

DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN CARNE FRESCA DE RES MEDIANTE PCR MÚLTIPLEX

Reyna A. Treviño López*, Viviana Mata Tijerina*, Arturo Espinoza Mata*, Irma O. Martínez Vázquez*, Alberto Morales Loredo**, Genoveva Alvarez Ojeda***, Miguel Angel Gallegos Robles****
*Facultad de Ciencias Biológicas-UANL (San Nicolás de los Garza, N.L., México), **Consortio Técnico del Noreste de México (Guadalupe, N.L., México), ***Centro de Investigación Regional de Noreste-INIFAP-Nuevo León (Monterrey, N.L. México), ****Facultad de Agricultura y Zootecnia-UJED (Drango, Dgo., México)
E-mail: irmartinezv@hotmail.com



Introducción

Escherichia coli O157:H7 constituye un claro ejemplo de patógenos emergentes, que producen efectos crónicos en humanos (1). Este microorganismo es de los de mayor interés para la Organización Mundial de la Salud por su gran capacidad de supervivencia bajo condiciones adversas, razón por lo que ha establecido un programa continuo de vigilancia sanitaria, para controlar aquellos alimentos que representan riesgos para la salud (2). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ha declarado a este patógeno desde 1994 como un adulterante en carne cruda de res y además han tomado medidas

regulatorias para proteger la salud pública (3). Para la detección de cepas de *E. coli* O157:H7, se utilizan bioensayos y métodos convencionales, pero tienen limitaciones. Los métodos microbiológicos requieren tiempo, son laboriosos, difíciles de adaptar a un gran número de muestras y presentan poca sensibilidad, además de ser incapaces de detectar variantes fenotípicas (4). El establecimiento de nuevas metodologías para la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido el mejoramiento en el diagnóstico y determinación de riesgos de salud pública asociados con su consumo. Así, los métodos moleculares en microbiología de alimentos ofrecen una alternativa eficiente en comparación con los métodos estándares para la identificación de patógenos de interés en salud pública (5). Los objetivos del presente trabajo fueron: (a) Estandarizar la técnica de PCR Múltiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 en cepas de referencia, (b) Determinar el límite de detección de la técnica de PCR Múltiplex y el método microbiológico en muestras de carne inoculadas artificialmente con dos medios de enriquecimiento, (c) Comparar el límite de detección obtenido con cada medio de enriquecimiento en muestras de carne inoculadas artificialmente mediante la técnica de PCR Múltiplex y el método microbiológico y (d) Comparar la técnica de PCR Múltiplex y el método microbiológico para la detección de *E. coli* O157:H7 en muestras de carne comercial.

Metodología

Se utilizó la cepa de referencia de *Escherichia coli* O157:H7 toxigénica; donada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE), la cepa de *E. coli* no toxigénica ATCC 4350 y muestras de carne de los tipos Top Sirloin, New York y Rib eye colectadas de la zona metropolitana de Monterrey, N. L., México. Se seleccionaron iniciadores reportados para amplificar secuencias de los genes *rfbE*, *fliC*, *stx1*, *stx2* y *eaeA* de *E. coli* O157:H7 sintetizados por MWG Oligo Syntesis USA. Al iniciador VT2-Am se le eliminaron los últimos 2 nucleótidos en la región 3' y al iniciador VT2-Bm se le eliminó el nucleótido final en la región 3' (6,7,8,9). Para la extracción de ADN de cepa se utilizó el método bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (10), a partir de un paquete bacteriano obtenido de 1 ml de cultivo de 24 h de incubación a 37 °C en caldo infusión cerebro corazón (ICC) (Difco).

Se realizaron 2 ensayos de PCR Múltiplex independientes; uno basado en la detección de los genes que definen el serotipo O157:H7 (*rfbE* y *fliC*) y el otro en la detección de los genes que codifican los factores de patogenicidad más importantes en *E. coli* O157:H7 (*stx1*, *stx2* y *eaeA*). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador marca Thermo Hybaid®, modelo PCR Express mediante el siguiente protocolo: 25 pmoles de cada iniciador, 200 µM de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 2 mM de MgCl₂, 1X de Buffer para PCR pH 8.0 (200 mM Tris-HCl 500 mM KCl), 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (PROMEGA), de 10-200 ng de ADN templado y completando el volumen final a 25 µl con agua estéril. Las condiciones del termociclador para el

PCR Múltiplex de serotipo fueron: un ciclo a 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de tres pasos consistentes en: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento de iniciadores a 62 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s, con una extensión final de 72 °C por 10 min. En el PCR Múltiplex para factores de patogenicidad las condiciones del termociclador fueron: un ciclo a 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de tres pasos consistentes: desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento de iniciadores a 58 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 75 s, con una extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos de PCR fueron fraccionados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en una cámara Labnet International, Inc[®]; modelo E-0310 y fuente de poder de la misma marca, modelo 300, con 70 V durante 40 min. Los fragmentos fueron visualizados por exposición del gel teñido con bromuro de etidio (0.5 ml/ml), en un transiluminador Epi-Chemi Darkroom[®] modelo UVP a una longitud de onda de 302 nm conectado a una cámara digital HP photosmart[®] 850 adaptada con filtro para luz ultravioleta.

Previo a la inoculación de muestras, se realizaron pruebas microbiológicas y de PCR a cortes de carne Top Sirloin para seleccionar aquellos exentos de *E. coli* O157:H7. La muestra seleccionada se preparó en porciones de 25 g y se congelaron a -20 °C. Se activó *E. coli* O157:H7 en Caldo Soya Tripticasa (CST) incubado a 37°C por 24 h. El crecimiento obtenido fue ajustado a una absorbancia de 0.100, longitud de onda de 600 nm, a partir del cual se realizaron diluciones seriadas base 10 en solución reguladora de fosfatos (pH 7± 0.2), las cuales se homogenizaron en vortex (MS1 minishaker IKA[®], Works, Inc.). La estimación de la cantidad de células bacterianas/ml se realizó por triplicado mediante una cuenta bacteriana en placa de AST. Con esto se seleccionó la dilución adecuada para la inoculación a las muestras de carne. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. Para determinar el límite de detección de los ensayos de PCR Múltiplex y el método microbiológico, se realizó la inoculación a los 25 g de carne, previamente descongelada a 4 °C y colocadas en bolsas de plástico estéril con malla (Whirl Pak[®]). Se utilizó 1 ml de las diluciones seriadas de la cepa para obtener concentraciones de 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹, 10⁰, 10⁻¹ UFC/g de muestra (10⁻¹ UFC/g equivale a 1 célula por cada 10 g de muestra). En cada experimento se incluyó una muestra de carne sin inocular como control negativo con cada serie de diluciones. Los experimentos se realizaron asépticamente tres veces con tres réplicas, lo que permitió obtener 9 repeticiones para cada concentración celular inoculada. Posterior a la inoculación de las muestras, se procedió a realizar el análisis microbiológico y los ensayos de PCR Múltiplex con DNA obtenido a partir de 3 ml de caldo de preenriquecimiento.

Se utilizaron dos tipos de enriquecimiento para cada muestra inoculada: El primero mediante la adición de 225 ml de CST (Difco) con 0.05 mg/l de cefixima (Denvar), 10 mg/l de cefsulodín (Sigma) y 8 mg/l de vancomicina (Sigma) (CST+ccv). Para el segundo enriquecimiento se prepararon 225 ml de Caldo Ec modificado (Ecm+n) (Difco) con 0.02 g/l de novobiocina (Difco). La muestra se homogenizó con el caldo en un homogenizador peristáltico (Labeasy, Technology[®] L.E.D., Inc.) por 1 min. Ambos cultivos se incubaron a 37°C por 18-24 h.

Para el aislamiento selectivo, se colectó 1 ml de cada cultivo de enriquecimiento, con el que se realizaron 3 diluciones seriadas en solución reguladora de fosfatos (pH 7±0.2). De cada dilución se tomó una alícuota de 0.1 ml que se depositó en la superficie de agar MacConkey sorbitol (Difco) suplementado con 0.05 mg/ml de cefixima (Denvar) y 2.5 mg/l de telurito de potasio (Sigma) (MCS+CT) y se sembró por estría en 4 cuadrantes. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se seleccionaron cinco colonias típicas de *E. coli* O157:H7 (colonias no fermentadoras de sorbitol; incoloras con centro oscuro) y se sembraron en agar Fluorocult[®] *E. coli* O157:H7 (Merck) por estría en 4 cuadrantes. Las placas se incubaron a 37°C y a las 24 h se revisaron para seleccionar las colonias sin fluorescencia (negativas en presentar la enzima β-glucoronidasa) y que no fermentaran el sorbitol (colonias verdes). Para esto se empleó una lámpara de luz UV (Mineralight[®] Lamp. Modelo UVGL-25, UVP, Upland CA, USA) con longitud de onda larga (365 nm). Las colonias seleccionadas en agar Fluorocult[®] *E. coli* O157:H7 se resembraron por estría en AST y se incubaron a 37°C por 24 h para su posterior identificación. Se confirmó mediante microscopía que los microorganismos aislados fueran Gram negativos. La identificación bioquímica y serotipificación se realizó con el sistema API 20E (bioMérieux Marcy l'Etoile France) y por aglutinación con antisueros O157 y H7 (Difco) respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

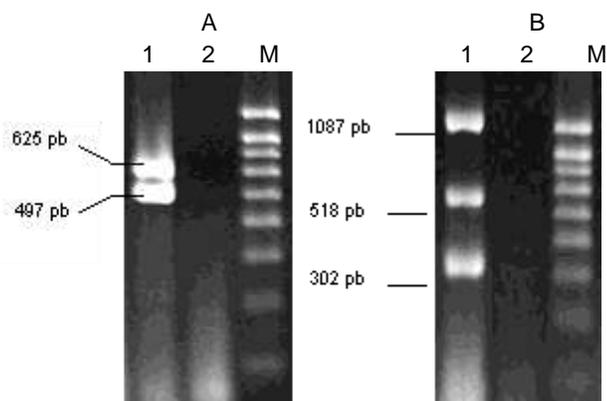
Para evaluar el PCR Múltiplex y el método microbiológico en la detección de *E. coli* O157:H7 con muestras de campo, se analizaron 40 muestras de carne de corte New York y Rib Eye de la zona metropolitana de Monterrey, N. L., México. Para el análisis microbiológico, las muestras se cultivaron en caldo Ecm+n y se incubaron por 18-24 h. Para el análisis mediante los PCRs múltiplex de serotipo y de los factores de patogenicidad se obtuvo el ADN por el método CTAB a partir de 3 ml de cultivo.

Los resultados de PCR Múltiplex y el método microbiológico en las muestras inoculadas se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney con el programa SPSS versión 10.0 (11). De manera simultánea se calculó el porcentaje de sensibilidad, especificidad, precisión relativa e índice kappa (12).

Resultados

En cepas de referencia, el PCR Múltiplex generó fragmentos de 497 y 625 pb en la secuencia del gen que codifica el antígeno somático O157 (*rfbE*) y el del antígeno flagelar H7 (*fliC*) (Fig.1 panel A). El PCR Múltiplex para factores de patogenicidad en *E. coli* O157:H7 generó los fragmentos de 1,087, 518 y 302 pb para los genes *eaeA*, verotoxinas 1 y 2, respectivamente (Figura 1 panel B).

Figura 1. Panel A. Amplificaciones correspondientes a secuencias de los genes *rfbE* (497 pb) y *fliC* (625 pb) en cepas de referencia Carriles 1 = ADN *E. coli* O157:H7, carril 2 = control negativo. M = marcador 100 pb Ladder. Panel B. Amplificaciones correspondientes a secuencias del gen *eaeA* (1087 pb) y los genes *stx1* y *stx2* (302 y 518 pb). Carriles 1 = ADN *E. coli* O157:H7; carril 2 = control negativo; M = 100 pb Ladder.



Mediante la prueba estadística U de Mann-Whitney ($z=-2.557$, $P < 0.05$) se encontró diferencia significativa entre PCR Múltiplex y el método microbiológico a la concentración celular de 10^0 UFC/ g de muestra. Sin embargo, a una concentración de 10^1 UFC/g se obtuvieron resultados satisfactorios en las 9 repeticiones realizadas por ambos métodos. No se obtuvieron resultados positivos cuando la bacteria se encontraba a una concentración de 10^{-1} UFC/ g por ninguno de los dos métodos. Los porcentajes de sensibilidad, especificidad y precisión relativa, así como el índice kappa obtenidos por cada método se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de sensibilidad, especificidad, precisión relativa e índice Kappa obtenidos

Enriquecimiento	Método	Sensibilidad relativa (%)	Especificidad relativa (%)	Precisión relativa (%)	Índice kappa
CST+ccv	Microbiológico	77	100	78	0.241
	PCR Múltiplex	85	100	86	0.352
Ecm+n	Microbiológico	85	100	86	0.352
	PCR Múltiplex	100	100	100	1.0

CST+ccv = caldo soya tripticasa + cefixima, cefsulodín, y vancomicina

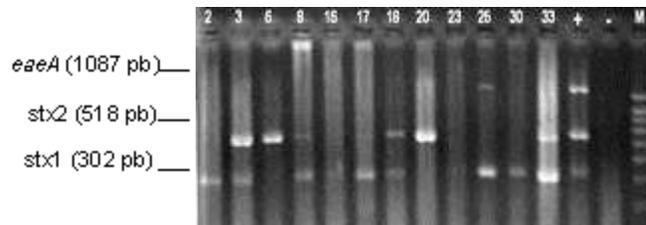
Ecm+n = caldo Ec modificado + novobiocina

En los ensayos de PCR Múltiplex, el caldo Ecm+n mostró tener 100% de sensibilidad y precisión relativa, así como una completa concordancia (1.0), en comparación al CST+ccv donde se obtuvieron 85 y 86% de sensibilidad y precisión relativa, además de una débil concordancia (0.35). Con respecto al método microbiológico, con el caldo Ecm+n, se obtuvo un 85 y 86% de sensibilidad y precisión relativa, mientras que con el caldo CST+ccv fue de 77 y 78 %, respectivamente. Sin embargo, ambos caldos presentaron débil concordancia entre sí (0.35 y 0.24, respectivamente), por lo que se seleccionó el caldo Ecm+n como medio de enriquecimiento para el análisis de las muestras de campo.

En las 40 muestras de campo analizadas, *E. coli* O157:H7 no fue aislada por el método microbiológico. Por PCR Múltiplex se detectó solo en 2 (5%). Una de las cepas encontradas no fue verotoxigénica y no se logró amplificar

el gen *eaeA*, mientras que en la segunda solo se logró amplificar el gen *stx2* (2.5%). Por medio del PCR múltiplex para serotipo también se detectaron 10 muestras positivas que solo albergaron el gen *fliC* (25%), además el ensayo permitió la detección de 10 cepas verotoxigénicas pertenecientes a otros serotipos, de los cuales 5 de ellas presentaron solo el gen *stx1* (12.5 %), 2 el gen *stx2* (2.5%), 4 ambos genes (10%), y solo una (2.5%) el gen *eaeA*(Figura 2).

Figura 2. Muestras de carne comercial analizadas mediante el ensayo para factores de patogenicidad de PCR Múltiplex. Carriles 2, 16, 17, 25 y 30 = muestras positivas para el gen *stx1*; carriles 6 y 20 = muestras positivas para el gen *stx2*; carriles: 3, 8, 18 y 33 = muestras positivas para ambos genes; carril 25 = muestra positiva para el gen *eaeA*; carril 23 = muestra negativa. (+) = control positivo; (-) = control negativo; M = marcador 100 pb Ladder.



Discusión

Se estandarizaron las pruebas de PCR múltiplex y se comprobó que los genes blanco fueron amplificados satisfactoriamente, posteriormente se inocularon muestras de carne con diferentes concentraciones de la bacteria para determinar el límite de detección de los ensayos de PCR múltiplex y el método microbiológico, con dos medios de enriquecimiento: CST+ccv y caldo Ecm+n. Con el medio de enriquecimiento CST+ccv, el límite de detección fue de 1 UFC/g por medio del ensayo de serotipos (85 y 86% de sensibilidad y precisión relativa, respectivamente), en cambio, por el ensayo de factores de patogenicidad se obtuvieron resultados satisfactorios en todas las repeticiones realizadas cuando la bacteria se encontraba a una concentración de 10 UFC/g, lo mismo se presentó por el método microbiológico (77 y 78% de sensibilidad y precisión relativa, respectivamente). Estos resultados indicaron una débil concordancia del PCR múltiplex para serotipo (0.369) y el método microbiológico (0.241) con este medio de enriquecimiento. Se esperaba que las muestras inoculadas con la concentración celular más baja (10^{-1} UFC/g) no produjeran los fragmentos de PCR esperados, ni fueran detectadas por el método microbiológico. Sin embargo, con el caldo Ecm+n se pudo detectar a la bacteria a esta concentración celular mediante el ensayo de PCR múltiplex para serotipo (100% de sensibilidad y precisión relativa, así como una completa concordancia), mientras que por medio del ensayo de PCR múltiplex para factores de patogenicidad, así como por el método microbiológico (85 y 86% de sensibilidad y precisión relativa, respectivamente) y una débil concordancia de 0.369 se obtuvieron resultados satisfactorios a la concentración de 10 UFC/g..

En las 40 muestras de carne procedentes de diversos supermercados de la zona metropolitana de Monterrey, N. L., México, *E. coli* O157:H7 se detectó en dos muestras (5%); una resultó positiva para el gen *stx2* y la otra resultó negativa para los genes de patogenicidad detectados por PCR múltiplex. Por otro lado, no se logró el aislamiento de la bacteria mediante el método microbiológico. El haber encontrado una muestra positiva para el gen *stx2* es epidemiológicamente importante, ya que la toxina VT1 juega un papel crítico para el desarrollo de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (13). Se han reportado los hallazgos de cepas de *E. coli* O157:H7, negativas en contener estos genes, aisladas de productos alimenticios (14, 15), muestras ambientales (16), aislados de pacientes con SUH (17) y en cepas de colección (18, 19). Esto se debe a que existe una inestabilidad genética exhibida por estas cepas debido a la pérdida de bacteriófagos (20).

De acuerdo al número de muestras y resultados obtenidos, se determinó que la incidencia de *E. coli* O157:H7 es baja (5%), sin embargo, es importante mencionar que las muestras también contenían otros serotipos verotoxigénicos (25%), por lo que se requieren estrategias de intervención enfocadas en la prevención de contaminación por estas bacterias patógenas en las operaciones de desollado y evisceración durante el sacrificio, ya que en estos procesos ocurre la primera ruta por la cual la bacteria se incorpora a la carne. Aunque se trata de carne cruda que se consume cocida, la posibilidad de una contaminación cruzada del alimento preparado puede ocurrir, así como que el cocimiento no alcance la temperatura suficiente para destruir al patógeno, por lo que es necesario evitar riesgos para la salud de los consumidores.

Los ensayos de PCR múltiplex fueron satisfactorios cuando se utilizó un paso de enriquecimiento. Se intentó detectar al patógeno a las 0 h de incubación en las muestras de carne inoculadas artificialmente, pero no se observó la amplificación de los genes de interés en ninguna repetición (datos no mostrados), por lo que es necesario utilizar un paso de enriquecimiento para poder detectar al organismo a bajos niveles y así fortalecer la sensibilidad de detección del PCR. Se han realizado intentos en aplicar la PCR a partir del extracto directo del alimento, pero han mostrado menor sensibilidad que los ensayos de PCR a partir de cultivos de enriquecimiento (21). Por lo que es importante señalar que estos ensayos son altamente aplicables acompañados con protocolos de enriquecimiento (caldo Ecm+n en éste caso), ya que por medio de este paso se diluyen los inhibidores presentes en la muestra y a la vez el crecimiento bacteriano incrementa el número de copias de la secuencia blanco (22).

Los ensayos de PCR múltiplex descritos pueden realizarse en menor tiempo que el método microbiológico de rutina para la detección de *E. coli* O157:H7, ya que el primero puede realizarse en aproximadamente 36 h, y se reduce el tiempo de emisión de resultados; y por medio del segundo se pueden tomar más de 48 h y aún así requiere de la realización de pruebas bioquímicas y serológicas para la confirmación de la presencia de la bacteria. La PCR múltiplex es un método altamente sensible y específico, no discrimina entre cepas con características fenotípicas atípicas y puede detectar los antígenos somático y flagelar sin las dificultades observadas con las pruebas serológicas convencionales y a la vez permite la detección de los genes que codifican los factores de patogenicidad más importantes presentes en *E. coli* O157:H7 que la hacen una herramienta de diagnóstico de utilidad para la identificación de esta bacteria.

Conclusiones

Se estandarizó la técnica de PCR múltiplex para la detección de *E. coli* O157:H7 y los factores de patogenicidad más importantes en esta bacteria en muestras de carne de res inoculadas artificialmente. Existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos por medio del PCR múltiplex y el método microbiológico. La sensibilidad y precisión relativa, así como la concordancia obtenidas en el PCR Múltiplex fueron superiores a las obtenidas mediante el método microbiológico en las muestras de carne inoculadas artificialmente. El caldo Ecm+n mostró tener un límite de detección superior ($\leq 10^{-1}$ UFC/g) con respecto al CST+ccv (≤ 10 UFC/g) en las muestras de carne inoculadas artificialmente. En 40 muestras de campo analizadas, la PCR múltiplex con dos positivas superó al método microbiológico en donde todas fueron negativas. En general la incidencia de *E. coli* O157:H7 fue baja (5%) en las muestras de carne comercial analizadas.

Resumen

Para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne fresca de res, se comparó el método microbiológico tradicional y dos ensayos de PCR Múltiplex. En ensayos con muestras inoculadas se obtuvo una diferencia significativa entre PCR Múltiplex y aislamiento microbiológico. PCR Múltiplex mostró porcentaje mayor de sensibilidad, precisión relativa e índice kappa en el enriquecimiento con el caldo Ecm+n en comparación al CST+ccv. En 40 muestras de res corte tipo americano se detectaron 2 positivas (5%) por PCR múltiplex, mientras que por el método microbiológico no se logró su aislamiento en ninguna muestra.

Palabras clave: PCR Múltiplex, E. coli O157:H7, Carne

Abstract

In the present study were compared the traditional microbiological method and two tests of multiplex PCR for the detection of *E. coli* O157:H7 in fresh beef meat. A significant difference was obtained between PCR multiplex and microbiological isolation in inoculated samples; in addition, in multiplex PCR was obtained a higher percentage of sensitivity, precision relative and Kappa index using the Ecm+n broth in comparison to the CST+ccv in the enrichment. In 40 samples of meat cuts American type were detected two positive samples (5%) by Multiplex PCR, whereas by the microbiological method was not obtained the isolation in any sample.

Key words: PCR multiplex, E. coli O157:H7, Beef

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Fundación Produce Nuevo León, A. C. por el apoyo recibido para la realización de esta investigación a través del proyecto No. 118 y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias a través del proyecto PRECI No. 2907.

Referencias

1. Blanco, M., J. E. Blanco, J. Blanco, E. A. González and M. P. Alonso. 1996. Prevalence and characteristics of human and bovine verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated in Galicia (north-western Spain). *Eur. J. Epidemiol.*; 12:13-19.
2. Arias-Echandi, M.L. 1996. *Escherichia coli* O157:H7. Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica.
3. USDA-FSIS, 1996. Revision 4 of Laboratory Communication 38 Protocol for Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7. Amelia K. Sharar and Bonnie E. Rose.
4. Witham P.K., C. T. Yamashiro, K. J. Livak and C. A. Batt. 1996. A PCR-based assay for the detection of *Escherichia coli* shiga-like toxin genes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1347-1353.
5. Venkateswaran, K., Y. Kamijoh, E. Ohashi and H. Nakanishi. 1997. A simple filtration technique to detect Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its toxins in beef by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4127-4131.
6. Blanco, M., *et. al., Op.cit.*
7. Gannon, V. P. J., M. Rashed., R. K. King., and E. J. Golsteyn 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. of Clin. Microbiol.* 31: 1268-1274.
8. Desmarchelier, P. M., S. S. Bilge., N. Fegan., L. Mills., J. C. Vary. Jr., and P. I. Tarr. 1998. A PCR specific for *Escherichia coli* O157:H7 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolisaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 36: 1801-1804.
9. Gannon, V. P. J., S. D'souza., T. Graham., R. K. King., K. Rahn., and S. Read. 1997. Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 35: 656-662.
10. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
11. Ferrán-Aranaz, M. 1996. SPSS para Windows. Programación y Análisis Estadístico. Serie McGraw-Hill de Informática. McGraw-Hill / Interamericana de España, S. A. ISBN: 84-481-0589-3.. pp: 580.
12. Malorny, B., J. Hoorfar, C. Bunge and R. Helmuth. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1):290-296.
13. Wang, G., C. G. Clark and F. G. Rodgers. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O15:H7 serotype and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:3613-19.
14. Cebula, T. A., W. L. Payne and P. Feng. 1995. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:248-250.
15. Weagant, S. D. and K. G. Jinneman. 1995. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *J. Food Prot.* 58:7-12.

16. Campbell, G.R., J. Prosser, A. Glover and K. Killham. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. J. Appl. Microbiol. 91:1004-1010.
17. Kehl, S. C. 2002. Minireview: Role of the laboratory in the diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. J. Clin. Microbiol. 40(8): 2711-2715.
18. Fratamico P. M., S. K. Sackitey, M. Wiedmann and M. Yi Deng. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33:2188-2191.
19. Jothikumar, N. and M. W. Griffiths. 2002. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. Appl. Environ. Microbiol. 68(6):3169-3171.
20. Ramotar, K., B. Waldhart, D. Church, R. Szumski and T. J. Louie. 1995. Direct detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in stool samples by PCR. J. Clin. Microbiol. 33(3):519-524.
21. Willshaw, G. A., H. R. Smith, D. Roberts, J. Thiriwell, T. Cheasty and B. Rowe. 1993. Examination of raw beef products for the presence of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli*, particularly those of serogroup O157. J. Appl. Bacteriol. 75:420-426.
22. Paton, A. W. and J. Paton. 1999. Direct detection of shiga toxigenic *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O111, O157 and O113 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 37(10):3362-3365.