

DetECCIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN RESES BOVINAS Y CARNE MOLIDA DE CORRIENTES, ARGENTINA*

Cicuta, M.E.¹; Deza, N.³; Roibón, W.R.¹; Pereyra, D.³;
Benitez, M.C.¹; Arzú, R.O.²; Boehringer, S.I.¹

Cátedras de Microbiología¹ y Bromatología², Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina, Tel/Fax 03783-425753. E-mail: cicuta@vet.unne.edu.ar.
Servicio Fisiopatogenia³, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sarsfield 563, Buenos Aires (1281), Argentina. E-mail: ndeza@anlis.gov.ar.

Resumen

Cicuta, M.E.; Deza, N.; Roibón, W.R.; Pereyra, D.; Benitez, M.C.; Arzú, R.O.; Boehringer, S.I.: Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. Rev. vet. 17: 1, 20-25, 2006. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente asociado a casos esporádicos de diarrea, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) o púrpura trombocitopénica en seres humanos. Los rumiantes en general y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC, y los alimentos de origen cárnico como el vehículo de transmisión más frecuente. Entre mayo de 2004 y abril de 2005 se analizaron 107 muestras de hisopados de reses bovinas y 66 partidas de carnes molidas listas para expendio al consumidor, provenientes de diversos establecimientos de las ciudades de Resistencia y Corrientes, con el objetivo de establecer la presencia de STEC en este tipo de muestras. El método de aislamiento utilizado fue enriquecimiento en agua peptonada con cefixima, repique en agar MacConkey y tipificación de las colonias fermentadoras de lactosa en citrato de Koser y agar lisina hierro. Se hicieron pruebas de desarrollo en presencia de telurito de potasio, fermentación de sorbitol, y detección de β -glucuronidasa. A las 75 cepas obtenidas y confirmadas bioquímicamente como *E. coli* (39 aisladas de reses bovinas y 36 de carnes molidas), se les efectuó PCR múltiple para detectar genes codificantes de las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*), *rfbO157* y PCR para enterohemolisina (*EHEC-hlyA*) e intimina (*eae*), todos atributos de virulencia de cepas enterohemorrágicas (EHEC), una de las cuales es O157:H7. Sólo una, aislada de carne molida, resultó ser *stx2vh-a*, no-O157, móvil, *eae* (-), *EHEC-hlyA* (-). Las principales conclusiones del trabajo fueron la necesidad de realizar la vigilancia de las cepas STEC O157 y no-O157 en muestras de origen bovino y carne molida, como así también poder determinar vías y vehículos de transmisión a los efectos de implementar estrategias de prevención y control de las enfermedades asociadas a STEC debido a la alta incidencia de SUH en Argentina.

Palabras clave: bovino, *Escherichia coli*, toxina Shiga, carne molida.

Abstract

Cicuta, M.E.; Deza, N.; Roibón, W.R.; Pereyra, D.; Benitez, M.C.; Arzú, R.O.; Boehringer, S.I.: Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from bovine carcasses and ground beef of Corrientes, Argentina. Rev. vet. 17: 1, 20-25, 2006. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an emergent pathogen associated to sporadic cases of diarrhoea, haemolytic uraemic syndrome (HUS), haemorrhagic colitis or thrombotic thrombocytopenic purpura in human beings. Ruminants, specially cattle, and their beef products are the most important reservoirs of STEC. From May 2004 to April 2005, 107 bovine carcasses and 66 ground beef samples from two cities of the Northeastern Region of Argentina were analysed to determine the presence of STEC. The methodology of isolation was pre-enrichment STEC in cefixime-peptone-water, streaking on MacConkey agar and biochemical typing using fermentation of lactose, growth in Koser's citrate and differentiation on lysine iron agar. Other specific tests were growth in presence of potassium telurite, sorbitol fermentation and detection of β -glucuronidase activity. The 75 strains biochemically determined as *E. coli*, (39 from bovine carcasses and 36 from ground beef), were tested by a multiplex PCR that allowed to

detect *stx1* and *stx2*, *rfbO157* genes, and PCR for enterohemolysin (*EHEC-hlyA*) and the *eae* genes that codes intimin protein. Of the 75 strains analyzed, one strain isolated from ground beef was *stx2vh-a*, non-O157, motile, *eae* and *EHEC-hlyA* negative. It is emphasized the need of vigilance STEC and non-STECS strains of bovin origin to determine transmission routes in order to prevent and control STEC-associated diseases owing the high incidence of HUS in Argentina.

Key Words: cattle, *Escherichia coli*, Shiga toxin, ground beef.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de metodologías moleculares para la detección de microorganismos patógenos ha aumentado la sensibilidad, especificidad y rapidez del diagnóstico, permitiendo establecer los riesgos para la Salud Pública asociados con el consumo de los alimentos^{1, 2, 11, 16, 23, 24, 30, 31}.

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC), incluido el serotipo O157:H7, es un patógeno de transmisión por alimentos que puede causar enfermedades severas y potencialmente fatales para el hombre. Es el principal agente causal de gastroenteritis que puede complicarse con colitis hemorrágicas (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) que se traduce en falla renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia^{9, 14}. También es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. Las cepas STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre, pertenecen a la categoría de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)^{17, 33}. Dentro de este grupo, O157:H7 es el serotipo aislado con mayor frecuencia. A dicho serotipo se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes como los registrados en la costa oeste de Estados Unidos en 1993² y en Japón en 1996³².

En Argentina la tasa de incidencia de SUH fue de 12,5 casos/100.000 niños menores de 5 años en 2004, la más alta a nivel mundial; además se estima que el 10% de los niños infectados con STEC evolucionan a SUH^{18, 29}. Los rumiantes, especialmente bovinos y ovinos⁵, son los principales reservorios de STEC^{19, 22, 25}.

Las cepas STEC de origen humano, animal o de alimentos pueden producir dos tipos de toxina Shiga (Stx1 y Stx2) que poseen efectos citotóxicos en células VERO y portan marcadores de virulencia accesorios como el gen *eae* que codifica una proteína, intimina, la cual induce una unión íntima de la bacteria al enterocito y la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE (del inglés “attaching and effacing”) y el gen *hlyA* que codifica una enterohemolisina (*EHEC-hly*)^{24, 30, 31}. Análisis de alimentos asociados con brotes de CH han mostrado que la dosis infectiva es muy baja, pues menos de cien bacterias por gramo en aquellos pueden causar enfermedad¹. Entre 0,3 y 15 bacterias por gramo de STEC O157:H7 fueron detectadas en varios lotes de carne vacuna congelada

implicada en un brote importante ocurrido en EE.UU¹¹.

En las últimas décadas, la incorporación de STEC O157:H7 en el abastecimiento mundial de comidas y los numerosos brotes y casos esporádicos detectados en distintas partes del mundo son ejemplos de las consecuencias que acarrea un patógeno emergente cuando ingresa en la cadena alimentaria¹⁴.

Teniendo en cuenta la alta tasa de incidencia de SUH en Argentina y la ocurrencia de casos en Corrientes, en el presente proyecto se propuso detectar la presencia de STEC en hisopados superficiales de reses bovinas y de diferentes partidas de carnes molidas listas para expendio al consumidor, provenientes de diversos establecimientos de las ciudades de Resistencia y Corrientes a fin de establecer su probable papel en la transmisión de STEC.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el período comprendido entre mayo de 2004 y abril de 2005 se analizaron 107 muestras de hisopados de res y 66 de carne molida. Las mismas fueron enriquecidas en agua peptonada con cefixima (Bagó, 0,05 mg/l) a 37°C durante 6 h, y posteriormente aisladas en agar MacConkey (Merck). La caracterización de las colonias fermentadoras de lactosa se realizó mediante la utilización de citrato de Koser (Oxoid) y la producción de lisina decarboxilasa en agar lisina hierro (Britania). Con esta identificación previa se hicieron las pruebas de crecimiento en presencia de telurito de potasio, fermentación de sorbitol, y detección de β -glucuronidasa¹¹. En 75 de las 173 muestras analizadas se aisló *E. coli* las cuales fueron confirmadas bioquímicamente¹² y se conservaron en agar blando (0,8%) para su posterior tipificación molecular en el Servicio Fisiopatogenia del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Los aislamientos se enriquecieron en caldo tripticasa de soja (Difco) a 37°C por 6 h y posteriormente fueron sembrados en agar MacConkey sorbitol (SMAC) (Difco). Las placas de SMAC se incubaron a 37°C durante 18–24 h. Como tamizaje se realizó la técnica de PCR múltiple¹⁵ de la zona de crecimiento confluyente, para detección de los genes *stx1* y *stx2*, usando los oligonucleótidos descritos por Pollard²⁶ y el gen *rfbO157*, usando los oligonucleótidos descritos por Paton & Pa-

ton²⁴. Los aislamientos *stx1* y/o *stx2* positivos fueron identificados por técnicas bioquímicas estándares¹⁵, serotificados usando antisueros de *E. coli* O y H²¹ y caracterizados fenotípicamente^{10,27}.

Caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos. El gen *eae* fue detectado por PCR¹⁵; las cepas STEC *eae*-negativas fueron analizadas para detectar la presencia del gen *saa*²⁴, el gen *EHEC-hly* fue identificado por PCR³⁰ y la hemólisis debida a *EHEC*-enterohemolisina se detectó en placas de agar sangre con glóbulos rojos desfibrinados de oveja⁶.

El antibiograma fue determinado según el método de Kirby Bauer para: ácido nalidixico, amikacina, ciprofloxacina, ampicilina, cloranfenicol, colistin, estreptomycin, gentamicina, nitrofurantoina, tetraciclina y trimetoprima-sulfametoxazol²⁰.

Subtipificación de los aislamientos. Las variantes de *stx2* se determinaron por análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de amplificación obtenidos por PCR de una región de la subunidad B de la toxina³¹.

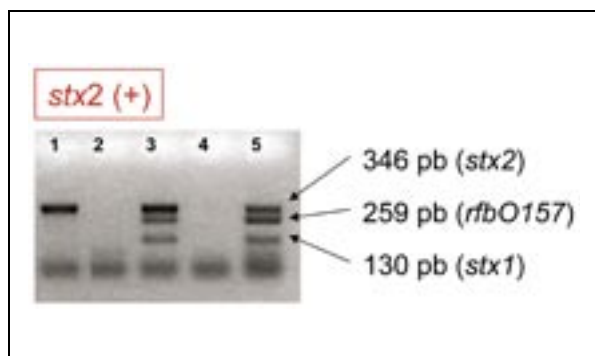


Figura 1. Productos de amplificación por PCR para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*. Línea 1: *E. coli* OR:HNT *stx2* cepa aislada de carne molida (C37a). Línea 2: control negativo *E. coli* ATCC 25922 sin factores de virulencia. Línea 3: control positivo *E. coli* EDL933 *stx1/stx2/rfbO157*. Línea 4: control de reactivos (mezcla sin templado). Línea 5: Amplificación de control positivo *E. coli* EDL933 *stx1/stx2/rfbO157*.

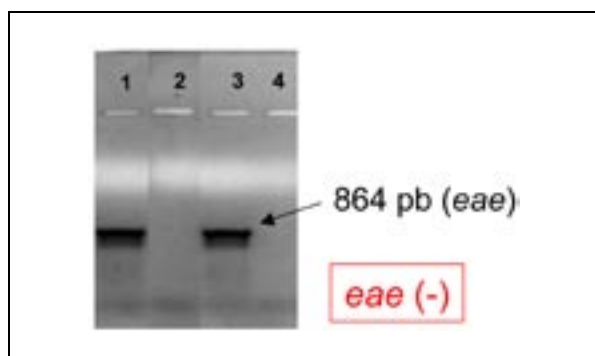


Figura 2. Productos de amplificación por PCR para la detección del gen *eae*. Línea 1: *E. coli* O145:NM *stx2/eae+*, aislado de un caso de SUH. Línea 2: *E. coli* OR:HNT *stx2/eae-* cepa aislada de carne molida (C37a). Línea 3: control positivo *E. coli* 2348/68 *eae+* (EPEC). Línea 4: control de reactivos (mezcla sin templado).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

STEC no-O157:H7 fue detectado en una (1,3%) de las 75 cepas identificadas como *E. coli* (39 de reses bovinas y 36 de carnes molidas). La cepa aislada de carne molida e identificada como C37a, fue caracterizada como *E. coli* OR:HNT, *stx2vh-a* negativa para los marcadores de virulencia accesorios: *eae*, *EHEC-hlyA* y *saa* (Figuras 1, 2, 3, 4 y 5), fermentadora de sorbitol, β -glucuronidasa positiva, no desarrollando en presencia de telurito de potasio y sensible a todos los antibióticos ensayados.

Si bien la mayoría de los estudios están orientados a la detección de *E. coli* O157, en la actualidad aumentaron los esfuerzos para detectar los diferentes serotipos de STEC no-O157^{3,4}. En España⁸, detectaron 13% de STEC en 455 muestras de carne cruda, aislando 1% de *E. coli* O157:H7 y 12% de STEC no-O157.

En Argentina se analizaron 279 muestras de carne, detectándose STEC O157:H7 en 3,8% de muestras de carne picada, 4,8% de muestras de chorizo fresco y

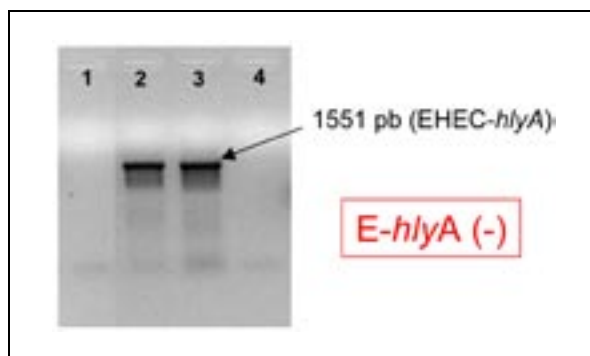


Figura 3. Productos de amplificación por PCR para la detección del gen *EHEC-hlyA*. Línea 1: *E. coli* OR:HNT *stx2/EHEC-hlyA* cepa aislada de carne molida (C37a). Línea 2: control positivo *E. coli* E32511 *EHEC-hlyA+*. Línea 3: Amplificación de control positivo *EHEC-hlyA+*. Línea 4: control de reactivos (mezcla sin templado).

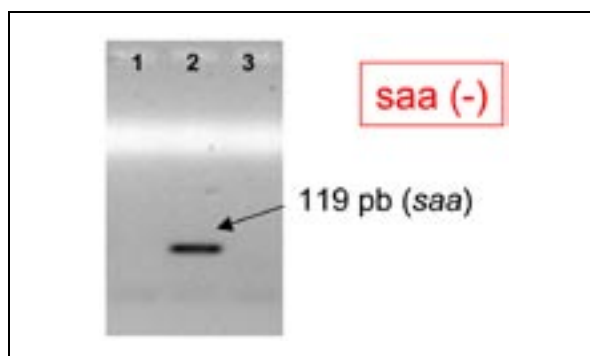


Figura 4. Productos de amplificación por PCR para la detección del gen *saa*. Línea 1: *E. coli* OR:HNT *stx2/saa-* cepa aislada de carne molida (C37a). Línea 2: control positivo *E. coli* 434-1 *saa+*. Línea 3: control de reactivos (mezcla sin templado). Variante: *stx2vh-a*

3,3% de muestras de chorizo seco¹⁰. En el año 2003 se pudo establecer por primera vez en Argentina la asociación entre un caso esporádico de SUH y el consumo de hamburguesas caseras contaminadas por STEC O157:H7^{27,28}.

Nuestros resultados coinciden con los reportados por Blanco *et al.*⁷ y Parma *et al.*²⁵ quienes luego de realizar un estudio de los factores de virulencia de 218 cepas de STEC obtenidas de bovinos adultos, terneros sanos y diarreicos, y muestras de carne, comprobaron la prevalencia de *stx2*.

Las medidas necesarias para proteger a los consumidores de la infección por STEC son las mismas que se requieren contra *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* y otros patógenos no esporulados. En alimentos de origen animal una temperatura interna de 63°C constituye un punto de control crítico para asegurar la inactivación de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, la *Food and Drug Administration* de EEUU recomendó incrementar la temperatura de cocción de las hamburguesas a 68,3°C, después de un brote ocurrido en cinco estados de la costa oeste del país, con más de 700 afectados¹³.

En el año 2005 comenzó a funcionar una Unidad Centinela en el *Hospital Pediátrico Juan Pablo II* de Corrientes para la vigilancia de SUH. Para dicha provincia la tasa de incidencia de SUH fue de 3,8 casos/100.000 niños menores de 5 años en 2005.

Teniendo en cuenta que no existe ninguna vacuna que proteja de la infección por STEC, la identificación de factores de riesgo es crítico para implementar nuevas estrategias que reduzcan la ocurrencia de SUH en Argentina. También es necesario fortalecer estos hallaz-

gos de manera que pueda determinarse el papel de la transmisión persona–persona y animal–persona como responsables de la endemidad de la enfermedad en nuestro país.

Agradecimientos. Este trabajo fue realizado con el apoyo financiero correspondiente al PI 20/03 SGCYT/UNNE: *Escherichia coli* productor de toxina Shiga, con especial referencia a O157:H7, en medias reses y carne molida bovinas del nordeste argentino (Resolución 638/2003–CS). A la Dra. Marta Rivas del Servicio Fisiopatología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas–ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, por la revisión del trabajo.

REFERENCIAS

1. Armstrong GL, Hollingsworth J, Glenn M Jr. 1996. Emerging Foodborne Pathogens. *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidem Rev* 18, 29–51.
2. Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. 1994 Laboratory investigation of a multistate foodborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *J Clin Microbiol* 32: 3013–3017.
3. Bettelheim KA. 2003. Non O–157 Verotoxin–producing *Escherichia coli*. A problem, paradox and paradigm. *Exp Biol Med* 228: 333–344.
4. Bettelheim KA. 2000. Serotypes of verotoxin–producing *Escherichia coli* reported in the literature apart from tho-

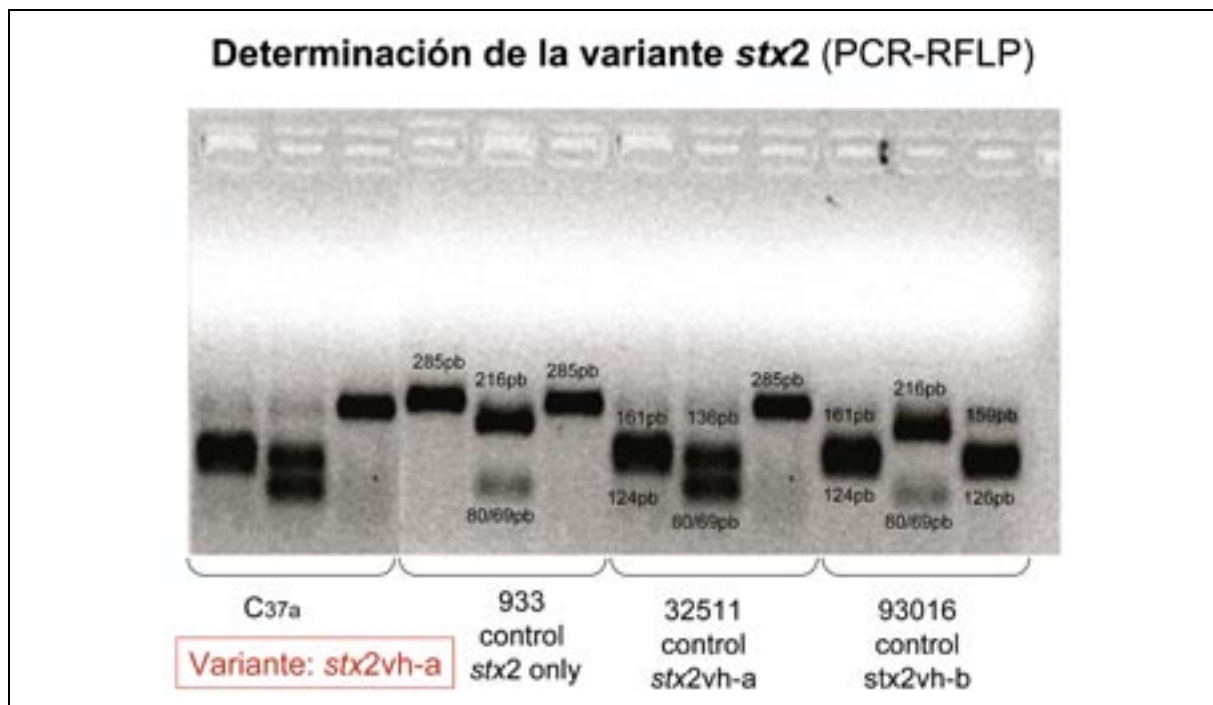


Figura 5. Genotipos de *Stx2* por análisis de RFLP después de la digestión usando las enzimas de restricción *HaeIII*, *RsaI* y *NciI* de los productos de amplificación por PCR. Línea 1: *E. coli* OR:HNT *stx2vh–a* cepa aislada de carne molida (C37a). Línea 2: control positivo de *E. coli* EDL 933 O157:H7 *stx2*. Línea 3: control positivo *E. coli* 32511 O157:NM *stx2vh–a*. Línea 4: control positivo *E. coli* 93–016 O113:H211 *stx2vh–b*.

- se belonging to serogroup O157. MicroBionet.http://www.microbionet.com.au/frames/feature/vtec/intro.htm.
5. **Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K.** 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 42: 1099–1108.
 6. **Beutin L, Montenegro MA, Ørskov F, Ørskov I, Prada J, Zimmermann S, Stephan R.** 1989. Cloos association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 27: 2559–2564.
 7. **Blanco M, Padola NL, Kruger A, Sanz ME, Blanco JE, Gonzalez EA, Dahbi G, Mora A, Bernardez MI, Etcheverria AI, Arroyo GH, Lucchesi PM, Parma AE, Blanco J.** 2004. Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *Int Microbiol* 7: 269–276.
 8. **Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Azucena M, González EA, Bernárdez MI, Alonso MP, Coira A, Rodríguez A, Rey J, Alonso JM, Usera M.** 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp Biol Med* 228: 345–351.
 9. **Comité de Nefrología.** 1995. Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatr* 93: 407–411.
 10. **Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M.** 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Protect* 64: 1346–1351.
 11. **Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ.** 2001. *Escherichia coli* O157. En: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd ed, ASM Press, Washington, 880 p.
 12. **Ewing WH.** 1986. *Edwards & Ewing Identification of Enterobacteriaceae*, Elsevier, 4th ed. New York, 362 p.
 13. **Griffin PM, Bell BP, Cieslak PR, Tuttle J, Barret TJ, Doyle MP, McNamara AM, Shefer AM, Wells JG.** 1994. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in the Western United States: the big picture. In: *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections* (Karmali MA, Goglio AG Ed), Elsevier, Amsterdam, p. 7–12.
 14. **Joseph SW, Ingram DT, Kaper JB.** 2002. The epidemiology, pathogenicity and microbiology of foodborne *Escherichia coli* O157:H7. *Rev Med Microbiol* 13: 53–62.
 15. **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.
 16. **Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, 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: 1–10.
 17. **Levine MM.** 1987. That cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J Infect Dis* 155: 377–389.
 18. **López EL, Contrini MM, Sanz ME, Viñas MR, Parma AR, De Rosa MF, Cleary TG.** 1997. Perspectives on Shiga-like toxin infections in Argentina. *J Food Protect* 60: 1458–1462.
 19. **Meichtri LH, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth BEC, Masana MO, Cataldi A, Rodríguez HR, 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.
 20. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2004. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standard M100–S13, Wayne, USA, p. 24.
 21. **Orskov F, Orskov I.** 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods in Microbiology* (T Bergan Ed), Academic Press, London, p. 14, 43–112.
 22. **Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE.** 2004. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Vet Microbiol* 100: 3–9.
 23. **Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement–negative Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 69: 6999–7009.
 24. **Paton A, Paton J.** 1998. Detection and characterization of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* by using Multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* 36: 598–602.
 25. **Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, Padola NL, Etcheverría AI.** 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidem* 16: 757–762.
 26. **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.
 27. **Rivas M, Caletti MG, Chinen I, Refi SM, Roldán CD, Chillemi G, Fiorilli G, Bertolotti A, Aguerre L.** 2003. Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerging Infect Dis* 9:1184–1186.
 28. **Rivas M, Sosa Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Mead P, Griffin P.** 2003. Risk factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, Argentina. A Case–Control Study. *Abstract 5th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (verocytotoxin) Producing Escherichia coli infections*, Edinburg (United Kingdom), p. 19.
 29. **Rivas M, Voyer LE, Tous M, de Mena MF, Leardini N, Wainsztein R, Callejo R, Quadri B, Corti S, Prado V.** 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in family members of children with hemolytic uremic syndrome. *Medicina* (Buenos Aires) 56: 119–125.

30. **Schmidt H, Beutin L, Karch H.** 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 63: 1055–1061.
31. **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.
32. **Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K.** 1996. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet* 348: 381–382.
33. **World Health Organization (WHO)** 1997. *Prevention and control of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157: H7 infections*. Report of a WHO Consultation World Health Organization, Geneva.