido láctico fue aprobado recientemente para su uso en carcasas (Commission Regulation EC N° 101/2013).

1.9.4. Contaminación cruzada en planta de faena

En la Circular N°3834 (2008) del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) se identifican a las siguientes maniobras como puntos críticos de contaminación: duchado del animal vivo, atado de culata, cuereado, aserrado de pecho, atado de esófago y evisceración. En cada punto de control se evalúa la aplicación de buenas prácticas de manufactura (BPM) y los procedimientos operativos estandarizados de saneamiento (POES). Se recomienda verificar la correcta limpieza de los animales previo al sacrificio, medidas de higiene y desinfección de las instalaciones, desempeño de los operarios respecto a las tareas operativas, evaluar el estado de salud de los operarios, capacitar a los operarios, verificar los flujos de aire de zonas más contaminantes (tripera, mondonguería, etc.) hacia zonas más limpias, evaluar la cantidad de animales

sacrificados versus capacidad operativa óptima, verificar los orígenes de la materia prima, campos proveedores, feed-lot, etc. Cualquier falla en los puntos mencionados puede desencadenar la contaminación de las carcasas. Por otra parte, está probado que *E. coli* puede sobrevivir un tiempo considerable en acero inoxidable (ca. 8 días a 4°C) (Farrel y col, 1998) y plástico (Ak y col., 1994) por lo que estas superficies podrían actuar como fuente de contaminación intermedia durante el procesamiento de los alimentos.

1.10. ESTUDIOS DE PREVALENCIA EN CARCASA: TÉCNICAS DE TAMIZAJE Y AISLAMIENTO

Desde la década de los '90 grupos de INTA y del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" han investigado la prevalencia de STEC en el reservorio bovino. Los resultados obtenidos permitieron establecer una primera línea de base en el conocimiento de la contaminación con STEC (Masana y col., 2011), y en particular del serotipo O157:H7 (Masana y col., 2010) en frigoríficos de exportación de carne vacuna. En aquel entonces, la técnica de tamizaje utilizada fue una PCR de punto final, y las muestras que se analizaron fueron de materia fecal y de carcasa. Sin embargo, conforme avanzó la tecnología también lo hicieron las técnicas de tamizaje y aislamiento de STEC. En la última guía de laboratorio de USDA-FSIS (MLG 5A.04/MLG 5B.05) una de las técnicas que se recomienda para el tamizaje es una PCR en tiempo real que utiliza un kit cerrado denominado BAX STEC Screening, desarrollado por DuPont y para el aislamiento una Separación Inmunomagnética (SIM) serogrupo específica. El protocolo se encuentra validado para muestras de carne, esponjeados ambientales y esponjeados de carcasas. Por el momento, no hay un protocolo validado para muestras de cuero.

1.11. LEGISLACIONES NACIONALES E INTERNACIONALES

Según SENASA, todos los establecimientos deben aplicar un sistema de muestreo y verificación tomando como indicador de contaminación el análisis de *E. coli* genérica. Se considera aceptable cuando se encuentra por debajo de 5 UFC/cm². Para el monitoreo de STEC se indica 1 muestra semanal compuesta por 5 subunidades correspondientes a la misma carcasa, cada subunidad debe ser de

100 gramos y debe corresponder al sector de: cogote, brazuelo, lomo, pecho y nalga de afuera. Si la muestra resulta positiva para genes *stx* y *eae* se considera presencia presuntiva de STEC potencialmente patógena para humanos. Muestras positivas para genes *stx*, *eae* y para algunos de los serogrupos O45, O26, O103, O111, O121, O145, O157, se considera presencia presuntiva de STEC altamente patógena para humanos. Si hay aislamiento de la cepa que porta los genes *stx* y *eae* se informa presencia de STEC protencialmente patógena para humanos. Y si pertenece a algunos de los serogrupos prevalentes se informa presencia de STEC altamente patógena para humanos. (Circular N° 4032 del SENASA, 2012).

Organismos internacionales como el USDA-FSIS crearon un sistema de muestreo y análisis para monitorear la presencia de STEC en alimentos cárnicos y frigoríficos (USDA-FSIS MLG 5A.04/MLG 5B.05). En este caso, recomienda hacer un esponjado de las carcasa en lugar de tomar muestras de cortes. El criterio para definir la peligrosidad de las muestras es el mismo al utilizado por SENASA. Para EFSA (ISO/TS 13136:2012) es causa de alerta la simple detección del gen *stx* por PCR en tiempo real.

1.12. SUH EN ARGENTINA

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 y la segunda de insuficiencia renal crónica, responsable del 10% de todos los trasplantes en niños y adolescentes. Durante el período 2011-2015 se notificaron 1953 casos de SUH, siendo la tasa de notificación para todo el período de 0,93 casos cada 100.000 habitantes/año y la mediana de casos anuales notificados de 402. La tasa de incidencia en menores de 5 años en dicho período fue de 8,5 casos cada 100.000 menores/año, este valor es el más alto del mundo. Los niveles más elevados están en las provincias de Buenos Aires y Neuquén, con aproximadamente 20 casos cada 100.000 niños menores de 5 años. Entre 2004 y 2010 el principal serotipo de STEC asociado epidemiológicamente a SUH fue O157:H7 (>70%). Sin embargo, el 25,4% de las cepas STEC aisladas de infecciones humanas correspondieron a no-O157. Los serogrupos no-O157 responsables de la

mayor parte de las infecciones en nuestro país son: O145, O121, O26, O174, O111 y O103 (Boletín Integrado de Vigilancia del Ministerio de Salud de la Nación).

Dada la importancia que tiene el SUH en nuestro país resulta necesario ampliar los conocimientos de prevalencia de STEC en los frigoríficos que abastecen a la población, tanto cuando ingresa el animal, tomando una muestra de cuero, como cuando egresa, tomando una muestra de carcasa. Además, muy poco se sabe de la prevalencia de los serogrupos más representativos de STEC no-O157 en frigoríficos de consumo interno.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer la frecuencia de STEC, fundamentalmente de los serogrupos O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145, su caracterización y su relación clonal en muestras de cuero y carcasa de bovinos en frigoríficos de consumo interno.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la frecuencia de detección de STEC en muestras de carcasa y cuero de bovino en frigoríficos de consumo interno, mediante diferentes metodologías que utilizan *stx*, *eae*, y el antígeno somático O como marcadores moleculares.
- Comparar los resultados de detección de los genes *stx* y *eae* de STEC utilizando diferentes metodologías.
- Establecer el potencial patogénico de las cepas aisladas mediante el análisis de los factores de virulencia.
- Establecer la relación clonal de las cepas aisladas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EQUIPOS, REACTIVOS, MEDIOS Y CEPAS CONTROLES

3.1.1. Equipos

Balanza de 0,1 g de sensibilidad (Ohaus, Pa 224c, EE.UU.)

Stomacher (AES, Easy Mix, Francia)

Estufas de cultivo a 42°C y a 37°C (Sanyo, Japón)

Bloques fríos 4±1°C (DuPont, EE.UU.)

Bloques congelados a -20°C (DuPont, EE.UU.)

Bloque seco 100°C (Labnet, Taiwan)

Bloque seco 37°C y 95°C (DuPont, EE.UU.)

Micropipetas de 10 µl, 20 µl, 200 µl y 1000 µl (Eppendorf, EE.UU.)

BAX® System Q7 Instrument (DuPont, EE.UU.)

Termociclador para PCR (Eppendorf, Mastercycler, EE.UU.)

Vortex (Vicking, Argentina)

Centrífuga (Eppendorf, EE.UU.)

Agitador rotatorio (DynaL, Noruega)

Gradilla magnética (DynaL, Noruega)

Cuba y fuente de poder para electroforesis (BIORAD, EE.UU.)

Transiluminador UV (UVP, Inglaterra)

Cámara fotográfica (Canon, Power Shot G6, Japón)

Freezer -70°C (Haier, China)

Freezer -20°C (Whirlpool, EE.UU.)

Heladera 4°C (Whirlpool, EE.UU.)

Baño termostático con agitación (54°C) (Julabo, SW-20C, Alemania)

Baño termostático estacionario (55-60°C) (Guivart, ABMK2, Argentina)

Turbidímetro (Microscan, Inglaterra)

Equipo de Electroforesis CHEF DR III (BIORAD, EE.UU.)

Moldes reutilizables (BIORAD, EE.UU.)

Portapeine (BIORAD, EE.UU.)

Armador del gel (BIORAD, EE.UU.)

Peine (BIORAD, EE.UU.)

Nivel (BIORAD, EE.UU.)

3.1.2. Reactivos

BAX® System Real-time PCR Assay STEC Screening (DuPont, EE.UU.)

BAX® System Real-time PCR Assay STEC Panel 1 (DuPont, EE.UU.)

BAX® System Real-time PCR Assay STEC Panel 2 (DuPont, EE.UU.)

BAX® System Real-time PCR Assay *E. coli* O157:H7 (DuPont, EE.UU.)

Buffer Tris 10 mM: EDTA 1 mM, pH 8,0 (TE 1X)

Buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X

Kit de extracción de ADN (Promega, EE.UU.)

Buffer PCR 10X, MgCl₂ 50 mM y Taq polimerasa: 5 U/μl (Invitrogen, EE.UU.)

Mezcla de dNTPs: dATP, dCTP, dGTP y dTTP: 2,5 mM (Invitrogen, EE.UU.)

Agarosa (Invitrogen, EE.UU.)

Buffer Tris Acetato EDTA 1X (TAE)

Bromuro de etidio (BrEt 10 mg/ml) (Promega, EE.UU.)

Buffer de siembra: Xilene cianol, 0,25%, glicerol en agua 30%

Partículas inmunomagnéticas para *E. coli* O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145. (Invitrogen, EE.UU.)

Buffer fosfato salino 1X (PBS 1X) (BIORAD, EE.UU.)

E-buffer (100 ml PBS 1X: 0,5 g albúmina bovina: 12,5 μl Tween 80)

Mastermix, HotStart (Qiagen, Alemania)

Antisueros anti-O (Staten Serum Institute, Dinamarca)

Antisueros anti-H (Denka Seiken, Japon)

Solución fisiológica formolada 1% (v/v)

Buffer de suspensión celular (BSE) (Tris 100 mM: EDTA 100 mM, pH 8,0)

Buffer Tris Borato EDTA 0,5X (TBE 0,5X)

Proteinasa K (20 mg/ml) (Fermentas, EE.UU.)

Agarosa (SeaKem Gold, EE.UU.)

Gel Red (Invitrogen, EE.UU.)

Galerías API 20 E (Biomerieux, Francia)

API 20 E Reactivos complementarios (Biomerieux, Francia)

3.1.3. Medios

Agua Peptonada 0,1% (AP 0,1%) (Oxoid, Inglaterra)

Agar MacConkey (MAC) (Oxoid, Inglaterra)

Caldo Trypticase Soja modificado (TSBm) (Oxoid, Inglaterra)

Agar Sorbitol MacConkey (SMAC) (Oxoid, Inglaterra)

Agar Trypticase Soja (TSA) (Oxoid, Inglaterra)

CHROMagar STEC (CHROMagar, Francia)

Medio de Craigie fraccionado en tubo de ensayo con varilla de vidrio central

Agar tripticase de soja fraccionado en forma de pico de flauta en tubo de ensayo

3.1.4. Cepas controles

Las cepas utilizadas como control positivo y negativo en cada PCR se detallan en la Tabla 1 del ANEXO.

3.2. TOMA DE MUESTRA Y ENRIQUECIMIENTO

3.2.1. Lugar y período de muestreo

Se realizó un estudio observacional, transversal, descriptivo y prospectivo.

El lugar de muestreo fueron 2 frigoríficos ubicados en la provincia de Buenos Aires, destinados al consumo interno. El período de muestreo fue de Noviembre de 2014 a Septiembre de 2015. Cada frigorífico se visitó 5 veces, el total de visitas fue de 10: 3 en primavera 2015, 3 en otoño 2015 y 4 en verano 2014/2015.

3.2.2. Tamaño de la muestra

Se tomaron 12 muestras por visita, 6 de cuero y 6 de carcasa. Las 12 muestras pertenecían al mismo lote, y la muestra de cuero y carcasa pertenecía al mismo animal.

3.2.3. Obtención de la muestra

Las muestras de cuero se tomaron luego del noqueo y antes del desollado. La zona de muestreo corresponde a la zona anterior de costillas y pecho, como señala la fotografía presentada a continuación (Figura 1).

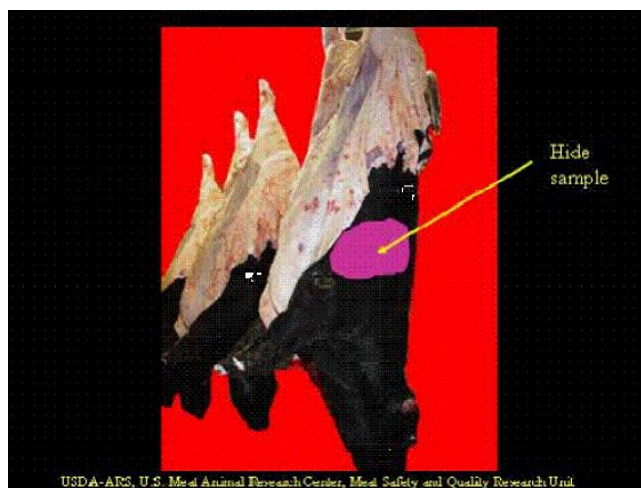


Figura 1. Zona de muestreo en cuero. Carcass Sampling Protocol, *US Meat Animal Research Center*.

El protocolo de muestreo se realizó según el Carcass Sampling Protocol, *US Meat Animal Research Center*. Se agregaron 25 ml de AP 0,1% a una bolsa de Stomacher conteniendo 1 esponja deshidratada. Se escurrió la esponja presionando la bolsa externamente y se la extrajo con guantes. Se esponjaron 1000 cm² realizando aproximadamente 10 barridos cubriendo el área de un lado, 5 veces en sentido izquierdo-derecho-izquierdo, se invirtió la esponja y 5 veces sentido arriba-abajo-arriba. Finalmente se colocó la esponja en la bolsa de Stomacher.

Las muestras de carcasa se tomaron antes de su ingreso a la cámara de refrigeración. Se procedió de igual forma que para los cueros, con la salvedad de que se esponjaron 2 zonas, primero la zona anterior (pecho, 4000 cm²) y en segundo lugar la zona posterior (cuarto trasero, 4000 cm²). La superficie total muestreada fue de aproximadamente 8000 cm² (Figura 2).

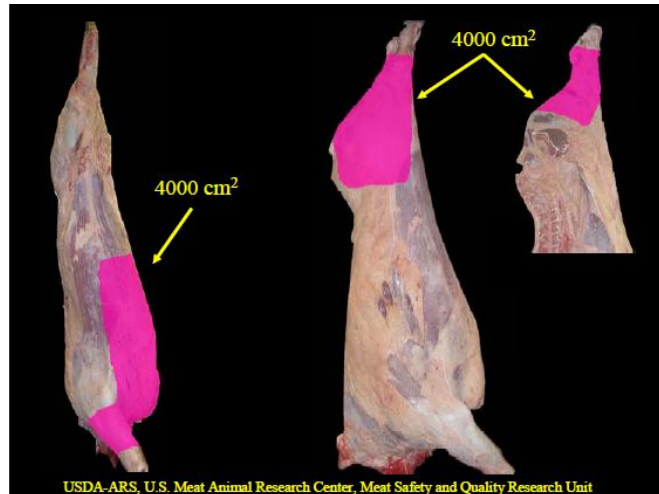


Figura 2. Zonas de muestreo en carcasas. Carcass Sampling Protocol, US Meat Animal Research Center.

3.2.4. Enriquecimiento

A cada bolsa de Stomacher, con la esponja sumergida en 25 ml de AP 0,1%, se le agregó 125 ml de TSBm, incubándose a 42°C por 18h.

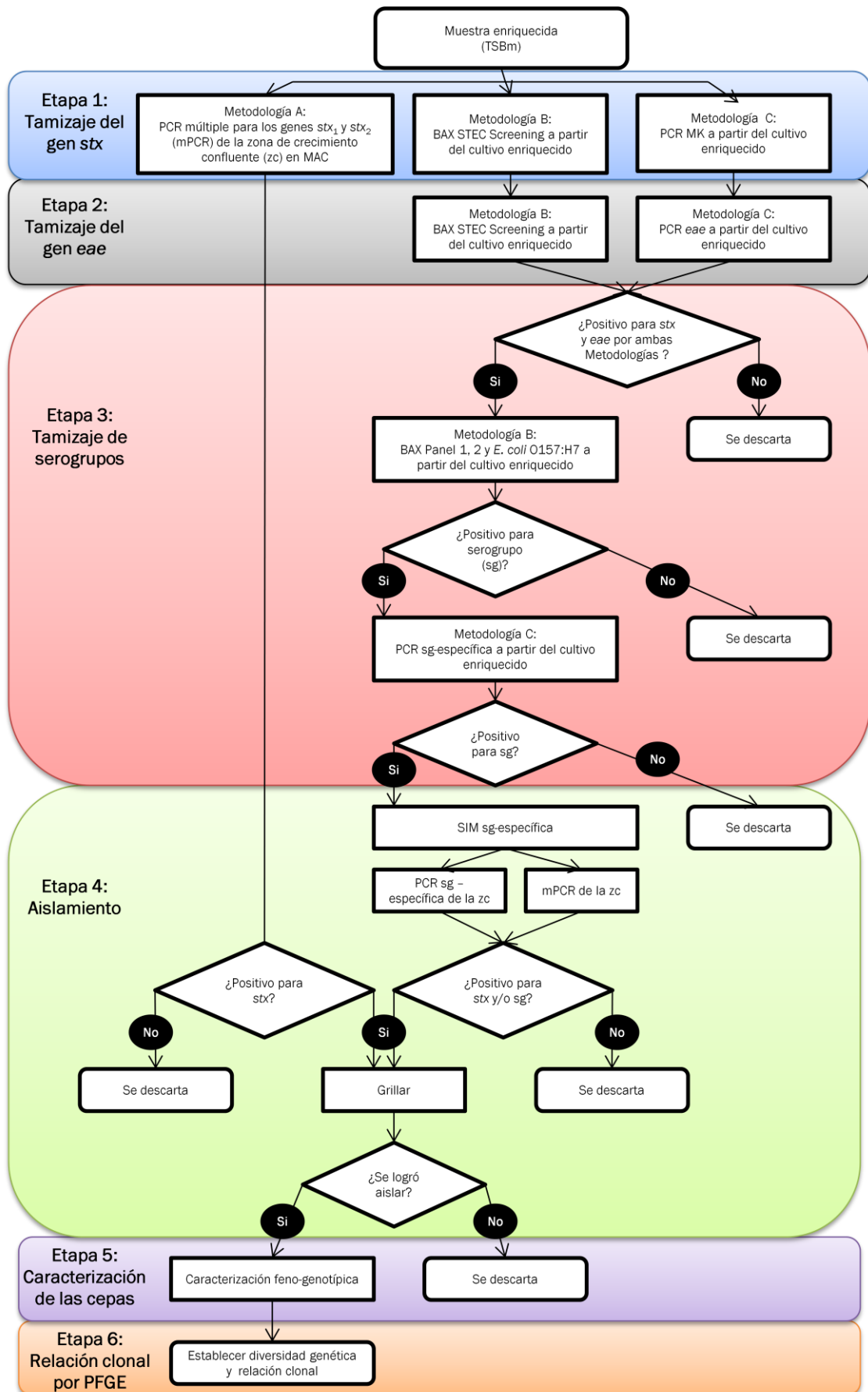


Figura 3. Bolsa de Stomacher con esponja sumergida en TSBm.

3.4 PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE STEC A PARTIR DE LAS MUESTRAS ENRIQUECIDAS

Las muestras enriquecidas fueron procesadas en 6 etapas, siguiendo distintas metodologías (Flujograma):

Flujograma:



Etapa 1) Tamizaje del gen *stx*

Se utilizaron 3 metodologías denominadas: A, B y C.

En la Metodología A, se sembró el volumen de un ansa rulo (0,001 ml) en una placa de MAC y se incubó a 37°C por 18 h. De la zona de crecimiento confluyente se tomó una ansada y se procesó por una PCR múltiple de tamizaje para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂.

En las Metodologías B y C se trabajó directamente a partir de la muestra enriquecida.

En la Metodología B, se realizó una PCR en tiempo real, con el kit BAX STEC Screening.

En la metodología C, una PCR de punto final denominada PCR MK.

Etapa 2) Tamizaje del gen *eae*

Se utilizaron 2 metodologías: B y C, en ambas se trabajó directamente a partir de la muestra enriquecida. En la Metodología B, el BAX STEC Screening, incluyó la etapa de tamizaje del gen *eae* y en la Metodología C se utilizó la PCR *eae*, de punto final.

Etapa 3) Tamizaje de los serogrupos

En esta etapa sólo se analizaron las muestras que resultaron positivas para *stx* y *eae* por las Metodologías B y C. Para el tamizaje, se utilizó una PCR en tiempo real [BAX Panel 1 (*E. coli* O26, O111 y O121), Panel 2 (*E. coli* O45, O103 y O145) y *E. coli* O157:H7]; para la confirmación se utilizó una PCR de punto final serogrupo-específica.

Etapa 4) Aislamiento

Se procedió al aislamiento de la cepa *stx*-positiva a partir de las muestras que resultaron positivas en la Etapa 1 por la Metodología A (Tamizaje de *stx*). Además, se realizó el aislamiento por SIM serogrupo-específica en aquellas muestras positivas para *stx*, *eae* y serogrupo por Metodologías B y C. Por PCR de punto final, se analizó la zona de crecimiento confluyente para la detección de los genes *stx*₁, *stx*₂ y serogrupo. Finalmente, se prosiguió con el procedimiento de aislamiento de la cepa *stx*-positiva y/o serogrupo-positiva.

Etapa 5) Caracterización de las cepas

Se buscaron los genes correspondientes a los principales factores de virulencia de STEC: *eae*, *saa*, *ehxA* y *aggR*. Además, se determinaron las variantes de toxina Stx1 y Stx2.

Etapa 6) Relación clonal por electroforesis en campo pulsado

A través de esta técnica se estableció la relación clonal entre las cepas aisladas. Asimismo, los patrones de las cepas STEC se compararon con los cargados en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E.coli* O157 y no O157.

3.4.1. Etapa 1. Tamizaje del gen *stx*

3.4.1.1. Metodología A – Tamizaje del gen *stx* en zona de crecimiento confluyente por PCR de punto final

3.4.1.1.1. Preparación de templados

El caldo enriquecido se sembró por agotamiento en superficie en una placa de MAC y se incubó a 37°C por 18 h. Para la preparación del ADN templado se tomó una ansada de cultivo correspondiente a la zona de crecimiento confluyente, identificada en la ilustración con una línea negra (Figura 4). La ansada se resuspendió en 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X, se hirvió a 100°C por 15 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min.

Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de una ansada de cultivo puro.

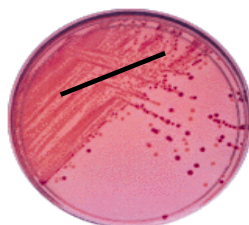


Figura 4. Placa de Agar MacConkey sembrada con el caldo enriquecido.

3.4.1.1.2. PCR múltiple para los genes *stx*₁ y *stx*₂ (mPCR)

Se realizó según Leotta y col. (2005) con algunas modificaciones. Los cebadores, sus secuencias, el gen target y las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 2 del ANEXO.

3.4.1.2. Metodología B – Tamizaje del gen *stx* con PCR en tiempo real

3.4.1.2.1. Preparación de templados

Los reactivos necesarios para la reacción son provistos en el kit BAX STEC Screening. Se preparó una solución de 12 ml de buffer con 150 µl de proteasa. A 200 µl de dicha solución se le agregó 20 µl del caldo enriquecido. Las condiciones indicadas por el fabricante para la lisis incluyen 2 etapas de calentamiento: la primera a 37°C por 20 min y la segunda a 95°C por 10 min. Una vez finalizada la lisis los tubos se mantuvieron en refrigeración.

Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de un caldo de cultivo puro.

3.4.1.2.2. BAX STEC Screening: *stx*

Se utilizó el kit BAX STEC Screening, que amplifica una región común del gen *stx*, para ello se transfirieron 30 µl del lisado en cada tubo de PCR, se colocaron las tapas ópticas correspondientes y se los ubicó en el equipo BAX® System Q7 para el inicio de la corrida de PCR.

3.4.1.3. Metodología C – Tamizaje del gen *stx* con PCR de punto final

3.4.1.3.1. Preparación de templados

Cuero: para decantar la suciedad que este tipo de muestras suele presentar y que las células queden suspendidas en el sobrenadante, se tomó 1 ml del caldo enriquecido y se centrifugó a 2170 rpm durante 10 min. Para la extracción se utilizó el kit “Wizard® Genomic DNA Purification Kit”, de Promega. El protocolo de trabajo fue el diseñado para la extracción de ADN a partir de bacterias gram negativas. Se transfirió 1 ml del sobrenadante a un tubo y se centrifugó a 11600 rpm durante 2 min. El sobrenadante se descartó, se resuspendió el pellet en 600 µl de “Nucleic Lysis Solution” y se incubó a 80°C por 5 min. Se agregaron 3 µl de la “RNase Solution” y se incubó a 37°C por 40 min. Se agregaron 200 µl de “Protein

Precipitation Solution” y se agitó en Vortex a máxima velocidad por 20 seg. Se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 11600 rpm durante 3 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo con 600 µl de isopropanol y se volvió a centrifugar a 11600 rpm durante 2 min. El sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se drenó el tubo en papel secante. Se le agregó 600 µl de etanol 70% y se volvió a centrifugar a 11600 rpm durante 2 min. Se extrajo el etanol, se drenó en papel secante y se dejó airear el pellet durante 15 min. Finalmente, se agregaron 100 µl de “DNA Rehydration Solution” y se incubó a 65°C durante 1 h. Los ADN templados obtenidos se mantuvieron refrigerados.

Carcasas: se tomó 1 ml del caldo de enriquecimiento, se centrifugó 5 min a 10000 rpm, se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 150 µl de Tritón 1%, se hirvió durante 15 min y se centrifugó 10000 rpm durante 5 min. Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de un caldo de cultivo puro. Los ADN templados obtenidos se mantuvieron en freezer de -20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)

3.4.1.3.2. PCR MK

Los cebadores, sus secuencias, el gen target y las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 2 del ANEXO.

3.4.2. Etapas 2. Tamizaje del gen eae

3.4.2.1. Metodología B – Tamizaje del gen eae con PCR en tiempo real

Se procesaron con el mismo kit (BAX STEC Screening: *stx* y *eae*) y al mismo tiempo, según lo descrito en 3.4.1.2.

3.4.2.2. Metodología C – Tamizaje del gen eae con PCR de punto final

3.4.2.2.1. Preparación de templados

Se utilizaron los mismos templados preparados en 3.4.1.3.1.

Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de un caldo de cultivo puro.

3.4.2.2.2. PCR eae

Los cebadores, sus secuencias, el gen target y las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 2 del ANEXO.

3.4.3. Etapa 3. Tamizaje de serogrupos

3.4.3.1. Metodología B - Tamizaje de serogrupos con PCR en tiempo real

3.4.3.1.1. Preparación de templados

Se utilizaron los mismos templados preparados en 3.4.1.2.1.

Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de un caldo de cultivo puro.

3.4.3.1.2. BAX Panel 1 (*E. coli* O26, O111, y O121), Panel 2 (*E. coli* O45, O103, y O145), y *E. coli* O157:H7

Se utilizaron 3 kits, el BAX STEC Panel 1: *E. coli* O26, O111, O121, el BAX STEC Panel 2: *E. coli* O45, O103, y O145 y el BAX *E. coli* O157:H7.

3.4.3.2. Metodología C - Confirmación de serogrupo con PCR de punto final

3.4.3.2.1. Preparación de templados

Se utilizaron los mismos templados preparados en 3.4.1.3.1.

Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de un caldo de cultivo puro.

3.4.3.2.2. PCR serogrupo-específica

Se realizaron utilizando las PCR citadas en la Tabla 2 del ANEXO con algunas modificaciones.

3.4.4. Etapa 4. Aislamiento

3.4.4.1. Aislamiento de cepas stx-positivas recuperadas por Metodología A

3.4.4.1.1. Grillado de las placas y detección de la colonia aislada

Ante una señal positiva por PCR de la zona de crecimiento confluyente se procedió al grillado. Ésta es una técnica que consiste en realizar una grilla de 20 cuadrados en una placa de MAC. En cada cuadrado se siembra 1 colonia aislada, de la placa utilizada en la etapa de tamizaje 3.4.1.1. (Figura 5). Se incubó a 37°C por 18 h.

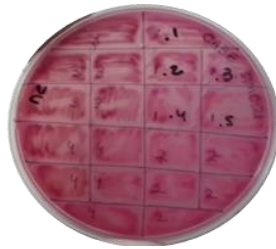


Figura 5. Placa de Agar MacConkey con grilla de 20 cuadrados sembrada con colonias aisladas.

3.4.4.1.2. Preparación de templados

En primera instancia se analizaron pooles, para ello se tomó una ansada de cultivo de 5 colonias y se resuspendió en 150 μ l de buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X, se hirvió a 100°C por 15 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Si algún pool resultaba positivo se preparaba un templado de cada colonia y se analizaba en forma individual. Para la obtención del ADN templado de las cepas control se procedió de la misma manera partiendo de una ansada de cultivo puro.

3.4.4.1.3. mPCR para los genes *stx*₁ y *stx*₂.

Ídem 3.4.1.1.2.

Los aislamientos positivos se conservaron a -70°C para su posterior caracterización y subtipificación.

3.4.4.2. Aislamiento de cepas *stx*-positivas y/o serogrupo-positivas por Separación inmunomagnética detectadas por Metodologías B y C

3.4.4.2.1. Separación inmunomagnética (SIM)

Se procedió al aislamiento por SIM serogrupo-específica de las muestras positivas para *stx*, eae por Metodologías B y C; según el serogrupo positivo por PCR de punto final. Se mezcló 1 ml de muestra enriquecida con 20 μ l de partículas inmunomagnéticas serogrupo-específicas. Se colocó en el agitador rotatorio a 18

rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Se colocó el tubo en la gradilla imantada y se agitó suavemente por inversión durante 5 min. Sin quitar el imán se extrajo el sobrenadante. Se quitó el imán y se agregó 1 ml de E-buffer, se volvió a colocar el tubo en la gradilla imantada y se agitó por inversión durante 3 min. Se repitieron 2 veces los últimos 3 pasos. El último lavado se realizó con PBS 1X. Finalmente, las partículas se resuspendieron en 100 µl de PBS 1X.

Se transfirieron 50 µl a una placa de SMAC y 50 µl a una placa de CHROMagar, se dejó secar por unos minutos y sembró en forma confluyente media placa y luego en forma aislada. Las placas se incubaron a 37°C por 18 h.

3.4.4.2.2. mPCR *stx*₁ y *stx*₂ y PCR serogrupo-específica de la zona de crecimiento confluyente

Los extractos se prepararon como se describió en el punto 3.4.1.1.1.

La mPCR para los genes *stx*₁ y *stx*₂ corresponde a la descrita en el punto 3.4.1.1.2.

La PCR serogrupo-específica corresponde a la descrita en el punto 3.4.3.2.2.

3.4.4.2.3. Grillado de las placas y detección de la colonia aislada por PCR

Ante una señal positiva para *stx* y/o serogrupo por PCR de la zona de crecimiento confluyente se realizó el mismo procedimiento de grillado que 3.4.4.1.1. Los templados se prepararon como se describió en 3.4.4.1.2; en primera instancia se analizaron pooles y si algún pool resultaba positivo para *stx* y/o para serogrupo se preparaba un templado por cada colonia y se analizaba en forma individual.

Los aislamientos positivos se conservaron a -70°C para su posterior caracterización y subtipificación.

3.4.5. Etapa 5. Caracterización de las cepas aisladas

3.4.5.1. Identificación bioquímica

La identificación bioquímica de los aislamientos obtenidos se realizó mediante la utilización de galerías API 20 E, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.5.2. Serotipificación

Para la detección del antígeno somático O se utilizaron antisueros siguiendo la técnica de aglutinación según Ørskov & Ørskov (1984). Se comenzó con la inactivación por calor del antígeno capsular, para ello se realizó una suspensión de un inóculo de la cepa en estudio en solución fisiológica y se calentó a ebullición durante 1 h. Para la detección del antígeno O se colocaron 20 µl de la suspensión en una lámina de vidrio y se agregaron 15 µl del antisuero a ensayar. Se mezclaron ambas suspensiones y visualmente se determinó la aglutinación de las cepas positivas. Previo a la detección del antígeno flagelar H se realizó la estimulación de la movilidad en medio de “Craigie” (Manual de procedimientos, Servicio Fisiopatogenia, 2006). Para ello se sembró una colonia introduciendo el ansa en aguja en la varilla central del tubo y se incubó a 37°C por 18 h. Se realizaron 15 pasajes. Luego se tomó una ansada del tubo correspondiente al 15° pasaje, se sembró en estría de TSA y se incubó a 37°C por 18 h. Para la identificación del antígeno H se realizó la técnica de aglutinación en tubo, para ello se sembró una ansada de la estría de TSA en caldo TSB, se incubó a 37°C con agitación por 8 h. Se mezcló el volumen de cultivo-TSB con igual volumen de solución formolada al 1% (v/v). Se colocaron 500 µl de la mezcla en un tubo de hemólisis y se agregaron 50 µl del antisuero anti-H. Se mezcló y se incubó en baño de agua a 50°C por 1h. Finalmente se observó con luz de una lámpara. Se ensayaron 23 antisueros flagelares de Denka Seiken (H2, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H16, H18, H19, H20, H21, H27, H28, H34, H40, H41, H42, H45 y H51).

3.4.5.3. Caracterización genotípica

Se utilizaron los templados de cepas aisladas preparados en 3.4.4.1.2. y en 3.4.4.2.3. El ADN de las cepas control se preparó de la misma manera que se describió en 3.4.1.1.1.

Para la detección del gen *eae* se realizó la PCR descrita en 3.4.2.2.2.; para la detección del gen *ehxA* se realizó una PCR *ehxA*; para la detección del gen *saa* se realizó una PCR *saa* y para la detección del gen *aggR*, la PCR *aggR*. Los cebadores, sus secuencias, el gen target y las condiciones de cada PCR se detallan en la Tabla 2 del ANEXO.

3.4.5.4. Subtipificación de toxina Shiga

Para la preparación de templado las colonias aisladas fueron sembradas en medio TSA e incubadas a 37°C ON. Se transfirió 1 sola colonia a TSB y se incubó en iguales condiciones. Se transfirieron 25 µl del caldo a 975 µl de agua tridestilada y se hirvió durante 15 min. Se centrifugó a 18000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se utilizó como templado. Se procedió de la misma manera para la obtención del ADN templado de las cepas control.

Para la subtipificación de *stx*₁ se realizó una PCR múltiple para *stx*_{1a}, *stx*_{1c} y *stx*_{1d}. El volumen de reacción fue de 25 µl de los cuales 12 µl correspondieron al MasterMix HotStart, 1 µl a cada uno de los cebadores *stx*_{1c} y *stx*_{1d}; 2 µl a cada cebador *stx*_{1a} y 5 µl del templado. Los cebadores, sus secuencias, el gen target y las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 2 del ANEXO.

Para la subtipificación de *stx*₂ se realizaron PCR independientes para cada variante *stx*₂. El volumen de la reacción fue de 20 µl, de los cuales 10 µl correspondieron al Master Mix Hot Start, 2,5 µl al agua tridestilada, 1,25 µl a cada primer y 5 µl al templado. Los cebadores, sus secuencias, el gen target y las condiciones de PCR se detallan en la Tabla 2 del ANEXO.

3.4.6. Etapa 6. Relación clonal por electroforesis de campo pulsado (PFGE)

La técnica de PFGE fue realizada según el protocolo estandarizado de la red PulseNet [Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* (CDC, 2013)]. Los bloques de agarosa (plugs) conteniendo el ADN de cada cepa fueron digeridos con la enzima de restricción *Xba*I. El marcador de peso molecular fue la cepa *Salmonella Braenderup* H9812.

3.4.6.1. Preparación de suspensiones celulares

A partir de un cultivo puro, una colonia se sembró en una placa de TSA y se incubó a 37°C por 18 h. De la zona de crecimiento confluyente se tomó el cultivo con un hisopo y se realizaron suspensiones celulares homogéneas en buffer BSE hasta alcanzar una densidad óptica de $0,40 \pm 0,02$.

3.4.6.2. Preparación de “plugs” (bloques de agarosa) y lisis de las células

A 200 µl de cada suspensión bacteriana en tubos Eppendorf, se agregó 10 µl de proteinasa K y se incubó a 37°C por 10 min. Para el armado de los bloques de agarosa, una mezcla consistente en 200 µl de la suspensión bacteriana/proteinasa K con 200 µl de la solución de agarosa SeaKem gold al 1% en buffer Tris-EDTA, se dispensó en moldes reutilizables. Se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante 15 min, luego se extrajeron de los moldes y se colocaron en tubos conteniendo 5 ml de solución de lisis. Posteriormente se incubaron en un baño termostático a 54°C con agitación vigorosa (120 rpm) durante 18 h. Luego de la lisis, se realizaron 5 lavados utilizando tubos con tapa colador que facilitan el desecho del buffer de lavado manteniendo la integridad del plug, 2 con 5 ml de agua estéril tri-destilada precalentada, en baño de agua a 50°C con agitación vigorosa durante 10-15 min, y 4 con buffer TE 1X estéril en las mismas condiciones. Los bloques de agarosa se conservaron en criotubos a 4°C en buffer TE 1X estéril hasta realizar la restricción enzimática.

3.4.6.3. Digestión del ADN en los bloques de agarosa con la enzima XbaI

De cada bloque de agarosa preparado, y de uno de *Salmonella* serovar Braenderup H9812, se cortaron fragmentos de 2 mm de espesor, que fueron colocados en tubos de microcentrífuga, conteniendo 200 µl del buffer de restricción 1X y 30 U de la enzima de restricción XbaI. Se incubó a 37°C durante 2 h en baño de agua.

3.4.6.4. Preparación del gel y siembra de las muestras

Para el armado de los geles se disolvió agarosa SeaKem Gold al 1% en TBE 0,5X. Una vez disuelta la agarosa se la dejó enfriar en baño de agua termostático a 50°C hasta alcanzar dicha temperatura. Se armó y niveló un molde de 15 calles. Luego, sobre los dientes del peine, se colocaron los fragmentos de los bloques de agarosa conteniendo el ADN digerido, se ubicó el peine en el molde y se agregó la agarosa a 50°C. Una vez solidificada, se retiró el peine.

3.4.6.5. Electroforesis de campo pulsado

El gel armado se colocó dentro del marco ubicado en la cuba electroforética nivelada, y se realizó la corrida electroforética en el equipo de electroforesis CHEF DR III. Para las cepas O157 se aplicó un pulso eléctrico inicial de 2,2 seg y un pulso eléctrico final de 54,2 seg. Para las cepas no-O157 se aplicó un pulso eléctrico inicial de 6,76 seg y un pulso eléctrico final de 35,38 seg. El voltaje de cada pulso fue de 6 V/cm, considerando la aplicación de 200V en una cuba cuya distancia entre los electrodos es de 33 cm. El ángulo de interacción entre los vectores generados por los pulsos eléctricos fue de 120°. El tiempo de corrida fue de 16,5 a 17 h.

3.4.6.6. Tinción y documentación de los resultados

Para la tinción, el gel se sumergió en una solución de GelRed y se mantuvo a temperatura ambiente en un agitador orbital de 60 rpm durante 20 min. Para eliminar el exceso de colorante, el gel se sumergió en agua tri-distilada y se mantuvo en el agitador durante 2 min a temperatura ambiente. La documentación de los resultados se realizó mediante la adquisición de una imagen en formato TIFF utilizando el equipo fotográfico DocIT.

3.4.6.7. Análisis de los patrones

El análisis de los patrones de PFGE para determinar la relación clonal y la diversidad genética, se realizó mediante el programa BioNumerics versión 5.1. (Applied Math, Bélgica). Los aislamientos con patrones de restricción *Xba*I-PFGE idénticos, fueron agrupados como cluster (100% similitud). Asimismo, los patrones de las cepas STEC fueron comparados con la Base Nacional de Datos PFGE de *E. coli* O157 y no O157.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se planteó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial anidado donde el factor lote se encuentra anidado en el factor frigorífico. El factor lote

posee 10 niveles, mientras que el factor frigorífico posee 2 niveles. La expresión del modelo planteado es la siguiente:

$$x_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \varepsilon_{k(ij)}$$

donde:

α_i = es el término debido al efecto de los niveles del factor frigorífico ($i=1, 2$);

$\beta_{j(i)}$ = es el término debido al efecto de los niveles del factor lote ($j=1, 2... 10$) anidados en el factor frigorífico;

$\varepsilon_{k(ij)}$ = es el término de error o perturbación aleatoria y es también un efecto anidado en la combinación (ij) pues las unidades experimentales son diferentes.

Las variables respuesta fueron el valor Ct (del inglés, cycle threshold) para el gen stx en muestras de cuero y el valor Ct para el gen stx en muestras de carcasa.

Luego se realizó un test de múltiples comparaciones de Tukey para evaluar diferencias entre la medias de los factores en los que se haya detectado efecto significativo en el ANOVA.

4. RESULTADOS

4.1. ETAPA 1 – TAMIZAJE DEL GEN *stx*

4.1.1. Metodología A- Tamizaje del gen *stx* en zona de crecimiento confluyente por PCR de punto final

De las 60 muestras de cuero analizadas, en 8 (13,3%) se detectaron los genes *stx*₁ y/o *stx*₂ en la zona de crecimiento confluyente, por PCR de punto final (mPCR).

De las 60 muestras de carcasa analizadas, en 19 (31,7%) se detectaron los genes *stx*₁ y/o *stx*₂ en la zona de crecimiento confluyente, por PCR de punto final (mPCR) (Tabla 2).

Tabla 2. Tamizaje de los genes *stx*₁ y/o *stx*₂ por PCR de punto final (mPCR) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 - Metodología A).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>stx</i> ₁ y/o <i>stx</i> ₂ + en zc
Cueros	60	8 (13,3%)
Carcasas	60	19 (31,7%)
TOTAL	120	27 (22,5%)

zc: zona de crecimiento confluyente

4.1.2. Metodología B- Tamizaje del gen *stx* por PCR en tiempo real

En las 60 (100%) muestras de cuero analizadas y en las 60 (100%) muestras de carcasa analizadas, se detectó el gen *stx*, por PCR en tiempo real (BAX STEC Screening) (Tabla 3).

Tabla 3. Tamizaje del gen *stx* por PCR en tiempo real (BAX) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 – Metodología B).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>stx</i> +
Cueros	60	60 (100%)
Carcasas	60	60 (100%)
TOTAL	120	120 (100%)

4.1.3. Metodología C- Tamizaje del gen *stx* por PCR de punto final

De las 60 muestras de cuero analizadas, en 29 (48,3%) se detectó señal para el gen *stx* y de las 60 muestras de carcasa analizadas, en 48 (80%) se detectó señal para el gen *stx*, por PCR de punto final (PCR MK) (Tabla 4).

Tabla 4. Tamizaje del gen *stx* por PCR de punto final (PCR MK) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 – Metodología C).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>stx</i> +
Cueros	60	29 (48,3%)
Carcasas	60	48 (80%)
TOTAL	120	77 (64,2%)

4.1.4. Comparación de resultados entre las 3 metodologías

Las 8 (13,3%) muestras de cuero positivas para *stx* por Metodología A, también lo fueron por Metodologías B y C; de las cuales 6 correspondieron a muestras del frigorífico A identificadas como cuero N° 7 (lote 2), 25 (lote 5), 31, 35, 36 (lote 6) y 47 (lote 8); y 2 correspondieron a muestras del frigorífico B identificadas como cuero N° 24 (lote 4) y 49 (lote 9) (Tabla 5).

En 21 (35%) muestras de cuero se detectó el gen *stx* por Metodologías B y C pero no por la Metodología A; de las cuales 13 correspondieron a muestras del frigorífico A identificadas como cuero N° 26, 27, 28, 29, 30 (lote 5), 32, 33, 34 (lote 6), 43, 44, 45, 46 y 48 (lote 8); y 8 a muestras del frigorífico B identificadas como cuero N° 19, 23 (lote 4), 37, 39, 40, 41, 42 (lote 7) y 50 (lote 9) (Tabla 5).

En 31 (51,7%) muestras de cuero se detectó el gen *stx* solamente por Metodología B (Tabla 5).

Las 19 (31,7%) muestras de carcasa positivas para *stx* por Metodología A, también lo fueron por Metodologías B y C; de las cuales 12 correspondieron a muestras del frigorífico A identificadas como carcasa N° 6 (lote 1), 7, 8, 9, 10, 11, 12 (lote 2), 25 (lote 5), 30, 31, 36 (lote 6) y 43 (lote 8); y 7 a muestras del frigorífico B identificadas como carcasa N° 14 (lote 3), 20 (lote 4), 38 (lote 7), 49, 50, 53 y 54 (lote 9) (Tabla 6).

En 29 (48,3%) muestras de carcasa se detectó el gen *stx* por Metodologías B y C pero no por la Metodología A; de las cuales 13 correspondieron a muestras de frigorífico A identificadas como carcasa N° 2, 5 (lote 1), 26, 29 (lote 5), 32, 33, 34, 35 (lote 6), 44, 45, 46, 47 y 48 (lote 8); y 16 al frigorífico B identificadas como carcasa N° 13, 15, 16, 17, 18 (lote 3), 23, 24 (lote 4), 37, 42 (lote 7), 51, 52 (lote 9), 55, 56, 57, 59 y 60 (lote 10) (Tabla 6).

En 12 (20%) muestras de carcasa se detectó el gen *stx* solamente por Metodología B (Tabla 6).

Tabla 5. Tamizaje del gen stx por Metodologías A, B y C en muestras de cuero, detallado por muestra (Etapa 1).

N°	Muestra		Metodología A	Metodología B		Metodología C
	Tipo	Frigorífico/ Lote		Resultado	Ct	
1	Cuero	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	38,3	NEGATIVO
2	Cuero	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	38,5	NEGATIVO
3	Cuero	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	40,5	NEGATIVO
4	Cuero	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	37,3	NEGATIVO
5	Cuero	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	36,4	NEGATIVO
6	Cuero	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	37,3	NEGATIVO
7	Cuero	A/2	POSITIVO	POSITIVO	31	POSITIVO
8	Cuero	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	34,3	NEGATIVO
9	Cuero	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	32,8	NEGATIVO
10	Cuero	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	34,3	NEGATIVO
11	Cuero	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	34,3	NEGATIVO
12	Cuero	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	33,6	NEGATIVO
13	Cuero	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	38,4	NEGATIVO
14	Cuero	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	38,9	NEGATIVO
15	Cuero	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	39,1	NEGATIVO
16	Cuero	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	38,8	NEGATIVO
17	Cuero	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	39,3	NEGATIVO
18	Cuero	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	39,3	NEGATIVO
19	Cuero	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	33,9	POSITIVO
20	Cuero	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	35	NEGATIVO
21	Cuero	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	34,8	NEGATIVO
22	Cuero	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	36,1	NEGATIVO
23	Cuero	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	35,2	POSITIVO
24	Cuero	B/4	POSITIVO	POSITIVO	30,2	POSITIVO
25	Cuero	A/5	POSITIVO	POSITIVO	33,8	POSITIVO
26	Cuero	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	33,9	POSITIVO
27	Cuero	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	33,5	POSITIVO
28	Cuero	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	34,5	POSITIVO
29	Cuero	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	33,7	POSITIVO
30	Cuero	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	34,3	POSITIVO
31	Cuero	A/6	POSITIVO	POSITIVO	29	POSITIVO
32	Cuero	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	31,2	POSITIVO
33	Cuero	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	32,1	POSITIVO
34	Cuero	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	30,2	POSITIVO
35	Cuero	A/6	POSITIVO	POSITIVO	30,8	POSITIVO
36	Cuero	A/6	POSITIVO	POSITIVO	32,3	POSITIVO
37	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	36,7	POSITIVO
38	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	37,4	NEGATIVO
39	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	37,9	POSITIVO
40	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	39,3	POSITIVO
41	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	37	POSITIVO
42	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	37,5	POSITIVO
43	Cuero	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	36,9	POSITIVO
44	Cuero	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	37	POSITIVO
45	Cuero	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	35,4	POSITIVO
46	Cuero	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	35,2	POSITIVO
47	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	32,6	POSITIVO
48	Cuero	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	35,6	POSITIVO
49	Cuero	B/9	POSITIVO	POSITIVO	31,4	POSITIVO
50	Cuero	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	33	POSITIVO
51	Cuero	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	35,3	NEGATIVO
52	Cuero	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	34,4	NEGATIVO
53	Cuero	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	32	NEGATIVO
54	Cuero	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	35	NEGATIVO
55	Cuero	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	38,1	NEGATIVO
56	Cuero	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	37,6	NEGATIVO
57	Cuero	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	38,6	NEGATIVO
58	Cuero	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	38,2	NEGATIVO
59	Cuero	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	38,1	NEGATIVO
60	Cuero	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	38,4	NEGATIVO
TOTAL POSITIVOS			8	60	Me= 35 x̄ = 35,4	29

Me: Mediana; \bar{x} : media aritmética; Ct: del inglés, *Cycle threshold*

Tabla 6. Tamizaje del gen *stx* por Metodologías A, B y C en muestras de carcasa, detallado por muestra (Etapa 1).

Muestra			Metodología A	Metodología B		Metodología C
N°	Tipo	Frigorífico/Lote		Resultado	Ct	
1	Carcasa	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	35,5	NEGATIVO
2	Carcasa	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	33,4	POSITIVO
3	Carcasa	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	35,8	NEGATIVO
4	Carcasa	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	40,6	NEGATIVO
5	Carcasa	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	35	POSITIVO
6	Carcasa	A/1	POSITIVO	POSITIVO	34,4	POSITIVO
7	Carcasa	A/2	POSITIVO	POSITIVO	28,2	POSITIVO
8	Carcasa	A/2	POSITIVO	POSITIVO	24,8	POSITIVO
9	Carcasa	A/2	POSITIVO	POSITIVO	27	POSITIVO
10	Carcasa	A/2	POSITIVO	POSITIVO	26,7	POSITIVO
11	Carcasa	A/2	POSITIVO	POSITIVO	21,8	POSITIVO
12	Carcasa	A/2	POSITIVO	POSITIVO	28,4	POSITIVO
13	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	31,4	POSITIVO
14	Carcasa	B/3	POSITIVO	POSITIVO	30,9	POSITIVO
15	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	30,5	POSITIVO
16	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	31,2	POSITIVO
17	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	34,1	POSITIVO
18	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	31,9	POSITIVO
19	Carcasa	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	32,2	NEGATIVO
20	Carcasa	B/4	POSITIVO	POSITIVO	28,9	POSITIVO
21	Carcasa	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	33,3	NEGATIVO
22	Carcasa	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	31,4	NEGATIVO
23	Carcasa	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	29,4	POSITIVO
24	Carcasa	B/4	NEGATIVO	POSITIVO	28,9	POSITIVO
25	Carcasa	A/5	POSITIVO	POSITIVO	29,7	POSITIVO
26	Carcasa	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	31	POSITIVO
27	Carcasa	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	30,8	NEGATIVO
28	Carcasa	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	29,9	NEGATIVO
29	Carcasa	A/5	NEGATIVO	POSITIVO	30,9	POSITIVO
30	Carcasa	A/5	POSITIVO	POSITIVO	28,3	POSITIVO
31	Carcasa	A/6	POSITIVO	POSITIVO	28,1	POSITIVO
32	Carcasa	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	29,1	POSITIVO
33	Carcasa	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	30,2	POSITIVO
34	Carcasa	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	32,5	POSITIVO
35	Carcasa	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	30,9	POSITIVO
36	Carcasa	A/6	POSITIVO	POSITIVO	30,1	POSITIVO
37	Carcasa	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	33,5	POSITIVO
38	Carcasa	B/7	POSITIVO	POSITIVO	28,9	POSITIVO
39	Carcasa	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	33,3	NEGATIVO
40	Carcasa	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	34,3	NEGATIVO
41	Carcasa	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	31,5	NEGATIVO
42	Carcasa	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	32	POSITIVO
43	Carcasa	A/8	POSITIVO	POSITIVO	32,9	POSITIVO
44	Carcasa	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	35,3	POSITIVO
45	Carcasa	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	35,8	POSITIVO
46	Carcasa	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	35,6	POSITIVO
47	Carcasa	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	33,2	POSITIVO
48	Carcasa	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	36,2	POSITIVO
49	Carcasa	B/9	POSITIVO	POSITIVO	29,4	POSITIVO
50	Carcasa	B/9	POSITIVO	POSITIVO	31,3	POSITIVO
51	Carcasa	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	33,4	POSITIVO
52	Carcasa	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	30,2	POSITIVO
53	Carcasa	B/9	POSITIVO	POSITIVO	30,8	POSITIVO
54	Carcasa	B/9	POSITIVO	POSITIVO	29,3	POSITIVO
55	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	33,5	POSITIVO
56	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	33,2	POSITIVO
57	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	36,2	POSITIVO
58	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	38,7	NEGATIVO
59	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	35,1	POSITIVO
60	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	34,1	POSITIVO
TOTAL POSITIVOS			19	60	Me=31 x̄ = 31,7	48

Me: Mediana; x̄: media aritmética; CT: del inglés *Cycle threshold*

4.2. ETAPA 2 - TAMIZAJE DEL GEN *eae*

4.2.1. Metodología B - Tamizaje del gen *eae* por PCR en tiempo real

En las 60 (100%) muestras de cuero analizadas, se detectó el gen *eae*, por PCR en tiempo real (BAX STEC Screening).

De las 60 muestras de carcasas analizadas, en 57 (95%) se detectó el gen *eae*, por PCR en tiempo real (BAX STEC Screening) (Tabla 7).

Tabla 7. Tamizaje del gen *eae* por PCR en tiempo real (BAX) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 2 – Metodología B).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>eae</i> +
Cueros	60	60 (100%)
Carcasas	60	57 (95%)
TOTAL	120	117 (97,5%)

4.2.2. Metodología C - Tamizaje del gen *eae* por PCR de punto final

De las 60 muestras de cuero analizadas, en 38 (63,3%) se detectó el gen *eae*, por PCR de punto final (PCR *eae*).

De las 60 muestras de carcasa analizadas, en 36 (60%) se detectó el gen *eae*, por PCR de punto final (PCR *eae*) (Tabla 8).

Tabla 8. Tamizaje del gen *eae* por PCR de punto final (PCR *eae*) en muestras de cuero y carcasa (Etapa 2 – Metodología C).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>eae</i> +
Cueros	60	38 (63,3%)
Carcasas	60	36 (60%)
TOTAL	120	74 (61,7%)

4.3. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS (ETAPA 1 + ETAPA 2)

4.3.1. Tamizaje de los genes *stx* y *eae* por PCR en tiempo real

En las 60 (100%) muestras de cuero analizadas, se detectaron los genes *stx* y *eae*, por PCR en tiempo real (BAX STEC Screening).

De las 60 muestras de carcasa analizadas, en 57 (95%) se detectaron los genes *stx* y *eae*, por PCR en tiempo real (BAX STEC Screening) (Tabla 9).

Tabla 9. Tamizaje de los genes *stx* y *eae* por PCR en tiempo real en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 y 2 - Metodología B).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>stx</i> +/ <i>eae</i> +
Cueros	60	60 (100%)
Carcasas	60	57 (95%)
TOTAL	120	117 (97,5%)

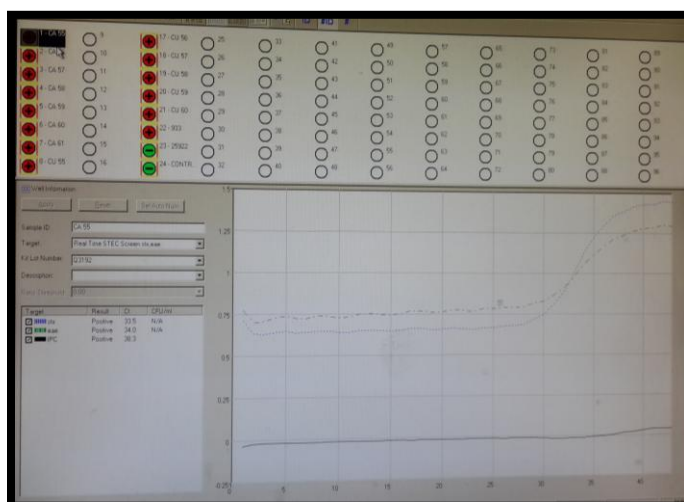


Figura 6. Captura de pantalla de los resultados del BAX STEC Screening.

4.3.2. Tamizaje de los genes *stx* y *eae* por PCR punto final

De las 60 muestras de cuero analizadas, en 22 (36,7%) se detectaron los genes *stx* y *eae*, por PCR de punto final (PCR MK y PCR *eae*).

De las 60 muestras de carcasa analizadas, en 29 (48,3%) se detectaron los genes *stx* y *eae*, por PCR de punto final (PCR MK y *eae*) (Tabla 10).

Tabla 10. Tamizaje de los genes *stx* y *eae* por PCR de punto final en muestras de cuero y carcasa (Etapa 1 y 2 - Metodología C).

Muestras [N° (%)]		
Tipo	analizadas	<i>stx</i> +/ <i>eae</i> +
Cueros	60	22 (36,7%)
Carcasas	60	29 (48,3%)
TOTAL	120	51 (42,5%)

4.3.3. Comparación de resultados entre las 2 metodologías

En 22 (36,7%) muestras de cuero y en 29 (48,3%) muestras de carcasa se detectaron los genes *stx* y *eae* por ambas Metodologías (Tabla 11 y 12). Las 3 muestras de carcasa *eae*-negativas por Metodología B, también lo fueron por Metodología C. Las muestras fueron identificadas como carcasa N° 32, 36 y 40.

Tabla 11. Tamizaje de los genes *stx* y *eae* por Metodologías B y C en muestras de cuero, detallado por muestra (Etapas 1 y 2).

Muestra			Metodología B				Metodología C			Metodologías B y C	
N°	Tipo	Frigorífico/Lote	stx		eae		stx y eae	stx	eae	stx y eae	stx y eae
			Rdo.	Ct	Rdo.	Ct					
1	Cuero	A/1	POSITIVO	38,3	POSITIVO	33,7	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	Cuero	A/1	POSITIVO	38,5	POSITIVO	34,4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	Cuero	A/1	POSITIVO	40,5	POSITIVO	33,2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	Cuero	A/1	POSITIVO	37,3	POSITIVO	34	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	Cuero	A/1	POSITIVO	36,4	POSITIVO	32,8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
6	Cuero	A/1	POSITIVO	37,3	POSITIVO	32,9	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	Cuero	A/2	POSITIVO	31	POSITIVO	32,9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
8	Cuero	A/2	POSITIVO	34,3	POSITIVO	34,1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	Cuero	A/2	POSITIVO	32,8	POSITIVO	32,6	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	Cuero	A/2	POSITIVO	34,3	POSITIVO	31,9	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	Cuero	A/2	POSITIVO	34,3	POSITIVO	34,8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
12	Cuero	A/2	POSITIVO	33,6	POSITIVO	35,5	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	Cuero	B/3	POSITIVO	38,4	POSITIVO	36,3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	Cuero	B/3	POSITIVO	38,9	POSITIVO	35,2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
15	Cuero	B/3	POSITIVO	39,1	POSITIVO	34,5	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	Cuero	B/3	POSITIVO	38,8	POSITIVO	31,7	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
17	Cuero	B/3	POSITIVO	39,3	POSITIVO	31,9	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
18	Cuero	B/3	POSITIVO	39,3	POSITIVO	32,1	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	Cuero	B/4	POSITIVO	33,9	POSITIVO	33,6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
20	Cuero	B/4	POSITIVO	35	POSITIVO	34,4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
21	Cuero	B/4	POSITIVO	34,8	POSITIVO	34,4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	Cuero	B/4	POSITIVO	36,1	POSITIVO	33,3	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	Cuero	B/4	POSITIVO	35,2	POSITIVO	34,9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	Cuero	B/4	POSITIVO	30,2	POSITIVO	40,5	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	Cuero	A/5	POSITIVO	33,8	POSITIVO	35,1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
26	Cuero	A/5	POSITIVO	33,9	POSITIVO	35,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
27	Cuero	A/5	POSITIVO	33,5	POSITIVO	34,2	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	Cuero	A/5	POSITIVO	34,5	POSITIVO	34,5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
29	Cuero	A/5	POSITIVO	33,7	POSITIVO	32,9	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
30	Cuero	A/5	POSITIVO	34,3	POSITIVO	33,6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
31	Cuero	A/6	POSITIVO	29	POSITIVO	33,1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
32	Cuero	A/6	POSITIVO	31,2	POSITIVO	34,5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
33	Cuero	A/6	POSITIVO	32,1	POSITIVO	37	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	Cuero	A/6	POSITIVO	30,2	POSITIVO	33,7	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
35	Cuero	A/6	POSITIVO	30,8	POSITIVO	35,9	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	Cuero	A/6	POSITIVO	32,3	POSITIVO	37,8	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
37	Cuero	B/7	POSITIVO	36,7	POSITIVO	29	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
38	Cuero	B/7	POSITIVO	37,4	POSITIVO	29	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
39	Cuero	B/7	POSITIVO	37,9	POSITIVO	30,1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
40	Cuero	B/7	POSITIVO	39,3	POSITIVO	31,7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
41	Cuero	B/7	POSITIVO	37	POSITIVO	31	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
42	Cuero	B/7	POSITIVO	37,5	POSITIVO	30,7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
43	Cuero	A/8	POSITIVO	36,9	POSITIVO	30,5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
44	Cuero	A/8	POSITIVO	37	POSITIVO	29,3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
45	Cuero	A/8	POSITIVO	35,4	POSITIVO	26,8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
46	Cuero	A/8	POSITIVO	35,2	POSITIVO	29	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
47	Cuero	A/8	POSITIVO	32,6	POSITIVO	30,6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
48	Cuero	A/8	POSITIVO	35,6	POSITIVO	29,2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
49	Cuero	B/9	POSITIVO	31,4	POSITIVO	32,3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
50	Cuero	B/9	POSITIVO	33	POSITIVO	29,6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
51	Cuero	B/9	POSITIVO	35,3	POSITIVO	30	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
52	Cuero	B/9	POSITIVO	34,4	POSITIVO	30,8	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
53	Cuero	B/9	POSITIVO	32	POSITIVO	32,2	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
54	Cuero	B/9	POSITIVO	35	POSITIVO	32,8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
55	Cuero	B/10	POSITIVO	38,1	POSITIVO	30,1	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
56	Cuero	B/10	POSITIVO	37,6	POSITIVO	27,8	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
57	Cuero	B/10	POSITIVO	38,6	POSITIVO	30,2	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
58	Cuero	B/10	POSITIVO	38,2	POSITIVO	27,2	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
59	Cuero	B/10	POSITIVO	38,1	POSITIVO	28,4	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
60	Cuero	B/10	POSITIVO	38,4	POSITIVO	29	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
TOTAL POSITIVOS			60	$\bar{x} = 35,4$	60	$\bar{x} = 32,5$	60	29	38	22	22

Rdo: resultado; Ct: del inglés, *Cycle threshold* y \bar{x} : media aritmética.

Tabla 12. Tamizaje de los genes stx y eae por Metodologías B y C en muestras de carcasa, detallado por muestra (Etapa 1 y 2).

Muestra			Metodología B				Metodología C			Metodologías B y C	
N°	Tipo	Frigorífico/Lote	stx		eae		stx y eae	stx	eae	stx y eae	eae
			Rdo.	Ct	Rdo.	Ct					
1	Carcasa	A/1	POSITIVO	35,5	POSITIVO	35,6	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	Carcasa	A/1	POSITIVO	33,4	POSITIVO	32,6	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
3	Carcasa	A/1	POSITIVO	35,8	POSITIVO	33,8	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	Carcasa	A/1	POSITIVO	40,6	POSITIVO	33,5	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	Carcasa	A/1	POSITIVO	35	POSITIVO	33,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
6	Carcasa	A/1	POSITIVO	34,4	POSITIVO	33,5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
7	Carcasa	A/2	POSITIVO	28,2	POSITIVO	29,8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
8	Carcasa	A/2	POSITIVO	24,8	POSITIVO	36,1	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
9	Carcasa	A/2	POSITIVO	27	POSITIVO	39,2	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	Carcasa	A/2	POSITIVO	26,7	POSITIVO	25,2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
11	Carcasa	A/2	POSITIVO	21,8	POSITIVO	31	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
12	Carcasa	A/2	POSITIVO	28,4	POSITIVO	34,7	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	Carcasa	B/3	POSITIVO	31,4	POSITIVO	32,2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
14	Carcasa	B/3	POSITIVO	30,9	POSITIVO	32,7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
15	Carcasa	B/3	POSITIVO	30,5	POSITIVO	32,8	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
16	Carcasa	B/3	POSITIVO	31,2	POSITIVO	25,7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
17	Carcasa	B/3	POSITIVO	34,1	POSITIVO	29,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
18	Carcasa	B/3	POSITIVO	31,9	POSITIVO	30,8	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
19	Carcasa	B/4	POSITIVO	32,2	POSITIVO	32,3	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
20	Carcasa	B/4	POSITIVO	28,9	POSITIVO	33,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
21	Carcasa	B/4	POSITIVO	33,3	POSITIVO	37,2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	Carcasa	B/4	POSITIVO	31,4	POSITIVO	31	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
23	Carcasa	B/4	POSITIVO	29,4	POSITIVO	40,9	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	Carcasa	B/4	POSITIVO	28,9	POSITIVO	39,5	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	Carcasa	A/5	POSITIVO	29,7	POSITIVO	35,1	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
26	Carcasa	A/5	POSITIVO	31	POSITIVO	36,2	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
27	Carcasa	A/5	POSITIVO	30,8	POSITIVO	32,7	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	Carcasa	A/5	POSITIVO	29,9	POSITIVO	34,4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
29	Carcasa	A/5	POSITIVO	30,9	POSITIVO	34,5	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
30	Carcasa	A/5	POSITIVO	28,3	POSITIVO	32,4	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
31	Carcasa	A/6	POSITIVO	28,1	POSITIVO	35,6	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
32	Carcasa	A/6	POSITIVO	29,1	NEGATIVO	0	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
33	Carcasa	A/6	POSITIVO	30,2	POSITIVO	35,5	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	Carcasa	A/6	POSITIVO	32,5	POSITIVO	30,1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
35	Carcasa	A/6	POSITIVO	30,9	NEGATIVO	0	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	Carcasa	A/6	POSITIVO	30,1	POSITIVO	34,6	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
37	Carcasa	B/7	POSITIVO	33,5	POSITIVO	31,2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
38	Carcasa	B/7	POSITIVO	28,9	POSITIVO	29,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
39	Carcasa	B/7	POSITIVO	33,3	POSITIVO	29,4	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
40	Carcasa	B/7	POSITIVO	34,3	NEGATIVO	0	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
41	Carcasa	B/7	POSITIVO	31,5	POSITIVO	31,8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
42	Carcasa	B/7	POSITIVO	32	POSITIVO	31	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
43	Carcasa	A/8	POSITIVO	32,9	POSITIVO	26,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
44	Carcasa	A/8	POSITIVO	35,3	POSITIVO	26	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
45	Carcasa	A/8	POSITIVO	35,8	POSITIVO	26,9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
46	Carcasa	A/8	POSITIVO	35,6	POSITIVO	28,9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
47	Carcasa	A/8	POSITIVO	33,2	POSITIVO	27,7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
48	Carcasa	A/8	POSITIVO	36,2	POSITIVO	28,1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
49	Carcasa	B/9	POSITIVO	29,4	POSITIVO	31,5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
50	Carcasa	B/9	POSITIVO	31,3	POSITIVO	30,3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
51	Carcasa	B/9	POSITIVO	33,4	POSITIVO	33,9	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
52	Carcasa	B/9	POSITIVO	30,2	POSITIVO	33,3	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
53	Carcasa	B/9	POSITIVO	30,8	POSITIVO	33,4	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
54	Carcasa	B/9	POSITIVO	29,3	POSITIVO	36,4	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
55	Carcasa	B/10	POSITIVO	33,5	POSITIVO	34	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
56	Carcasa	B/10	POSITIVO	33,2	POSITIVO	31,1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
57	Carcasa	B/10	POSITIVO	36,2	POSITIVO	31,4	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
58	Carcasa	B/10	POSITIVO	38,7	POSITIVO	34,4	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
59	Carcasa	B/10	POSITIVO	35,1	POSITIVO	31,8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
60	Carcasa	B/10	POSITIVO	34,1	POSITIVO	34,7	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
TOTAL POSITIVOS			60	$\bar{x} = 31,7$	60	$\bar{x} = 31,9$	57	48	36	29	29

Rdo: resultado; Ct: del inglés, *Cycle threshold* y \bar{x} : media aritmética.

4.4. ETAPA 3 - TAMIZAJE DE SEROGRUPOS

4.4.1. Tamizaje de serogrupos con PCR en tiempo real

Se utilizó el BAX Panel 1 (O26, O111 y O121), el Panel 2 (O45, O103 y O145) y BAX *E. coli* O157:H7. Las 22 (100%) muestras de cuero analizadas, positivas para *stx* y *eae*, por Metodologías B y C, resultaron positivas para al menos, 1 serogrupo. Las frecuencias de detección de los serogrupos, en orden decreciente, fueron: O103 (18/22; 81,8%), O26, O45 y O121 (14/22; 63,6%), O145 (12/22; 54,5%) y O157 (1/22; 4,5%). No se detectó señal para O111 (Tabla 13).

Tabla 13. Detección de los serogrupos (SG) O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR en tiempo real (BAX Panel 1, 2 y O157:H7), en muestras de cuero positivos para *stx* y *eae* por Metodologías B y C (Etapa 3).

Muestra			Serogrupos analizados							N° de SG por muestra
N°	Tipo	Frigorífico/Lote	O26	O45	O103	O111	O121	O145	O157	
7	Cuero	A/2	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
19	Cuero	B/4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
23	Cuero	B/4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
25	Cuero	A/5	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	5
26	Cuero	A/5	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
28	Cuero	A/5	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
30	Cuero	A/5	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
31	Cuero	A/6	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
32	Cuero	A/6	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
37	Cuero	B/7	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
39	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
40	Cuero	B/7	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
41	Cuero	B/7	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	5
42	Cuero	B/7	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
43	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	4
44	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	5
45	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
46	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
47	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
48	Cuero	A/8	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
49	Cuero	B/9	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
50	Cuero	B/9	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
TOTAL POSITIVOS			14	14	18	0	14	12	1	73

De las 29 muestras de carcasas analizadas, positivas para *stx* y *eae* por ambas Metodologías, 27 (93,1%) resultaron positivas para al menos 1 serogrupo. Las frecuencias de detección de los serogrupos, en orden decreciente, fueron: O121 (24/29; 82,8%); O103 (16/29; 55,2%); O45 (13/29; 44,8%) y, finalmente, O145 y O26, con la misma frecuencia (2/29; 6,9%). No se detectó señal para O157 ni para O111 (Tabla 14).

Tabla 14. Detección de los serogrupos (SG) 026, 045, 0103, 0111, 0121, 0145 y 0157 por PCR en tiempo real (BAX Panel 1, 2 y 0157:H7), en muestras de carcasa, positivas para stx y eae por Metodologías B y C (Etapa 3).

Muestra			Serogrupos analizados							N° de SG por muestra
N°	Tipo	Frigorífico /Lote	026	045	0103	0111	0121	0145	0157	
2	Carcasa	A/1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
5	Carcasa	A/1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
6	Carcasa	A/1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
7	Carcasa	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
10	Carcasa	A/2	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
11	Carcasa	A/2	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
13	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
14	Carcasa	B/3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
16	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
17	Carcasa	B/3	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
20	Carcasa	B/4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
34	Carcasa	A/6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
37	Carcasa	B/7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
38	Carcasa	B/7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
42	Carcasa	B/7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
43	Carcasa	A/8	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
44	Carcasa	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
45	Carcasa	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
46	Carcasa	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
47	Carcasa	A/8	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	4
48	Carcasa	A/8	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
49	Carcasa	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
50	Carcasa	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
51	Carcasa	B/9	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
52	Carcasa	B/9	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
55	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
56	Carcasa	B/10	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
57	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	3
59	Carcasa	B/10	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
TOTAL POSITIVOS			2	13	16	0	24	2	0	57

4.4.2. Confirmación de serogrupos con PCR de punto final serogrupo-específica

De las 22 muestras enriquecidas de cuero, positivas para stx, eae y alguno de los serogrupos, analizados con PCR en tiempo real, en 21 (95,5%) se detectó, al menos, 1 serogrupo por PCR serogrupo-específica. Se confirmaron la totalidad de las muestras (14/14, 100%) que habían resultado positivas para 0121; 8 (8/18, 44,4%) para 0103; 6 (6/14, 42,9%) para 026, 4 (4/12, 33,3%) para 0145 y 1 (1/1, 100%) para 0157. Ninguna muestra fue confirmada para 045.

De los 73 serogrupos detectados por PCR en tiempo real, el total confirmado fue 33 (45,2%). La frecuencia de detección en muestras de cuero de cada uno de los serogrupos estudiados confirmado por PCR serogrupo-específica, en orden decreciente, fueron: 0121 (14/22; 63,6%), 0103 (8/22; 36,4%), 026 (6/22; 27,3%), 0145 (4/22; 18,9%) y 0157 (1/22; 4,5%) (Tabla 15).

Tabla 15. Confirmación de los serogrupos (SG) 026, 045, 0103, 0111, 0121, 0145 y 0157 por PCR serogrupo-específica de punto final en muestras de cuero positivos para stx y eae por Metodologías B y C (Etapa 3).

Muestra			Serogrupos analizados						N° de SG por muestra
N°	Tipo	Frigorífico /Lote	026	045	0103	0121	0145	0157	
7	Cuero	A/2	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NR	NR	1
19	Cuero	B/4	NR	NR	POSITIVO	NR	NR	NR	1
23	Cuero	B/4	NR	NR	POSITIVO	NR	NR	NR	1
25	Cuero	A/5	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NR	2
26	Cuero	A/5	POSITIVO	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NEGATIVO	NR	2
28	Cuero	A/5	POSITIVO	NR	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NR	3
30	Cuero	A/5	NEGATIVO	NR	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NR	1
31	Cuero	A/6	NR	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NR	NR	2
32	Cuero	A/6	NR	NR	NEGATIVO	POSITIVO	NR	NR	1
37	Cuero	B/7	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	POSITIVO	POSITIVO	NR	2
39	Cuero	B/7	NR	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	NR	1
40	Cuero	B/7	POSITIVO	NR	POSITIVO	POSITIVO	NR	NR	3
41	Cuero	B/7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NR	1
42	Cuero	B/7	NR	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	2
43	Cuero	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	NR	1
44	Cuero	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NR	2
45	Cuero	A/8	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NR	2
46	Cuero	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	NEGATIVO	NR	0
47	Cuero	A/8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NR	1
48	Cuero	A/8	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	NEGATIVO	NR	2
49	Cuero	B/9	NR	NR	POSITIVO	NR	NR	NR	1
50	Cuero	B/9	NR	NR	POSITIVO	NR	NR	NR	1
TOTAL POSITIVOS			6	0	8	14	4	1	33

NR: No Realizado

De las 27 muestras enriquecidas de carcasa, positivas para stx, eae y alguno de los 6 serogrupos analizados con BAX System, en 25 (92,6%) se confirmó al menos 1 serogrupo por PCR serogrupo-específica. Se confirmaron 23 (23/24, 95,8%) muestras para 0121; 8 (8/16, 50%) para 0103; 4 (4/13, 30,8%) para 045, 1 (1/2, 50%) para 0145 y 1 (1/2, 50%) para 026.

El total de serogrupos confirmados por PCR fue de 37 (64,9%) de los 57 detectados por PCR en tiempo real. La frecuencia de detección en muestras de carcasa confirmado por PCR serogrupo-específica, en orden decreciente, fueron: 0121 (23/27; 85,2%), 0103 (8/27; 29,6%), 045 (4/27; 14,8%), 026 y 0145 (1/27; 3,7%) (Tabla 16).

Tabla 16. Confirmación de los serogrupos (SG) O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 por PCR de punto final (PCR serogrupo-específica) en muestras de carcasa positivas para *stx* y *eae* por Metodologías B y C (Etapa 3).

Muestra			Serogrupos analizados					Nro. de SG por muestra
N°	Tipo	Frigorífico/Lote	O26	O45	O103	O121	O145	
2	Carcasa	A/1	NR	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NR	1
5	Carcasa	A/1	NR	NR	POSITIVO	POSITIVO	NR	2
6	Carcasa	A/1	NR	NR	NEGATIVO	POSITIVO	NR	1
7	Carcasa	A/2	NR	NEGATIVO	NR	POSITIVO	NR	1
10	Carcasa	A/2	NR	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	2
11	Carcasa	A/2	NR	NR	POSITIVO	NR	NR	1
13	Carcasa	B/3	NR	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	2
14	Carcasa	B/3	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
16	Carcasa	B/3	NR	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	0
17	Carcasa	B/3	NR	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	1
20	Carcasa	B/4	NR	NR	NEGATIVO	NR	NR	0
34	Carcasa	A/6	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
38	Carcasa	B/7	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
43	Carcasa	B/7	NR	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NR	1
44	Carcasa	B/7	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
45	Carcasa	A/8	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
46	Carcasa	A/8	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
49	Carcasa	B/9	NEGATIVO	NR	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	1
50	Carcasa	B/9	POSITIVO	NR	POSITIVO	POSITIVO	NR	3
51	Carcasa	B/9	NR	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NR	2
52	Carcasa	B/9	NR	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NR	3
55	Carcasa	B/10	NR	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NR	2
56	Carcasa	B/10	NR	NR	POSITIVO	NR	NR	1
57	Carcasa	B/10	NR	NEGATIVO	NR	POSITIVO	POSITIVO	2
59	Carcasa	B/10	NR	NR	NR	POSITIVO	NR	1
57	Carcasa	B/9	NR	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NR	2
59	Carcasa	B/9	NR	POSITIVO	NR	POSITIVO	NR	2
TOTAL POSITIVOS			1	4	8	23	1	37

NR: No Realizado

4.5. ETAPA 4 - AISLAMIENTO

4.5.1. Aislamiento de cepas *stx*-positivas recuperadas por Metodología A

De las 8 (8/60, 13,3%) muestras de cuero en las que se detectaron los genes *stx*₁ y/o *stx*₂ en la zona de crecimiento confluyente, en 3 (5%) se logró aislar la colonia *stx*-positiva. De las 19 (19/60, 31,7%) muestras de carcasa en las que se detectaron los genes *stx*₁ y/o *stx*₂ en la zona de crecimiento confluyente, en 4 (4/60, 6,7%) se logró aislar la colonia *stx*-positiva. El total de aislamientos recuperados por este método fue de 7 (5,8%) (Tabla 17).

Tabla 17. Aislamiento de cepas *stx*-positivas por mPCR *stx*₁ y *stx*₂ en muestras de cuero y carcasa (Etapa 4 - Metodología A).

Muestras [N° (%)]			
Tipo	Analizadas	<i>stx</i> ₁ y/o <i>stx</i> ₂ en zc*	Aisladas
Cueros	60	8 (13,3%)	3 (5,0%)
Carcasas	60	19 (31,7%)	4 (6,7%)
TOTAL	120	27 (22,5%)	7 (5,8%)

zc: zona de crecimiento confluyente

4.5.2. Aislamiento de cepas stx y/o serogrupo positivas recuperadas por SIM – Metodologías B y C

De las 33 SIM serogrupo específicas realizadas para las muestras de cuero, en 19 (57,6%) se detectó el gen que identifica serogrupo en la zona de crecimiento confluyente. En ninguna se detectó el gen que identifica la toxina Stx. En total se aislaron 11 cepas no toxigénicas: 5 cepas O26, 4 cepas O121, 1 cepa O103 y 1 cepa O157. La frecuencia de serogrupos de cepas aisladas en orden decreciente, fue: O26 (5/11; 45,5%), O121 (4/11; 36,4%), O103 y O157 (1/11; 9,1%) (Tabla 18).

De las 37 SIM serogrupo específicas realizadas para las muestras de carcasa, en 24 (64,9%) se detectó el gen que identifica el serogrupo en la zona de crecimiento confluyente. En 4 (10,8%) se detectó el gen que identifica la toxina en la zona de crecimiento confluyente. En total se aislaron 13 cepas no toxigénicas: 6 cepas O121, 3 cepas O45, 3 cepas O103, 1 cepa O26; y 1 cepa O103 toxigénica. La frecuencia de serogrupos de cepas aisladas en orden decreciente, fue: O121 (6/14; 42,9%); O103 (4/14; 28,6%); O45 (3/14; 21,4%) y O26 (1/14; 7,1%) (Tabla 18).

Tabla 18. Aislamiento de cepas *E. coli* toxigénicas y no toxigénicas serogrupo positivas por SIM a partir de muestras de cuero y carcasa stx y eae positivas (Etapa 4).

Tipo de muestra	O26		O45		O103		O121		O157		TOTAL
	No-tox	Tox	No-tox	Tox	No-tox	Tox	No-tox	Tox	No-tox	Tox	
Cuero	5/11	0/11	0/11	0/11	1/11	0/11	4/11	0/11	1/11	0/11	11
Carcasa	1/14	0/14	3/14	0/14	3/14	1/14	6/14	0/14	0/14	0/14	14
TOTAL	6	0	3	0	4	1	10	0	1	0	25

4.6. ETAPA 5. CARACTERIZACIÓN

En total se aislaron 32 cepas, 7 por Metodología A (4 provenientes de muestras de carcasas y 3 de muestras de cueros), y 25 por Metodología B (14 provenientes de muestras de carcasas y 11 de muestras de cueros).

Las 7 cepas aisladas por la Metodología A resultaron stx-positivas. De las 25 cepas aisladas por Metodologías B y C, 1 resultó stx-serogrupo-positivo y 24 resultaron serogrupo-positivas no toxigénicas.

4.6.1. Identificación bioquímica

Según los resultados obtenidos con el API 20 E, las cepas fueron identificadas como *Escherichia coli*.

4.6.2. Serotipificación

Los serotipos de las 8 cepas STEC fueron los siguientes: O103:H2 *stx*₁, O113:H21 *stx*₂, O130:H11 *stx*₁/*stx*₂, O171:H2 *stx*₂, O178:H19 *stx*₂, ONT:H21 *stx*₂ y 2 cepas ONT:H7 *stx*₂.

Las 24 cepas serogrupo-positivas no toxigénicas no fueron serotipificadas fenotípicamente.

4.6.3. Caracterización genotípica

4.6.3.1. PCR *eae*

De las 32 cepas analizadas, en 4 (12,5%) se detectó el gen *eae*. Una cepa correspondió a STEC O103:H2 *stx*₁, y las otras 3 resultaron ser cepas de *E. coli* no toxigénicas (Tabla 19 y 20).

4.6.3.2. PCR *ehxA*

De las 32 cepas analizadas, en 3 (9,4%) se detectó el gen *ehxA*. Las cepas que resultaron positivas fueron: O103/*stx*₁/*eae*; O130:H11 *stx*₁/*stx*₂ y O113:H21 *stx*₂ (Tabla 19 y 20).

4.6.3.3. PCR *saa*

De las 28 cepas analizadas *eae*-negativas, sólo en 2 (7,1%) se detectó el gen *saa*. Las cepas *saa*-positivas fueron: O130:H11 *stx*₁/*stx*₂/*ehxA* y la O113:H21 *stx*₂/*ehxA* (Tabla 19 y 20).

4.6.3.4. PCR *aggR*

Las 7 cepas STEC *eae*-negativas, fueron negativas para *aggR* (Tabla 19).

4.6.4. Subtipificación de la toxina Shiga

Se analizaron 8 cepas con PCR para subtipificación de las variantes de *stx*. Las dos cepas que portaban *stx*₁, resultaron positivas para la variante *stx*_{1a}. De las 7 cepas que portaban *stx*₂, 5 resultaron positivas para *stx*_{2c}, 1 para *stx*_{2a} y 1 para *stx*_{2d} (Tabla 19).

Tabla 19. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas STEC aisladas de cuero y carcasa, detallado por muestra (Etapa 5).

Muestra			Cepa					
N°	Tipo	Frigorífico/ Lote	Serotipo	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>saa</i>	<i>aggR</i>
5	Carcasa	A/1	O103:H2	<i>stx</i> _{1a}	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	Cuero	A/2	O178:H19	<i>stx</i> _{2c}	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	Carcasa	A/2	ONT:H7	<i>stx</i> _{2c}	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	Carcasa	B/3	O130:H11	<i>stx</i> _{1a} y <i>stx</i> _{2a}	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
25	Cuero	A/5	O113:H21	<i>stx</i> _{2d}	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
35	Cuero	A/6	O171:H2	<i>stx</i> _{2c}	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
38	Carcasa	B/7	ONT:H7	<i>stx</i> _{2c}	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
49	Carcasa	B/9	ONT:H21	<i>stx</i> _{2c}	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
TOTAL POSITIVOS				8	1	3	2	0

Tabla 20. Caracterización genotípica de las cepas NO toxigénicas aisladas de cuero y carcasa, detallado por muestra (Etapa 5).

Muestra			Cepa			
Nro.	Tipo	Frigorífico/ Lote	Serogrupo	eae	ehxA	saa
7	Carcasa	A/2	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	Carcasa	A/2	O45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	Carcasa	A/2	O103	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	Cuero	A/5	O26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
26	Cuero	A/5	O26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	Cuero	A/6	O26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
34	Carcasa	B/7	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
37	Cuero	B/7	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
38	Carcasa	B/7	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
39	Cuero	B/7	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
40	Cuero	B/7	O103	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
41	Cuero	B/7	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
42	Cuero	B/7	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
			O157	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
45	Cuero	A/8	O26	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
48	Cuero	A/8	O26	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
48	Carcasa	A/8	O26	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
50	Carcasa	B/9	O103	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
			O45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
55	Carcasa	B/10	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
57	Carcasa	B/10	O103	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
			O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
59	Carcasa	B/10	O121	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
			O45	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
TOTAL POSITIVOS				3	0	0

4.7. ETAPA 6. ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO

Por *Xba*I-PFGE, 31 cepas se diferenciaron en 25 patrones de restricción y 1 cepa resultó no tipificable. Se detectaron aislamientos con patrones idénticos, los cuales fueron agrupados en clusters (100% de similitud). El análisis y la interpretación de los patrones se realizaron por serogrupo.

4.7.1. Patrones *Xba*I-PFGE de cepas toxigénicas

Las 8 cepas STEC presentaron patrones únicos (Tabla 21).

Tabla 21. Patrón *Xba*I-PFGE y caracterización genotípica de las cepas STEC aisladas de cuero y carcasa (Etapa 5 y 6).

Muestra			Cepa			
Nº	Tipo	Frigorífico/Lote	Serotipo	Caracterización genotípica	Patrón <i>Xba</i> I-PFGE	Cluster
5	Carcasa	A/1	O103:H2	<i>stx_{1a}/eae/ehxA</i>	AREXWX01.0030	-
7	Cuero	A/2	O178:H19	<i>stx_{2c}</i>	AREMAX01.0041	-
11	Carcasa	A/2	ONT:H7	<i>stx_{2c}</i>	AREZKX01.0069	-
14	Carcasa	B/3	O130:H11	<i>stx_{1a}/stx_{2a}/ehxA/saa</i>	AREHBX01.0003	-
25	Cuero	A/5	O113:H21	<i>stx_{2c}/ehxA/saa</i>	AREXPX01.0051	-
35	Cuero	A/6	O171:H2	<i>stx_{2c}</i>	AREZ8X01.0010	-
38	Carcasa	B/7	ONT:H7	<i>stx_{2c}</i>	AREZKX01.0099	-
49	Carcasa	B/9	ONT:H21	<i>stx_{2c}</i>	AREZKX01.0100	-

4.7.2. Análisis e interpretación de los patrones por serogrupo

4.7.2.1. *Xba*I-PFGE serogrupo O121

Entre las 10 cepas O121 aisladas se identificaron 6 patrones *Xba*I-PFGE con 59,3% de similitud. Al analizar dichos resultados, se pudieron identificar 2 clusters y 4 patrones únicos.

En el cluster 1 se agruparon 2 cepas aisladas de muestras de carcasa (muestras N° 55 y 57), las cuales correspondieron a muestras obtenidas en el mismo frigorífico, pertenecientes al mismo lote, pero provenientes de animales distintos (Figura 7).

En el cluster 2 se agruparon 4 cepas, 3 aisladas de muestra de cuero (muestras N° 39, 41 y 42) y 1 aislada de muestra de carcasa (muestra N° 38). Todas correspondieron a muestras extraídas en el mismo frigorífico, pertenecientes al mismo lote pero proveniente de animales distintos (Figura 7).

Las cepas aisladas de la carcasa N° 7 y de la carcasa N° 34 presentaron un 96,3% de similitud. Las mismas correspondieron a muestras extraídas en el mismo frigorífico pero de distintos lotes, por ende, en distintas jornadas de muestreo y distintos animales (Figura 7).

Las cepas aisladas de la muestra de cuero N° 37 y de la muestra de carcasa N° 59; presentaron patrones únicos y bajos porcentajes de similitud con respecto a las otras cepas (Figura 7).

Figura 7. Relación clonal entre las 10 cepas *E. coli* O121 aisladas de muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).



4.7.2.2. XbaI-PFGE serogrupo O26

Entre las 6 cepas O26 aisladas se identificaron 3 patrones de XbaI-PFGE con 66,9% de similitud. Al analizar dichos resultados se identificó 1 cluster (cluster 3), y 2 patrones únicos.

En el cluster 3, se agruparon 3 cepas *eae*-positivas; de las cuales 2 fueron aisladas de muestras de cuero (muestras N° 45 y 48) y 1 fue aislada de muestra de carcasa (muestra N° 48). Las 3 correspondieron a muestras obtenidas en el mismo frigorífico y pertenecientes al mismo lote. Las cepas aisladas de la carcasa N° 48 y del cuero N° 48 pertenecen al mismo animal; mientras que la cepa aislada del cuero N° 45 corresponde a un animal diferente (Figura 8).

Las cepas aisladas de las muestras de cuero N° 25 y N° 28 presentaron un 97,4% de similitud, las cepas corresponden a muestras de cuero obtenidas en el mismo frigorífico y pertenecientes al mismo lote, pero provenientes de animales distintos (Figura 8).

Figura 8. Relación clonal entre las 6 cepas *E. coli* O26 aisladas de muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-XbaI



4.7.2.3. XbaI-PFGE serogrupo O45

De las 3 cepas O45 aisladas, 2 presentaron patrones únicos de XbaI-PFGE, con 88,9% de similitud y una resultó ser no tipificable por PFGE por estar lisada aún después del tratamiento con tiourea (Figura 9).

Figura 9. Relación clonal entre las 2 cepas *E. coli* O45 aisladas en muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

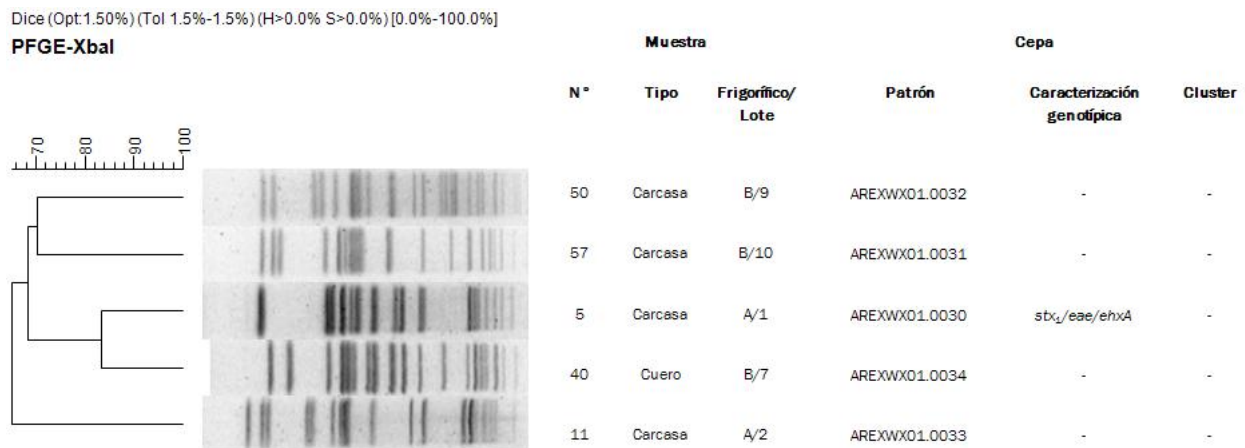
PFGE-XbaI



4.7.2.4. XbaI-PFGE serogrupo O103

Las 5 cepas O103 aisladas presentaron patrones únicos de XbaI-PFGE con 65,3% de similitud (Figura 10). La cepa aislada de la carcasa N° 5 del frigorífico A fue caracterizada como *stx_{1a}/eae/ehxA* y presentó un 83,3% de similitud con la cepa aislada del cuero N° 40 del frigorífico B.

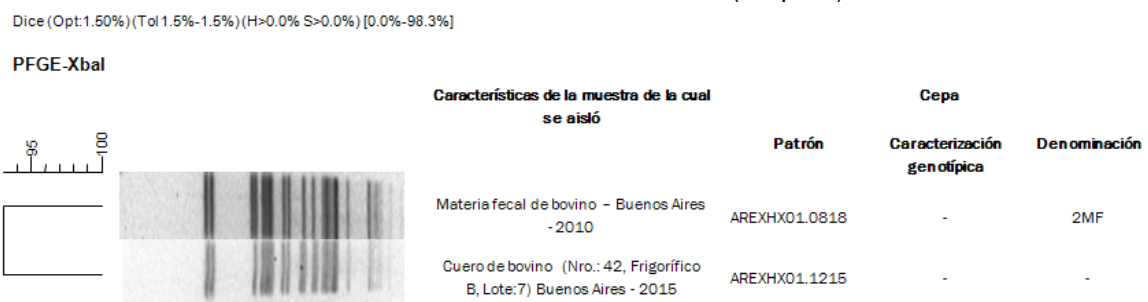
Figura 10. Relación clonal entre las 5 cepas *E. coli* O103 aisladas de muestras de cuero y carcasa (Etapa 6).



4.7.3. Comparación con la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* O157

Se encontró un 93% de similitud entre el patrón *XbaI*-PFGE de la cepa O157 no toxigénica aislada de la muestra de cuero N° 42 y una cepa aislada de materia fecal bovina del mismo serotipo, negativa para *eae* y *exxA*, aislada en el 2010 (Figura 11).

Figura 11. Relación clonal entre la cepa *E. coli* O157 aislada de cuero y una cepa *E. coli* O157 aislada de materia fecal cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* O157 (Etapa 6).

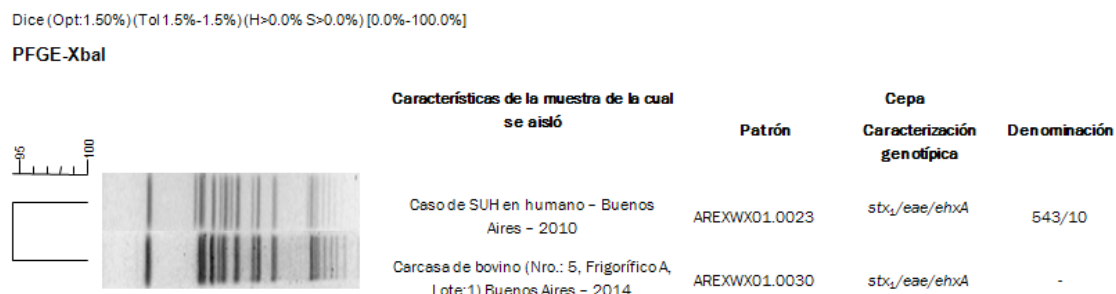


4.7.4. Comparación de los patrones *XbaI*-PFGE de las cepas toxigénicas con la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-O157

4.7.4.1. *XbaI*-PFGE O103:H2 *stx_{1a}/eae/exxA*

Se encontró un 94,5% de similitud con el patrón *XbaI*-PFGE de un aislamiento detectado en un caso de SUH en el año 2010, del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia (Figura 12).

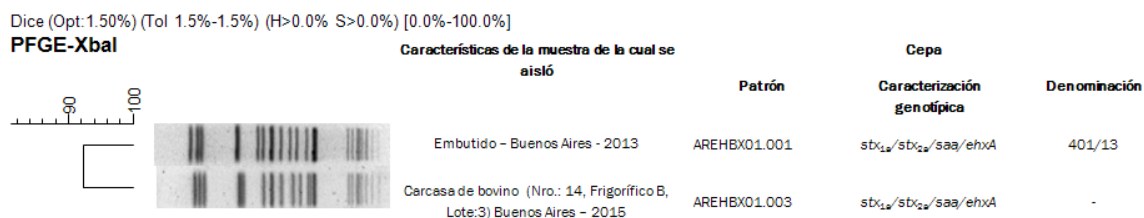
Figura 12. Relación clonal entre la cepa STEC O103:H2 aislada de carcasa y una cepa STEC O103 aislada de un caso de SUH, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-0157 (Etapa 6).



4.7.4.2. XbaI-PFGE O130:H11 stx_{1a}/stx_{2a}/saa/ehxA

Se encontró un 92,3% de similitud con el patrón *XbaI*-PFGE de un aislamiento obtenido a partir de un embutido fresco de carne vacuna, del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia (Figura 13).

Figura 13. Relación clonal entre la cepa STEC O130:H11 aislada de carcasa y una cepa STEC O130:H11 aislada de alimento, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-0157 (Etapa 6).



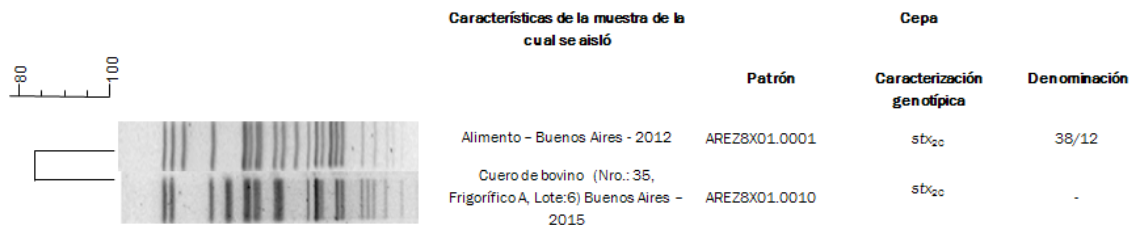
4.7.4.3. XbaI-PFGE O171:H2 stx_{2c}

Se encontró un 82,1% de similitud con el patrón *XbaI*-PFGE de un aislamiento obtenido a partir de alimento cárnico, del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia, aislada en el 2012 (Figura 14).

Figura 14. Relación clonal entre la cepa STEC O171:H2 aislada de cuero y una cepa STEC O171:H2 aislada de alimento, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-O157 (Etapa 6).

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-XbaI



4.7.4.4. XbaI-PFGE O178:H19 stx_{2c}

Se encontró un 88,1% de similitud con los patrones XbaI-PFGE de cepas de bovino aisladas en Argentina en el año 2007 del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia (Figura 15).

Figura 15. Relación clonal entre la cepa STEC O178:H19 aislada de cuero y cinco cepas STEC O178:H19 aislada de animales, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-O157 (Etapa 6).

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-XbaI



4.7.4.5. XbaI-PFGE ONT:H7 stx_{2c}

Se encontró un 56,41% de similitud entre las 2 cepas ONT:H7. Con respecto a la aislada de la carcasa N° 11 se encontró idéntico patrón de XbaI-PFGE con 3 cepas aisladas de alimentos cárnicos en los años 2010, 2011 y 2016 del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia (Figura 16).

Figura 16. Relación clonal entre la cepa STEC ONT:H7 (carcasa N° 11) y cuatro cepas STEC ONT:H7 aislada de alimentos, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-O157 (Etapa 6).

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-XbaI

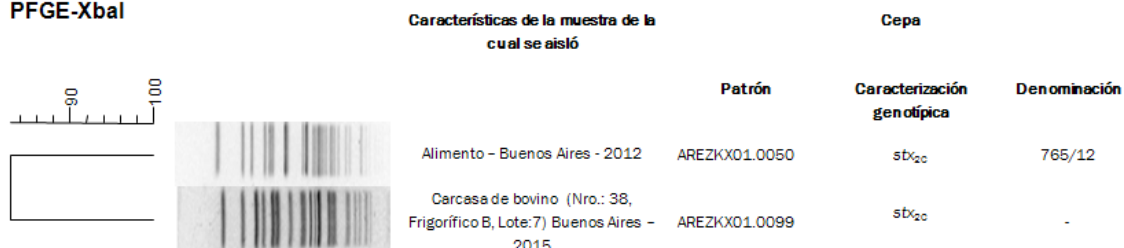


En referencia a la cepa aislada de la carcasa N° 38 se encontró un 82,9% de similitud con una cepa aislada de alimento cárnico en el 2012 del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia (Figura 17).

Figura 17. Relación clonal entre la cepa STEC ONT:H7 (carcasa N° 38) y una cepa STEC ONT:H7 aislada de alimento, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-O157.

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-XbaI

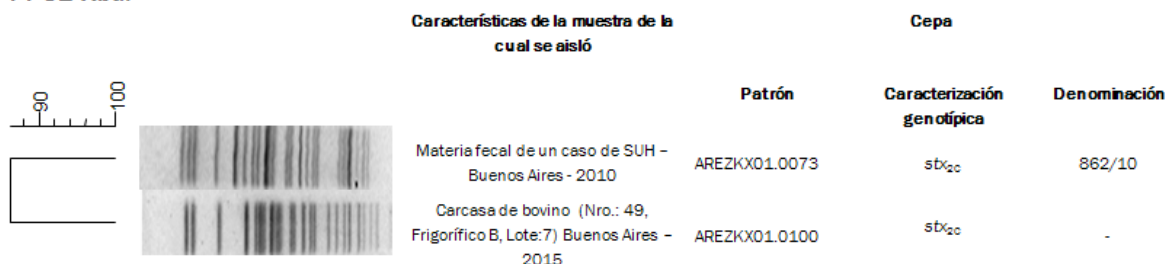


Con respecto a la cepa ONT:H21 aislada de la carcasa N° 49, se encontró un 86,4% de similitud con una cepa aislada de un caso de SUH del año 2010, del mismo serotipo e idéntico perfil de virulencia (Figura 18).

Figura 18. Relación clonal entre la cepa STEC ONT:H21 (carcasa N°49) y una cepa STEC ONT:H21 aislada de un caso de SUH, cargada en la Base Nacional de Datos de PFGE de *E. coli* no-O157 (Etapa 6).

Dice (Opt: 1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

PFGE-XbaI



4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se probaron los supuestos de normalidad (Test de Shapiro-Wilk's) y homogeneidad de varianza (Test de Levene) al 5% de significancia. De los tests correspondientes se determinó que el conjunto de datos analizados presentó distribución normal y varianzas homogéneas.

El ANOVA de la variable, valor Ct para el gen stx en muestras de cuero, se muestra en la Tabla 22 en donde se observó un efecto contundente tanto del frigorífico como de los lotes ($p = 0,001$).

Tabla 22. ANOVA de la variable, valor Ct para el gen stx en muestras de cuero

ANOVA					
Factor	SC	GL	CM	F	Valor-p
Frigorífico	68,91	1	68,91	43,03	0,001
Lote	312,03	8	39	24,38	0,001

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios y F: Fisher.

Ante la existencia de efectos significativos, se realizó una análisis de comparaciones múltiples (prueba post hoc) a través del test de Tukey con el objeto de ahondar aún más en los efectos de cada uno. En este sentido se observó que la media del frigorífico A (34,35) fue significativamente ($p=0,001$) menor que la media del frigorífico B (36,50). Asimismo, se observaron diferencias significativas ($p = 0,001$) entre los lotes del frigorífico A y entre los lotes del frigorífico B (Tabla 23).

Tabla 23. Comparación de medias entre lotes del frigorífico A y del frigorífico B para la variable, valor Ct para el gen stx en muestras de cuero (Test de Tukey).

Test de Tukey							
Frigorífico	Lote	Media		Frigorífico	Lote	Media	
A	1	38,05	A	B	3	38,97	A
A	8	34,45	B	B	10	38,17	A
A	5	33,95	B	B	7	37,63	A
A	2	33,38	B	B	4	34,20	B
A	6	30,93	C	B	9	33,52	B
Medias con letra común no son significativamente diferentes							

El ANOVA de la variable, valor Ct para el gen stx en muestras de carcasa, se muestra en la Tabla 24 en donde no se observó efecto significativo del frigorífico ($p = 0,149$) pero sí de los lotes ($p = 0,001$).

Tabla 24. ANOVA de la variable, valor Ct para el gen stx en muestras de carcasa.

ANOVA					
Factor	SC	GL	CM	F	Valor-p
Frigorífico	7,14	1	7,14	2,14	0,149
Lote	450,61	8	56,33	16,88	0,001

SC: suma de cuadrados, GL: grados de libertad, CM: cuadrados medios y F: Fisher.

Ante la existencia de efecto significativo para el factor lote, se realizó del test de Tukey en donde se observaron diferencias significativas ($p = 0,001$) entre los lotes de ambos frigoríficos (Tabla 25).

Tabla 25. Comparación de medias entre lotes de ambos frigoríficos para la variable, valor Ct para el gen *stx* en muestras de carcasa (Test de Tukey).

Test de Tukey						
Frigorífico	Lote	Media				
A	1	35,78	A	B		
B	10	35,13	A	B	C	
A	8	34,83	A	B	C	
B	7	32,25		B	C	D
B	3	31,67		B	C	D
B	9	30,73			C	D
B	4	30,68			C	D
A	6	30,15			C	D
A	5	30,10			C	D
A	2	26,15				E
Medias con letra común no son significativamente diferentes						

4.9. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

Del frigorífico A se aislaron 15 cepas, 5 de las cuales resultaron STEC y 10 *E. coli* no toxigénicas pertenecientes a los serogrupos investigados. De las 5 cepas STEC, 3 fueron aisladas de cuero y 2 de carcasa. Del lote 1 se aisló 1 cepa STEC, a partir de una muestra de carcasa (O103:H2 *stx*_{1a}/*eae/ehxA*). Del lote 2 se aislaron 2 cepas STEC, una a partir de una muestra de carcasa y otra de cuero (O178:H19 *stx*_{2c} y ONT:H7 *stx*_{2c}). De los lotes 5 y 6 se aisló 1 cepa STEC, a partir de muestras de cuero (O113:H21 *stx*_{2d/ehxA/saa y O171:H2 *stx*_{2c}) y del lote 8 no hubo aislamiento de cepas STEC. Entre las cepas *E. coli* no toxigénicas se identificó 1 cluster, denominado cluster 3, conformado por cepas O26 que se aislaron de muestras de cuero y carcasa del mismo animal y de 1 cuero de 1 animal perteneciente al mismo lote, lo que confirmaría la contaminación cruzada (Tabla 26).}

Del frigorífico B se aislaron 17 cepas, 3 de las cuales resultaron STEC y 14 *E. coli* no toxigénicas pertenecientes a los serogrupos investigados. Las 3 cepas STEC se aislaron de muestras de carcasa. Del lote 3, 7 y 9 se aislaron cepas STEC (O130:H11 *stx*_{1a/stx}_{2a/ehxA/saa, ONT:H7 *stx*_{2c} y ONT:H21 *stx*_{2c} respectivamente) y del lote 4 y 10, no hubo aislamiento. Entre las cepas *E. coli* no toxigénicas se identificaron 2 clusters, denominados 1 y 2, conformados por cepas O121 aisladas}

de muestras de cuero y carcasa de distintos animales pero pertenecientes al mismo lote, lo que confirmaría la contaminación cruzada (Tabla 26).

En 7 muestras (5 carcasas y 2 cueros) se aislaron 2 cepas por muestra. De las carcasas N° 11 y 38 y del cuero N° 25 se aislaron cepas STEC (ONT:H7 *stx*_{2c}, ONT:H7 *stx*_{2c} y O113:H21 *stx*_{2d}/*ehxA/saa*, respectivamente) y cepas *E. coli* no toxigénicas (O103, O121 y O26, respectivamente). Del cuero N° 42 y de las carcasas N° 50, 57 y 59 se aislaron 2 cepas *E. coli* no toxigénicas de distinto serogrupo (O121-O157, O103-O45, O103-O121 y O121-O45, respectivamente) (Tabla 26).

Como se observó en el punto 4.8, la media del valor Ct para el gen *stx* en muestras de cuero del frigorífico A (34,35) fue significativamente ($p=0,001$) menor que la media (36,50) del frigorífico B. Es decir, que la concentración del gen *stx* fue mayor en las muestras de cuero del frigorífico A. Este resultado coincide con la mayor frecuencia de recuperación de cepas STEC en muestras de cuero del frigorífico A (3/30; 10%) comparado con la frecuencia de recuperación de cepas STEC del frigorífico B (0%). En referencia al análisis de los resultados por lote se observó que en el frigorífico A se recuperaron cepas STEC de las muestras de cueros obtenidas a partir de los lotes categorizados con las letras B y C, según la prueba de Tukey, es decir, de los que presentaron menor valor de Ct.

Con respecto a las muestras de carcasa no se encontró relación entre el valor Ct para el gen *stx* y la frecuencia de recuperación de cepas STEC, ya que hubo aislamientos de los lotes 1, 2, 3, 7 y 9, es decir, de lotes categorizados con las letras A, B, C y D, según la prueba de Tukey.

Tabla 26. Caracterización y relación clonal de las cepas aisladas de cuero y carcasa, detallado por muestra (Etapa 5 y 6).

Muestra				Cepa			
N°	Tipo	Frigorífico	Lote	Serotipo/ Serogrupo	Caracterización genotípica	Cluster	Patrón
5	Carcasa	A	1	O103:H2	<i>stx_{1a}/eae/ehxA</i>	-	AREXWX01.0030
7	Cuero	A	2	O178:H19	<i>stx_{2c}</i>	-	AREMAX01.0041
7	Carcasa	A	2	O121	-	-	AREXKX01.0061
10	Carcasa	A	2	O45	-	-	No tipificable
11	Carcasa	A	2	ONT:H7	<i>stx_{2c}</i>	-	AREZKX01.0069
11	Carcasa	A	2	O103	-	-	AREXWX01.0033
14	Carcasa	B	3	O130:H11	<i>stx_{1a}/stx_{2a}/saa/ehxA</i>	-	AREHBX01.0003
25	Cuero	A	5	O113:H21	<i>stx_{2d}/saa/ehxA</i>	-	AREXPX01.0051
25	Cuero	A	5	O26	-	-	AREVCX01.0059
26	Cuero	A	5	O26	-	-	AREVCX01.0061
28	Cuero	A	5	O26	-	-	AREVCX01.0060
34	Carcasa	A	6	O121	-	-	AREXKX01.0060
35	Cuero	A	6	O171:H2	<i>stx_{2c}</i>	-	AREZ8X01.0010
37	Cuero	B	7	O121	-	-	AREXKX01.0064
38	Carcasa	B	7	ONT:H7	<i>stx_{2c}</i>	-	AREZKX01.0099
38	Carcasa	B	7	O121	-	2	AREXKX01.0063
39	Cuero	B	7	O121	-	2	AREXKX01.0063
40	Cuero	B	7	O103	-	-	AREXWX01.0034
41	Cuero	B	7	O121	-	2	AREXKX01.0063
42	Cuero	B	7	O121	-	2	AREXKX01.0063
42	Cuero	B	7	O157	-	-	AREHXH01.1215
45	Cuero	A	8	O26	<i>eae</i>	3	AREVCX01.0058
48	Cuero	A	8	O26	<i>eae</i>	3	AREVCX01.0058
48	Carcasa	A	8	O26	<i>eae</i>	3	AREVCX01.0062
49	Carcasa	B	9	ONT:H21	<i>stx_{2c}</i>	-	AREZKX01.0073
50	Carcasa	B	9	O103	-	-	AREXWX01.0032
50	Carcasa	B	9	O45	-	-	AREHZX01.0001
55	Carcasa	B	10	O121	-	1	AREXKX01.0065
57	Carcasa	B	10	O103	-	-	AREXWX01.0031
57	Carcasa	B	10	O121	-	1	AREXKX01.0065
59	Carcasa	B	10	O121	-	-	AREXKX01.0062
59	Carcasa	B	10	O45	-	-	AREHZX01.0002

5. DISCUSIÓN

Justificación de las Metodologías empleadas:

Para definir un protocolo específico de detección y aislamiento es necesario conocer las características fenotípicas y genotípicas que permiten diferenciar a la bacteria blanco del resto de la flora.

Respecto a STEC O157:H7/NM, presenta características fenotípicas distintivas como la incapacidad de fermentar sorbitol y la ausencia de actividad β -glucuronidasa. La detección de las mismas utilizando la metodología apropiada contribuye a la rápida identificación de la colonia positiva pudiendo separarla del resto de la población bacteriana Otra característica que facilita su aislamiento, es la capacidad de desarrollar en medios de cultivo conteniendo distintos antibióticos (novobiocina, cefixima, vancomicina, entre otros).

El verdadero desafío siguen siendo las cepas STEC no-O157 ya que representan un grupo muy heterogéneo que no presenta características fenotípicas que permitan diferenciarlas de otras cepas *E. coli*, siendo la toxina Shiga el único factor de virulencia que podría distinguirlas. La identificación del antígeno somático, también resulta compleja ya que más de 100 serotipos de STEC fueron asociados a enfermedad humana. Sin embargo, en Estados Unidos seleccionaron 6 serogrupos denominados “Big Six”, utilizando como criterio aquellos que más frecuentemente estaban asociados a cuadros clínicos.

Otro factor importante que debe contemplarse al seleccionar un protocolo, es la matriz de trabajo de la muestra a analizar. En las muestras de cuero y carcasa puede haber inhibidores de la PCR, los cuales deben ser eliminados aplicando técnicas de extracción de ADN específicas para cada matriz.

Por otro lado, es de resaltar que en este tipo de muestra, las cepas STEC se suelen encontrar en baja concentración, estresadas y obligadas a competir por los nutrientes del medio con una abundante flora bacteriana.

Es por todo esto que existen diferentes protocolos propuestos para la detección de STEC en el marco normativo, según el país y/o la región del mundo. A fin de asegurar la detección y aislamiento de STEC en cada tipo de matriz, de acuerdo a lo planteado en este estudio, se utilizaron diferentes metodologías para tratar de aumentar la probabilidad de llegar al aislamiento de la colonia *stx* y *eae* positiva.

Discusión de los resultados obtenidos con las distintas metodologías:

A lo largo de la discusión se citan los estudios de Chaves y col. (2015), Barcoy y col. (2003) y Arthur y col. (2002). En dichos estudios las carcasas fueron evaluadas en 2 momentos; previo a la evisceración y luego de la aplicación de intervenciones antimicrobianas. En los frigoríficos estudiados en el presente trabajo no se aplicó intervención alguna, por lo que resulta coherente la comparación entre las frecuencias observadas con las reportadas en las carcasas previas a la evisceración en los trabajos mencionados.

Con respecto a la frecuencia de detección de STEC, por Metodología A, fue del 13,3% en muestras de cuero y del 31,7% en muestras de carcasa. En este caso lo que se analizó fue la zona de crecimiento confluyente desarrollado como resultado de la siembra del enriquecido en una placa de MAC; mientras que en las Metodologías B y C se analizó el enriquecido en forma directa. Este protocolo permitió eliminar el efecto matriz, pero perdió sensibilidad de detección ya que las cepas STEC fueron sometidas a la presión de selección ejercida por el medio selectivo y por ende, sólo desarrollan aquellas bacterias que se encuentran metabólicamente activas.

Por la Metodología B (PCR en tiempo real) la frecuencia de detección de STEC en muestras de cuero fue del 100%. Este resultado es similar al 96,7% reportado por Chaves y col. (2012) quienes también utilizaron el BAX System como técnica de tamizaje. La frecuencia de detección de STEC en muestras de carcasa fue del 100%. Esta frecuencia dista bastante del 33,3% reportado por dichos autores. Esta diferencia se puede deber al protocolo para la toma de muestra y a la efectividad de las prácticas de trabajo en frigorífico para evitar la contaminación cruzada.

Por la Metodología C (PCR de punto final) la frecuencia de detección de STEC en las muestras de cuero fue del 48,3%. Otros estudios, que también utilizaron una PCR de punto final, reportaron frecuencias del 91,7% (Barkocy y col. 2003) y del 67% (Monaghan y col., 2012). Las diferencias se pueden deber al protocolo para la toma de muestra y a la PCR empleada. La frecuencia de detección de STEC en muestras de carcasa fue del 80%. Este resultado es inferior al 96,6% reportado por Barcoy y col. (2003), pero superior al 71,9% reportado por Arthur y col. (2002).

Las frecuencias de detección de STEC registradas *a posteriori* de las intervenciones en carcasas, fueron de: 16,3% (Barcoy y col., 2003), 10,1% (Arthur y col., 2002) y del 0% (Chaves y col., 2015). Estos valores evidencian la efectividad de las mismas.

En el presente estudio tanto por Metodología A como por Metodología B la frecuencia de detección de STEC fue mayor en carcasas que en cueros. De los distintos estudios realizados, sólo Barcoy y col. (2003), encontraron resultados similares, ya que reportaron una frecuencia de detección del 91,68% en cueros y del 96,68% en carcasas pre-evisceración. Posibles explicaciones para este hallazgo es la baja efectividad de las técnicas de trabajo empleados en el frigorífico para evitar la transferencia de microorganismos del cuero a la carcasa y a la ausencia de intervenciones antimicrobianas, especialmente luego de las maniobras identificadas como puntos críticos de contaminación (atado de culata, cuereado, aserrado de pecho, atado de esófago y evisceración).

Las diferencias observadas entre Metodologías B y C fueron del 20% para carcasas y del 51,7% para cueros. Una posible explicación es que la PCR en tiempo real es más sensible que la PCR de punto final. De hecho, se observó que a medida que aumentó la concentración de STEC, evidenciado por la disminución en el valor de Ct, aumentó el porcentaje de muestras positivas para la PCR de punto final. Además, se observó que el 96,7% de las carcasas presentaron un Ct menor a 37; mientras que para las muestras de cuero, sólo el 61,7% presentaron valores inferiores a 37. El 38,3% restante pudo haber presentado una concentración de STEC lo suficientemente baja como para no ser detectable por PCR de punto final. Otra posibilidad es que haya que realizar una validación "in house" para la determinación de los valores de Ct que deberían considerarse como punto de corte

para este tipo de muestras, recordemos que la técnica no está validada para muestras de cuero.

La frecuencia de detección de *stx* y *eae* por Metodologías B y C fue del 36,7% en muestras de cuero y del 48,3% en muestras de carcasa. Estas muestras se definirían, según criterio SENASA y USDA como muestras con **presencia presuntiva** de STEC patógena para humanos.

Los marcadores moleculares de O103 y de O121 fueron los más frecuentes tanto en cueros como en carcasas. El marcador de O26 fue el tercero en frecuencia en las muestras de cuero; mientras que el marcador de O45 fue el tercero en frecuencia en las muestras de carcasa. En ninguna muestra se detectó el marcador de O111. Los resultados coinciden con los publicados por Chaves y col. (2012), en donde identifica al O103 como el serogrupo más frecuente en temporada de lluvias y al O121 junto con el O26 como los más frecuentes en temporada seca. Los autores detectaron O45 y O145 con la misma frecuencia en ambas temporadas y no detectaron O111 (Chaves y col., 2015). Otros autores también reportaron a los serogrupos O26 y O103 como más frecuentes que O111 y O145 (Joris, Pierard y De Zutter, 2011). Pearce y col. (2006) reportaron una prevalencia del 4,6% para O26; de 2,7% para O103; de 0,7% para O145 y de 0% para O111.

En cuanto a las diferencias observadas entre Metodologías surge que, por Metodología B (PCR en tiempo real), el 100% de las muestras de cuero fueron positivas para al menos 1 de los serogrupos analizados y el 77,22% presentó positividad para 3, 4 ó 5 serogrupos. Por Metodología C (PCR de punto final) se confirmó que el 95,45% de las muestras eran positivas para al menos uno de los serogrupos analizados, pero sólo el 9,09% resultó positivo para más de 2 serogrupos. En las muestras de carcasa por Metodología B (PCR en tiempo real), el 93,10% fueron positivas para, al menos, uno de los serogrupos analizados y el 44,44% presentó positividad para 3 ó 4 serogrupos. Por Metodología C (PCR de punto final) se confirmó que el 92,59% de las muestras eran positivas para, al menos, un serogrupo, pero sólo 16,67% resultó positivo para más de 2 serogrupos. Las posibles causas para las diferencias mencionadas fueron discutidas anteriormente.

La posibilidad de obtención del aislamiento a partir de una muestra con tamizaje positivo depende fundamentalmente de factores tales como: medio de cultivo y condiciones de enriquecimiento adecuado según matriz, nivel de estrés de la bacteria y contaminación múltiple que impida el desarrollo del patógeno en cuestión.

El porcentaje de recuperación de cepas STEC en las muestras de cuero fue del 5%, todas aisladas por la Metodología A. Estos resultados son semejantes al 5,5% reportado por Monaghan y col. (2012); pero inferiores al 56% reportado por Barcoy y col. (2003). El porcentaje de recuperación de cepas STEC en las muestras de carcasa fue del 8,3% (6,7% por la Metodología A y 1,7% por las Metodologías B y C). Los resultados son semejantes al 9% reportado por Masana y col. (2011); sin embargo, son inferiores al 20,8 y 59,8%; reportados por Breum y Boel (2010) y Arthur y col. (2002), respectivamente. Las diferencias se pueden deber a la técnica de aislamiento aplicada. Barcoy y col. (2003), Arthur y col. (2002) así como Breum y Boel (2010) realizaron una técnica que en inglés se denomina colony blot hybridization, tal como lo describe Nielsen y Andersen (2003). En este caso la técnica se basa exclusivamente en la detección del gen *stx* indistintamente del serogrupo al que pertenecen.

El porcentaje de recuperación de cepas positivas para los serogrupos analizados en muestras de cuero fue de 63,3%. El serogrupo más frecuentemente aislado fue el O26, seguido por el O121, O103 y O157. Todas las cepas aisladas resultaron negativas para el gen *stx*. El porcentaje de recuperación de cepas positivas para serogrupos en muestras de carcasa fue de 40,74%. El serogrupo más frecuentemente aislado fue el O121, seguido por O103, O45 y O26. Sólo 1 cepa O103 resultó *stx*-positiva.

De las 25 cepas pertenecientes a los serogrupos O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145, sólo 1 (O103 *stx*₁/*eae/ehxA*) presentó los genes *stx* y *eae*. Thomas y col. (2011), realizaron un estudio semejante en cueros y carcasas y reportaron que de las 26 cepas O26, sólo 1 era *stx*-positiva, de las 131 cepas O103, sólo 1 era *stx*-positiva y de las 12 cepas O145, ninguna resultó *stx*-positiva. No reportaron

aislamiento de O111. Lo que podemos inferir es que la mayor parte de las cepas positivas para O26, O103, O121 y O145 son no toxigénicas.

Thomas y col. (2011) también aislaron 59 cepas O157 de las cuales 55 resultaron stx-positivas. En el presente estudio se aisló 1 sólo cepa O157 y resultó stx-negativa. Una posible causa es que en el estudio de Thomas y col. se agregó vancomicina (6 mg/l) y cefixima (50 µg/l) al medio de enriquecimiento; mientras que en el presente trabajo no. Éstos antibióticos seleccionan el crecimiento de *E. coli* O157; sin embargo pueden afectar el desarrollo de STEC no-O157.

La disminución desde los altísimos valores de frecuencia de detección por las técnicas de tamizaje hasta la escasa o nula frecuencia de recuperación de cepas STEC de los serogrupos O26, O45, O103, O111, O121 y O145 refleja la complejidad de análisis de las cepas STEC no-O157. Posibles causas son: que los genes detectados en cada etapa de tamizaje no se correspondían a la misma bacteria, que el congelamiento de las muestras enriquecidas afectó la viabilidad de las cepas STEC o que se encontraban en tan baja concentración que no fue posible su aislamiento. Recordemos que la ausencia de marcadores fenotípicos y la altísima prevalencia de *E. coli* serogrupo-positiva no toxigénica hace del aislamiento un verdadero desafío (Wasilenko y col.; 2012).

En el 35% de las muestras de cuero y en el 41,7% de las muestras de carcasa se detectaron los genes *stx*, *eae* y alguno de los serogrupos (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157). Según criterio SENASA y USDA, estas muestras son consideradas con presencia presuntiva de STEC **altamente patógena** para humanos. Sin embargo, se aisló 1 sola cepa STEC perteneciente al serogrupo O103; mientras que se aislaron 24 cepas serogrupo-positivas stx-negativas. Estos resultados reflejan la limitaciones de la Metodología, ya que si bien fue pensado para ajustar la orientación hacia STEC queda establecido que el serogrupo no es marcador privativo de STEC.

Análisis del potencial patogénico de las cepas aisladas

Del total de las cepas aisladas, 21 no presentaron factores de virulencia por lo que no se los podría definir como patógenos para el hombre. Sin embargo, el hallazgo de estas cepas evidenció: la contaminación, muchas veces como contaminación múltiple, de las diferentes muestras analizadas; la contaminación cruzada; y la persistencia de la contaminación a través del tiempo.

Se aislaron 3 cepas EPEC, las cuales fueron clasificadas como EPEC atípicas (EPECa) (datos no mostrados). Esta subclase de EPEC es considerada un enteropatógeno emergente. El humano es el único reservorio de EPEC típica, mientras que animales y humanos son reservorio de EPECa, tal como se evidencia habiéndose aislado 3 cepas EPECa de cuero y carcasa bovina (Nguyen y col., 2006).

Con respecto al potencial patogénico de las cepas toxigénicas, se desprende que la cepa O103:H2, *stx_{1a}/eae/ehxA* detectada pertenece al seropatotipo B (Karmali y col., 2003) y corresponde al grupo “Big Six” establecido por USDA-FSIS para productos cárnicos. Tal como quedaría demostrado al tener un 94% de similitud con una cepa aislada de un caso de SUH.

La detección de la cepa O113:H21 *stx_{2d}/ehxA/saa* es relevante para la salud pública, ya que la variante Stx2d es una de las descritas como más virulentas. Se la denomina Stx2d activable ya que, tras incubarla con elastasa de la mucosa intestinal, aumenta su toxicidad frente a las células Vero (Melton-Celsa y col., 1996). La variante Stx2d está asociada a manifestaciones más severas de la infección por STEC como el SUH (Bielaszewska y col., 2006). Melton-Celsa y col. (1996), sugieren que la producción de una toxina activable podría compensar la falta de *eae*. Existe el antecedente de una cepa, O113:H21 *stx_{2d}/ehxA* (*eae* negativo), que causó 3 casos de SUH en Australia (Paton y col., 1999). En el estudio realizado por Feng y col. (2014) se analizaron 65 cepas STEC O113:H21 aisladas del ambiente, del alimento y de infecciones clínicas en diferentes países, incluyendo la Argentina y se compararon con las aisladas de los casos de SUH en Australia. Los autores encontraron que todas las cepas tenían subtipos de Stx

enfermedades en humanos, por lo cual sugirieron que las cepas ambientales podían considerarse potencialmente patogénicas (Feng y col. 2014).

En el presente trabajo se recuperaron 2 cepas STEC de los serotipos O130:H11 y O178:H19, los cuales fueron descritos dentro de los más prevalentes en bovinos lecheros (Fernández y col., 2010) y en frigoríficos de exportación de Argentina (Masana y col., 2011). También, ambos serotipos fueron aislados de casos de colitis hemorrágica y SUH en diferentes países. En el estudio de Miko y col. (2014), se analizaron 66 cepas O178:H19 aisladas de animales, alimentos y de un caso de SUH, las cepas correspondieron a aislamientos de Argentina y de Alemania. Miko y col. analizaron la relación clonal por PFGE y encontraron 2 grandes clusters (definidos como patrones que poseían una similitud igual o mayor al 80%). El cluster A incluyó 35 cepas, entre las cuales se encontraba una cepa aislada de un caso de SUH en el año 2000 en Argentina. En las cepas de dicho cluster se detectaron genes asociados a enfermedad (*stx_{2a}*, *stx_{2d}*, *ehxA*, *saa*, *sub_{AB1}*, *lpfA₀₁₁₃*, *terE* combinado con *stx_{1a}*, *espP* e *iha*). El cluster B incluyó 26 cepas y se detectó un repertorio limitado de genes virulentos (*stx_{2c}*, *pagC*, *lpfA₀₁₁₃*, *espP*, *iha*). La cepa O178:H19 *stx_{2c}* aislada en el presente estudio presentó un perfil de virulencia que coincidiría con el perfil del cluster B del estudio de Miko y col. (2014). Asimismo, al comparar los patrones XbaI-PFGE con la cepa aislada de un caso de SUH, incluida en dicho estudio, presentó un porcentaje de similitud inferior al 80% (78,95%).

El genotipo *stx_{2c}* fue el más frecuente (75%) seguido por el genotipo *stx_{1a}/eae/ehxA* y *stx_{1a}/stx_{2a}/saa/ehxA* (12,5%). Masana y col. (2011), describieron el genotipo *stx₁/stx₂/ehxA/saa* como el más frecuente (16,7%) y el genotipo *stx_{2c}* como el segundo en orden de frecuencia (15,4%) en muestras de materia fecal y carcasa de bovinos en frigoríficos de exportación.

La mayoría (7/8) de las cepas STEC aisladas fueron *eae* y *aggR* negativas y, por lo tanto, según las recomendaciones de EFSA, USDA-FSIS y SENASA se las clasificaría como con potencial patogénico desconocido. Este resultado coincide con lo reportado por otros autores (Blanco y col., 2004; Monaghan y col., 2011).

Análisis de la relación clonal

Respecto a la relación clonal de las cepas, el hallazgo de cepas *E. coli* O26 con igual patrón de PFGE en muestras de cuero y carcasa del mismo animal (cluster 3), brindaría evidencia de que el cuero podría actuar como fuente de contaminación. Barcoy y col. (2001), reportaron que el 68% de las *E. coli* O157 aisladas de carcasas tenían el mismo patrón de PFGE que las aisladas de cuero y materia fecal.

El hallazgo de cepas *E. coli* O26 con igual patrón de PFGE en muestras de cuero (cluster 3) pertenecientes al mismo lote, aportaría evidencia de la contaminación cruzada entre cueros. La contaminación pudo haber ocurrido durante el transporte o en la etapa de estabulación. Existe el antecedente de Arthur y col. (2007) y de Dewel y col. (2008) quienes demostraron que estas dos instancias actúan como multiplicadores de la contaminación de los cueros.

El aislamiento de cepas *E. coli* O121 con igual patrón de PFGE en muestras de carcasas (cluster 1) pertenecientes al mismo lote, aportaría evidencia de la contaminación cruzada entre carcasas. Esta contaminación pudo haber ocurrido por contacto directo entre ellas o con algún elemento que actúa como vehículo. *E. coli* puede sobrevivir un tiempo considerable en superficies de acero inoxidable (ca. 8 días a 4°C) (Farrel y col., 1998) y plástico (Ak y col., 1994). Byrne y col. (2000) realizaron un ensayo desafío, en donde inocularon cueros con materia fecal contaminada con *E. coli* O157:H7, los sometieron a lavados de distintas duración y luego verificaron la recuperación de la cepa en distintos puntos del procesamiento de la canal. Así fue como lograron aislar la cepa inoculada en carcasas, en cuchillos y en las manos de los operarios. Si bien en el presente estudio no se tomaron muestras de los elementos de trabajo ni de los operarios, estos antecedentes nos permitirían inferir que este mecanismo de contaminación es factible. Elder y col. (2000) identificaron que en algunos lotes, aun cuando la materia fecal y el cuero fueron negativos, las muestras de carcasas resultaron positivas, otra evidencia que la contaminación cruzada de las carcasas podría ocurrir en frigoríficos.

El hallazgo de cepas *E. coli* O121 con 96,3% entre muestras del mismo frigorífico pero de distintos lotes y por ende, de distintas jornadas de muestreo evidenciaría la contaminación persistente en el frigorífico A.

El aislamiento de más de 1 serogrupo de *E. coli* por muestra evidenciaría la contaminación múltiple de las muestras.

Otro hallazgo interesante fue la identificación de cepas con altos porcentaje de similitud entre las aisladas en este ensayo y aquellas existentes en la Base de Datos de Argentina, lo cual nos permitiría inferir que hay cepas circulando en nuestro país desde hace muchos años y además, brindaría evidencia de la transferencia desde el reservorio bovino hasta el hombre y el alimento.

6. CONCLUSIONES

La técnica de PCR en tiempo real (Metodología B) resultó ser la más sensible para la detección de STEC, seguido por la técnica de PCR de punto final a partir del cultivo enriquecido (Metodología C) y por último, por la técnica de PCR de punto final a partir de la zona de crecimiento confluyente en agar MacConkey (Metodología A).

Las frecuencias de detección de muestras *stx* positivas, por Metodologías B y C, fueron de 48,3% para las muestras de cuero y de 80% para las muestras de carcasa. Las frecuencias de detección de muestras *stx* y *eae* positivas, por Metodologías B y C, fueron de 36,7% para las muestras de cuero y de 48,3% para las muestras de carcasa. Las frecuencias de detección de muestras *stx*, *eae* y serogrupos O157, O26, O45, O103, O111, O121 y O145 positivas, por Metodologías B y C, fueron de 35% para las muestras de cuero y de 41,7% para las muestras de carcasa. Los marcadores moleculares de O103 y O121 fueron los más frecuentes, tanto en cueros como en carcasas. Estas frecuencias elevadas reflejarían la importancia de mejorar las condiciones de pre-faena y, sobre todo, de la faena, ya que las frecuencias detectadas en carcasas fueron superiores a las detectadas en cueros. Asimismo, el hallazgo de cepas *E. coli* con idéntico patrón de *Xba*I-PFGE, confirmaría la existencia de contaminación cruzada entre cueros, entre cuero y carcasa y entre carcasas. La recuperación de más de un serogrupo de *E. coli* por muestra, brindaría evidencia de la contaminación múltiple y, el aislamiento de cepas con alto porcentaje de similitud del mismo frigorífico pero de diferentes jornadas de muestreo, evidenciaría una contaminación persistente. Los resultados obtenidos en este estudio representan una instancia inicial para revisar los procesos en los frigoríficos de consumo interno y para evaluar la eventual implementación de intervenciones antimicrobianas.

De las 32 cepas aisladas, 21 sólo presentaron el marcador molecular de alguno de los 7 serogrupos analizados (O26, O45, O103, O111, O121, O145 u O157), 7 sólo presentaron el gen *stx*, 3 presentaron el gen *eae* y el marcador de serogrupo O26 y 1 presentó el gen *stx*, *eae* y el marcador de serogrupo O103. Esta última fue la única que presentó un perfil de virulencia considerado altamente patogénico por

las autoridades sanitarias de Argentina y Estados Unidos. En base a estos resultados, podemos concluir que, si bien las técnicas de tamizaje resultaron útiles para evaluar rápidamente las prácticas de trabajo en los frigoríficos, el aislamiento sigue siendo una herramienta fundamental para definir la verdadera peligrosidad de las muestras, ya que sólo el aislamiento permitió verificar que los genes detectados en cada etapa de tamizaje correspondían o no a una misma bacteria.

Finalmente, cabe mencionar que los altos porcentajes de detección con técnicas de alta sensibilidad, como la PCR en tiempo real pero con baja frecuencia de recuperación, evidencian la necesidad de continuar trabajando con la comunidad científica, para lograr un protocolo más efectivo de detección y aislamiento de cepas STEC no-O157 en muestras de cuero y carcasa.

Bibliografía consultada

Ak, N.O.; Cliver, D.O. & Kaspar, C.W. 1994. Cutting boards of plastic and Wood contaminated experimentally with bacteria. *J. Food Prot.* 57:16-22.

Arthur, T.M.; Bosilevac, J.M.; Nou, X.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L.; Kent, M.P.; Jaroni, D.; Pauling, B.; Allen, D.M. & Koohmaraie, M. 2004. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. *J. Food Prot.* 67:658–665.

Arthur, T.M.; Barcoy-Gallagher, G.A.; Rivera-Betancourt, M. & Koohmaraie, M. 2002. Prevalence and characterization of Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4847-4852.

Arthur, T.M.; Bosilevac, J.M.; Brichta-Harhay, D.M.; Guerini, M.N.; Kalchayanand, N.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T. L. & Koohmaraie, M. 2007. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. *J. Food Prot.* 70 (2):280-286.

Arthur, T.M.; Nou, X.; Kalchayanand, N.; Bosilevac, J.M.; Wheeler, T. & Koohmaraie, M. 2011. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on cattle hides. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (9):3002-3008.

Barcoy-Gallagher, G.A.; Arthur, T.M.; Siragusa, G.R.; Keen, J.E.; Elder, R.O.; Laegreid, W.W. & Koohmaraie, M. 2001. Genotypic Analyses of *Escherichia coli* O157:H7 and O157 Nonmotile Isolates recovered from beef cattle and carcasses at processing plants in the Midwestern States of the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (9):3810-3818.

Barcoy-Gallagher, G.A.; Arthur, T.M.; Rivera-Betancourt, M.; Nou, X.; Shackelford, S.D.; Wheeler, T.L. & Koohmaraie, M. 2003. 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.* 66:1978-1986.

Bielaszewska, M.; Friedrich, A.W.; Aldick, T.; Schurk-Bulgrin, R. & Karch, H. 2006. Shiga toxin actively by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin. Infect. Dis.* 43:1160–116.

Blanco, M.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Dahbil, G.; Alonsol, M.P.; Gonzalez, E.A.; Bernardez, M. I. & Blanco, J. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new variant gene (*eae-*). *J. Clin. Microbiol.* 42:645-651.

Boletín Integrado de Vigilancia. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación. N° 316 – SE 26 – 2016.

<http://www.msal.gov.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia>

Breum, S.O. & Boel, J. 2010. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 141:90-96.

Bugarell, M.; Beutin, L.; Martin, A.; Gill, A. & Fach, P. 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans. *Int. Food Microbiol.* 142:318-329.

Byrne, C.M.; Bolton, D.J.; Sheridan, J.J.; McDowell, D.A. & Blair, I. S. 2000. The effects of preslaughter washing on the reduction of *Escherichia coli* O157:H7 transfer from cattle hides to carcasses during slaughter. *Lett. Appl. Microbiol.* 30:142-145.

Calderwood, S.B.; Acheson, D.W.K.; Keusch, G.T.; Berret, T.J.; Griffin, P.M.; Strockbine, N.A.; Swaminathan, B.; Kaper, J.B.; Levine, M.M.; Kaplan, B.S.; Karch, H.; O'Brien, A.D.; Obrig, G.T.; Takeda, Y.; Tarr, P.I. & Wachsmuth, I.K. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* 62:118–119.

Carcass Sampling Protocol US Meat Animal Research Center. USDA. <https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/30400510/protocols/USMARC%20Carcass%20Sampling%20Protocol.pdf>

Chaves, B.D.; Echeverry, A.; García, L.G.; Brashears, M.T.; Miller, M.F. & Brashears, M.M. 2015. Seasonal prevalence of potentially positive non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) bovine hides and carcasses in Costa Rica. *Meat Sci.* 110:196-200

Chinen, I.; Otero, J.L.; Miliwebsky, E. S.; Roldan, M.L.; Baschkier, A.; Chillemi, G.M.; Nóboli, C.; Frizzo, L. & Rivas, M. 2003. Isolation and characterization of Shiga toxigen-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Res. Vet.* 74:283-286.

Chinen, I.; Epszteyn, S.; Melamed, C.L.; Aguerre, L.; Martínez Espinosa, E.; Motter, M.M.; Baschkier, A.; Manfredi, E.; Miliwebsky, E. & Rivas, M. 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int. J. Food. Microbiol.* 132 (2-3):167-171.

Circular N° 3834 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2008.

Circular N°4032 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2012.

Commission Regulation (EU) No 101/2013 of 4 February 2013 concerning the use of lactic acid to reduce microbiological surface contamination on bovine carcasses. <http://eurlex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013R0101&from=EN>

D'Souza, J. M.; Wang, L. & Reeves, P. 2002. Sequence of the *Escherichia coli* O26 O antigen gene cluster and identification of O26 specific genes. *Gene.* 297:123–127.

Dewell, G.A.; Simpson, C.A.; Dewell, R.D.; Hyatt, D.R.; Belk, K.E.; Scanga, J.A.; Morley, P.S.; Grandin, T.; Smith, G.C.; Dargatz, D.A.; Wagner, B.A. & Salman, M.D. 2008. Impact of transportation and lairage on hide contamination with *Escherichia coli* O157 in finished beef cattle. *J. Food Prot.* 71:1114–1118.

Doughty, S.; Sloan, J.; Bennet-Wood, V.; Robertson, M.; Robins-Brown, R.M. & Hartland, E.L. 2002. 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.* 70(12):6761-6769

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2013. Scientific Opinion on VTEC-serovars and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA J.* 11(4):3138.

Elder, R.O.; Keen, J.E.; Siragusa, G.R.; Barcoy-Gallagher, G.A.; Koohmaraie, M. & Laegreid, W.W. 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses during processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(7):2999-3003.

Erickson, M.C. & Doyle, M.P. 2007. Food as a vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 70(10):2426-2449.

Farrel, B.L.; Ronner, A.B. & Wong, A.C.L. 1998. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef to meat grinders and survival after sanitation with chlorine and peroxyacetic acid. *J. Food Prot.* 61:817-822.

Feng, P.C.H.; Delannoy, S.; Lacher, D.W.; dos Santos, L.F.; Beutin, L.; Fach, P.; Rivas, M.; Hartland, E.L.; Paton, A.W. & Guth, B.E. 2014. Genetic diversity and virulence potential of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O113:H21 isolated from clinical, environmental, and food sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(15):4757-4763.

Fernández, D.; Rodríguez, E.M.; Arroyo, G.H.; Padola, N.L. & Parma, A.E. 2009. Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (stx) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *J. Appl. Microbiol.* 106(4):1260-1267.

Fernández, D.; Irino, K.; Sanz, M.E.; Padola, N. & Parma, A.E. 2010. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 51: 377-382.

Frank, C.; Werber, D.; Cramer, J.P.; Askar, M.; Faber, M.; an der Heiden, M.; Bernard, H.; Fruth, A.; Prager, R.; Spode, A.; Wadl, M.; Zoufaly, A.; Jordan, S.; Kemper, M.J.; Follin, P.; Muller, L.; King, L.A.; Rosner, B.; Buchholz, U.; Stark, K. & Krause, G. 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365:1771–1780

Fratamico, P.M.; Briggs, C.E.; Needle, D.; Chen, C.Y. & DebRoy, C. 2003. Sequence of the *Escherichia coli* O121 O-antigen gene cluster and detection of enterohemorrhagic *E. coli* O121 by PCR amplification of the wzx and wzy genes. *J. Clin. Microbiol.* 41(7):3379-83

Gould, H.L.; Rajal, K.M.; Ong, K.L.; Clogher, P.; Cronquist, A.B.; Garman, K.N.; Lathrop, S.; Medus, C.; Spina, N.L.; Webb, T.H.; White, P.L.; Wymore, K.; Gierke, R.E., Mahon, B. E. & Griffin, P. M. 2013. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne Pathog. Dis.* 10(5):453-460.

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. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=53328

Jenkis, C.; Willshaw, G.A.; Evans, J.; Cheasty, T.; Chart, H.; Shaw, D.J.; Dougan, G.; Frankel, G. & Smith, H.R. 2003. Subtyping of virulence genes in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 associated with disease in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.* 52:941-947.

Joris, M. A.; Pierard, D. & De Zutter, L. 2011. Occurrence and virulence patterns of *E. coli* O26, O103, O111 and O145 in slaughter cattle. *Vet. Microbiol.* 151: 418-421.

Karch, H. & Meyer, T. 1989. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:2751-2757.

Karch, H.; Bohm, H.; Schmidt, H.; Gunzer, F.; Aleksic, S. & Heesemann, J. 1993. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 31:1200-1205.

Karmali, M.A.; Petric, M.; Lim, C.; Cheung, R. & Arbus, G.S. 1985. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 22:614-619.

Karmali, M.A.; Mascarenhas, M.; Shen, S.; Ziebell, K.K.; Jonson, S.; Reid-Smith, R.; Isaac-Renton, J.; Clark, C.; Rahn, K. & Koper, J.B. 2003. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41:4930-4940.

Knowalchuk, J.; Speir, J.I. & Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. 1977. *Infect. Immun.* 18:775-779.

Leotta, G.A.; Chinen, I.; Epszteyn S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I.C.; Motter, M.; Ferrer, M.; Marey, E. & Rivas, M. 2005. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev. Arg. Microbiol.* 37:1-11.

Manual de Procedimientos Servicio Fisiopatogenia. 2006. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos por separación inmunomagnética y PCR.

Masana, M.O.; Leotta, G.A.; Del Castillo, L.L.; D'Astek, B.A.; Palladino, P. M.; Galli, L.; Vilacoba, E.; Carbonari, C.; Rodriguez, R. & Rivas, M. 2010. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.* 73:649–656.

Masana, M.O.; Dastek, B.A.; Palladino, P.M.; Galli, L.; Del Castillo, L.L.; Carbonari, C.; Leotta, G.A.; Vilacoba, E.; Irino, K. & Rivas, M. 2011. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.* 74:2008-2017.

McDaniel, T.K.; Jarvis, K.G.; Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:1664–1668.

Meichtri, L.; Miliwebsky, E.; Gioffre, A.; Chinen, I.; Baschkier, A.; Chillemi, G.; Guth, B.E.; Masana, M.O.; Cataldi, A.; Rodriguez, H.R. & Rivas, M. 2004. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int. J. Food Microbiol.* 96:189-198.

Melton-Celsa, A.R.; Darnell, S.C. & O'Brien, A.D. 1996. Activation of Shiga like toxins by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 64:1569–1576.

Miko, A.; Rivas, M.; Betancor, A.; Delannoy, S.; Fach, P. & Beutin, L. 2014. Emerging types of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O178 present in cattle, deer and humans from Argentina and Germany. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 17:4.

Monaghan, A.; Byrne, B.; Fanning, S.; Sweeney, T.; McDowell, D. & Bolton, D.J. 2012. Serotypes and virulotypes of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) on bovine hides and carcasses. *Food Microbiol.* 32(2):223-229.

Monaghan, A.; Byrne, B.; Fanning, S.; Sweeney, T.; McDowell, D. & Bolton, D.J. 2011. Serotypes and virulence profiles of non-O157 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) from bovine farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:8662-8668.

Nicholls, L.; Grant, T.H. & Robins-Browne, R.M. 2000. 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.* 35:275-288.

Nielsen, E.M. & Andersen, M.T. 2003. Detection and Characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5 Nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41(7):2884-2893.

Nguyen, R.N.; Taylor, L.S.; Tauschek, M. & Robinson-Browne, R.M. 2006. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg. Infect. Dis.* 12(4):597-603.

O'Brien, A. D.; LaVeck, G. D.; Thompson, M. R. & Formal, S. B. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146:763-769.

Ørskov, F. & Ørskov, I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods in Microbiology, Academic Press. 14:43–112.

Padola, N.L.; Sanz, M.E.; Blanco, J.E.; Blanco, M.; Blanco, J.; Etcheverría, A.L.; Arroyo, G.H.; Usera, M.A. & Parma, A.E. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feed lot in Argentina. Vet. Microbiol. 100(1-2):3-9.

Paton, A.W. & Paton, J.C. 1997. 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. 36(2):598-602.

Paton J.C. & Paton, A.W. 2000. Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. Sci. & Med.. 7(3):28-37.

Paton, A.W. & Paton, J.C. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, and *saa*. J. Clin. Microbiol. 40: 271-274.

Paton, A.W.; Woodrow, M.C.; Doyle, R.M.; Lanser, J.A. & Paton, J. C. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-Uremic Syndrome. J. Clin. Microbiol. 37(10):3357-3361.

Paton, A.W.; Srimanote, P.; Woodrow, M.C. & Paton, J.C. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect. Immun. 69:6999- 7009.

Pearce, M.C.; Evans, J.; McKendrick, I. J.; Smith, A.W.; Knight, H. I.; Mellor, D. J.; Woolhouse, M.E.J.; Gunn, G. J. & Low, J. C. 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroups O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. Appl. Environ. Microbiol. 72:653–659.

Perelle, S.; Dilasser, F.; Grout, J. & Fach, P. 2005. Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. J. Appl. Microbiol. 98:1162–1168.

Perelle, S.; Dillaser, F.; Grout, J. & Fach, P. 2003. Development of a 5´-nuclease PCR assay for detecting Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O145 based on the identification of an “O-island 29” homologue. J. Appl. Microbiol. 94:587-594.

Ratchtrachenchai, O.A.; Subpasu, S. & Ito, K. 1997. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. Bull. Dep. Med. Sci. 39:211-20.

Rhoades, J.R.; Duffy, G. & Koutsoumanis, K. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. Food Microbiol. 26(4):357–376.

Riley, L.W.; Remis, R.S.; Helgerson, S.D.; McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R.; Hebert, R.J.; Olcott, H.M.; Johnson, L.M.; Hargrett, N.T.; Blake, P.A. & Cohen, M.L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308:681–685.

Rios, M.; Prado, V.; Trucksis, M.; Arellano, C.; Borie, C.; Alexandre, M.; Fica, A. & Levine, M. 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with Hemolytic-Uremic Syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. J. Clin. Microbiol. 37(3):778-781.

Rivas, M.; Sosa-Estani, S.; Rangel, J.; Caletti, M.G.; Vallés, P.; Roldan, D.; Balbi, L.; Marsano, M.C.; Amoedo, D.; Miliwebsky, E.; Chinen, I., Hoekstra, R.M.; Mead, P. & Griffin, P. 2008. Risk factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Argentina. Emerg. Infect. Dis. 14(5):763-771.

Scheutz, F.; Teel, L.D.; Beutin, L.; Pierard, D.; Buvens, G.; Karch, H.; Mellmann, A.; Caprioli, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; Strockbine, N.A.; Melton-Celsa, A.R.; Sanchez, M.; Persson, S. & O'Brien, A.D. 2012. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. J. Clin. Microbiol. 50:2951–2963.

Schmidt, H.; Beutin, L. & Karch, H. 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain 933. Infect. Immun. 63:1055-1063.

Schmidt, H.; Kernbach, C. & Karch, H. 1996. Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiol. 145:907-914.

Tanaro, J.D.; Galli, L.; Lound, L.H.; Leotta, G.A.; Piaggio, M.C.; Carbonari, C.; Irino, K. & Rivas, M. 2012. Non-O157:H7 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in bovine rectums and surface water streams on a beef cattle farm in Argentina. Foodborne Pathog. Dis. 9(10):878-884.

Tarr, P.I.; Bilge, S.S.; Vary, J.C.; Jelacic, S.; Habeeb, R.L.; Ward, T.R.; Baylor, M.R. & Besser, T.E. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. Infect. Immun. 68:1400-1407

Thomas, K. M.; McCann, M.S.; Collery, M.M., Logan, A.; Whyte, P.; McDowell, D.A. & Duffy, G. 2011. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. Int. J. Microbiol. 153:288-296.

Torres, A.G.; Giron, J.A.; Perna, N.T.; Burland, V.; Blattner, F.R.; Avelino-Flores, F. & Kaper, J.B. 2002. Identification and characterization of IpfABCC´DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. 70:5416-5427.

USDA-FSIS Directive 7120.1. 2016. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry and egg products.

<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bab10e09-aefa-483b-8be8-809a1f051d4c/7120.1.pdf?MOD=AJPERES>

USDA-FSIS. MLG 5A.04/MLG 5B.05. Laboratory Guidebook. 2014. Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental Sponges. <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>

Wasilenko, J.L.; Fratamico, P.M.; Sommers, C.; DeMarco, D.R.; Varkey, S.; Rhoden, K. & Tice, G. 2014. 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 DuPont BAX system. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 4:81.

7. ANEXO

7.1. TABLA 1. DENOMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS UTILIZADAS COMO CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO DE LAS PCR.

PCR	Control	Denominación	Caracterización genotípica
PCR múltiple <i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ , PCR MK, BAX STEC Screening, PCR O157, PCR variante <i>stx</i> _{1a}	POSITIVO	EDL933	O157:H7 <i>stx</i> ₁ +/ <i>stx</i> ₂ +/ <i>eae</i> +/ <i>ehxA</i> +
PCR <i>eae</i>	POSITIVO	2348	O126:H6 <i>eae</i>
PCR O26 y BAX Panel 2 (O26)	POSITIVO	217/O2	O26:H11 <i>stx</i> ₁ +/ <i>eae</i> +/ <i>ehxA</i> +
PCR O45 y BAX Panel 2 (O45)	POSITIVO	543/12	O45 <i>stx</i> ₁ -/ <i>eae</i> -/ <i>ehxA</i> +
PCR O103 y BAX Panel 1 (O103)	POSITIVO	DD4/O8	O103 <i>stx</i> ₁ +/ <i>eae</i> +/ <i>ehlyA</i> +
PCR O111 y BAX Panel 1 (O111)	POSITIVO	165/O3	O111 <i>stx</i> ₁ +/ <i>stx</i> ₂ +/ <i>eae</i> +/ <i>ehxA</i> +
PCR O121 y BAX Panel 1 (O121)	POSITIVO	BB2/O7	O121:H19 <i>stx</i> ₂ +/ <i>eae</i> +/ <i>ehxA</i> +
PCR O145 y BAX Panel 2 (O145)	POSITIVO	02/O2	O145/NM <i>stx</i> ₂ +/ <i>eae</i> +/ <i>ehxA</i> +
PCR <i>ehxA</i>	POSITIVO	32511	O157:NM <i>stx</i> ₂ / <i>ehxA</i> +
PCR <i>saa</i>	POSITIVO	434-1	<i>saa</i> +
PCR variante <i>stx</i> _{1c}	POSITIVO	DG131-3	O174 <i>stx</i> _{1c}
PCR variante <i>stx</i> _{1d}	POSITIVO	MHI813	O8 <i>stx</i> _{1d}
PCR variante <i>stx</i> _{2a}	POSITIVO	94C	O48 <i>stx</i> _{2a}
PCR variante <i>stx</i> _{2b}	POSITIVO	EH250	O118 <i>stx</i> _{2b}
PCR variante <i>stx</i> _{2c}	POSITIVO	O31	O174 <i>stx</i> _{2c}
PCR variante <i>stx</i> _{2d}	POSITIVO	C165-O2	O73 <i>stx</i> _{2d}
PCR variante <i>stx</i> _{2e}	POSITIVO	S1191	O139 <i>stx</i> _{2e}
PCR variante <i>stx</i> _{2f}	POSITIVO	T4/97	O128 <i>stx</i> _{2f}
PCR variante <i>stx</i> _{2g}	POSITIVO	7v	O2 <i>stx</i> _{2g}
PCR múltiple <i>stx</i> ₁ / <i>stx</i> ₂ , PCR MK, BAX Screening, PCR <i>eae</i> , PCR serogrupos específicas, PCR <i>ehxA</i> , PCR <i>saa</i> , PCR variantes <i>stx</i> ₁ y <i>stx</i> ₂ .	NEGATIVO	ATCC25922	

7.2. TABLA 2. SECUENCIAS DE CEBADORES, CONDICIONES DE PCR Y TAMAÑO DE FRAGMENTOS DE AMPLIFICACIÓN (PB)

Nombre de la PCR	Cebador	Secuencia del cebador 5´-3´	Gen blanco	Condiciones de PCR ^a			Longitud del producto de PCR (pb)	Referencia
				Desnaturalización	Annealing	Extensión		
mPCR para los genes <i>stx</i> ₁ y <i>stx</i> ₂	stx1F	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	<i>stx</i> ₁	94°C, 30"	58°C, 30"	72°C, 30"	130	Leotta y col., 2005
	stx1R	AGCGATGCAGCTATTAATAA						
	stx2F	TTAACCACACCCACCGGGCAGT	<i>stx</i> ₂					
	stx2R	GCTCTGGATGCATCTCTGGT						
PCR MK	MK1	TTTACGATAGACTTCTCGAC	<i>stx</i>	94 °C, 1´	54 °C, 1´	72 °C, 1´	224	Karch y col., 1989
	MK2	CACATATAAATTTTCGCTC						
PCR <i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	<i>eae</i>	94°C, 30"	54°C, 1'	72°C, 2'	864	Karch y col., 1993
	SK2	CCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG						
PCR O26	O26-F	CTCTGATTATACAGAAGCA	<i>wbu A</i>	94°C, 30"	55 °C, 1´	72 °C, 1´	767	D´Souza y col., 2002
	O26-R	AGTCGTAATATGAGCTTTTC						
PCR O45	O45-F	TACGTCTGGCTGCAGGG	<i>wzx</i>	94°C, 30"	55 °C, 1´	72 °C, 1´	100	Bugerell y col., 2010
	O45-R	ACTTGCAGCAAAAAATCCCC						
PCR O103	O103-F	CAAGGTGATTACGAAAATGCA	<i>wzx</i>	95°C, 1´	57 °, 1´	72°C, 1'	550	Perelle y col., 2005
	O103-R	AAATTATTAGTGAGAATAGTTTCG						
PCR O111	O111-F	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC	<i>rbf O</i>	95°C, 1´	57 °, 1´	72°C, 1'	406	Paton y col., 1997
	O111-R	ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC						
PCR O121	O121-F	GCAATGAGGACCGGTATATCTC	<i>wzy</i>	95°C, 1´	57 °, 1´	72°C, 1'	318	Fratamico y col., 2003
	O121-R	CACGCCCGTGTAATATTCC						
PCR O145	O145-F	ATAATATTTACCCACCAG	<i>ihp I</i>	94°C, 30"	55 °C, 1´	72 °C, 1´	418	Perelle y col., 2003
	O145-R	TGTGATTGTTGCGCATCA						
PCR O157	O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	<i>rfb0157</i>	94°C, 30"	58°C, 30"	72°C, 30"	259	Leotta y col., 2005
	O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC						
PCR <i>ehxA</i>	hlyA1	GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG	<i>ehxA</i>	94°C, 30"	58°C, 90"	72°C, 90"	1551	Schmidt y col., 1995
	hlyA4	TCTCGCCTGATAGTGTGGTA						
PCR <i>saa</i>	SAADF	CGTCATGAACAGGCTATTGC	<i>saa</i>	93°C, 1´	55 °C, 1´	72°C, 1´	119	Paton y col., 2002
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC						
PCR <i>aggR</i>	aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	<i>aggR</i>	94°C, 30"	55 °C, 1´	72°C, 30"	254	Ratchtrachenchai y col., 1997
	aggRkas2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC						

CONTINUACIÓN TABLA 2

Nombre de la PCR	Cebador	Secuencia del cebador 5´-3´	Gen blanco	Condiciones de PCR ^b			Longitud del producto de PCR (pb)	Referencia
				Desnaturalización	Annealing	Extensión		
PCR subtipificación Stx1	Stx1a-F1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC	stx _{1a}	94°C, 50"	56°C, 40"	72°C, 60"	478	Scheutz y col., 2012
	Stx1a-R2	AGCAGTCATTACATAAGAACYCCACT						
	Stx1c-F1	CCTTTCCTGGTACAACGCGTT	stx _{1c}				252	Scheutz y col., 2012
	Stx1c-R1	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA						
Stx1d-F1	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	stx _{1d}	203				Scheutz y col., 2012	
Stx1d-R2	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA							
PCR subtipificación Stx2a	Stx2a-F2	GCGATACTGRGBACTGTGCC	stx _{2a}				349-347	Scheutz y col., 2012
	Stx2a-R3	CCGKCAACCTTCACTGTAATGTG						
	Stx2a-R2	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG						
PCR subtipificación Stx2b	Stx2b-F1	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	stx _{2b}				251	Scheutz y col., 2012
	Stx2b-R1	CAGCAAATCCTGAACCTGACG						
PCR subtipificación Stx2c	Stx2c-F1	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGTA	stx _{2c}	177	Scheutz y col., 2012			
	Stx2c-R2	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA						
PCR subtipificación Stx2d	Stx2d-F1	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	stx _{2d}	179-280	Scheutz y col., 2012			
	Stx2d-R1	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG						
	Stc2d-R2	GCCTGATGCACAGGTAAGGAC						
PCR subtipificación Stx2e	Stx2e-F1	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	stx _{2e}	411	Scheutz y col., 2012			
	Stx2e-R2	CTTCCTGACACCTCACAGTAAAGGT						
PCR subtipificación Stx2f	Stx2f-F1	TGGGCGTCATCACTGGTTG	stx _{2f}	424	Scheutz y col., 2012			
	Stx2f-R1	TAATGGCCGCCCTGTCTCC						
PCR subtipificación Stx2g	Stx2g-F1	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	stx _{2g}	573	Scheutz y col., 2012			
	Stx2g-R1	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT						

^a Las PCR incluyeron 30 ciclos precedidos por una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C y seguidos por un paso de extensión final de 2 min a 72°C

^b Las PCR de variantes stx₁ y stx₂ incluyeron 35 ciclos precedidos por una desnaturalización inicial de 15 min a 95°C y seguidos por un paso de extensión final de 3 min a 72°C.

