

Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga

G.A. LEOTTA¹, I. CHINEN¹, S. EPSZTEYN², E. MILIWEBSKY¹, I.C. MELAMED²,
M. MOTTER², M. FERRER², E. MAREY², M. RIVAS^{1*}

¹ Servicio Fisiopatogenia, INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, ² Laboratorio de Microbiología de Alimentos DLIM-DGHySA, G.C.B.A., Av. Patricias Argentinas 277 (1045) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: mrivas@anlis.gov.ar

RESUMEN

La infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es causa de diarrea con o sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. El objetivo de este trabajo fue validar una técnica de PCR múltiple para el diagnóstico de STEC basado en la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*. La validación de la técnica se realizó en dos laboratorios independientes, en forma paralela. Se determinó rango de trabajo, selectividad y robustez. Se evaluó el desempeño de la técnica al combinar distintas concentraciones de dos cepas con diferentes factores de virulencia. El rango de trabajo dependió de la cepa analizada, los valores máximos y mínimos fueron $6,6 \times 10^7$ y $1,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l. El límite de detección fue de $1,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l y el límite de corte de $1,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l. La robustez fue óptima al modificar diferentes variables. Se obtuvo 100% de inclusividad, exclusividad, precisión analítica, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. No se observó interferencia al combinar distintas concentraciones de los factores de virulencia blanco de la reacción. La técnica validada es una alternativa apropiada para la detección y confirmación de STEC O157 y no-O157 a partir de cultivos bacterianos.

Palabras clave: validación, PCR, STEC, O157

SUMMARY

Validation of a multiplex PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) cause non-bloody or bloody diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. The aim of the present study was to validate a multiplex PCR for the STEC diagnosis based on the detection of *stx1*, *stx2* and *rfbO157* genes. The multiplex PCR validation was carried out in two independent laboratories in a parallel way. Work range, selectivity and robustness were established. The PCR performance was evaluated using different concentrations of two STEC strains harboring different target genes. The work range depended on the strain analyzed, the maximum and the minimum values were 6.6×10^7 and 1.0×10^4 CFU/50 μ l. The detection limit was 1.0×10^4 CFU/50 μ l and the cut limit 1.0×10^5 CFU/50 ml. A good robustness was observed when different variables were introduced. Inclusivity, exclusivity, positive predictivity, negative predictivity and analytical accuracy were of 100%. Interference was not shown when different concentrations of STEC strains, carrying different genes, were used. The validated technique is an appropriate alternative for detection and confirmation of STEC O157 and non-O157 strains from bacterial cultures.

Key words: validation, PCR, STEC, O157

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente asociado a Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica (CH) ocurridos en Oregon y Michigan, EE.UU., atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas (38).

La infección por STEC puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea, CH y síndrome urémico hemolítico (SUH) (35). En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica;

además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (16, 37). Cada año se producen aproximadamente 400 casos nuevos de SUH, aunque existe un importante subregistro. Desde 1965 hasta el presente se registraron más de 7.000 casos (11). La tasa de hospitalización para el año 2003 fue de 11,5 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años, una de las más altas del mundo, y la letalidad en la fase aguda fue del 2,4% (39).

En abril de 2000 (Resolución N° 346/00), el Ministerio de Salud estableció la notificación obligatoria del SUH al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, con modalidad semanal e inclusión en la Planilla C2 (diagnósticos médicos).

Escherichia coli O157:H7 es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de STEC que poseen los mismos marcadores de virulencia. Entre ellos, existen 5 serotipos (O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM) que fueron reconocidos por la Organización Mundial de la Salud por su potencial patogénico (49). Los serotipos de STEC asociados a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (21, 48).

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir una o más potentes citotoxinas que forman parte de la familia de las toxinas Shiga (Stxs), las que poseen estructura de subunidades A-B (27). Las Stxs se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2. Esta clasificación se basa en la neutralización del efecto citotóxico sobre células Vero con anticuerpos específicos. Hasta el momento para Stx1 se identificó la variante Stx1c (50), y para Stx2 se describieron numerosas variantes, Stx2c (*stx2vh-a* y *stx2vh-b*), Stx2e, Stx2d y Stx2f (24, 33, 42, 45). Las cepas STEC pueden producir Stx1, Stx2 o variantes de Stx1 o Stx2, solas o en combinación de dos o más toxinas. Stx2c y Stx2d fueron identificadas en aislamientos humanos, la primera de ellas en cepas O157 y no-O157, y la segunda sólo en cepas STEC no-O157. Stx2e o SLT-IIv fue la primera variante de Stx2 descrita y está asociada a la enfermedad de los edemas en cerdos (22), aunque raramente a enfermedad humana. Stx2f fue identificada en aislamientos de STEC en heces de paloma (42) y fue idéntica a una variante de Stx2-e descrita previamente como SLT-IIva, aislada de un caso de diarrea humana (17). Stx2e y Stx2f están codificadas en el cromosoma a diferencia del resto de las Stxs que están codificadas por profagos lambdoides en el cromosoma bacteriano.

Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular son considerados los principales reservorios de STEC (6, 8, 9, 10, 25, 30, 31, 47).

Distintos alimentos como carne molida y productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, entre otros, fueron considerados fuente de contaminación en casos esporádicos o brotes asociados a STEC (2, 3, 5, 7, 40, 48). Otras formas de diseminación son la contaminación cruzada, el contacto directo del hombre con los animales y la transmisión persona a persona (4, 12, 36).

El 11 de mayo de 2004, mediante Resolución Conjunta de la Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias del Ministerio de Salud y Ambiente, y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (79/2004 y 500/2004), se incluyó el Artículo 156tris y se modificaron los Artículos 255 y 302 del Código Alimentario Argentino. Estos, refieren a las especificaciones microbiológicas que deben cumplir los productos preparados a base de carne picada una vez cocidos, la

carne picada fresca y los chacinados frescos, respectivamente.

Las tres categorías de alimentos deben responder a la siguiente especificación microbiológica: ausencia de *E. coli* O157:H7/NM en 5 muestras de 65g cada una. Para la detección de *E. coli* O157:H7 y O157:NM en productos cárnicos se recomienda la metodología validada por United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science (46).

Teniendo en cuenta que en Argentina la frecuencia de detección de STEC no-O157 en casos de SUH es aproximadamente del 30% (41), se considera de fundamental importancia la validación de una metodología destinada a la detección de STEC, incluyendo bajo esta denominación a cepas O157 y no-O157.

Según la rigurosidad de las diferentes etapas de validación, es posible clasificar a los métodos analíticos de la siguiente manera: I) métodos del propio laboratorio, II) métodos de revistas científicas, III) métodos oficiales y IV) métodos estándar.

Validación es la confirmación obtenida mediante la provisión de evidencia objetiva, de haber cumplido los requisitos particulares para un uso pretendido y específico (44).

Se define como método cualitativo al método análisis cuya respuesta está basada en la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cierta cantidad de muestra (15). La mayoría de los parámetros cualitativos se expresan en términos probabilísticos (44) y entre los parámetros para su evaluación se describen los siguientes:

a) Rango de trabajo: intervalo de concentración en el cual el analito puede determinarse con un adecuado nivel de confianza y precisión. Bajo el concepto de rango de trabajo se incluyen los términos límite de detección y límite de corte. Límite de detección es la menor concentración de analito detectable, y límite de corte es la cantidad óptima de analito detectable. El límite de corte se establece mediante la concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetida e independientemente el mismo método analítico en alícuotas de la misma muestra (44).

b) Selectividad: parámetro que permite ponderar la detección de la mayor cantidad de microorganismos especificados por parte de la técnica evaluada y la ausencia de reacción positiva con otros géneros y especies relacionados. La selección de un mínimo de 50 cepas puras de microorganismos relacionados y la selección de un mínimo de 30 cepas potencialmente competitivas deben ser analizadas como cultivos puros. Bajo el concepto de selectividad se incluyen los términos exclusividad e inclusividad (26). Exclusividad es la habilidad del método alternativo de no detectar un rango relevante de cepas relacionadas que pueden provocar reacciones cruzadas (15). Inclusividad es la habilidad del método alter-

nativo de detectar un rango de cepas verdaderamente positivas para los analitos "blanco" (15).

c) Robustez: resistencia de un método al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones deliberadas a los parámetros del mismo. Deben especificarse las condiciones diferentes para poder identificar cuales son los factores de la técnica que pueden afectar la robustez. Deben determinarse como mínimo 10 resultados y todos los pasos del método, incluidas la toma y preparación de la muestra, deben realizarse *n* veces (28).

El objetivo de este trabajo fue validar una técnica de PCR múltiple basada en la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157* de STEC O157 y no-O157. Para ello se plantearon las siguientes etapas:

- 1) Comparar dos técnicas de extracción de ADN.
- 2) Evaluar la técnica de PCR múltiple mediante los siguientes parámetros: a) rango de trabajo, b) selectividad, c) robustez.
- 3) Desafiar la técnica de PCR múltiple combinando distintas concentraciones de dos cepas STEC con diferentes factores de virulencia blanco de la reacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Se seleccionó un total de 82 cepas; 51 cepas STEC de los serotipos y variantes *Stx* de mayor importancia epidemiológica en Argentina, una cepa de *Shigella dysenteriae* (serotipo 1, *stx1*) (Tabla 1), y 30 cepas de distintos géneros no productoras de *Stx* (Tabla 2). Las cepas *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*) y *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia), fueron utilizadas como controles positivo y negativo, respectivamente.

Las cepas utilizadas fueron identificadas por pruebas bioquímicas (14) y seroagrupadas según su antígeno somático (O) y flagelar (H). Para la detección del antígeno O se utilizó la técnica de aglutinación en lámina con antisuero policlonal anti-O y para la detección del antígeno H se utilizó la técnica de aglutinación en tubo con antisuero anti-H (29). Se determinó la capacidad de producción de toxina Shiga de las cepas STEC mediante ensayos de citotoxicidad específica en células Vero (19) utilizando anticuerpos monoclonales específicos MA13C4 para *Stx1* (43) y BC5BB12 para *Stx2* (13). Las células Vero poseen una alta sensibilidad a la actividad de las toxinas Shiga, por lo que la técnica de citotoxicidad utilizando esta línea celular es considerada prueba de oro (32).

Preparación de las muestras de ADN

Las cepas conservadas a -70 °C en caldo tripticasa soja (Becton Dickinson, EE.UU.) (CTS) con 20% de glicerol, fueron

Tabla 1. Cepas productoras y no productoras de toxina Shiga utilizadas para validar la técnica de PCR múltiple

Cepa	Serotipo	Genotipo <i>Stx</i>	Cepa	Serotipo	Genotipo <i>Stx</i>
FP 792/01	O8:H19	<i>stx2</i>	FP 445/03	O136:H19	<i>stx2vh-b</i>
FP 763/02	O8:H19	<i>stx2</i>	FP 764/01	O145:NM	<i>stx2</i>
FP 406/03	O8:H19	<i>stx1/stx2vh-b</i>	FP 807/01	O145:NM	<i>stx2</i>
FP 421/03	O8:H21	<i>stx2vh-b</i>	FP 916/01	O145:NM	<i>stx2</i>
FP 428/03	O20:H19	<i>stx2vh-b</i>	FP 2/02	O145:NM	<i>stx2</i>
FP 412/03	O22:H16	<i>stx2vh-a</i>	FP 125/04	O157:NM	-
FP 573/01	O25:NM	<i>stx2</i>	FP 233/02	O157:H7	-
FP 238/03	O25:NM	<i>stx2</i>	FP 1009/02	O157:H7	<i>stx1</i>
FP 145/02	O26:H11	<i>stx1</i>	EDL933J	O157:H7	<i>stx1</i>
S17B	O26:H11	<i>stx1</i>	FP 796/03	O157:H7	<i>stx2</i>
FP 71/02	O26:H11	<i>stx1</i>	FP 363/02	O157:H7	<i>stx2</i>
FP 217/02	O26:H11	<i>stx1</i>	FP 213/00	O157:H7	<i>stx1/stx2vh-a</i>
FP 327/02	O26:H11	<i>stx2</i>	FP 1031/01	O157:H7	<i>stx2/stx2vh-a</i>
FP 156/03	O91:H21	<i>stx2/stx2vh-b</i>	FP 56/01	O157:H7	<i>stx2a</i>
T171	O91:H21	<i>stx2vh-b</i>	FP 352/03	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>
FP 209/99	O91:H21	<i>stx2/stx2vh-b</i>	FP 215/02	O157:H7	<i>stx2/stx2vh-a</i>
FP 373/02	O103:H2	<i>stx1</i>	FP 530/02	O157:H7	<i>stx1/stx2/stx2vh-a</i>
FP 53/01	O103:NM	<i>stx2</i>	FP 63/03	O157:H7	<i>stx2/stx2vh-a</i>
FP 433/01	O111:NM	<i>stx1</i>	FP 33/98	O157:H7	<i>stx2</i>
FP 999/01	O111:NM	<i>stx1</i>	T154	O161:H2	<i>stx2vh-a</i>
FP 67/03	O111:NM	<i>stx1/stx2/stx2vh-b</i>	FP 257/02	O174:H28	<i>stx2</i>
FP 207/02	O111:NM	<i>stx1/stx2</i>	FP 149/02	O174:H21	<i>stx2vh-b</i>
FP 370/02	O113:H21	<i>stx2</i>	FP 424/03	O174:H21	<i>stx2vh-b</i>
FP 226/99	O113:H21	<i>stx2vh-b</i>	T123	ONT:H28	<i>stx2vh-b</i>
FP 267/01	O113:H21	<i>stx2vh-b</i>	EDL933	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>
FP 242/01	O113:H21	<i>stx2vh-b</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	Serotipo 1	<i>stx1</i>

sembradas en CTS e incubadas a 37 °C durante 4 h y luego en agar MacConkey (Becton Dickinson) incubándose a 37 °C durante 18 h. A partir de una colonia se realizó un subcultivo en CTS a 37 °C durante 18 h.

La concentración bacteriana se determinó por recuento en agar (*plate count agar*, Biokar Diagnostic), por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y la concentración bacteriana se expresó en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Paralelamente se realizaron diluciones decimales en agua tridestilada estéril y un ml de cada dilución se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se agregó a cada tubo 150 µl de solución de tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X. Luego de hervir en baño de agua durante 15 minutos, los tubos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 5 minutos. Se conservó el sobrenadante para ser utilizado como blanco en la técnica de PCR múltiple.

PCR múltiple para detección de los genes *stx1/stx2/rfbO157*

Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos iniciadores para amplificar un fragmento del gen correspondiente a la subunidad B de *stx1* (34), un fragmento del gen correspondiente a la subunidad A de *stx2* (52) y un fragmento del gen *rfbO157* (32) (Tabla 3).

Laboratorio 1: se utilizó un termociclador Biometra T Gradient (Biotron, Germany). Se utilizaron 50 µl finales de mezcla de reacción de PCR, conteniendo 5 µl de Buffer PCR 10X (Invitrogen Life Technologies, Brasil), 2 µl de mezcla de dNTPs 2,5 mM (Promega, Madison, WI, EE.UU.), 1,5 µl de Cl_2Mg 50 Mm (Invitrogen), 0,2 µl de los pares de oligonucleótidos iniciadores *Stx2* y *O157* 0,1 nmol/ml (Invitrogen), 1 µl del par de oligonucleótidos iniciadores *Stx1* 0,1 nmol/µl (Invitrogen), 0,2 µl de *Taq* polimerasa 5U/ml (Invitrogen), 36,5 µl de agua tridestilada estéril y finalmente 2 µl de ADN templado. Como control positivo y negativo se utilizó el ADN templado de las cepas *E. coli* EDL933 *O157:H7 stx1/stx2* y *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia, respectivamente. Además se utilizaron 50 µl de mezcla de reacción de PCR sin ADN templado como control de sistema. Las condiciones de amplificación fueron 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg y 72 °C por 30 seg. La extensión final fue a 72 °C por 2 min. Se agregaron 10 ml de una solución de xilene cyanol 0,25% y glicerol en agua 30% (Sigma, St Louis, EE.UU.) a 50 ml del ADN amplificado; sembrándose 10 ml en un gel de agarosa (Invitrogen) al 2% en buffer TAE 1X y adicionado con 0,5 µg de bromuro de etidio/ml (Promega). Se realizó la corrida electroforética a 8V/cm duran-

Tabla 2. Microorganismos no productores de toxina Shiga utilizados para validar la técnica de PCR múltiple

Microorganismo	Cepa	Microorganismo	Cepa
<i>Citrobacter freundii</i>	OMS 2/94-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Enterobacter cloacae</i>	1707/03	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	C034
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Salmonella</i> Dublin	301/03
<i>E. coli</i> enterotoxigénico	H10407	<i>Salmonella</i> Enteritidis	FCV-S 23
<i>E. coli</i> enteropatógeno	2348	<i>Salmonella</i> Newport	FCV-S 79
<i>E. coli</i> enteroinvasivo	481	<i>Salmonella</i> Typhimurium	1925/00
<i>E. coli</i> enteroagregativo	17-2	<i>Shigella boydii</i>	370/04
<i>Escherichia coli</i>	K12 HS	<i>Shigella dysenteriae</i> Ser 2	INEI
<i>Escherichia hermannii</i>	FP 34/96	<i>Shigella flexneri</i>	M-185-A
<i>Edwardsiella tarda</i>	FCV-ET 101	<i>Shigella flexneri</i> Ser 1	544/04
<i>Hafnia alvei</i>	248/99	<i>Shigella flexneri</i> Ser 2	545/04
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10051	<i>Shigella flexneri</i> Ser 6	431/04
<i>Morganella morganii</i>	FCV-V 3	<i>Shigella sonnei</i>	550/04
<i>Proteus vulgaris</i>	OMS 2/96-3	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Proteus mirabilis</i>	FCV-PR 5	<i>Yersinia enterocolitica</i>	FCV-V 2

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la técnica de PCR múltiple para detección de los genes *stx1*, *stx2*, y *rfbO157*

Oligonucleótidos	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del fragmento de amplificación (pb)	Referencia
Stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	34
Stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
Stx2a	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT	346	52
Stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT		
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259	32
O157R	TTGCCATGTACAGCTAATCC		

te 50 min. Se utilizaron los marcadores de peso molecular 100 bp Molecular Rule (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) y Cienmarker (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina). Para documentar los geles se utilizó un transiluminador modelo 2000 (BioRad) y el sistema Kodak Digital Science DC 120 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU.). El análisis de los geles se realizó con el programa Kodak Digital Science 1D™ (Eastman Kodak Company).

Laboratorio 2: la técnica de PCR múltiple se realizó según lo descrito en laboratorio 1, exceptuando los siguientes equipos y reactivos: termociclador Eppendorf Master Cycler Personal (Eppendorf, Germany), oligonucleótidos iniciadores Stx1, Stx2 y O157 (Quiagen, Operon, Germany), xilene cyanol (BioRad) 0,25% y glicerol (Invitrogen) en agua 30% (J. T. Baker HPLC water, Cat # 4218-02, México), gel de agarosa (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EE.UU.), marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) y Cienmarker (Biodynamics S.R.L., Buenos Aires, Argentina), el sistema para documentación de geles UVP programa Visión Works 3.1 (UVP, Cambridge, UK) y el transiluminador modelo M-26 (UVP, Upland, Canadá).

Comparación de dos técnicas de extracción de ADN

Se utilizaron dos técnicas para extracción de ADN, una con buffer tritón X-100 al 1% (Merck, Germany) en TE 1X y otra utilizando un equipo comercial (Wizard™, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Se realizaron dos ensayos de PCR con cada técnica de extracción de ADN en dos días independientes. Para la extracción de ADN se efectuaron diluciones por duplicado abarcando un rango de $2,0 \times 10^2$ a $2,0 \times 10^6$ UFC de la cepa *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*) en 50 μ l de mezcla de reacción de PCR.

Extracción de ADN con buffer tritón. Un ml de cada dilución fue procesado como se describe en preparación de las muestras de ADN.

Extracción de ADN con el equipo comercial. Un ml de cada dilución fue procesado según las indicaciones del fabricante.

Evaluación de la técnica

Se realizó en dos laboratorios independientes, en forma paralela.

Rango de trabajo

Las cepas EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*), FP 2/02 (O145:NM, *stx2*) y ATCC 25922 fueron analizadas en un rango de 0 a 10^8 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR. Para el análisis de las cepas FP 125/04 (O157:NM, no toxigénica), FP 796/03 (O157:H7, *stx2*), FP 145/02 (O26:H11, *stx1*), FP 67/03 (O111:NM, *stx1/stx2*) y EDL933J (O157:H7, *stx1*) se ajustó el rango de 10^2 a 10^6 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR. El rango utilizado con este último grupo de cepas se ajustó según los resultados obtenidos con las cepas EDL933, FP 2/02 y ATCC 25922, ya que no se observó detección de los genes evaluados en las concentraciones de 10^0 y 10^1 UFC/50 μ l de mezcla de reacción, ni se observó inhibición de la reacción de PCR en las concentraciones mayores a 10^6 . La preparación de las muestras se realizó por triplicado, por un mismo operador, en un intervalo de uno a dos días. La PCR múltiple se realizó simultáneamente a todos los extractos de ADN, empleando el mismo equipamiento y los mismos reactivos.

Selectividad

Se realizaron ampliaciones de todas las cepas (Tablas 1 y 2) por duplicado, empleando como blanco el ADN correspondiente a 10^5 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR (límite de corte).

Robustez

Se utilizaron las cepas *E. coli* FP 999/01 (O111:NM, *stx1*), *E. coli* FP 261/01 (O113:H21, *stx2*vh-b), *E. coli* FP 2/02 (O145:NM, *stx2*), *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*) y *E. coli*

Tabla 4. Tabla de contingencia para el análisis estadístico de los resultados

	PCR múltiple <i>stx1/stx2/rfbO157</i>		Σ
	positivo	negativo	
Citotoxicidad específica en células Vero y serotipificación			
Positivo	A Verdadero positivo	B Falso negativo	A + B
Negativo	C Falso positivo	D Verdadero negativo	C + D
Σ	A + C	B + D	

ATCC 25922 (sin factores de virulencia). Se identificaron aquellas variables que podrían afectar el desempeño de la técnica, tales como termociclador y operador. En la PCR se empleó como blanco el ADN correspondiente a 10^5 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR (límite de corte). Los ensayos se realizaron por sextuplicado y se repitieron en las mismas condiciones, con dos operadores y en tres días consecutivos. En el laboratorio 1 se utilizaron dos termocicladores Biometra T Gradient (Biotron, Germany) y en el Laboratorio 2 se utilizó un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf).

Desafío de la PCR múltiple con distintas concentraciones de dos cepas stec

En el laboratorio 1 se utilizaron las cepas EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*) y EDL933J (O157:H7, *stx1*) y en el Laboratorio 2 las cepas EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*) y *E. coli* FP 2/02 (O145:NM, *stx2*). Se prepararon concentraciones finales de ADN correspondientes a $2,0 \times 10^4$ y $2,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR y se realizaron combinaciones del ADN templado de cada cepa en las siguientes relaciones, expresadas en porcentajes, 100/0, 90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90 y 0/100.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una tabla de contingencia (Tabla 4). Se compararon los resultados con los obtenidos mediante citotoxicidad específica en células Vero y serotipificación; considerándose positivo a todo resultado en el que se observó señal positiva para los genes *stx1*, *stx2* y/o *rfbO157* esperados, y negativo a todo resultado en el que no se observó señal positiva para los mismos. Se utilizaron las siguientes fórmulas probabilísticas: inclusividad (%) = $A/A+B$ x 100, exclusividad (%) = $D/C+D$ x 100, precisión analítica (%) = $A+D/A+B+C+D$ x 100, valor predictivo positivo (%) = $A/A+C$ x 100, valor predictivo negativo (%) = $D/B+D$ x 100.

RESULTADOS

Comparación de dos técnicas de extracción de ADN

El tratamiento de la cepa *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*) con buffer tritón X-100 al 1%, permitió detectar los fragmentos de amplificación esperados correspon-

dientes a los genes *stx1* (130 pb), *stx2* (346 pb) y *rfbO157* (259 pb) en concentraciones inferiores en un logaritmo respecto a la extracción y purificación de ADN con el equipo comercial. Los límites de detección y corte obtenidos mediante la extracción de ADN con buffer tritón fueron de $2,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l y $2,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l, respectivamente. Los límites de detección y corte obtenidos mediante la extracción y purificación de ADN con el equipo comercial fueron de $2,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l y $2,0 \times 10^6$ UFC/50 μ l, respectivamente. Por lo tanto, en los ensayos para evaluar la técnica de PCR múltiple *stx1/stx2/rfbO157* se utilizó la extracción de ADN con buffer tritón.

Evaluación de la técnica

Rango de trabajo

Los valores máximos y mínimos obtenidos fueron, a) $6,6 \times 10^7$ y $1,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l con las cepas *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*), y *E. coli* FP 2/02 (O145:NM, *stx2*) b) $4,0 \times 10^6$ y $3,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l con las cepas *E. coli* FP 67/03 (O111:NM, *stx1/stx2*), *E. coli* FP 145/02 (O26:H11, *stx1*), *E. coli* EDL933J (O157:H7, *stx1*), *E. coli* FP 796/03 (O157:H7, *stx2*), *E. coli* FP 125/04 (O157:NM, no toxigénica), c) no se observó señal positiva para ninguno de los genes evaluados con la cepa *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia). En la Figura 1 se presentan los resultados obtenidos con la cepa *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*).

Límite de detección. Todas las cepas STEC analizadas presentaron como límite de detección el ADN correspondiente a $1,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR. Los resultados obtenidos con la cepa *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia) fueron negativos.

Límite de corte. Todas las cepas STEC analizadas presentaron como límite de corte el ADN correspondiente a $1,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR.

Los resultados obtenidos con la cepa *E. coli* ATCC 25922 fueron negativos.

Selectividad

Inclusividad. La totalidad de las cepas productoras de Stx y la cepa de *Shigella dysenteriae* serotipo 1, presentaron señal positiva para el o los genes esperados, al utilizar el ADN correspondiente a 10^5 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR. Parte de los resultados se presentan en la Figura 2.

Exclusividad. La totalidad de las cepas no productoras de Stx, no presentaron señal positiva para los fragmentos genómicos evaluados, al utilizar el ADN correspondiente a 10^5 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR.

Robustez

Las cinco cepas analizadas presentaron la señal esperada en un total de seis repeticiones que incluyeron

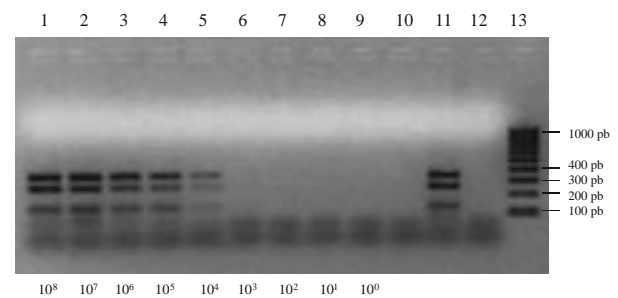


Figura 1. Rango de trabajo, límite de corte y límite de detección de la técnica de PCR múltiple para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*, con la cepa EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*), en concentraciones de 10^8 a 10^0 UFC/50 μ l de mezcla de reacción. Calles 1 a 9: Extractos de ADN. Calle 10: control de sistema. Calle 11: control positivo, *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*). Calle 12: control negativo, *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia). Calle 13: marcador de peso molecular (100 bp).

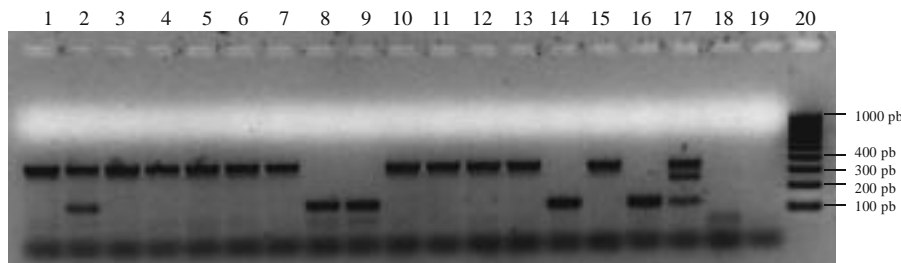


Figura 2. Inclusividad de la técnica de PCR múltiple para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*. Calle 1: FP 763/02 (O8:H19, *stx2*). Calle 2: FP 406/03 (O8:H19, *stx1/stx2*). Calle 3: FP 209/99 (O91:H21, *stx2*). Calle 4: FP 428/03 (O20:H19, *stx2*). Calle 5: FP 412/03 (O22:H16, *stx2*). Calle 6: FP 573/01 (O25:NM, *stx2*). Calle 7: FP 238/03 (O25:NM, *stx2*). Calle 8: FP 145/02 (O26:H11, *stx1*). Calle 9: S 17 B (O26:11, *stx1*). Calle 10: FP 156/03 (O91:H21, *stx2*). Calle 11: T 171 (O91:H21, *stx2*). Calle 12: FP 257/02 (O174:H28, *stx2*). Calle 13: T 154 (O161:H2, *stx2*). Calle 14: FP 433/01 (O111:NM, *stx1*). Calle 15: FP 421/03 (O8:H21, *stx2*). Calle 16: FP 999/01 (O11:NM, *stx1*). Calle 17: control positivo, *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*). Calle 18: control negativo, *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia). Calle 19: control de sistema. Calle 20: marcador de peso molecular (100 bp).

cuatro operadores, tres termocicladores y en tres días consecutivos; considerando ambos laboratorios. Se demostró que la técnica de PCR múltiple es resistente al cambio de respuesta cuando se introducen pequeñas variaciones deliberadas con 10 resultados independientes (cinco cepas por cada laboratorio) repetidos 12 veces (seis repeticiones por cada laboratorio) (Figura 3).

Desafío de la PCR múltiple con distintas concentraciones de dos cepas STEC

Los valores de límite de corte y de límite de detección de la técnica para las cepas analizadas por el laboratorio 1 (*stx1/rfbO157* y *stx2*) y por el laboratorio 2 (*stx2/rfbO157* y *stx1*) se mantuvieron en $2,0 \times 10^4$ y $2,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR, respectivamente. No se

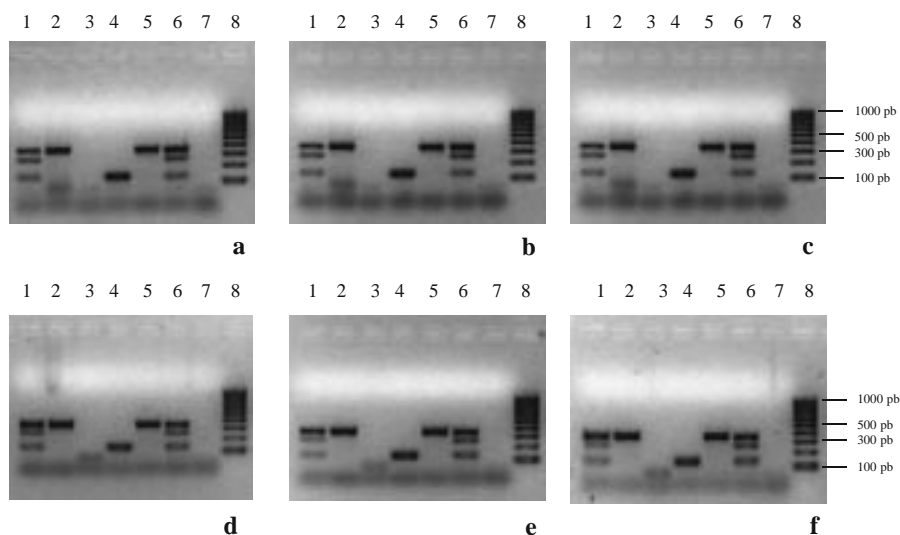


Figura 3. Robustez de la técnica de PCR múltiple para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*. **a)** operador 1, termociclador 1, día 1, **b)** operador 1, termociclador 1, día 2, **c)** operador 1, termociclador 1, día 3, **d)** operador 2, termociclador 2, día 1, **e)** operador 2, termociclador 2, día 2, **f)** operador 2, termociclador 2, día 3. Calle 1: EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2/rfbO157*). Calle 2: FP 2/02 (O145:NM, *stx2*). Calle 3: ATCC 25922 (sin factores de virulencia). Calle 4: FP 999/01 (O111:NM, *stx1*). Calle 5: FP 267/01 (O113:H21, *stx2*). Calle 6: Control positivo, EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*). Calle 7: Control de sistema. Calle 8: marcador de peso molecular (100 bp).

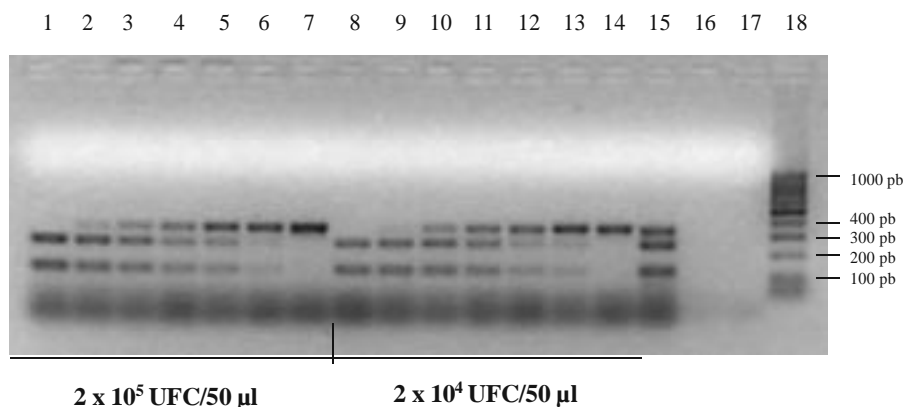


Figura 4. Desafío de la PCR múltiple con distintas concentraciones de ADN correspondientes a $2,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l y $2,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR, expresadas como porcentajes de las cepas EDL933J (O157:H7, *stx1*) y FP 2/02 (O145:NM, *stx2*) (Laboratorio 1). Concentración de $2,0 \times 10^5$ UFC/50 μ l, calle 1: 100% EDL933J/ 0% FP 2/02, calle 2: 90% EDL933J/ 10% FP 2/02, calle 3: 75% EDL933J/ 25% FP 2/02, calle 4: 50% EDL933J/ 50% FP 2/02, calle 5: 25% EDL933J/ 75% FP 2/02, calle 6: 10% EDL933J/ 90% FP 2/02, y calle 7: 0% EDL933J/ 100% FP 2/02. Concentración de $2,0 \times 10^4$ UFC/50 μ l. Calle 8: 100% EDL933J/ 0% FP 2/02, calle 9: 90% EDL933J/ 10% FP 2/02, calle 10: 75% EDL933J/ 25% FP 2/02, calle 11: 50% EDL933J/ 50% FP 2/02, calle 12: 25% EDL933J/ 75% FP 2/02, calle 13: 10% EDL933J/ 90% FP 2/02, y calle 14: 0% EDL933J/ 100% FP 2/02. Calle 15: control positivo, *E. coli* EDL933 (O157:H7, *stx1/stx2*). Calle 16: control negativo, *E. coli* ATCC 25922 (sin factores de virulencia). Calle 17: control de sistema. Calle 18: marcador de peso molecular (100 bp).

observó interferencia en la detección de los distintos factores de virulencia blanco de la reacción al combinar dos cepas STEC en distintas concentraciones (Figura 4).

Análisis estadístico

En la determinación de inclusividad, todas las cepas STEC utilizadas presentaron señal positiva al utilizar el ADN correspondiente a 10^5 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR. Las 30 cepas no toxigénicas fueron negativas en una concentración de 10^5 UFC/50 μ l de mezcla de reacción de PCR. La técnica de PCR múltiple cumplimentó los siguientes parámetros: 100% de inclusividad, 100% de exclusividad, 100% de precisión analítica, 100% de valor predictivo positivo, y 100% de valor predictivo negativo.

DISCUSIÓN

En la última década, fueron desarrolladas numerosas técnicas basadas en PCR para ser utilizadas en el diagnóstico de microorganismos patógenos presentes en muestras clínicas, de animales, de alimentos y ambientales. Sin embargo, pocas de ellas fueron validadas (1, 23).

El diagnóstico de STEC presenta algunas dificultades que pueden ser minimizadas mediante la combinación de procedimientos bacteriológicos y PCR. Esta última técnica es considerada una alternativa altamente satisfactoria para la detección de STEC (32). Hasta el presente se describieron diferentes PCR que utilizan oligonucleótidos y condiciones diferentes (32, 34, 51), aunque son pocos los trabajos disponibles referentes a la validación de dichas técnicas (1).

Para la detección de *E. coli* O157:H7 recientemente comenzaron a utilizarse nuevas técnicas basadas en PCR, como la PCR en tiempo real (RT-PCR), las cuales fueron previamente validadas (20). Sin embargo, aún no es posible utilizarlas en forma extensiva en Argentina debido a su costo.

Para obtener un resultado confiable a partir de una técnica de diagnóstico basada en PCR se sugiere utilizar un control positivo, un control negativo y un control "blanco" de reactivos (18). Además, la inclusión de un control interno de amplificación (IAC) puede evidenciar una falla en cada tubo de reacción, ya sea por la presencia de inhibidores o por un problema particular inherente a la técnica. Es por ello que la tendencia actual es incluir un IAC en las PCR destinadas a la detección de patógenos específicos en especímenes clínicos o en muestras de alimentos (18). Sin embargo, en la validación de la PCR múltiple, no se consideró la incorporación de un IAC porque la misma fue diseñada para ser utilizada como tamizaje o confirmación a partir de un cultivo bacteriano.

La técnica de PCR múltiple para detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157* fue desarrollada y utilizada por el Servicio Fisiopatogenia (INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán") para el diagnóstico de STEC desde el año

2001, y posteriormente transferida a laboratorios clínicos, veterinarios y de alimentos de Argentina; como así también a otros países de Latinoamérica en el marco de la Vigilancia de SUH y Diarreas Sanguinolentas, dentro de la Vigilancia de las Enfermedades Emergentes en los Países del Cono Sur establecida por la Organización Panamericana de Salud. Por su parte, el Laboratorio de Alimentos DLIM-DGHySA, G.C.B.A utiliza esta técnica desde el año 2003, con óptimos resultados.

La extracción con buffer tritón permitió obtener cantidades adecuadas de ADN para la PCR, tratándose de una técnica más rápida, menos laboriosa y más económica que la utilización de equipos comerciales. Por este motivo, dicha técnica de extracción fue utilizada en todas las etapas de la validación y es la recomendada en la rutina diagnóstica.

La técnica validada presentó un buen desempeño al utilizar el ADN correspondiente a $1,0 \times 10^5$ UFC/50 ml de mezcla de reacción. No se observaron interferencias al utilizar concentraciones elevadas de ADN cuando se determinó rango de trabajo, ni al combinar distintas concentraciones de cepas con diferentes factores de virulencia. La validación realizada en dos laboratorios, en forma paralela e independiente, utilizando diferentes equipos y reactivos, además de corroborar los parámetros considerados, confirmó la repetibilidad de la técnica.

Esta PCR múltiple permite detectar los genes *stx1*, *stx2*, *stx2c* (*stx2vh-a* y *stx2vh-b*) y *stx2d*, de cepas STEC y *stx1* de *Shigella dysenteriae* serotipo 1. Sin embargo, no permite detectar los genes *stx2e* y *stx2f*, pues los oligonucleótidos *Stx2a* y *Stx2b* fueron originalmente diseñados por Pollard *et al.* (34) para detectar las variantes de *stx2* de mayor impacto en salud pública y no para amplificar *stx2e*, raramente asociada a enfermedad humana (17, 34). Los genes *stx2e* y *stx2f*, cromosómicos y no insertos por bacteriófagos, están altamente relacionados, pues la secuencia de la subunidad B de *stx2e* presenta una homología del 98% con la subunidad B de *stx2f* (17). Por este motivo, cepas *stx2e*- y *stx2f*-positivas no fueron incluidas en la validación.

En conclusión, la optimización y posterior validación de la PCR múltiple provee una técnica rápida, precisa, segura y selectiva para la detección de STEC O157 y no-O157 en especímenes clínicos luego de un primario aislamiento, y en muestras de alimentos luego de un enriquecimiento y posterior aislamiento.

En una etapa posterior se cumplimentará un estudio interlaboratorio, con mayor número de laboratorios participantes, utilizando especímenes clínicos y muestras de alimentos contaminadas experimentalmente, a fin de establecer la seguridad diagnóstica y la reproducibilidad de la técnica de PCR múltiple validada.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. Nancy Strockbine (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, EE.UU.) por proveer los anticuerpos específicos

Mab13C4 y BC5BB12. Como así también la colaboración y sugerencias del Dr. Alejandro Shijman. Algunas cepas utilizadas en el presente trabajo fueron cedidas por el Servicio Enterobacterias, INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” y por el Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Bacteriológico de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. El presente trabajo fue subsidiado parcialmente por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) (PIP Nº 0020/98) y la Fundación Alberto J. Roemmers, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdulmawjood A, Bülte M, Roth S, Schönenbrücher H, Cook N, D'Agostino M, *et al.* (2004) Toward an International Standard for PCR-Based Detection of Foodborne *Escherichia coli* O157: Validation of the PCR-Based Method in a Multicenter Interlaboratory. *J. AOAC Internat.* 87: 856-860.
2. Ackers ML, Mahon BE, Leahy E, Goode B, Damrow T, Hayes PS, *et al.* (1998) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with leaf lettuce consumption. *J. Infect. Dis.* 177: 1588-1593.
3. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon CD, Tarr PI, *et al.* (1994) A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *JAMA* 272: 1349-1353.
4. Belongia EA, Osterholm MT, Soler JT, Ammend DA, Braun JE, McDonald KL (1993) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. *JAMA* 269: 883-888.
5. Besser RE, Lett SM, Weber JT (1993) An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269: 2217-2220.
6. Beutin L, Geier D, Steinrück H, Zimmermann S, Scheutz F (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2483-2488.
7. Centers for Disease Control and Prevention (1997) *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand frozen ground beef patties and burgers-Colorado, 1997. *MMWR Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 46: 777-778.
8. Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E (1993) Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol. Infect.* 111: 439-447.
9. Chinen I., Otero JL, Miliwebsky E, Roldán ML, Chillemi GM, Baschkier A, *et al.* (2003) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from calves in Argentina. *Res. Vet. Sci.* 74: 283-286.
10. Cobbold R, Desmarchelier P (2001) Characterization and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from Australian dairy cattle. *Vet. Microbiol.* 79: 323-335.
11. Comité de Nefrología (1995) Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch. Arg. de Pediatría.* 93: 407-411.
12. Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, Schaben C, Crielli AS, Gage R, *et al.* (2002) An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N. Engl. J. Med.* 347: 555-560.
13. Downes FP, Barret TJ, Green JH, Aloisio CH, Spika JS, Strockbine NA, *et al.* (1988) Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. *Infection and Immunity.* 56: 1926-1933.
14. Edwards and Ewing's (1986) The Genus *Escherichia*. En: Ewing WH (Ed), Edwards and Ewing's, Identification of Enterobacteriaceae 4th Ed. Elsevier, New York, p. 93-134.
15. Feldsine P, Abeyta C, Andrews W (2002) AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. *J. AOAC Internat.* 85: 1187-1200.
16. Ferraris JR, Ramirez JA, Ruiz S, Caletti MG, Vallejo G, Piantanida JJ, *et al.* (2002) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: absence of recurrence after renal transplantation. *Pediatr. Nephrol.* 17: 809-814.
17. Gannon VPJ, Teerling C, Masri SA, Gyles CL (1990) Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin II family. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1125-1135.
18. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P (2004) Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1863-1868.
19. Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS (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.
20. Klerks MM, Zijlstra C, van Bruggen AHC (2004) Comparison of real-time PCR methods for detection of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7, and introduction of a general internal amplification control. *J. Microbiol. Methods* 59: 351-361.
21. Levine MM (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389.
22. MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP (1991) Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet. Pathol.* 28: 66-73.
23. Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R (2003) Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. *Appl. Environm. Microbiol.* 69: 290-296.
24. Marques LRM, Peiris JSM, Cryz SJ, O'Brien AD (1987) *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 33-38.
25. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, *et al.* (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 189-198.
26. NordVal c/o Department of Microbial Food Safety Danish Institute for Food and Veterinary Research Validation (2004) Protocol for the validation of alternative microbiological methods. NV-DOC.D-2004-01-01. Morkhoj Bygade 19 DK-1860 Soborg Denmark.
27. O'Brien AD, Holmes RK (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
28. Organismo Argentino de Acreditación (2003) Guía para validación de métodos de ensayo. Código DC-LE-05: 1-16.
29. Ørskov F, Ørskov I (1984) Serotyping of *Escherichia coli*. En Bergan T (Ed), *Methods in Microbiology*, Vol 14, London; Academic Press: 43-112.
30. Ørskov F, Ørskov I, Villar JA (1987) Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1: 276.
31. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Blanco M, Padola NL, *et al.* (2000) Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 16: 757-762.
32. Paton AW and Paton JC (1998) Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 598-602.
33. Pierard D, Muylderms G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S (1998) Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 36: 3317-3322.

34. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28: 540-545.
35. Remuzzi G, Ruggenenti P (1995) The hemolytic uremic syndrome. *Perspectives in clinical nephrology. Kidney Internat.* 147: 2-19.
36. Renwick SA, Wilson JB, Clark RC (1993) Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and human. *J. Infect. Dis.* 168: 792-793.
37. Repetto HA (1992) Follow up of hemolytic uremic syndrome in Argentina. In: hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. Kaplan BS, Trompeter RS, and Moake JL (editors). Marcel Dekker Inc. New York, p. 453-456.
38. Riley LW, Remis RS, Helgerson, McGee HB, Wells JG, Davis BR, *et al.* (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.
39. Rivas M (2004) Control and prevention of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans and in the animal reservoir. II Simposio Internacional de Biotecnología. Conferencia C5, p. 5, Tucumán, Argentina.
40. Rivas M, Caletti MG, Chinen I, Refi SM, Roldan CD, Chillemi G, *et al.* (2003) Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 1184-1186.
41. Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Valles P, Mead P, *et al.* (2003) Risk factor associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, Argentina. A case control study. 5th International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections". Edinburgh, UK.
42. Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H (2000) A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Environm. Microbiol.* 66: 1205-1208.
43. Strockbine NA, Marques LRM, Holmes RK, O'Brien AD (1985) Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*. *Infect. Imm.* 50: 695-700.
44. Trullols E, Ruisánchez I, Rius X (2004) Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry.* 23: 137-145.
45. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR (1991) Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1339-1343.
46. United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. USDA/FSIS (2002) United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (nonmotile) from meat products. Revision 03. Effective 10/25/02. Washington DC, EE.UU.
47. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, *et al.* (1991) Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29: 985-989.
48. World Health Organization (1997) Consultation on prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
49. World Health Organization (1998) Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response WHO/CSR/APH/98.8. Berlin, Germany.
50. Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H (2002) Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1441-1446.
51. Ziebell K (2003) Identification of presumptive positive verocytotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. MFLP-86. <http://www.hc-sc.ca/food-aliment>
52. Ziebell KA, Read SC, Johnson RP, and Gyles CL (2002) Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res. Microbiol.* 153: 289-300.