

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



FRECUENCIA DE *E. coli* O157:H7 y no-O157 Y GENES DE VIRULENCIA (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hly₉₃₃*) EN CANALES DE BOVINO CON LAS CONDICIONES SANITARIAS QUE OPERAN DURANTE SU OBTENCIÓN.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA :

M en C. Juan José Varela Hernández

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Agustín Ramírez Álvarez -Director

Dra. Rocío Flores Bello

Dra. Angélica Luis Juan Morales

Dr. Ricardo Alaniz de la O.

Dr. Efraín Pérez Torres

ASESORES.

Dra. Ma. Refugio Torres Vitela

Dr. Héctor Rangel Villalobos

Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jal., Julio del 2005



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS PECUARIAS
SEDE UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por este conducto nos permitimos enviar la **VERSIÓN FINAL DE LA TESIS** que desarrolló el pasante de Doctorado en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, **M. en C. Juan José Varela Hernández**, cuyo título es:

FRECUENCIA DE *E. coli* O157:H7 y no-O157 Y GENES DE VIRULENCIA (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hly₉₃₃*) EN CANALES DE BOVINO CON LAS CONDICIONES SANITARIAS QUE OPERAN DURANTE SU OBTENCIÓN.


Trabajo dirigido por: **Dr. Agustín Ramírez Álvarez**

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

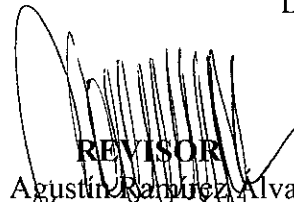
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 15 Junio del 2005


REVISOR
Dra. Rocío Flores Bello


REVISOR
Dra. Angélica Luis Juan Morales


REVISOR
Dr. Efraín Pérez Torres


REVISOR
Dr. Ricardo Alaniz de la O


REVISOR
Dr. Agustín Ramírez Álvarez

c.c.p. Archivo

Km. 15.5 Carretera Guadalajara – Nogales
Predio “Las Agujas”, Nextipac, C.P. 45100 AP 39-82
Tels (91-3) 682-00-77 682-0248 682-0374 Fax. 6820120
Zapopan, Jalisco, México

AGRADECIMIENTOS

A dios por dejarme vivir hasta estos días y permitirme disfrutar de mi familia.

Al Dr. Agustín Ramírez Álvarez quien fue mi director de tesis, gracias por la confianza que me proporcionó desde el inicio de este trabajo y por su experiencia.

Al comité tutorial: Dra. Rocío Flores Bello, Dra. Angélica Luis Juan Morales, Dr. Ricardo Alaniz de la O y Dr. Efraín Pérez Torres. Gracias a las aportaciones hechas a lo largo de los seis seminarios y al manuscrito final, fueron muy enriquecedores y valiosos.

A los Asesores: Dra. Ma. Refugio Torres Vitela, sus aportaciones siempre serán apreciadas, gracias por su gran apoyo. Y al Dr. Héctor Rangel Villalobos, al laboratorio de Biología Molecular siempre lo he considerado mi segundo espacio, gracias por compartir sus conocimientos y experiencias a este trabajo.

Dr. Alejandro Castillo Ayala. Gracias por las revisiones al artículo y por sus aportaciones.

M en C. Elisa Cabrera Díaz. Un incondicional apoyo desde el principio hasta el final, gracias por todo Ely.

A Esteban Pineda Pérez, Gracias.

QFB. Marco Antonio Cardona, QFB. Joel Hinojosa Dávalos, QFB. César Antonio Martínez Castillo. QFB. Juana del Rocio Rojas González y QFB. Nubia Maleny Bouler. Gracias por contar con ustedes cuando más necesité de su apoyo.

Al maestro Luis Antonio Páez. Gracias por sus enseñanzas en técnicas moleculares.

DEDICATORIAS

A mis hijos: Emiliano Varela Pineda y Juan Valente Varela Pineda. Son la razón de mi existencia.

A mi esposa: Rosa Pineda Pérez. Mi gran amor

A mis padres: Rosa Hernández Casillas y David Varela Amaya. Ejemplos de vida y trabajo, para ellos siempre todo mi amor y cariño.

A mis Hermanos: Luis David, Norma Leticia y Lidia Margarita.

A mis sobrinos: Andrea, César, David, Daniel, Joel, Braulio, Juan Manuel, Victoria, Ángel Arturo (Carmelo), Mariana y Rosa Urania.

A mis tíos: especialmente al Arq. Antonio Varela Amaya.

A mis suegros: Dr. Esteban Pineda López y Ludivina Pérez Rueda. Ejemplo de cómo sacrificar toda una vida por los hijos.

A mis compañeros de trabajo. M. en C. Óscar Ríos, Dr. Moscoso, M. en C. Luz María Ibarra, Dr. Pablo Pineda, M. en C. Daniel Rojas etc.

EN MEMORIA DE:

Mi abuelo: José Varela Landeros (2003 †). Siempre ejemplo de honestidad, honradez y rectitud, gracias por compartir su amor durante toda mi infancia y juventud, siempre seguiré sus pasos.

Mi Abuela: Rosa Amaya Vázquez (2004 †). Dificilmente olvidaré a quien me quería tanto y a quien yo quise más. Siempre vivirá en mí, hasta mis últimos días.

A todos mis parientes que no nombré y que partieron a vivir la vida eterna, han dejado una huella profunda en mi vida.

ÍNDICE

	PÁGINA
ABREVIATURAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
<i>1.1 Estadística e Impacto económico de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)</i>	2
<i>1.2 Participación de la carnes rojas en las ETAs</i>	6
<i>1.3 Escherichia coli</i>	7
<i>1.3.1 Escherichia coli enterohemorrágica</i>	8
<i>1.3.2 Características de las citotoxinas (stx)</i>	10
<i>1.3.3 Epidemiología</i>	10
<i>1.3.4 Reservorio y mecanismos de contaminación.</i>	11
<i>1.3.5 Alimentos implicados</i>	14
<i>1.3.6 Dosis infectante</i>	14
<i>1.3.7 Sobrevivencia.</i>	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
6. METODOLOGÍA	22
7. RESULTADOS	34
7.1 ETAPA I (Inspección Sanitaria)	34
7.2 ETAPA II (Postevisceración)	38
7.3 ETAPA III (Postproceso)	40
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	55
10. BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXO I	70
ANEXO II	80

ABREVIATURAS

BMA: Bacterias Mesófilas Aeróbias.
CT: Coliformes Totales.
CF: Coliformes Fecales.
CST: Caldo Soya Trypticaseina
CSTcv: Caldo Soya Trypticaseina con cefixima y vancomicina.
Caldo E.C: Caldo *Escherichia. coli*
dNTP: Deoxinucleosido trifosfato
ECEA: *Escherichia coli* enteroadherente.
ECEG: *Escherichia coli* enteroagregativa.
ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica
ECEI: *Escherichia coli* enteroinvasiva.
ECEP: *Escherichia coli* enteropatógena.
ECET: *Escherichia coli* enterotoxigénica.
ETAs: Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FDA: Food and Drug Administration
Gb₃: Globotriacilceramida
HUS: Hemolytic uremic syndrome
ICMSF: Comisión Internacional de especificaciones Microbiológicas en Alimentos
IMS: Separación inmunomagnética
LEE: Locus de anclaje al enterocito
LSD: Diferencia mínima significativa
MUG: Ácido 4-metilumbeliferil- β -D-glucorónido
NM: No móvil
ng: Nanogramos
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pb: Pares de bases
SMAC: Agar MacConkey sorbitol
SMAcct: Agar MacConkey sorbitol con cefixima y telurito de potasio
SSA: Secretaría de Salud.
STEC: *Escherichia coli* productora de toxina tipo shiga
Stx: Toxina tipo shiga.
ufc: Unidades formadoras de colonias.
USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica.
VT: Verocitotoxina.
VTEC: *Escherichia coli* productora de Verocitotoxina.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	PÁGINA
1. Casos de enfermedades infecciosas intestinales ^a en México y el estado de Jalisco del 2000 al 2004.	3
2. Principales agentes infecciosos transmitidos por alimentos durante 1997, rango estimado por el número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos	5
3. Límites de crecimientos para <i>E. coli</i> patógena.	15
4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR	31
5. Condiciones óptimas para llevar a cabo la PCR.	32
6. Media, desviación estándar, mínimo y máximo de la temperatura en cámaras de refrigeración del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.	35
7. Análisis de mínimos cuadrados (LSD) para temperatura de cámaras de refrigeración según día de la semana.	35
8. Media, desviación estándar, mínimo y máximo de la temperatura en canales de bovino después de la refrigeración.	36
9. Análisis de mínimos cuadrados (LSD) para la temperatura en canales de bovino según día de la semana.	36
10. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm ²) de microorganismos indicadores provenientes de mantas del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.	37
11. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm ²) de microorganismos indicadores en 10 muestras de superficie de la articulación del tarso en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.	38
12. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm ²) de microorganismos indicadores en 10 muestras de superficie de la articulación del carpo en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.	39
13. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm ²) de microorganismos indicadores en 10 muestras de superficie de la zona del eviscerado en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.	39
14. Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> O157 y no-O157 en canales de bovino.	40
15. Prevalencia de <i>E. coli</i> O157 y no-O157 STEC.	41
16. Recuperación de <i>E. coli</i> O157 según técnica y medio de cultivo.	42
17. Sensibilidad de la técnica para el aislamiento <i>E. coli</i> O157 y no-O157 en canales de bovino.	42
18. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm ²) de microorganismos indicadores en 258 muestras de canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.	43
19. Análisis de correlación entre los diferentes microorganismos indicadores y <i>E. coli</i> O157	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		PÁGINA
1.	Diagrama de Venn. Relación filogenética ente <i>E. coli</i> productora de toxina tipo shiga (STEC), <i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP), <i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH) y <i>Shigella dysenteriae</i> .	9
2.	Diagrama de las principales rutas de transmisión de EHEC.	13
3.	Recuento de bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino.	23
4.	Recuento de organismos coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> .	24
5.	Técnica de Inmuncaptura para la recuperación de <i>E. coli</i> O157.	25
6.	Ubicación del área de muestreo en la canal (FSIS., 1996).	27
7.	Recuento de BMA, CT, CF y <i>E. coli</i> (genérica) y <i>E. coli</i> O157.	28
8.	Extracción de ADN de cepas sospechosas a STEC	30
9.	Desarrollo de la PCR Múltiple para amplificar los genes <i>stx</i> ₁ , <i>stx</i> ₂ , <i>eaeA</i> y <i>hly</i> ₉₃₃ .	31
10.	Gel de agarosa al 1% donde se observa la PCR estandarizada usando <i>E. coli</i> enterohemorrágica ATCC 46597 y 43895 y <i>E. coli</i> enteropatógena ATCC 25922	33
11.	Bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.	44
12.	Coliformes totales en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.	44
13.	Coliformes fecales en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.	45
14.	<i>E. coli</i> genérica en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.	45

RESUMEN

Se llevó a cabo la presente investigación con la finalidad de conocer la frecuencia de *E. coli* productora de toxina tipo shiga (STEC) O157:H7 y no-O157, así como los genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly933* en canales de bovino procedentes del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco y la relación con las prácticas de manufactura tomándose como indicadores para este propósito el recuento de: coliformes fecales (CF), coliformes totales (CT), bacterias mesófilas aerobias (BMA) y *E. coli* genérica. Se colectaron 30 muestras postvisceración en tres zonas de la canal y 258 postproceso con una esponja estéril de acuerdo al protocolo de la FSIS, 1996. Para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 se utilizó con fines comparativos la técnica de la FDA e Inmunocaptura (AOAC). Para la determinación de BMA, CT, CF y *E. coli* genérica se emplearon las técnicas descritas por Vanderzant 1992. De las 30 muestras analizadas postvisceración los resultados demuestran recuentos elevados de bacterias indicadores y la presencia de *E. coli* O157:H7 en 2/10 muestras de la zona del eviscerado. En las 258 muestras postproceso analizadas se obtuvo una positividad de 20 canales contaminadas de las cuales 7 fueron positivas a *E. coli* O157:H7 (2.37%) y una presentó el gen *stx2*, *eaeA* y *hly933* y 13 (5.03%) *E. coli* O157:NM sin presentar citotoxinas y factores de virulencia. En una canal (0.4%) se aisló *E. coli* no-O157 con el gen *stx1* y en otra canal (0.4%) encontramos *E. coli* O157:H7 con los genes *eaeA* y *hly933*. El 60% de las cepas se aisló por la técnica de Inmunocaptura y el 40% por la técnica de la FDA, los mayores recuentos de bacterias indicadoras postproceso fueron BMA 2.7×10^9 ufc/cm², CT 1.5×10^6 ufc/cm², CF 1.3×10^6 ufc/cm² y *E. coli* genérica 8.3×10^5 ufc/cm². El 87.5% de las 258 muestras tomadas de las canales resultaron positivas a *E. coli* genérica. En las prácticas de manufactura se observó que hay deficiencias importantes durante todo el proceso de obtención de la canal, tanto en el lavado de las mantas como en la refrigeración de la canal. No existen programas de capacitación sobre las buenas prácticas de manufactura y esto repercute en la calidad sanitaria de las canales. Con base a los resultados obtenidos podemos concluir que: 1) Este es el primer reporte en México sobre la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC en canales de bovino. 2) La mayor prevalencia se presentó en la época calurosa 3) No existe una correlación entre microorganismos indicadores y la presencia de *E. coli* O157:H7 (P<.05). 4) El aislamiento de *E. coli* O157:H7 en la zona del eviscerado explica en parte la presencia de este patógeno en la canal y éste se debe a malas prácticas de manufactura durante el proceso de obtención. 5) La presencia de *E. coli* O157:H7, no-O157 STEC y los recuentos elevados de microorganismos indicadores enfatizan la importancia de implementar el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control, así como la necesidad de evaluar, validar e implementar tratamientos descontaminantes para reducir la presencia de patógenos potenciales que impliquen un peligro a la salud pública.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estadística e impacto económico de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

La incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos se ha incrementado en los últimos años en todos los países del mundo, las estadísticas indican que no menos del 5 al 10% de la población es afectada anualmente. Patógenos emergentes como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y la resistencia a antibióticos por *Salmonella typhimurium* representan una nueva amenaza a la salud pública (Chaldek, 1982; OPS, 1983; Nabbet, 1988; Bean y Griffin, 1990; Christopher *et al.*, 1995; OMS, 1997, 1998).

Las ETAs constituyen un capítulo importante en la morbilidad de la mayor parte de América Latina y El Caribe. En 1991 las defunciones estimadas a causa de diarrea fueron de 170,800, de éstas 96,000 fueron por diarrea acuosa aguda; 43,000 por diarrea persistente y 27,500 por disentería (Christopher *et al.*, 1995; SSA, 1992; OMS, 1982; Zottola y Lorraine, 1990). En el período comprendido entre 1995-1999 en América Latina se presentaron 4,234 brotes con 142,639 afectados y 240 muertes, de los cuales el agente causal del 55.04% correspondió a brotes de origen bacteriano (Morán, 2000). La OMS reporta que los casos de enfermedades transmitidas por alimentos pueden ser de 300 a 350 veces más a los reportados actualmente y cree que cientos de millones de personas en todo el mundo sufren de enfermedades transmitidas por agua y alimentos.

En México en el período de 1980-1989 la dirección general de epidemiología reportó que ocurrieron 314 brotes con un total de 12,344 casos y 348 defunciones. De éstas, 277 fueron de origen microbiano o parasitario con 9,621 casos y 232 defunciones. El agente etiológico fue en primer lugar *S. aureus*, con 45% de los brotes; en segundo lugar *Salmonella* entérica con un 35%. Les siguieron en menor porcentaje *E. coli* y *S. typhi*. (Christopher, *et al.*, 1995; Parrilla y Vásquez, 1993). Estas cifras son poco creíbles ya que en

esa década la notificación que se presentaba en el país era obsoleta, esto nos proporciona una idea de la confiabilidad de los datos revelados por la Secretaría de Salud donde la participación de las ETAs debiera estar muy por encima de las cifras presentadas. Sin embargo, la notificación de ETAs mejoró notablemente en 1994. Se notificaron 2'676,056 casos de los cuales 281,342 corresponden al estado de Jalisco siendo la mayor prevalencia en los meses cálidos. Es lamentable que en las décadas pasadas no se tengan registros confiables, sin embargo, en la década de los noventa con la aparición del cólera se mejoró la notificación y en los últimos cuatro años se cuentan con datos más “confiables” (Cuadro 1).

Cuadro 1. Casos de enfermedades infecciosas intestinales^a en México y el estado de Jalisco del 2000 al 2004.

		Año ^b				
		2000	2001	2002	2003	2004
México		6'717',159	6'209',392	6'756,986	6'059,356	5'467,208
Estado de Jalisco		374,923	296,750	392,406	286,904	335,285

^a Los boletines epidemiológicos no especifican el origen de las infecciones intestinales.

^b Notificación hasta la semana 52

Contrario a los reportes de las ETAs en México, en los Estados Unidos de Norteamérica se cuenta con un buen sistema de notificación, se calcula que ocurren entre 24 y 81 millones de casos de ETAs. A pesar de que muchas infecciones transmitidas por alimentos han sido controladas, la cantidad de ETAs no deja de ser importante. Se tuvo recientemente una estimación anual de 76 millones de casos de enfermedades con 323,000 hospitalizaciones y 5,000 muertes en Estados Unidos (Mead, 1999), lo que indica que 1 de cada 4 norteamericanos presenta una infección transmitida por alimentos al año y más de 1 por cada 1000 es hospitalizado (Tauxe, 2002). En los países desarrollados se reconoce que la incidencia verdadera es mayor a la reportada y en países como el nuestro, con infraestructuras menores, puede reconocerse un menor control de las estadísticas epidemiológicas que en los países desarrollados, además no se cuenta con una estimación de los costos, ya que no se hacen los suficientes estudios epidemiológicos para conocer el agente causal de un brote y

la información sobre la incidencia de estos patógenos en alimentos es insuficiente. Según el Boletín Semanal de Epidemiología del Sistema Nacional de Salud, las diarreas en México ocupan el segundo lugar como causa de enfermedad (Anónimo, 1991).

En Estados Unidos de Norteamérica se calcula que el costo anual de las ETAs es de aproximadamente entre 5 y 17 billones de dólares por diferentes causas entre las que son importante resaltar: gastos por servicios médicos, medicamentos, pérdida de productividad y discapacidades. (Vanderzant, 1992; Tauxe, 1992). Cinco patógenos son los responsables de generar en gran parte estos costos, alrededor de 5,161 a 6,075 millones de dólares anuales, de los cuales *T. gondii* representa 2,628; *Salmonella* de 1,188 a 1,588; *Campylobacter* 907 a 1,016; *E. coli* O157:H7 229 a 610 y *Listeria monocytogenes* 209 a 230 millones de dólares (Weiss *et al.*, 1993).

El costo de las ETAs también repercute de forma directa en la economía de los países donde el turismo es parte de su principal fuente de divisas, sobre todo en los países del tercer mundo donde suelen ser motivo de preocupación. Según la OMS, aproximadamente 500 millones de personas al año viajan como turistas y más de la mitad experimentan diarrea. Entre 20 y 50% de estos casos son causados por agentes infecciosos. Muchos países, incluyendo el nuestro, han sido objeto de serios reclamos por la situación antes señalada. En algunas ocasiones incluso, han tenido que cubrirse fuertes indemnizaciones al país reclamante (Nakamura, 1991). La asociación de consumidores británicos en su revista Holiday Which enlista a 51 países con una pobre y mala reputación en la higiene de los alimentos estando México entre esos países reportando que el 58% de los turistas que llegan a nuestro país sufren de enfermedades estomacales (Tanya *et al.*, 2000), esto obviamente trasciende de forma negativa en la imagen de nuestro país como destino turístico.

En los últimos treinta años han aparecido una serie de patógenos emergentes transmitidos por alimentos, esto se debe principalmente a que se presentan mutaciones y también a la generación de nuevos nichos dentro de la cadena de alimentos (Cuadro 2), el resultado de la frecuencia de ETAs refleja un balance entre la ecología que soporta las poblaciones microbianas que contaminan a los alimentos, así como los hábitos culturales y

limitaciones tecnológicas para prevenir la contaminación de los alimentos (Tauxe, 2002, Mead, 1999).

Cuadro 2. Principales agentes infecciosos transmitidos por alimentos durante 1997, rango estimado por el número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos (Mead, 1999). (Valores cercanos a 1000 son redondeados a 1000).

Patógeno	Casos
Virus tipo Norwalk *	9,200,000
<i>Campylobacter</i> *	1,963,000
<i>Salmonella</i> (no typhi)	1,342,000
<i>Clostridium perfringens</i>	249,000
<i>Giardia lamblia</i>	200,000
<i>Staphylococcus</i> (intoxicación)	185,000
<i>Toxoplasma gondii</i>	112,000
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 y otras STEC *	92,000
<i>Shigella</i>	90,000
<i>Yersinia enterocolitica</i> *	87,000
<i>E. coli</i> enterotoxigénica*	56,000
<i>Streptococos</i>	51,000
Astrovirus*	39,000
Rotavirus*	39,000
<i>Cryptosporidium parvum</i> *	30,000
<i>Bacillus cereus</i>	27,000
Otra <i>Escherichia coli</i>	23,000
<i>Cyclospora cayetanensis</i> *	14,000
<i>Vibrio</i> (no <i>cholerae</i>)*	5000
Hepatitis A	4000
<i>Listeria monocytogenes</i> *	2000
<i>Brucella</i>	777
<i>Salmonella typhi</i>	659
Botulismo	56
<i>Trichinella</i>	52
<i>Vibrio cholerae</i> , toxigenica*	49
<i>Vibrio vulnificus</i> *	47
Priones*	0

*Patógenos emergentes en los últimos 30 años.

Estos trece patógenos emergentes enlistados arriba, sin tomar en cuenta los priones ya que no se tiene ningún caso notificado en ese periodo (1997), representan el 82% de los

13.8 millones de casos estimados y el 61% de las 1,800 defunciones atribuidas a todos los patógenos conocidos transmitidos por alimentos en los Estados Unidos.

1.2 Participación de la carnes rojas en las ETAs

El consumo de carnes crudas, conservadas y manufacturadas se ha intensificado en el mundo. Los estudios epidemiológicos de los brotes de ETAs en todos los países muestran una asociación entre la ingestión de carne y sus derivados con agentes patógenos como *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *C. jejuni*, *A. hydrophila*, *C. botulinum* y *B. cereus*. (Fernández-Escartín, 2000). La participación de las carnes rojas y de aves en las ETAs en América Latina en el período de 1995-1999 fue de 12.5% y 5% respectivamente (Morán, 2000). Entre 1985-1989 en Albania representaba el 72%, Bélgica 53%, Inglaterra 62%, Francia 29%, Dinamarca 32%, Escocia 72%, Israel 25% y Yugoslavia 64% (OMS, 1992).

La carne de diferentes especies animales es el vehículo principal de los microorganismos que causan brotes de enfermedades, infecciones e intoxicaciones microbianas asociadas al consumo de alimentos (Fernández Escartín *et al.*, 1983). En particular la carne de cerdo resulta especialmente riesgosa dada la frecuencia con la cual se pueden recuperar bacterias patógenas a partir del producto crudo. En nuestro país se han obtenido cifras de 87.5 % de incidencia de *Salmonella* en carne cruda de cerdo colectada en carnicerías (Fernández Escartín *et al.*, 1983) y de 90.4% en empacadoras de la ciudad de Guadalajara (Fernández Escartín y Hernández Mireles 1983).

En Estados Unidos un estudio realizado en 2100 canales de bovino durante octubre de 1992 a septiembre de 1993 reveló una frecuencia de 2.6%/2079 para *Clostridium perfringens*, 4.2%/2089 para *S. aureus*, 4.1%/2089 para *Listeria monocytogenes*, 4.0%/2064 para *Campylobacter jejuni/coli*, *E. coli* O157:H7 0.2%/2081, 96.4% contenían 100 coliformes por cm² y el 95.9% contenían 10 *E. coli* (Biotipo I) por cm², *Salmonella* 1.0%/2089. Estos rastros eran Tipo Inspección Federal. (USDA Nationwide Beef, 1994).

1.3 *Escherichia coli*

Este organismo, originalmente denominado *Bacterium coli* fue aislado por el Dr. Theodor Escherich en 1885 en heces de niños (Doyle, 1989). En 1920, al microorganismo le fue asignada la denominación nueva de *Escherichia* y a mediados de la década de los 40, el papel de *Escherichia coli* como enteropatógeno fue demostrada de modo válido y posteriormente los países desarrollados adoptaron medidas de control para reducir la incidencia de la enfermedad (ICMSF, 1996).

E. coli patógena intestinal se define como aquellas cepas de *E. coli* que son capaces de causar una enfermedad diarreica en el hombre y en los animales, es un parásito normal en el contenido intestinal del hombre y de animales superiores. Actualmente se reconocen seis grupos que dan lugar a diversos padecimientos. Entre estos existen diferencias clínicas y epidemiológicas, así como en la estructura antigénica y mecanismos de patogenicidad de los diferentes grupos.

Cepas patógenas de *E. coli*: (Fernández Escartín, 2000).

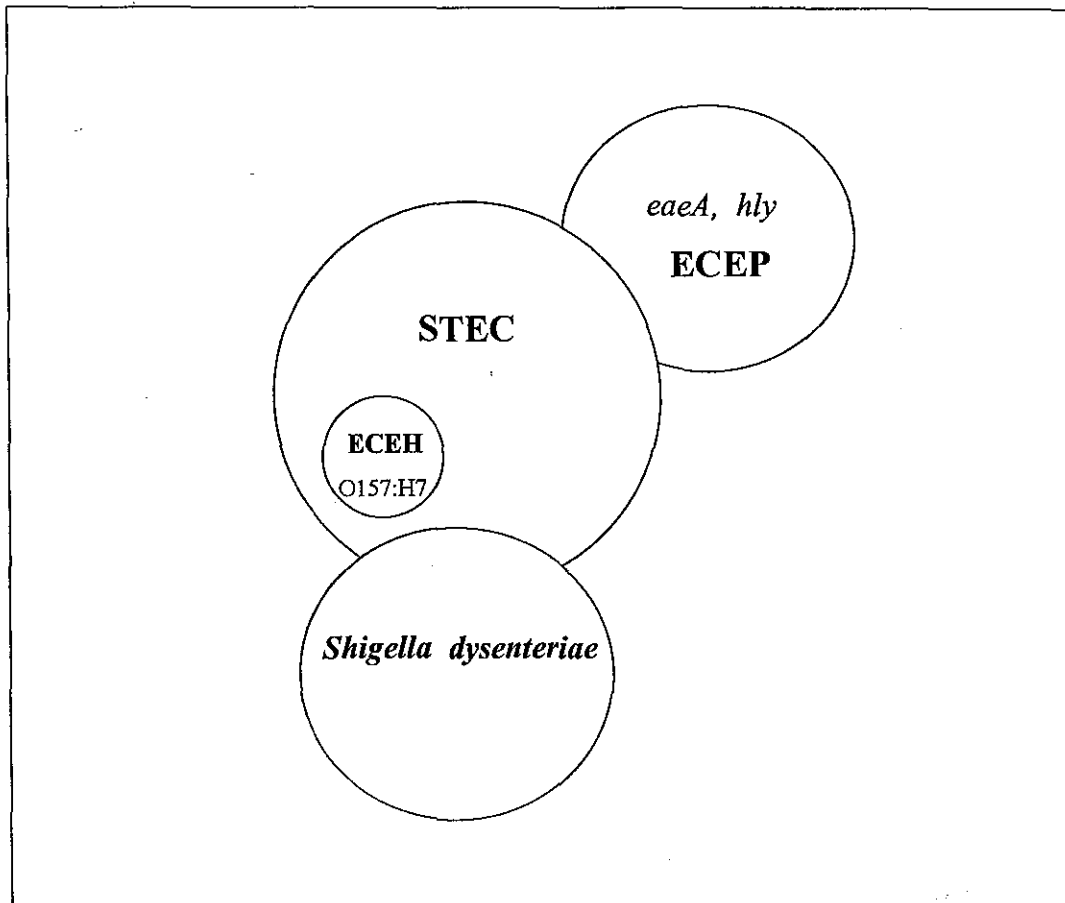
1. Enteropatógena (ECEP)
2. Enterotoxigénica (ECET)
3. Enteroinvasiva (ECEI)
4. Enterohemorrágica (ECEH)
5. Enteroadherente (ECEA)
6. Enteroagregativa (ECEG)

E. coli está clasificada como representante de la familia Enterobacteriaceae, como tales, los organismos son bacilos cortos gram negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos, anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunos son anaerogénicas (ICMSF, 1996).

La detección y recuento de cepas patógenas de *E. coli* enterohemorrágica en los alimentos es bastante difícil, debido a que no poseen las características típicas de *E. coli* esto es: son anaerógenas y no fermentan la lactosa o la fermentan tardíamente, otras son inhibidas por las sales biliares a temperaturas elevadas, son inhibidas o crecen mal a 44-45°C, la producción de Indol es variable, no producen β -glucuronidasa (MUG) y no fermentan el sorbitol en 24 horas (Doyle, 1984; 1989).

1.3.1 *Escherichia coli* enterohemorrágica

E. coli enterohemorrágica (ECEH) forma parte de un subgrupo de *E. coli* productora de toxina tipo Shiga (STEC) incluyendo cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características epidemiológicas y patogénicas que las del serotipo O157:H7 que se considera como prototipo del grupo, todas las ECEH son STEC y no todas las STEC son ECEH (Figura 1). La diferencia entre ECEH y STEC radica en que algunos autores refieren el término de ECEH a su principal serotipo (O157:H7), este germen causa una enfermedad más severa produciendo diarrea sanguinolenta o el síndrome urémico hemolítico, a diferencia de STEC que causa diarrea no sanguinolenta (Bell, 2002). ECEH causa colitis hemorrágica (diarrea sanguinolenta severa), síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica trombótica donde el sistema nervioso central tiene participación. Produce también parálisis y muerte en ratones y es citotóxica para una línea selecta de células in vitro (Karmali, 1989; Sears y Kapery, 1996). Las cepas están caracterizadas por la producción de citotoxinas llamada toxina "Shiga" (STEC) debido a que una de las citotoxinas es prácticamente idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 (*stx*), o también llamadas verotoxinas por el efecto citotóxico sobre monocapas de células vero en cultivo (O'Brien *et al.*, 1994). Se han identificado más de 100 serotipos toxigénicos de STEC, aunque muchos de ellos no han sido asociados al desarrollo de la enfermedad (Feng, 1995). Entre los serotipos más importantes destacan O157:H7, O157:H-, O5:H-, O8, O26:H-, O26:H11, O103:H2, O111:H-, O111:H8, O113:H21, O116, O84, O103, O145:H-, O153:H25 (Gyles, *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2001).



Whittam, (1998).

Figura 1. Diagrama de Venn. Relación filogenética ente *E. coli* productora de toxina tipo shiga (STEC), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) y *Shigella dysenteriae*.

La importancia de *E. coli* enterohemorrágica en la salud pública sobresale por lo siguiente:

- Es altamente infecciosa en humanos.
- Tiene una baja dosis infectante.
- Causa graves enfermedades.
- Deja serias secuelas a largo plazo, especialmente la pérdida del funcionamiento del riñón.

- Se encuentra en ganado bovino (y otros animales) y por lo tanto, se localiza en el excremento.
- Aparentemente no se encuentra infectado el ganado bovino (y otros animales), debido a que no presentan manifestaciones clínicas.
- Resistencia a factores físicos y químicos.
- Su ocurrencia es global (Bell. 2002).

1.3.2 Características de las citotoxinas (*stx*)

El principal factor de virulencia de STEC es la producción de citotoxinas, la *stx* poseen una alta toxicidad, la dosis letal media (LD50) en cerdos es de 3 ng/kg de peso corporal (Acheson *et al.*, 1996). La *stx1* está formada por una subunidad A de 33 kDa estructurada por dos péptidos unidos por un puente disulfuro. El péptido A1 mantiene la actividad enzimática, mientras que el péptido A2 une a la subunidad A en forma no covalente (Jackson y O'Brien, 1994; Calderwood, 1994) con un pentámero de subunidades B, que son responsables de la variabilidad biológica de la familia *stx*, unen a la toxina con los receptores específicos denominados Gb3 (globotriacilceramida) presentes en la superficie de células huésped; este tipo de receptores se encuentran presentes en grandes cantidades en células del epitelio renal de humanos, así como en plaquetas y eritrocitos (Lingwood, 1994). Una vez que la toxina se une al receptor específico, penetra a la célula huésped mediante un proceso de endocitosis e inhibiendo la síntesis de proteínas lo que conduce a la muerte de la célula huésped que contiene receptores Gb3 o Gb4 (Lingwood, 1998). La unión de la subunidad b al receptor Gb3 conduce a la apoptosis de linfocitos B (Calderwood, 1994), macrófagos (Lai, *et al.* 1999) y células de la corteza renal en pacientes con HUS y en animales infectados experimentalmente con *E. coli* O157:H7 (Karpman *et al.* 1988).

1.3.3 Epidemiología

En Estados Unidos de 1982 a 1997 se presentaron más de 100 brotes de infección con *E. coli* O157, de éstos, el 52% fueron alimentos derivados de ganado bovino, 16%

contacto persona-persona, 14% frutas y vegetales, 12% agua y 5% otros alimentos (WHO, 1997). En 1998 se reportaron 42 brotes confirmados de *E. coli* O157:H7 en 25 estados de los Estados Unidos afectando a 777 personas, de las cuales el 20% fueron hospitalizadas, 4% desarrollaron síndrome urémico hemolítico y el 0.4% murieron. En contraste durante los años 1994 y 1997 la media de brotes reportada anual fue de 31, el incremento en el número de brotes se puede deber a que en los últimos años se usan técnicas moleculares para identificar subtipos de *E. coli* O157:H7 lo que permite una detección más rápida y confiable (CDC, 1999).

En Canadá la incidencia de STEC durante el periodo de 1992 a 1995 se presentó con una frecuencia de 4.3 casos por cada 100,000 habitantes en Ontario y en Québec 4.5 casos por cada 100,00 habitantes. Es importante resaltar que en estas dos provincias vive el 60% de la población de Canadá (Spika *et al.* 1998). Argentina es uno de los países que sufre una de las tasas más altas del mundo del síndrome urémico hemolítico en niños causado por STEC 22/100,000 habitantes por año (López *et al.* 1988), en Chile se presentan 4.2/100,000 habitantes (Prado, 1996) y en Uruguay 5/100,000 habitantes (Schelotto *et al.* 1996). En México no se tiene un solo caso reportado de STEC, sin embargo esto no implica que no se hallan presentado.

En el año de 1996 en Europa por cada 100,000 habitantes menores de 15 años se presentaba una incidencia de STEC en Francia de 0.7, Lituania 1-2, Suiza 1.5 y Bélgica 1.4 (Caprioli y Tozzi 1998).

1.3.4 Reservorio y mecanismos de contaminación.

El hábitat primario de *E. coli* es el tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente, muchos serogrupos de *E. coli* son encontrados como flora normal en el intestino de mamíferos, siendo algunos patógenos para el hombre y animales. Los animales domésticos como perros y gatos pueden transmitir *E. coli*, incluyendo serogrupos patógenos para el humano como el O55, O111 y O128. Otros animales domésticos

incluyendo ganado bovino, cerdos, ovejas y aves de corral transmiten *E. coli* como flora comensal y a menudo cepas patógenas (Park, 1999).

El ganado bovino está ampliamente aceptado como el mayor reservorio de *E. coli* O157:H7 (actualmente es el más importante transmisor de EHEC por alimentos). Las rutas potenciales de infección del ganado bovino hacia el hombre incluye:

- Ruta fecal-oral de animales a humanos por contacto directo con animales infectados.
- Consumo de productos del campo contaminados con estiércol no tratado empleado como fertilizante.
- Consumo de agua y alimentos contaminados con aguas negras.
- Consumo de carne contaminada durante el proceso de obtención principalmente durante la evisceración.
- Consumo de leche sin pasteurizar y contaminada con materia fecal o productos derivados de estos (Bell, 2002).

La tasa de portadores de *E. coli* O157:H7 en ganado bovino es mayor en animales jóvenes que en adultos con una concentración en las heces de entre 100 y 10,000 ufc/gr. (Zhao *et al.*, 1995). El germen se aloja preferentemente en el tracto gastrointestinal, aunque no coloniza la mucosa ni muestra patogenicidad a estos animales. Es expulsado de manera intermitente y ordinaria por las heces de estos animales durante semanas o meses (Brown *et al.*, 1997; Cray y Moon 1995). La frecuencia de *E. coli* O157 en materia fecal de vacas (muestras con hisopos rectales), es similar cuando se toman las muestras en granjas y después en el rastro, la positividad fue del 3.4% y 3.8% respectivamente (Rice *et al.*, 1997). La presencia de *E. coli* O157:H7 persiste en las heces de becerros así como en vacas adultas y probablemente el tipo de alimento consumido por estos bovinos puede influenciar la prevalencia y resistencia de este microorganismo. Estudios sobre la incidencia de *E. coli* O157 en alimentos de origen animal como carne cruda indican niveles superiores al 50% (Cerqueira *et al.*, 1999).

La siguiente figura (2) esquematiza las diferentes rutas de transmisión por las cuales el ser humano puede llegar a adquirir EHEC.

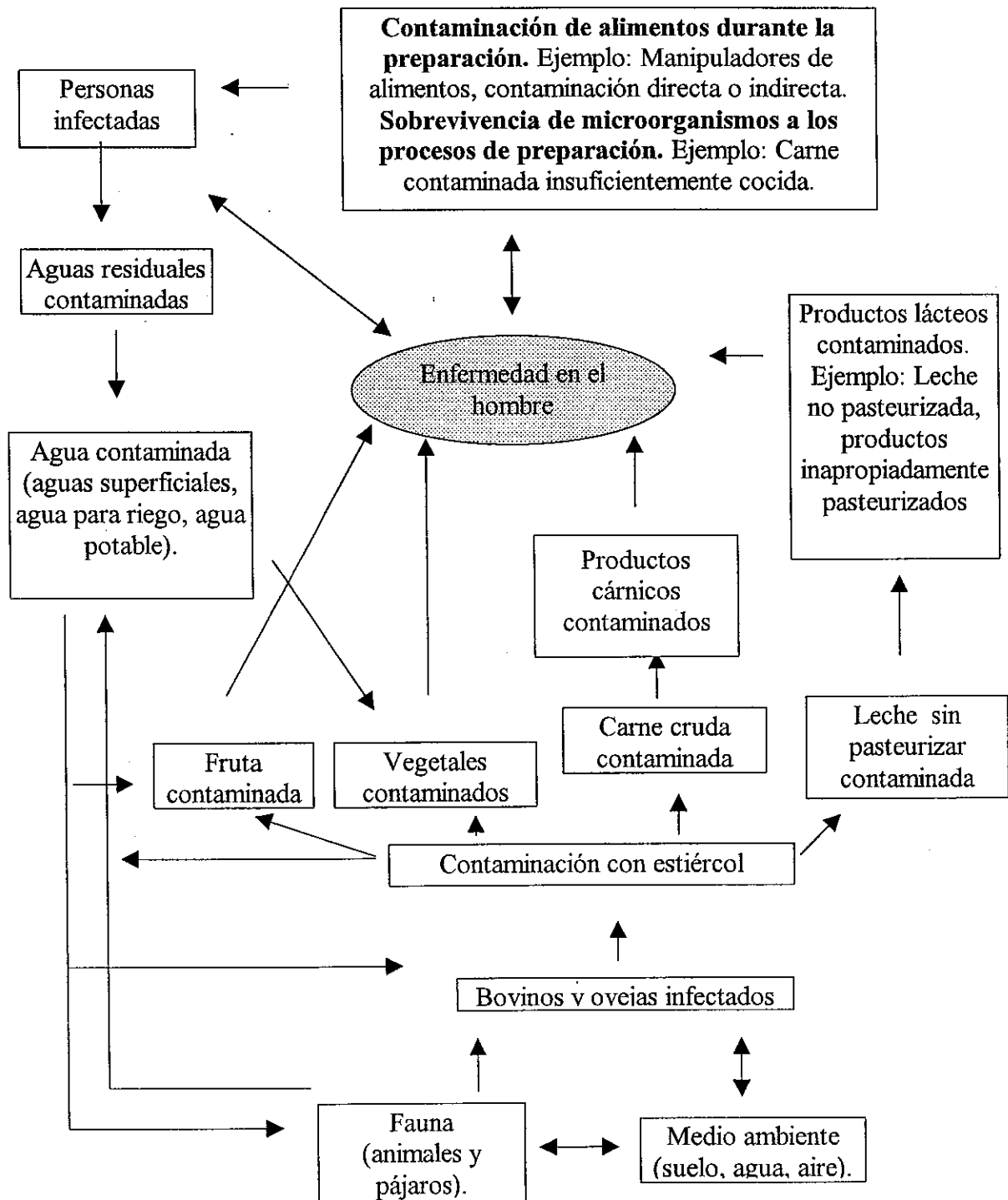


Figura 2. Diagrama de las principales rutas de transmisión de EHEC.

1.3.5 Alimentos implicados

E. coli O157:H7 se ha aislado de diferentes alimentos siendo la carne de bovino la principal fuente del patógeno. Se ha aislado también de hamburguesas, leche sin pasteurizar, comida rápida, sidra, ensaladas, y otros alimentos (Johnson *et al.*, 1995; Chapman, 2000; Besser *et al.*, 1993). Garay Martínez *et al.*, (2003), encontró una frecuencia del 6% en leche cruda que se produce en Jalisco y Aquino *et al.*, 2003 aisló 3 cepas de *E. coli* O157 con capacidad citotóxica y la presencia del gen *hlyA* en 107 muestras de hortalizas adquiridas en la central de abastos de la ciudad de México. Son pocos los estudios de *E. coli* enterohemorrágica en nuestro país, lo que hace importante conocer y caracterizar este patógeno en los alimentos.

1.3.6 Dosis infectante

La dosis infectante de ECEH es muy baja, los brotes se cree que son el resultado de una baja dosis infecciosa <100 células (Bolton, 1996). En carne implicada en un brote en los estados del oeste de los Estados Unidos en 1993 se encontraron 700 *E. coli* O157:H7 por hamburguesa antes de cocinar (Griffin *et al.*, 1994). En 1994 en un brote de *E. coli* O157:H7 en salami sólo se encontraron menos de 50 organismos (Tilden *et al.*, 1996), y en Australia donde estuvo involucrado el salami en un brote de *E. coli* O111:H se estimó un organismo /10 gr (Paton *et al.*, 1996).

Una vez que *E. coli* enterohemorrágica infecta al huésped, el período de incubación promedio es de tres a cuatro días y la enfermedad tiene una duración de dos a nueve días; su inicio se caracteriza por dolor abdominal repentino, vómito, fiebre ligera o ausente y desarrollo de diarrea sin presencia de sangre. Dentro de las siguientes 24 horas se presenta diarrea acuosa profusamente sanguinolenta y dolor abdominal sumamente intenso, este segundo período tiene una duración de cuatro a diez días y se conoce como colitis hemorrágica, aprox. 50% de los pacientes requieren hospitalización, la enfermedad suele ser autolimitante (Padhye y Doyle, 1992).

1.3.7 Sobrevivencia.

E. coli patógena es más sensible al calor a diferencia de otros patógenos Gram-negativos, la inactivación térmica sobre la resistencia al calor se ve afectado por otros factores como pH (se incrementa la sensibilidad al calor) actividad de agua y un alto contenido de grasa (puede incrementar la resistencia al calor) (Bell, 2002).

En general las características de los límites de crecimiento de *E. coli* patógena se observan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Límites de crecimientos para *E. coli* patógena.

	Mínimo	Máximo
Temperatura (°C)	7 – 8 ^a	44 – 46 ^b
pH	4.4 ^c	9.0
A_w	0.95	----
Cloruro de sodio	crece abundantemente en cloruro de sodio al 2.5%, crece lentamente en cloruro de sodio al 6.5%, no hay crecimiento en cloruro de sodio al 8.5%.	

^a El crecimiento está demostrado en leche a 6.5 °C (Kauppi *et al.* 1996).

^b Para algunas cepas de EHEC, la máxima temperatura para el crecimiento es menor que 44 °C.

^c Hay estudios que indican la sobrevivencia de *E. coli* O157 a niveles de pH por debajo de 4.4 (Semanchek y Golden, 1996).

E. coli enterohemorrágica se inactiva en las condiciones que generalmente se aplican para la pasteurización de la leche, no es un germen termodúrico (D'Aoust y col, 1998). Se ha observado también un activo desarrollo en caldo soya tripticasa a temperaturas de

incubación de entre 30 y 41°C, con tiempos de generación de 0.49 h a 37°C, en condiciones de congelación a - 25°C. *E. coli* no patógena es reducida hasta 10 veces y sobrevive durante 38 semanas, hay que resaltar que el serotipo O157:H7 no cambia el número de células en carne molida almacenada a -20 °C durante 9 meses (Doyle y Schoeni, 1984).

Otras investigaciones indican que cuando *E. coli* O157:H7 es expuesta a condiciones de estrés subletal manifiesta mayor resistencia a pH bajos (4.0), por ejemplo: en concentraciones de cloruro de sodio altos (20% w/v) y calor (56 °C por 80 min.) exhibe una mayor resistencia a pH 4 que a pH 7 (Rowe y Kirk, 1999).

En productos fermentados como quesos o carnes, el pH contribuye a controlar el crecimiento de EHEC, sin embargo la sobrevivencia dependerá del tipo de ácido orgánico presente y de las condiciones fisico-químicas (Bell 2002).

2. Planteamiento del problema

Escherichia coli O157:H7 es uno de los principales patógenos que causan ETAs en los países del primer mundo y Sudamérica (Spika *et al.* 1998; Caprioli y Tozzi 1998; CDC, 1999; López *et al.* 1988; Prado, 1996; Schelotto *et al.* 1996). En nuestro país, se tienen pocos datos acerca de la frecuencia de este patógeno en alimentos, menos aún se conocen los factores de virulencia de cepas aisladas de diferentes alimentos. Específicamente, en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco, no existen datos que indiquen la incidencia de este patógeno en canales de bovino. Se sabe que el ganado es un importante reservorio de *E. coli* O157:H7 y otras *E. coli* productoras de toxinas tipo “Shiga” (Brown *et al.*, 1997; Cray y Moon 1995; Zhao *et al.*, 1995), estas cepas pueden causar colitis hemorrágica, diarrea, y síndrome urémico hemolítico en humanos. El presente trabajo se pretende realizar de noviembre del 2001 a junio del 2003 con la finalidad de conocer la frecuencia de *E. coli* O157 y no-O157 STEC, así como la presencia de los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly₉₃₃* en canales de bovinos del Rastro Municipal de Guadalajara y qué relación guardan con las prácticas de manufactura.

3. Justificación

1. *E. coli* O157:H7 es considerado uno de los patógenos emergente de los últimos 30 años asociado al consumo de alimentos, el serotipo O157:H7 es el más frecuente relacionado a ETAs en Norteamérica, sin embargo existen alrededor de 100 serotipos de no-O157 STEC, de los cuales aproximadamente 50 han estado vinculados con colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico.
2. Se conoce el impacto epidemiológico y económico que causa *E. coli* O157:H7 y no- O157 STEC en países del primer mundo, en México no se tiene ningún reporte de este agente infeccioso en la población.
3. La enfermedad se transmite principalmente por los alimentos, teniendo como su vehículo frecuente la carne de bovino insuficientemente cocida.
4. La información disponible sobre la incidencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC en las canales de bovino no está documentada en el país. Con la presente investigación se contribuirá al conocimiento de la epidemiología de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC. También se caracterizarán las cepas por técnicas moleculares para conocer la presencia de factores de virulencia, así como su relación con las prácticas sanitarias que operan durante la obtención de canales de bovino en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.
5. En México, las deficiencias en diagnóstico y notificación epidemiológica hace que no se cuente con datos confiables que asocien la carne y otros alimentos como transmisores de *E. coli* enterohemorrágica y STEC; sin embargo, estudios realizados en otros países de nuestro continente como Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Brasil, Chile, y Argentina reportan la presencia de este germen en canales de bovino con una frecuencia de hasta el 8.3%.

6. Los datos obtenidos nos ayudarán a asociar el peligro potencial a la salud pública por el consumo de productos cárnicos, también servirá de soporte para que sean implementadas por parte de las autoridades sanitarias, las medidas necesarias para reducir el peligro por la presencia de este patógeno.

4. Hipótesis

Las canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara se encuentran contaminadas con *E. coli* O157:H7 y no-O157 presentando los genes de virulencia *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly₉₃₃* y su presencia está relacionada con las prácticas de manufactura.

5. Objetivos:

Objetivo General:

Determinar la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 y genes de virulencia (*stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly₉₃₃*), en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara y su relación con las condiciones sanitarias que operan durante el proceso de obtención de la carne durante dos épocas del año.

Objetivos particulares:

- a) Determinar la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara..
- b) Detectar la presencia de los genes de virulencia (*stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly₉₃₃*) en las cepas de *E. coli* O157:H7 y no-O157 aisladas.
- c) Comparar la sensibilidad de la técnica de la FDA y la técnica de Inmunocaptura para el aislamiento de *E. coli* O157 en canales analizadas postproceso.
- d) Elaborar un diagnóstico sanitario del proceso de obtención de la carne por medio de inspecciones, análisis de mantas y muestras en diferentes zonas de la canal, de la misma manera se verificarán temperaturas de cámaras de refrigeración y canales.
- e) Conocer si existe una correlación entre la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y la presencia de microorganismos indicadores (BMA, CT, CF, *E. coli* genérica).
- f) Determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC durante dos épocas del año caliente y fría.

6. Metodología

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Ciencias Básicas del Centro Universitario de la Ciénega de la Universidad de Guadalajara (CUCiénega) y constó de tres etapas:

Etapas:

1. **Inspección sanitaria:** se realizaron estancias en el rastro con la finalidad de evaluar las condiciones y el manejo higiénico observado durante el proceso de sacrificio.
2. **Postevisceración:** consistió en tomar muestras para analizar microorganismos indicadores y *E. coli* O157 donde la contaminación es más evidente después del eviscerado y lavado de la canal.
3. **Postproceso:** se tomaron muestras de las canales después de la refrigeración con la finalidad de conocer la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC así como microorganismos indicadores.

Etapas 1. Inspección sanitaria: Se llevaron a cabo 26 visitas al Rastro Municipal de Guadalajara de enero del 2002 a junio del 2003, con la finalidad de evaluar las prácticas de manufactura durante el proceso de sacrificio de bovinos en base a los parámetros que indican las normas oficiales establecidas, (NOM -008-ZOO-1994, NOM-009-ZOO-1994, NOM-EM-09-ZOO-1994, NOM-EM-003-SARH2-1994).

También se verificaron las variaciones de temperatura en las cámaras de refrigeración y canales ($n = 102$) durante los diferentes días de sacrificio. Las lecturas se realizaron por medio de un termómetro KOCH con bayoneta de 10 cm de longitud, estas fueron tomadas al centro de la cámara a la altura media de cada una de ellas y en las canales introduciendo la bayoneta totalmente al músculo en la región del brazuelo. Los resultados se analizaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de mínimos cuadrados (LSD), el diseño fue unifactorial y completamente aleatorio (Miller *et al.*, 1992).

Gutiérrez Pulido y de la Vara, 2004). Se analizaron también 10 muestras de mantas recién lavadas de 10 x 10 cm cuantificándose la presencia de microorganismos indicadores como Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Coliformes Totales (CT), Coliformes Fecales (CF), *E. coli* genérica y *E. coli* O157:H7 por medio de técnicas oficiales de la AOAC y ICMSF (Figura 2, 3 y 4).

Etapa 2. Postevisceración: se tomaron 10 muestras independientes y al azar después del eviscerado en la región del carpo, tarso y eviscerado con una plantilla de 10 x 10 cm y una esponja estéril con 25 ml de diluyente de buffer de fosfatos (BioPro® Sampling System), se les cuantificó BMA, CT, CF, *E. coli* genérica y *E. coli* O157:H7 por técnicas oficiales de la AOAC y de la ICMSF (figura 3, 4 y 5). Estas regiones de muestreo se tomaron en base a que son zonas de alta contaminación debido al manejo que se presenta durante el proceso de sacrificio y que impactan negativamente en la calidad sanitaria final de la canal. (Elder *et al.*, 2000; McEvoy *et al.*, 2000; Gun *et al.*, 2003).

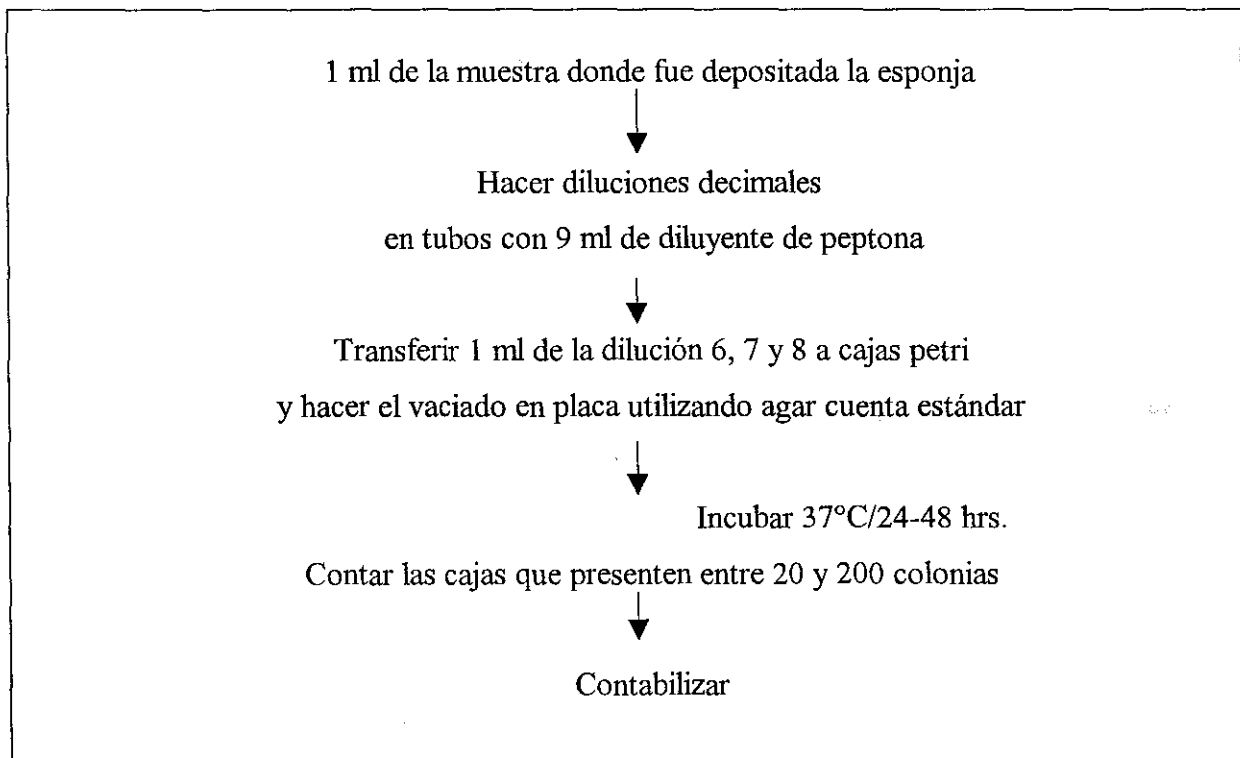


Figura 3. Recuento de bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino (Vanderzant., 1992)

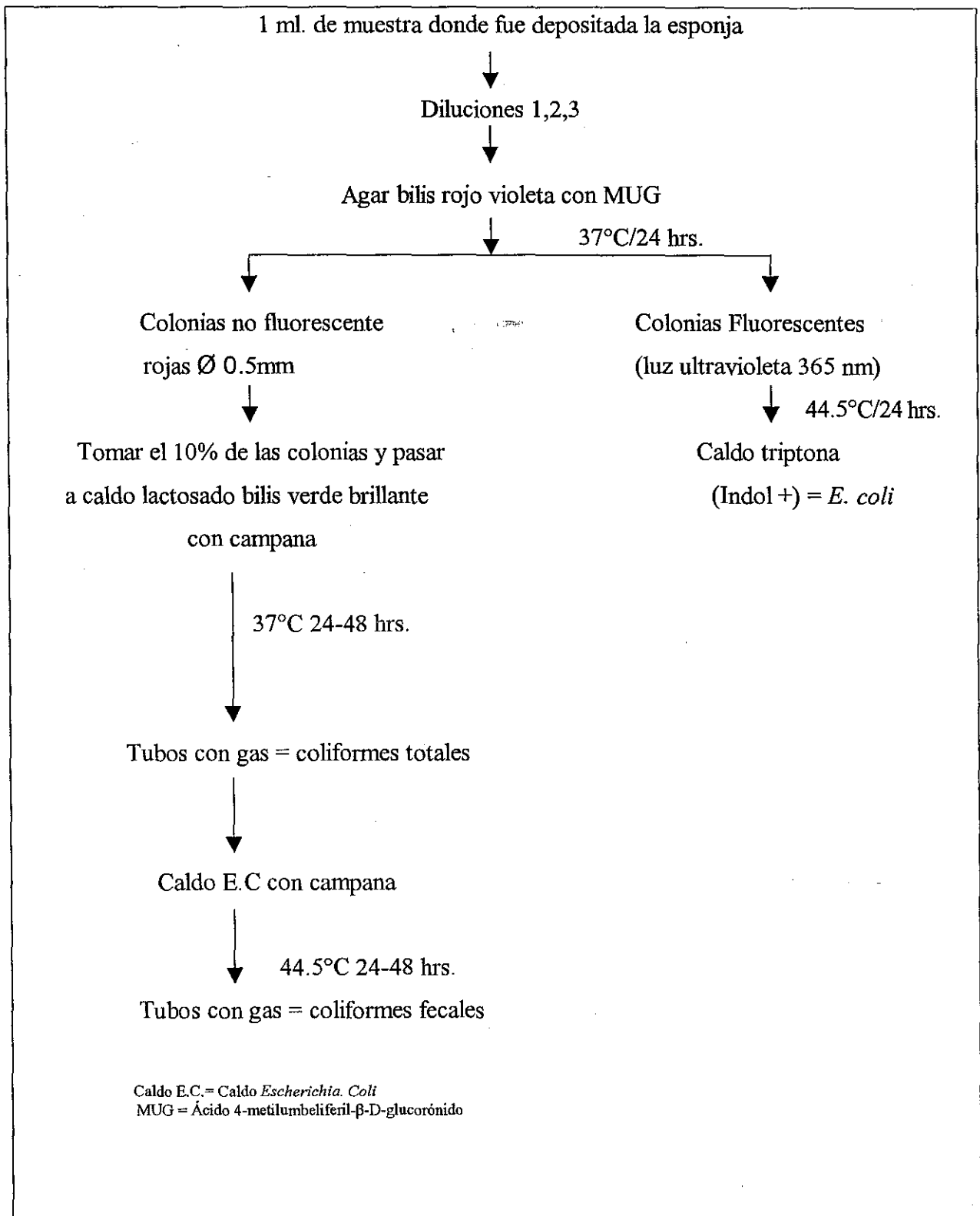


Figura 4. Recuento de organismos coliformes totales, fecales y *E. coli* (Vanderzant., 1992).

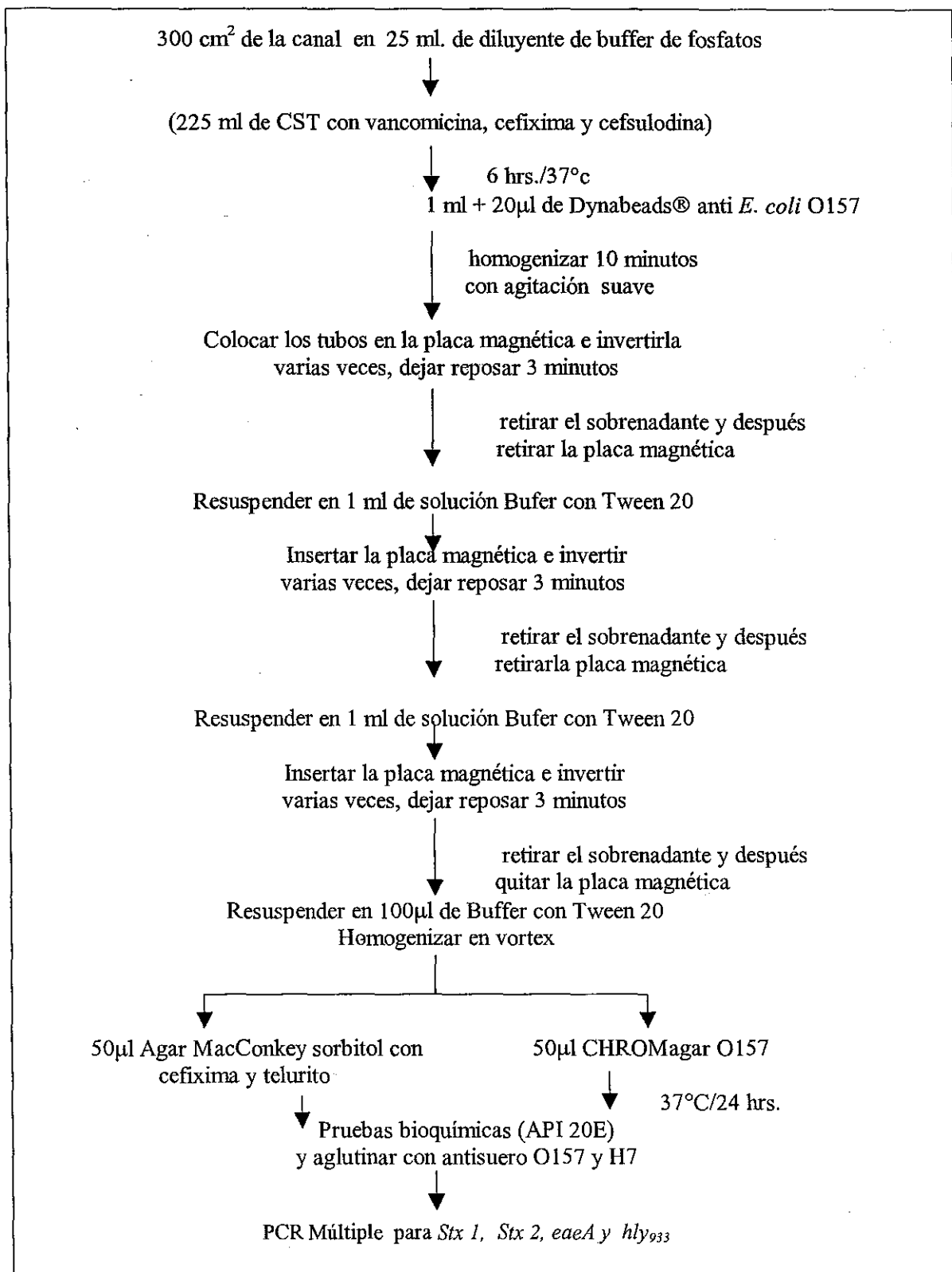


Figura 5. Técnica de Inmunocaptura para la recuperación de *E. coli* O157.
(AOAC 8th edition)

Etapa 3. Postproceso: Para calcular el tamaño de muestra y conocer la frecuencia de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC postproceso se realizaron los cálculos en base a una investigación de Cerqueira *et al.*, (1999) realizado en Río de Janeiro, Brasil, donde la incidencia de *E. coli* O157 fue del 53% en 76 canales analizadas de ganado bovino. Según lo anterior se decidió tomar $n = 258$ para mejorar la precisión estadística y se tomó como error máximo el 6.5% con una confianza estadística del 95% (Gutiérrez Pulido y de la Vara, 2004).

$$N = P(1 - P) \left[\frac{Z_{\alpha/2}}{E} \right]^2 = .53 (1 - .53) [1.96/.065]^2 = 226 \text{ canales}$$

Donde :

- P = Es la proporción promedio esperada de muestras positivas.
- $Z_{\alpha/2}$ = Se obtiene de las tablas de la distribución normal y define la confianza estadística, que en este caso se trabajó al 95% por lo que $Z_{\alpha/2}$ es = 1.96
- E = Error máximo de estimación deseado para la proporción real de muestras positivas en este caso se fijó al 6.5%.

La toma de muestra se efectuó de acuerdo al protocolo del departamento de agricultura de Estados Unidos (FSIS, 1996). El muestreo consistió en tomar las muestras de forma aleatoria en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, en tres zonas de la canal: pecho, pierna y vientre (figura 6). Se utilizó una plantilla de 10 x 10 cm y una esponja estéril (BioPro® Sampling System Aprobado por USDA) en diluyente de buffer de fosfatos (27 ml), las muestras fueron transportadas en una hielera preparada a temperatura de refrigeración no transcurriendo más de dos horas en llegar al laboratorio de alimentos del Centro Universitario de la Ciénega donde se realizaron los análisis para cuantificar la presencia de BMA, CT, CF, *E. coli* genérica y la presencia de *E. coli* O157:H7 por técnicas oficiales de la AOAC y de la ICMSF (figura 7).

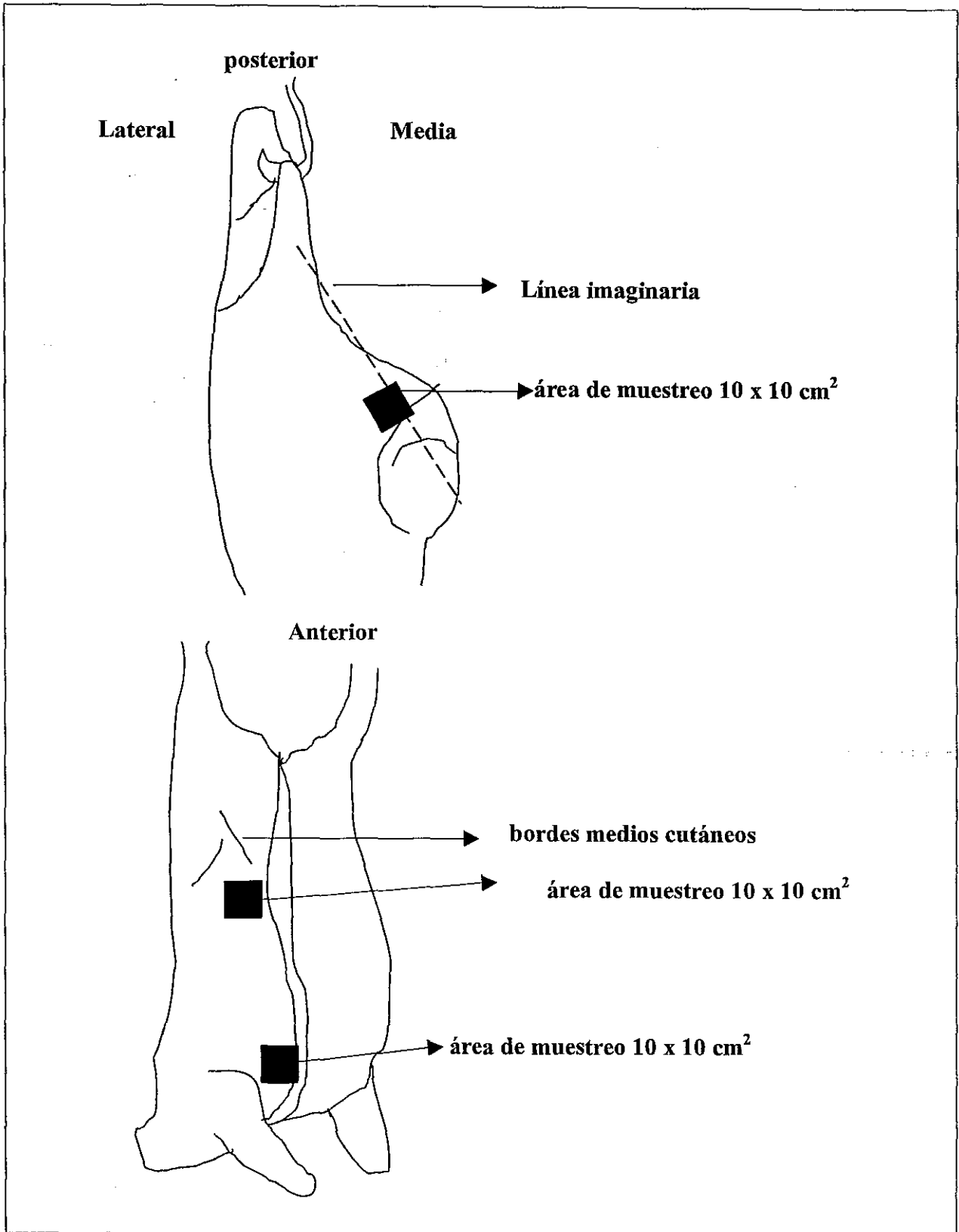


Figura 6. Ubicación del área de muestreo en la canal. (FSIS., 1996)

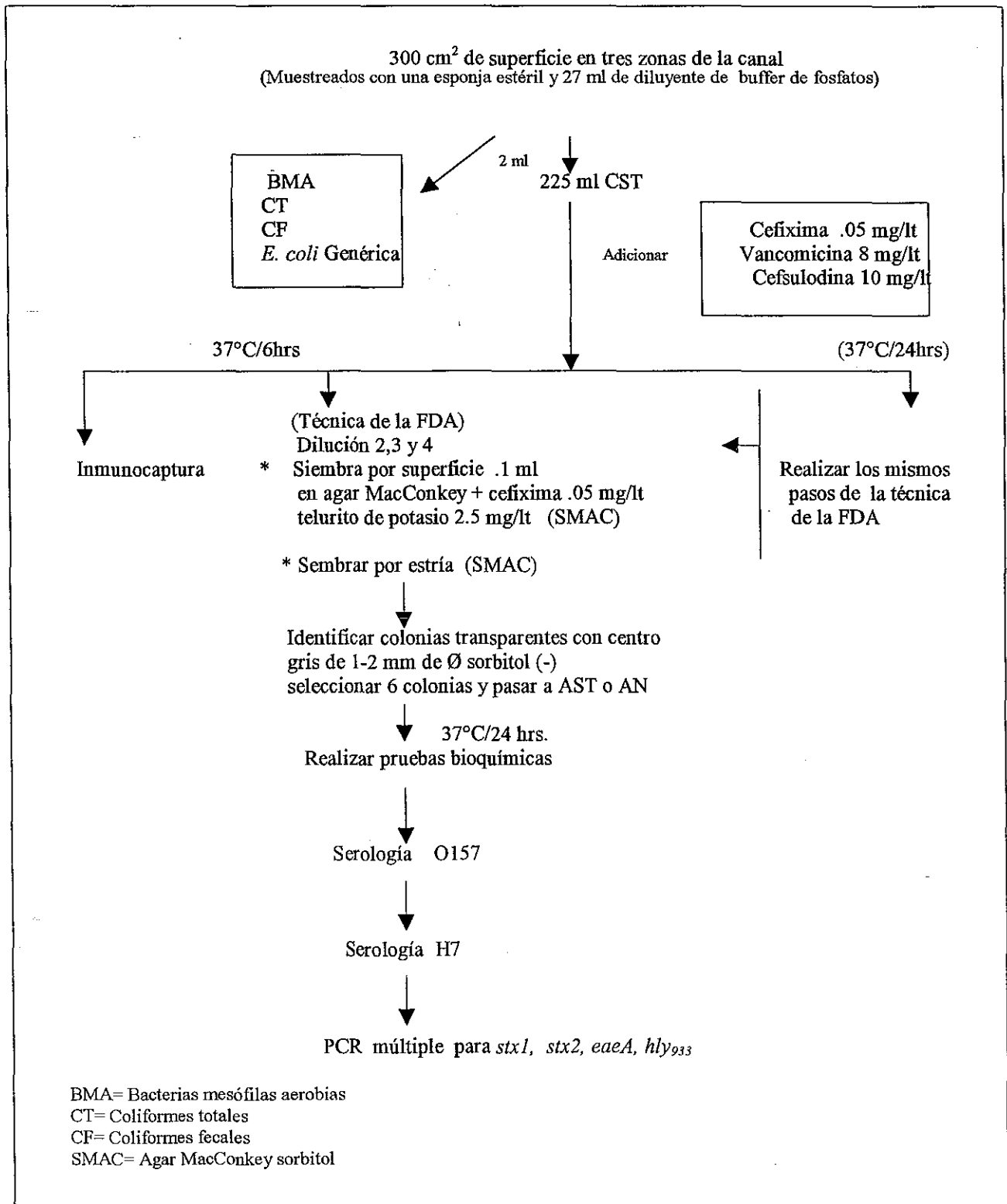


Figura 7. Recuento de BMA, CT, CF y aislamiento e identificación de *E. coli* (genérica) y *E. coli* O157.

Para la determinación de *E. coli* O157:H7 el método utilizado fue la técnica de la FDA 1995 la cual consiste en:

- Enriquecimiento selectivo (CSTcv)
- Aislamiento en placa (SMACct)
- Confirmación bioquímica
- Serología (Antígeno O157 y H7)
- Identificación de citotoxinas (*stx1*, *stx2*) y factores virulencia (*eaeA*, *hly₉₃₃*) por PCR multiplex.

Se utilizó también con fines comparativos y aumentar la sensibilidad de aislamiento la técnica de Inmunocaptura, que consistió en utilizar perlas magnéticas (DYNAL®) con anticuerpos monoclonales para O157. Se usaron inmediatamente después de las 6 horas de enriquecimiento y se continuó la misma ruta de aislamiento (Grif *et al.*, 1998).

Para comparar la eficacia de las dos técnicas de detección de *E. coli* O157 y no-O157 STEC se calculó la cantidad de muestras positivas detectadas en cada método sobre el número total de muestras positivas para *E. coli* O157:H7, O157: no móvil (NM) y no-O157 STEC (Tutenel *et al.*, 2003).

El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante análisis descriptivo, análisis de correlación, análisis de varianza con una confianza del 95%, y prueba de mínimos cuadrados. El diseño fue completamente aleatorizado (Miller *et al.*, 1992 Gutiérrez Pulido y de la Vara, 2004).

Para el desarrollo de la PCR múltiplex, la extracción de ADN se llevó a cabo por el método de ebullición propuesto por Feng (2000), el cual se realiza tomando una colonia de *E. coli* proveniente de agar soya tripticaseína y se pasa a un vial de un mililitro. Posteriormente se le agregan 100 µl de buffer Tris- EDTA pH 8, se homogeniza en un vortex a 2500 rpm y después se llevan a una temperatura de 95°C por 5 minutos en un termoblock para luego ser enfriado en hielo durante 5 minutos. Al finalizar el enfriado se

llevan a centrifugar y se obtiene el sobrenadante para colocarlo a un nuevo vial, este sobrenadante contiene el ADN bacteriano (figura 8).

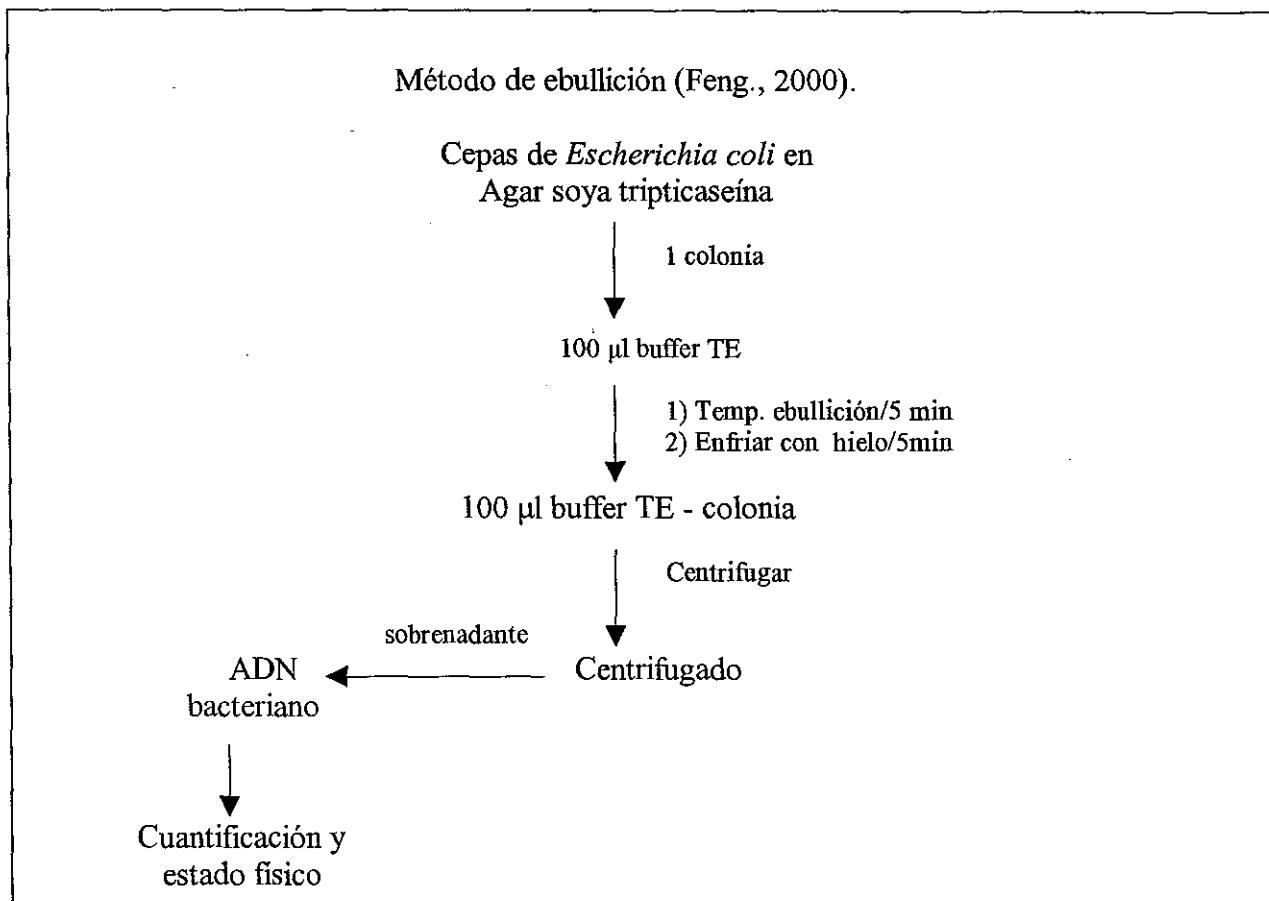


Figura 8. Extracción de ADN de cepas sospechosas a STEC.

Después de la obtención del ADN bacteriano, se cuantificó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a 260 nm, para posteriormente revisar el estado físico del ADN en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio (Williams y Rapley 2000).

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 µl de reacción conteniendo 400 µM de cada desoxinucleótido trifosfato, 300 nM de cada iniciador, buffer 1X (50 mM KCL, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCL, pH 8.3) y 2.5 U de Taq-polimerasa. La reacción se realizó en un termociclador utilizando 25 ciclos de 1 minuto a 94 °C para amplificar, 1 minuto a 56 °C y 1 minuto a 72°C seguida de una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de la PCR

fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) teñidos con bromuro de etidio (figura 9).

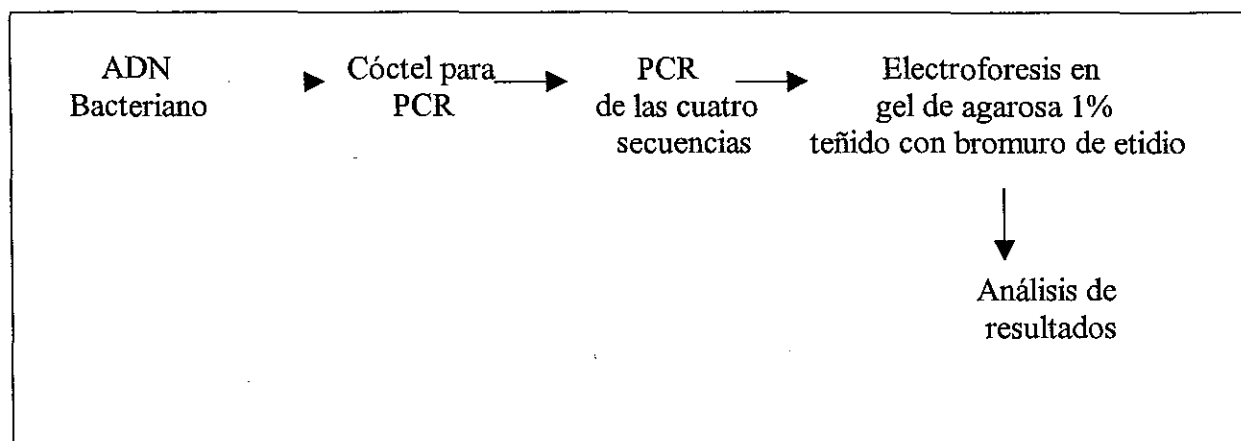


Figura 9. Desarrollo de la PCR Múltiple para amplificar los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly933*. (Feng., 2000).

La PCR se realizó con el propósito de amplificar los genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly933*, las secuencias de los oligonucleótidos necesarios para amplificar estos genes se describen en el cuadro 4. (Gannon *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1995; Richard *et al.*, 2000; Weagant *et al.*, 1999; Tsukamoto y Kawai, 1998; Meng *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1997).

Cuadro 4.- Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR

Oligonucleótidos	Secuencia (5' a 3')	Gen blanco	Tamaño esperado (pb)
SLTI-F	TGTAACCTGAAAGGTGGAGTATACA	<i>stx1</i>	210
SLTI-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC		
SLTII-F	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	<i>stx2</i>	484
SLTII-R	GATGCATCTCTGGTCATTCTATTAC		
AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	<i>eaeA</i>	397
AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT		
MFSI-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	<i>hly933</i>	166
MFSI-R	CTTCACGTCACCATACATAT		

Para la estandarización de la PCR Múltiplex se utilizaron dos cepas enterohemorrágicas ATCC (46597, 43895) de *E. coli* O157:H7 y una cepa de *E. coli* enteropatógena (25922). De las curvas de estandarización se encontró que la mejor concentración para el cloruro de magnesio es 2.5 mM; para la Taq polimerasa fue de 2.5 U y en los oligonucleótidos 0.5 mM de cada uno de ellos a excepción del AE22 y AE20-2 que se utilizaron a una concentración de 0.25 mM. La temperatura de alineación óptima fue 55°C durante 1 minuto.

Las condiciones óptimas para la realización de la PCR así como las concentraciones de los componentes de la mezcla se describen en el cuadro 5 y se observan en la figura 10.

Cuadro 5.- Condiciones óptimas para llevar a cabo la PCR.

TEMPERATURA		COMPONENTES DE LA MEZCLA
Pre calentamiento	94°C 2 min.	Buffer 5 µl buffer 1X
Desnaturalización	94°C 20 seg.	Cloruro de Magnesio 3.0 mM
Alineación	55°C 1 min.	dNTPs 0.4 mM
Extensión	72°C 1 min.	Oligonucleótido 1 F 0.5mM de todos primer excepto 0.25mM para eaeA
Extensión final	72°C 10 min.	Oligonucleótido 2 R 0.5mM de todos primer excepto 0.25mM para eaeA
Ciclos	35	Taq Polimerasa 2.5 U

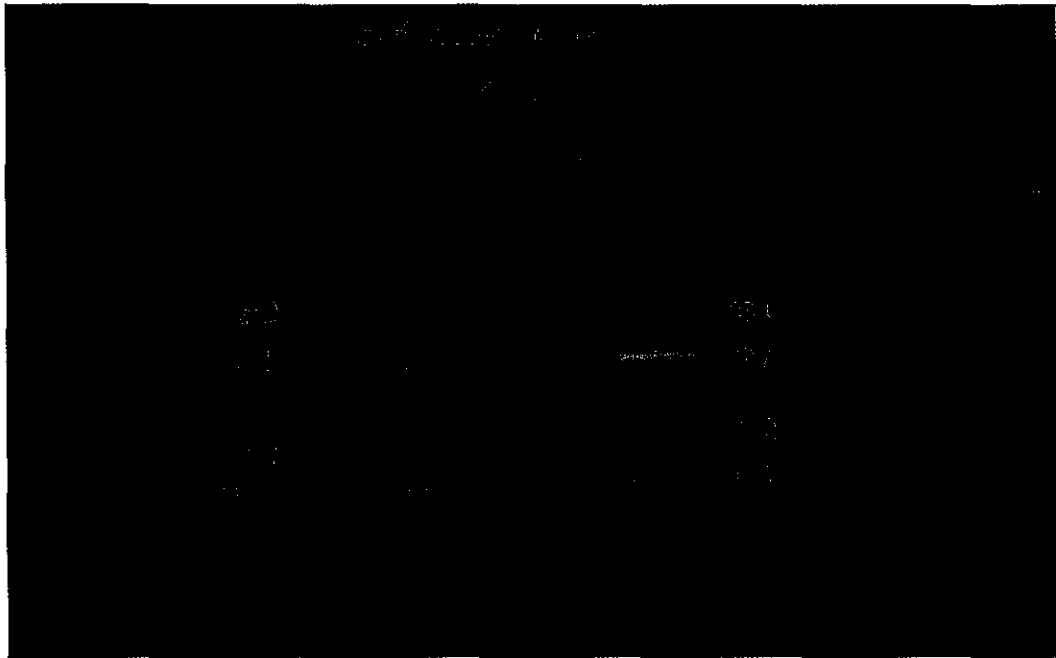


Figura 10.- Gel de agarosa al 1% donde se observa la PCR estandarizada usando *E. coli* enterohemorrágica ATCC 46597 y 43895 y *E. coli* enteropatógena ATCC 25922.

7. RESULTADOS

7.1 Etapa I (Inspección Sanitaria)

Se realizaron 26 visitas al Rastro Municipal de Guadalajara durante enero del 2002 a junio del 2003, con la finalidad de identificar las violaciones a las buenas prácticas de manufactura durante el proceso de obtención de la carne de bovino, encontrándose que no se cumple con la mayoría de parámetros citados en las normas establecidas, (NOM -008-ZOO-1994, NOM-009-ZOO-1994, NOM-EM-09-ZOO-1994, NOM-EM-003-SARH2-1994) Anexo 1.

Dentro de las deficiencias detectadas en las prácticas de manufactura, es importante recalcar la inadecuada refrigeración de las canales. El abuso de temperatura en las cámaras de refrigeración influye en los recuentos microbianos, ya que las puertas de las cámaras permanecen abiertas durante gran parte de la mañana. También se detectó carne fría con carne caliente en la misma cámara, lo cual provoca un incremento de temperatura y humedad en las superficies de las canales. No obstante la temperatura entre las diferentes cámaras no varía ($P > 0.05$). La temperatura se ve afectada principalmente por la carga de trabajo.

Los días que se registran mejores temperaturas de refrigeración en las cámaras son los lunes por la mañana ($P < 0.05$), mientras que los martes y sábado son los días con mayor deficiencia en la temperatura (cuadro 6,7).

Cuadro 6.- Media, desviación estándar, mínimo y máximo de la temperatura en cámaras de refrigeración del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco ($n = 102$).

	Cámara						
Temperatura (°c)	1	2	3	4	5	6	7
Media	11.0	9.8	10.9	10.1	10.3	9.9	10.6
Desviación estándar	4.6	4.7	4.6	3.9	5.2	4.5	4.1
Mínimo	1	0	2	2.6	0	1.8	3.5
Máximo	17.5	16.5	17.2	14.7	17.6	16	17

Cuadro 7. Análisis de mínimos cuadrados (LSD) para temperatura de cámaras de refrigeración según día de la semana.

Día	Media	Homogeneidad entre grupos			
Lunes	1.25	X			
Viernes	6.86		X		
Miércoles	7.65		X	X	
Jueves	8.74			X	X
Martes	9.82				X
Sábado	13.42				X

La temperatura de las canales no fue la misma todos los días ($P < 0.05$), sin importar en qué cámara de refrigeración se encuentren ($P > 0.05$). El día que la temperatura de la carne que se expende es más fría son los lunes (cuadro 8, 9).

Cuadro 8.- Media, desviación estándar, mínimo y máximo de la temperatura en canales de bovino después de la refrigeración ($n = 102$).

Temperatura (°c)	Cámara						
	1	2	3	4	5	6	7
Media	11	9.8	10.9	10.1	10.3	9.9	10.6
Desviación estándar	4.6	4.7	4.6	3.9	5.2	4.5	4.1
Mínimo	1	0	2	2.6	0	1.8	3.5
Máximo	17.5	16.5	17.2	14.7	17.6	16	17

Cuadro 9. Análisis de mínimos cuadrados (LSD) para la temperatura en canales de bovino según día de la semana.

Día	Media	Homogeneidad entre grupos
Lunes	2.67	X
Miércoles	7.55	X
Viernes	11.22	X
Jueves	11.56	X
Martes	14.03	X
Sábado	14.87	X

Las mantas se encontraban sucias con restos de sangre y grasa, también tenían un olor desagradable antes de ser utilizadas en las canales. Los análisis revelaron la presencia de hasta 1.4×10^5 ufc/cm² de CT, 1.1×10^5 ufc/cm² de CF y 5.4×10^3 ufc/cm² de *E. coli* genérica (cuadro 10).

Cuadro 10.- Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm²) de microorganismos indicadores provenientes de mantas del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco ($n = 10$).

	BMA	CT	CF	<i>E. coli</i> (genérica)
Media	1.9×10^7	3.9×10^4	3.2×10^4	1×10^3
desviación estándar	4.5×10^6	4.5×10^4	3.6×10^4	1.7×10^3
Máximo	2.7×10^7	1.4×10^5	1.1×10^5	5.4×10^3
Mínimo	1.4×10^7	8.1×10^2	8.1×10^2	2

BMA= Bacterias Mesófilas Aerobias; CT= Coliformes Totales; CF= Coliformes Fecales.
(Negativo a *E. coli* O157)

7.2 Etapa II (Postevisceración)

Los resultados obtenidos muestran los siguientes datos:

Solamente dos canales de las 30 analizadas resultaron positivas a *E. coli* O157:H7 (6.66%), estas cepas se presentaron en la región del eviscerado y resultaron negativas a citotoxinas (*stx1*, *stx2*) y factores de virulencia (*eaeA*, *hly₉₃₃*). En la articulación del tarso encontramos el mayor recuento de coliformes totales 1.2×10^4 ufc/cm² (cuadro 11). La mayor cantidad de BMA se presentó en la superficie de la articulación del carpo y en la zona del eviscerado 6.5×10^8 ufc/cm² y 3.1×10^8 ufc/cm² respectivamente (cuadro 12 y 13).

E. coli (genérica) al igual que los coliformes fecales se obtuvieron en mayor cantidad en la zona del eviscerado 3.3×10^3 ufc/cm² y 6.6×10^3 ufc/cm².

Cuadro 11. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm²) de microorganismos indicadores en la superficie de la articulación del tarso en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco ($n = 10$).

	BMA	CT	CF	<i>E. coli</i> (genérica)
Media	2.8×10^5	4.7×10^3	1.6×10^3	1.7×10^2
Desviación Estándar	4.2×10^5	4.6×10^3	1.9×10^3	2×10^2
Máximo	4.6×10^6	1.2×10^4	5.5×10^3	6×10^2
Mínimo	1.2×10^6	12	Negativo Dil.1	Negativo Dil.1

BMA= Bacterias Mesófilas Aerobias; CT= Coliformes Totales; CF= Coliformes Fecales.

(Negativo a *E. coli* O157)

Cuadro 12. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm²) de microorganismos indicadores en la superficie de la articulación del carpo en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco (*n* = 10).

	BMA	CT	CF	<i>E. coli</i> (genérica)
Media	7.7×10^6	1.6×10^3	8.1×10^2	4.7×10^2
Desviación estándar	2×10^7	2.3×10^3	1.3×10^3	7.1×10^2
Máximo	6.5×10^8	6.8×10^3	3.8×10^3	2.4×10^3
Mínimo	2.4×10^4	2×10^2	1.3×10^2	Negativo Dil.1

BMA= Bacterias Mesófilas Aerobias; CT= Coliformes Totales; CF= Coliformes Fecales.
(Negativo a *E. coli* O157)

Cuadro 13. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm²) de microorganismos indicadores en la superficie de la zona del eviscerado en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco (*n* = 10).

	BMA	CT	CF	<i>E. coli</i> (genérica)
Media	9.4×10^7	2.9×10^3	2.3×10^3	1.2×10^3
Desviación estándar	1.5×10^8	1.8×10^3	1.7×10^3	9.9×10^2
Máximo	3.1×10^8	6.6×10^3	6.6×10^3	3.3×10^3
Mínimo	1.9×10^6	4.4×10^2	2.9×10^2	1.5×10^2

BMA= Bacterias Mesófilas Aerobias; CT= Coliformes Totales; CF= Coliformes Fecales.
(2 muestras resultaron positivas a *E. coli* O157)

7.3 Etapa III (Postproceso)

Se analizaron 258 muestras al azar de canales de bovino postproceso (después de la refrigeración) de marzo del 2002 a marzo del 2003. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Se obtuvo un total de 146 cepas positivas al perfil bioquímico para *E. coli* O157, de las cuales 16 aglutinaron solamente con el antígeno somático O157 y no presentaron movilidad (NM); 11 cepas dieron positivo a la aglutinación con el antígeno somático O157 y al flagelar H7 y de éstas una posee los genes *stx2*, *eaeA* y *hly933*. 119 cepas no aglutinaron con los antígenos O157 y H7, sin embargo, a todas estas cepas se les realizó PCR presentándose una con el gen *stx1* y por lo tanto pertenece a *E. coli* productora de toxina tipo Shiga "STEC". Otra cepa exhibió el gen *eaeA* y *hly933* que pudiera corresponder a *E. coli* enteropatógena por poseer estos dos factores de virulencia (cuadro 14).

Cuadro 14. Aislamiento de *Escherichia coli* O157 y no-O157 en canales de bovino.

	No. Canales positivas (n=258)	%	No. aislamientos (n=146 ^a)	%	No. de aislamientos con factores de virulencia	%
<i>E. coli</i> no-O157	53	20.5	119	81.5	2 ^d	1.4
<i>E. coli</i> O157:NM	13	5.0	16	11.0	0	0.0
<i>E. coli</i> O157:H7	7	2.7	11	7.5 ^b	1 ^c	0.7
Total	73	28.2	146	100	3	2.1

^a Número total de aislamientos de *E. coli* obtenidos de Agar MacConkey sorbitol-CT y CHROMagar de 21 canales.

^b Porcentaje del total de aislamientos (n=146).

^c Presencia de los genes *stx2*, *eaeA* y *hly933*.

^d Una cepa con el gen *stx1* y otra con el gen *eaeA* y *hly933*.

Los datos anteriores representan una positividad de 20 (7.75%) canales de las 258 analizadas, de las cuales 7 fueron positivas a *E. coli* O157:H7 (2.37%), y de éstas una posee el gen *stx2*, *eaeA* y *hly933* (0.4%). *E. coli* O157:NM se presentó en 13 (5.03%) canales

sin presentar citotoxinas o factores de virulencia. En una canal (0.4%) se aisló *E. coli* no-O157:H7 con el gen *stx1* y en otra canal (0.4%) encontramos *E. coli* no-O157 con los genes *eaeA* y *hly₉₃₃*.

En el cuadro 15 se observa el efecto de la variación estacional sobre la frecuencia de *E. coli* O157:H7, O157:NM y no-O157 en las canales. Quince canales (5.8%) fueron positivas a estos microorganismos durante los meses cálidos (marzo a septiembre), mientras que 6 canales (2.3%) resultaron positivas durante los meses fríos (octubre a febrero). Estas diferencias fueron significativas ($p < 0.05$) siendo la época calurosa la de mayor prevalencia.

Cuadro 15. Prevalencia de *E. coli* O157 y no-O157 STEC.

	Canales positivas y época del año	
	Caliente ^a (n=128)	Fría (n=130)
<i>E. coli</i> O157:H7	5	1
<i>E. coli</i> O157:NM	8	5
<i>E. coli</i> no-O157 STEC	1	0
Total	15	6

^a Marzo a septiembre.

^b Octubre a febrero.

De las 21 canales positivas a *E. coli* O157:H7, O157:NM y no-O157 STEC el 57% se obtuvieron por la técnica de Inmuncaptura (55% en CHROMagartm O157 y 5% Agar MacConkey sorbitol + telurito y cefixima) y solamente el 38% se aisló por la técnica de la FDA (20% en Agar *E. coli* O157 y 20% en Agar MacConkey sorbitol + telurito y cefixima), una muestra (5%) resultó positiva por ambos métodos (cuadro 16). La relación de detección por el método de Inmuncaptura fue 62% mientras que por el método de la FDA la relación fue del 43% Estos dos valores no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) (cuadro 17).

Cuadro 16.- Recuperación de *E. coli* O157 según técnica y medio de cultivo.

Muestras positivas	%	Técnica	Medio de Cultivo
11	55	Inmunocaptura	CHROMagar ^{lm} O157
4	20	FDA	Agar <i>E. coli</i> O157
1	5	FDA,	Agar MacConkey sorbitol +
		Inmunocaptura	telurito y cefixima
3	15	FDA	Agar MacConkey sorbitol +
			telurito y cefixima
1	5	Inmunocaptura	Agar MacConkey sorbitol +
			telurito y cefixima

Cuadro 17. Sensibilidad de la técnica para el aislamiento *E. coli* O157 y no-O157 en canales de bovino.

Técnica de aislamiento	No. de muestras positivas	<i>E. coli</i>			Detección ^a (intervalo de confianza $\alpha = 0.05$)
		O157:H7	O157:NM	no-O157 STEC	
FDA ^b	9	1	7	1	0.43 (22, 64)
IMS ^c	13	6	7	0	0.62 (41, 83)

^a Proporción de muestras positivas sobre el número total de muestras con al menos una muestra positiva para *E. coli* O157:H7, O157:NM y no-O157 STEC (n=21).

^b Enriquecimiento en caldo soya tripticasa suplementado con cefixima, cefsulodina y vancomicina por 6 y 24 horas y vaciado en placa en agar MacConkey sorbitol –CT.

^c Enriquecimiento en caldo soya tripticasa suplementado con cefixima, cefsulodina y vancomicina por 6 horas, seguido de IMS y vaciado en placa en CHROMagar y agar MacConkey sorbitol –CT.

Se realizó un análisis de varianza para ver el efecto que tiene el método y los medios de cultivo sobre la recuperación de *E. coli* O157:H7 y se encontró que la técnica no influye ($P > 0.05$), no obstante los medios de cultivo sí influyen en el aislamiento ($P < 0.05$) siendo el CHROMagar® según la prueba de mínimos cuadrados el mejor medio de cultivo.

Los recuentos de bacterias mesófilas aerobias se presentaron en un máximo de 2.7×10^9 ufc/cm², los coliformes totales y fecales así como la *E. coli* genérica se presentaron con hasta 1.5×10^6 ufc/cm² CT, 1.3×10^6 ufc/cm² CF y 8.3×10^5 ufc/cm² *E. coli* genérica, (el 87.5% de las canales resultó positiva a *E. coli* genérica.) (cuadro 18, figura. 11, 12, 13 y 14).

Cuadro 18. Media, desviación estándar, máximo y mínimo (ufc/cm²) de microorganismos indicadores en canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco ($n = 258$).

	BMA	CT	CF	<i>E. coli</i> (genérica)
Media	6.5×10^7	1.3×10^4	1.1×10^4	7.5×10^3
Desviación estándar	2.2×10^8	1.2×10^5	1.1×10^5	7.3×10^4
Máximo	2.7×10^9	1.5×10^6	1.3×10^6	8.3×10^5
Mínimo	3×10^4	0	0	0

BMA= Bacterias Mesófilas Aerobias; CT= Coliformes Totales; CF= Coliformes Fecales.
(20 muestras positivas a *E. coli* O157)

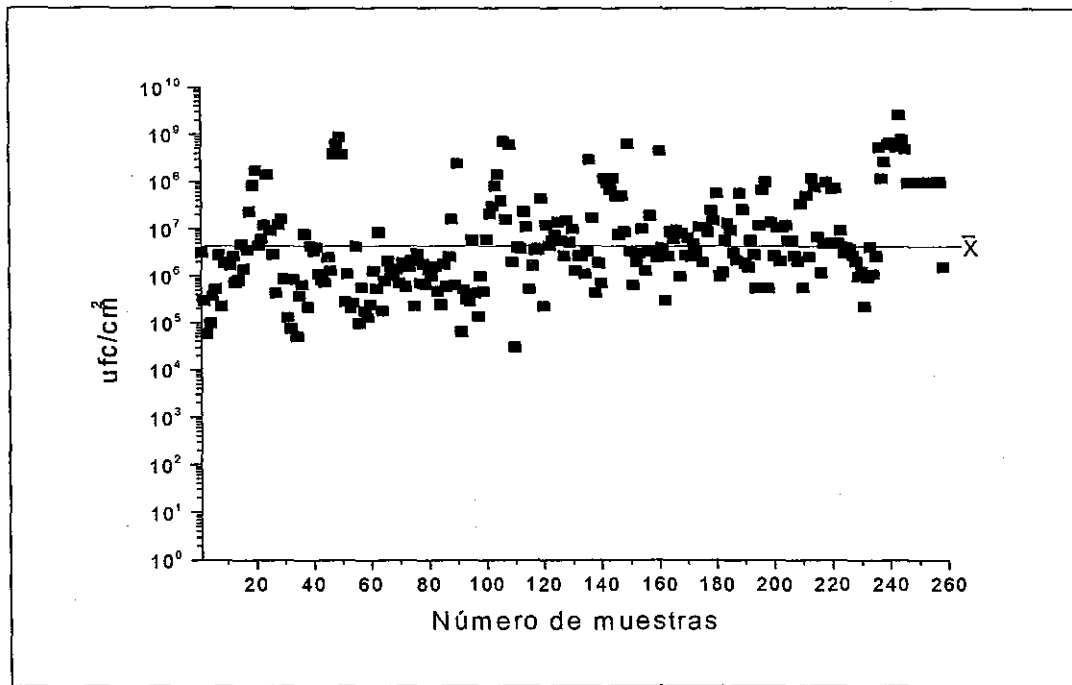


Figura 11. Bacterias mesófilas aerobias en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.

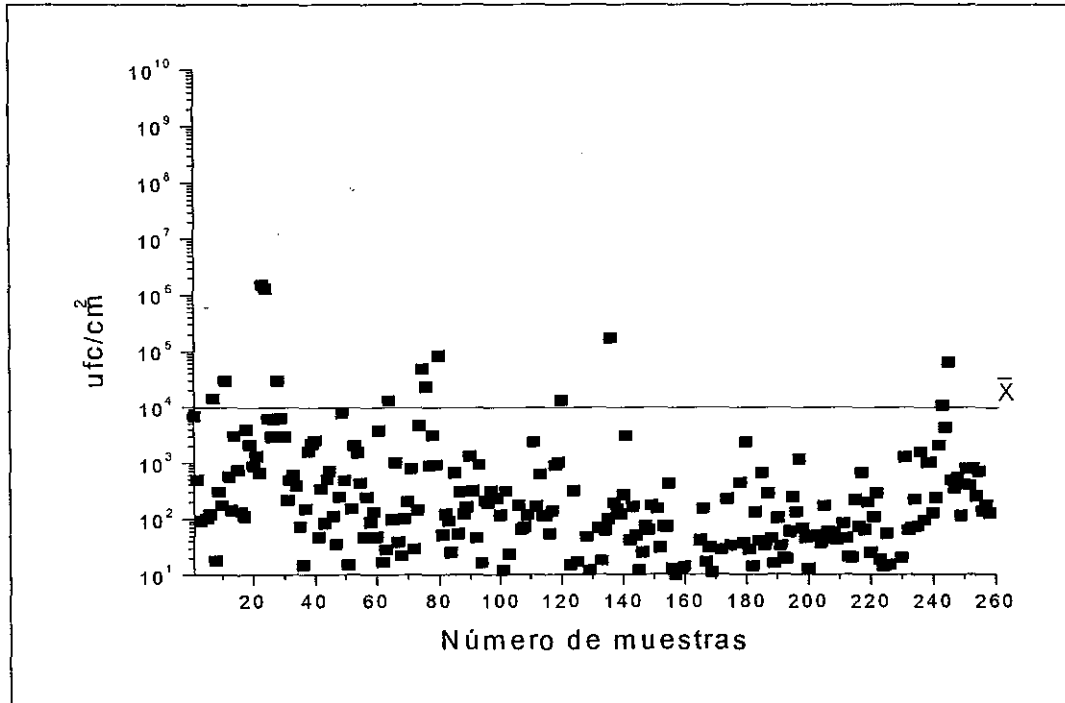


Figura 12. Coliformes totales en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.

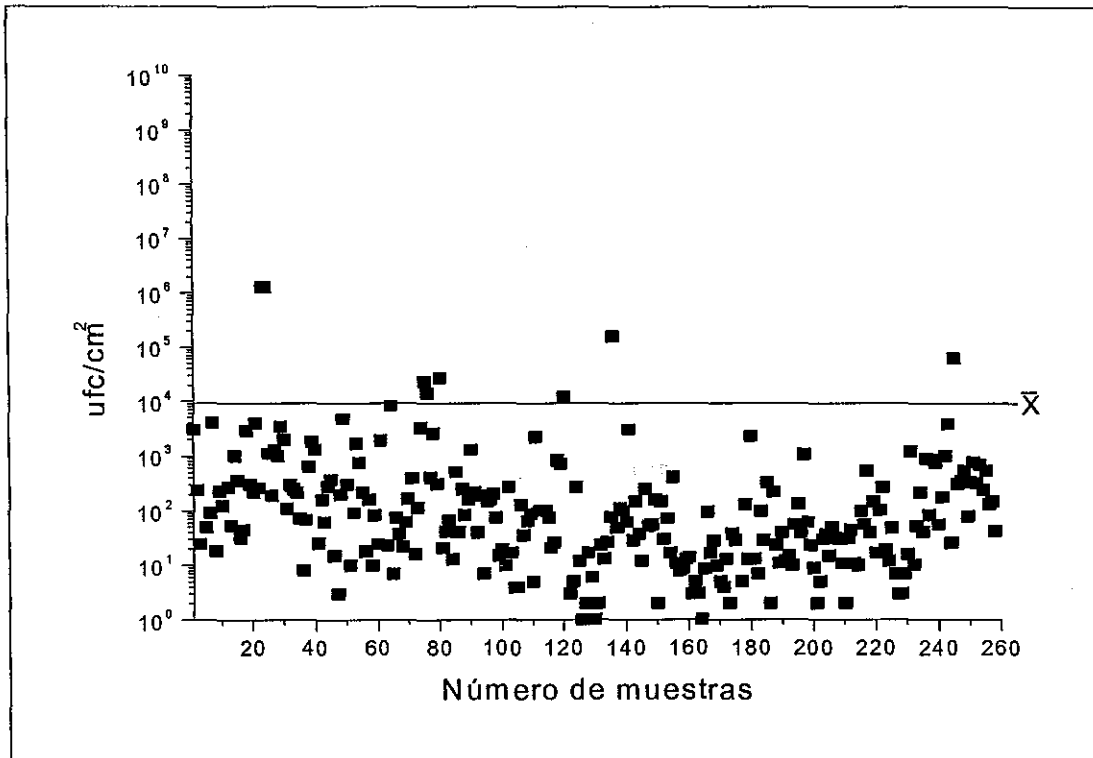


Figura 13. Coliformes fecales en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.

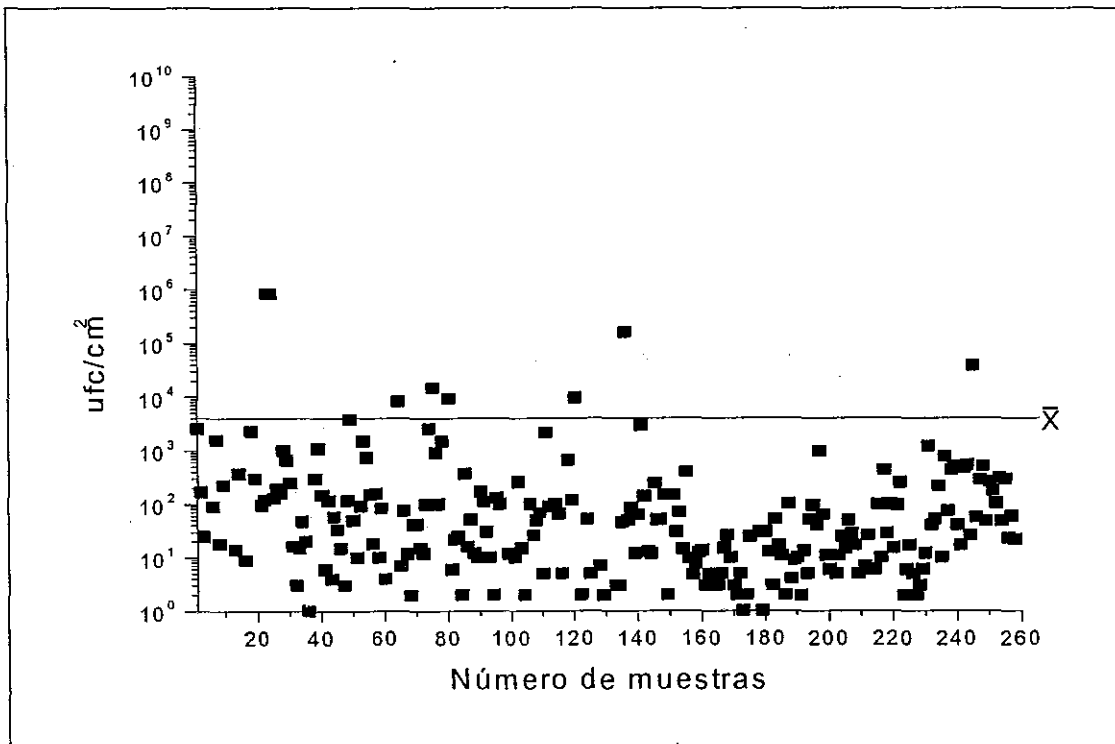


Figura 14. *E. coli* genérica en canales de bovino sacrificado en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jal.

No se encontró una correlación entre la presencia de BMA y los coliformes totales, fecales, *E.coli* genérica y *E. coli* O157. Sin embargo, sí existe una alta correlación entre los coliformes totales, fecales y *E. coli* genérica no observándose una correlación entre estos tres grupos indicadores con la presencia de *E. coli* O157. (cuadro 19)

Cuadro 19.- Análisis de correlación entre los diferentes microorganismos indicadores y *E. coli* O157

	BMA	C.T	C.F	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i> O157
BMA		0.0149 (258)	0.0155 (258)	0.0175 (258)	-0.0218 (258)
		0.8122	0.8042	0.7795	0.7277
C.T	0.0149 (258)		0.9968 (258)	0.9953 (258)	0.4321 (258)
	0.8144		0.000	0.000	0.000
C.F	0.0155 (258)	0.9968 (258)		0.9987 (258)	0.4054 (258)
	0.8042	0.000		0.000	0.000
<i>E. coli</i>	0.0175 (258)	0.9953 (258)	0.9987 (258)		0.4122 (258)
	0.7795	0.000	0.000		0.000
<i>E. coli</i> O157:H7	-0.0218 (258)	0.4321 (258)	0.4054 (258)	0.4122 (258)	
	0.7277	0.000	0.000	0.000	

8. DISCUSIÓN

8.1 Etapa I (Inspección Sanitaria)

Los resultados de las inspecciones sanitarias en el Rastro Municipal de Guadalajara mostraron que existen violaciones a las normas oficiales en diferentes grados de repercusión para la calidad de la carne, que van desde el tiempo de reposo del ganado que ingresa al rastro hasta una deficiente refrigeración. Campos en el año 2001 reportó las mismas irregularidades en el Rastro Municipal de Guadalajara. También se observó que la contaminación fecal de las canales puede ocurrir como consecuencia del contacto directo con las heces o el contacto con superficies contaminadas como la piel ya que esta puede llegar a aportar BMA y *E. coli* en cantidades de hasta 1×10^5 ufc/cm² y 1×10^2 ufc/cm² (Bell, 1997), Elder *et al.* encontraron en la piel una prevalencia de *E. coli* O157:H7 en cuatro rastros de Estados Unidos del 0 al 89% con una media de 13%, lo que indica que la piel es una fuente de contaminación importante de bacterias patógenas.

La contaminación cruzada se presentó durante todo el proceso siendo las manos y cuchillos el mecanismo de contaminación más común. Bell en 1997 determinó que la contaminación con el cuchillo y manos durante el despiece es similar a la contaminación que aporta la piel, nosotros detectamos que los esterilizadores no funcionan y no existen lavamanos próximos a los operarios. La contaminación del contenido ruminal puede operar debido a que al momento del eviscerado el operario rompe el estómago para introducir la mano y de este modo jalar y retirar estómago e intestinos, este es uno de los mayores puntos de contaminación en las canales (Anon. 1993). Gill y Landers (2004) observaron que removiendo las superficies visiblemente contaminadas se reduce notablemente el número de BMA y *E. coli*, sin embargo en el Rastro Municipal no se tiene esa práctica en las canales. En general, la contaminación bacteriana puede ocurrir durante cualquier parte del proceso como resultado de las malas prácticas de manufactura.

La suma de factores como mantas sucias, malas prácticas de manufactura, pésima refrigeración y una desorganización trae como resultados cuentas elevadas de microorganismos después del proceso con su probable pérdida de vida de anaquel y un aumento en el riesgo a la población a padecer infecciones gastrointestinales.

8.2 Etapa II (Postevisceración)

Bell (1997) investigó la contaminación de BMA en 15 zonas de la superficie de las canales. En la superficie del tarso encontró 1×10^3 ufc/cm², en la región del eviscerado 40 ufc/cm² y en la superficie del carpo 11 ufc/cm². Estos resultados son en mucho inferiores a los obtenidos en el Rastro Municipal de Guadalajara, en donde el valor máximo lo encontramos en la región del eviscerado con hasta 3.1×10^8 ufc/cm² y dos muestras positivas a *E. coli* O157:H7 (*stx*-), esto explica en parte los altos recuentos de BMA que se obtuvieron postproceso. La zona del eviscerado se considera una de las más críticas y de alto riesgo de contaminación y es una de las tres partes que marca la *Mega Red Methodology* (FSIS, 1996) para el análisis de las canales. Bell (1997) también encontró que antes y después del lavado de las canales las cargas microbianas se mantienen iguales ($P < 0.01$).

8.3 Etapa III (Postproceso)

E. coli no se encuentra naturalmente en la carne, pero ésta puede estar presente debido a la contaminación de las canales con heces fecales durante el proceso de sacrificio. Los niveles de contaminación fecal durante el sacrificio se considera en gran parte inevitable, empero las medidas de control en diferentes puntos críticos pueden prevenir esta contaminación. En nuestro estudio se presentó *E. coli* genérica con una frecuencia del 87.5% con un promedio de 7.5×10^3 ufc/cm², lo que demuestra que no se aplican medidas efectivas para prevenir la contaminación de las canales. También se encontró que 20/258 (7.56%) canales de bovino analizadas resultaron positivas a *E. coli* O157, de las cuales 7 fueron positivas a *E. coli* O157:H7 y una posee el gen *stx2*, *eaeA* y *hly₉₃₃* y 13 lo fueron para *E. coli* O157:NM sin presentar citotoxinas o factores de virulencia.

Múltiples fuentes y mecanismos de contaminación son los responsables de la diseminación de *E. coli* O157 durante el proceso (Elder *et al.*, 2000; Gun *et al.*, 2003). La presencia de ECEH en piel y heces están correlacionados significativamente con la prevalencia de este germen en las canales ($P < 0.05$) (Elder *et al.*, 2000). Nuestros resultados sugieren que el ganado bovino es un reservorio de ECEH en México como en otras partes del mundo. Elder *et al.* (2000) reportó en canales de bovino analizados postproceso una frecuencia del 2% (6 de 330) de *E. coli* O157, en las mismas muestras analizadas por Elder *et al.* (2000) Terrance *et al.* (2002) encontró *E. coli* no-O157 postproceso en 8.3% (27 de 326) canales, esto demuestra la importancia de investigar otros serotipos de *E. coli* y hacer el diagnóstico molecular para conocer la verdadera frecuencia de STEC en las canales. En Canadá 125 canales fueron analizadas y el 1.6% estaba contaminada con *E. coli* O157:H7 (Power *et al.*, 2000). En Argentina ECEH estuvo presente en el 16.3% en muestras rectales de ganado bovino y en el 21.3% de muestras de carne (López *et al.*, 1998). En Australia se detectó el 0.1% de *E. coli* O157:H7 en 812 canales de bovino procedentes de 21 rastros dedicados a la exportación (Phillips *et al.* 2001). La mayor fuente de patógenos en las plantas procesadoras de carne de bovino es la piel y el estiércol (Barkocy *et al.* 2001). La tasa de portadores de esta bacteria es mayor en animales jóvenes que en adultos con una concentración en las heces entre 100 y 10,000 ufc/gr. (Zhao *et al.*, 1995). La bacteria se aloja preferentemente en el tracto gastrointestinal, aunque no coloniza la mucosa ni muestra patogenicidad a estos animales (Cornick *et al.* 2002).

En el Rastro Municipal de Guadalajara solamente una *E. coli* O157:H7 presentó todos los genes de patogenicidad y *stx2*. Las cepas que producen *stx2* o ambas toxinas están más comúnmente asociados con enfermedades en humanos que las que producen solamente *stx1* (Strockbine *et al.*, 1988). Las cepas que producen *stx2* están más frecuentemente asociadas a casos de HUS que las cepas que expresan *stx1* solamente (Griffin and Tauxe., 1991).

López *et al.* (1998) en Argentina analizó de 50 muestras de carne de bovino obteniendo 686 cepas de *E. coli*, el 21% de las cepas aisladas fueron *stx* (+) siendo el más

frecuente la *stx2* (80%), en este estudio se registró una frecuencia de STEC del 1.36%. Chinen *et al.* (2001) en Argentina encontró una frecuencia de *E. coli* O157:H7 del 3.9% en 279 muestras de carne bovino. Se sabe que en Argentina existe un mayor riesgo de contagiarse con ECBH, de hecho la ciudad de Buenos Aires tiene una de las tasas más altas en el mundo de síndrome urémico hemolítico en niños 22/100,000 por año (López, *et al.*, 1998, 1995).

Schurman *et al.* (2000) determinó que el 0.4% (4/1000) de ganado sacrificado en la Isla Prince Edward tenía *E. coli* O157:H7. Dos cepas fueron *stx1* y *stx2*, mientras que las otras dos tenían solamente un gen *stx1* o *stx2*. Contrastando con el presente estudio, el 0.68% de las cepas presentó el gen *stx1* y ese mismo porcentaje para el gen *stx2*, en ninguna de las cepas se presentaron ambos genes, por lo que podemos observar que la frecuencia de ECEH es menor a las encontradas en otros países como Canadá.

Zhou *et al.* (2002) aisló y caracterizó *E. coli* O157:H7 en 2 (5%) de 40 muestras de canales en Changchun, China; ellos descubrieron que dos cepas fueron positivas a la presencia de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*. Cuando comparamos nuestro estudio con el de Zhou *et al.* encontramos que no hay una diferencia significativa entre los resultados, la similitud se presenta también en la epidemiología ya que en China, al igual que en México, no se tienen reportes de casos clínicos en humanos de ECEH.

En nuestro estudio, en una canal (0.38%) se aisló *E. coli* no-O157 y ésta presentó solamente el gen *stx1* que carecía de factores de virulencia intimina (*hly₉₃₃*) y/o hemolisina (*eaeA*). Muchas cepas de *E. coli* no-O157 están claramente asociadas con brotes y enfermedades esporádicas en humanos y llegan a carecer del gen *eae* o el plásmido pO157 (Willshaw *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1996; Paton and Paton., 1998). Uno de los serogrupos de STEC *eae*-negativo asociado con enfermedades en humanos es el O113 y particularmente el serotipo O113:H21 (Karmali, 1989; Paton, *et al.*, 1998). Hu *et al.* (1999) encontraron en un cepario de referencia de *E. coli* no-O157:H7 que el 66.6% tenía *stx1* y el 12.12% poseía *stx2* y ninguna presentó el gen para la intimina y hemolisina. También se ha demostrado que la dosis letal de *stx2* es 50% menos potente que *stx1*

administrado a ratones (Tesh *et al.* 1993). Rogerie *et al.* reportó al igual que nosotros una baja frecuencia de *E. coli* non-O157 postproceso (1.9%) en rastros de Francia. Estudios similares se registraron en Hong Kong donde la frecuencia fue del 1.7% (Leung, *et al.* 2001). Terrance *et al.* (2002) analizaron la prevalencia de *E. coli* no-O157 en cuatro plantas procesadoras de carne de bovino en Estados Unidos, el estudio puso en evidencia una frecuencia de *E. coli* no-O157 STEC de 53.9% ($n = 334$) previo a la evisceración y el 8.3% ($n = 326$) postevisceración, el total de muestras positivas en este estudio incluyendo el serotipo O157:H7 que fue analizado por Elder *et al.* (2000) fue del 71.9% en la preevisceración y 10.1% en la postevisceración. La investigación de Terrance *et al.* (2002) también demostró una reducción importante de *E. coli* O157:H7 y no-O157 STEC, esto debido a la utilización de métodos antimicrobianos después de la evisceración en las distintas plantas en estudio. En el Rastro Municipal de Guadalajara no se aplican métodos antimicrobianos en ninguna parte del proceso, a pesar de eso la frecuencia que encontramos es mucho menor ($P < 0.05$), que la reportada en Estados Unidos.

Se han realizado cuantiosos estudios para descontaminar canales de bovino aplicando diferentes tratamientos con ácidos orgánicos como el ácido láctico (Castillo *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 1999). A pesar de que en la industria se encuentran disponibles algunos productos, éstos no se aplican en las canales del Rastro de Guadalajara como se mencionó anteriormente, sin embargo es importante recalcar que estos productos se aplican para reducir patógenos, no para enmascarar malas prácticas de manufactura, por lo tanto su aplicación es congruente después de la implementación de buenas prácticas de manufactura y procedimientos estándar de saneamiento en el rastro.

En Estados Unidos, un estudio realizado de octubre de 1992 a septiembre de 1993 en 2100 canales de bovino provenientes de plantas tipo inspección federal reveló una frecuencia de *E. coli* O157:H7 del 0.2% en 2081 muestras (USDA Nationwide Beef, 1994), esta frecuencia es mucho menor a la encontrada años después por Elder *et al.* (2000) y Terrance *et al.* (2002), argumentando estos autores que el incremento se debe principalmente a que las técnicas que emplearon son más sensibles y además se analizaron cepas de *E. coli* no-O157 STEC. En este mismo estudio también se encontró que el 96.4%

de las canales analizadas contenían 100 coliformes por cm^2 y el 95.9% estaban contaminadas con hasta 10 *E. coli* (Biotipo I) por cm^2 y *Salmonella* 1.0% /2089. En esta investigación, al igual que la nuestra, no se observó una correlación entre la presencia de *E.coli* O157:H7 y los microorganismos indicadores.

En este estudio la prevalencia de *E. coli* O157 y no-O157 STEC fue similar a lo reportado por Barkocy-Gallagher *et al.* (2003), donde ellos encontraron una alta prevalencia de *E. coli* O157:H7 en canales antes del eviscerado en la primavera y verano ($p < 0.05$). Chapman *et al.* (2001) también reportó un alto aislamiento de *E. coli* O157 de animales, canales y muestras de carne durante el verano. Por otra parte, la epidemiología indica que los casos de STEC en humanos tienden a incrementarse durante los meses cálidos (CDC, 2002).

Campos Bravo y Ramírez Álvarez en 1993 analizaron 80 muestras de canales de bovino del Rastro Municipal de Guadalajara, donde encontraron BMA de 8×10^2 a 8.4×10^5 ufc/ cm^2 inmediatamente después del sacrificio, los cuales difieren de nuestra investigación ya que en nuestro trabajo el recuento promedio de BMA fue de 6.5×10^7 ufc/ cm^2 , puesto que se tomaron las muestras después de la deficiente refrigeración y el mal manejo de las canales en las cámaras de enfriamiento favoreciendo a un incremento de las BMA en las canales.

Un estudio realizado en Australia por Phillips *et al.* (2001) en 2 tipos diferentes de rastros (exportación y domésticos) encontró que de 812 canales de bovino procedentes de 21 rastros dedicados a la exportación se detectó el 0.1% de *E. coli* O157:H7 y 11.3% de *E. coli* genérica., mientras que en 7 rastros para consumo doméstico se analizaron 273 canales resultando negativo a *E.coli* O157:H7 y *E. coli* genérica se encontró en el 8.8% de las canales analizadas. Sumner y col. (2003) realizaron un estudio en sur de Australia donde comparan los recuentos de BMA y *E. coli* tipo I en carne de bovino proveniente de dos tipos de rastros (pequeños y grandes) no encontrando diferencias en la media de los recuentos de BMA $\log. 1.72/\text{cm}^2$ y $1.81/\text{cm}^2$, sin embargo la prevalencia de *E. coli* fue mayor en los rastros grandes 28.4% que en los pequeños 8.4%. Comparando esta

investigación con la nuestra, observamos que los recuentos que obtuvimos son superiores a los encontrados por este autor.

El departamento de agricultura de los Estados Unidos en el programa de verificación de HACCP (USDA, 1996) establece límites para las BMA, la cual menciona como rango aceptable ($\log. \text{ ufc/cm}^2$) <2.8 , rango marginal $2.8-4.3$ y como rango inaceptable >4 . Bajo este criterio, el 100 % de las canales analizadas ($n = 258$) estuvieron en el límite inaceptable lo que indica que no se cumplen con criterios internacionales de calidad. El diario oficial de las comunidades Europeas establece como valor inaceptable para BMA $\log. >5 \text{ ufc/cm}^2$ donde solamente el 2.3% (6/258) estuvieron por debajo de ese valor.

En los métodos utilizados para aislar *E. coli* O157 (Inmunocaptura y FDA) se encontró que los dos son estadísticamente iguales ya que no se observó una diferencia estadística significativa entre ellos, este resultado es similar al reportado por Sanderson *et al.* (1995) donde comparó estos dos métodos para recuperar *E. coli* O157:H7 inoculada en canales de bovinos. En contraste otras investigaciones han reportado que la técnica de Inmunocaptura es más sensible que la de vaciado en placa para la detección de *E. coli* O157 inoculada y no inoculada en estiércol y carne. (Chapman *et al.*, 1994; Bennett *et al.*, 1996; Fratamico *et al.*, 1992; Fratamico *et al.*, 2000; Tutenel *et al.*, 2003). El haber utilizado solamente la técnica de Inmunocaptura hubiera resultado en una baja frecuencia de *E. coli* O157. La técnica de Inmunocaptura ha mostrado un gran incremento y sensibilidad de detección en una gran variedad de ambientes, los falsos negativos se presentan entre el 2-10% dependiendo del inóculo, flora asociada y tipo de muestra, la sensibilidad de la técnica es de 100 células de *E.coli* O157 con un alto número de microorganismos de flora asociada 10^6 o más por mililitro (AOAC 8th edition; Bolton *et al.*, 1995; Chapman *et al.*, 1993; Chapman y Siddons, 1994; Chapman *et al.*, 1994; Chapman *et al.*, 1997; Grif *et al.*, 1998; Takahiro, 1998).

En cuanto a los medios de cultivo por la técnica de Inmunocaptura, 11 cepas se aislaron por el medio CHROMagartm O157 y 2 por el medio Agar MacConkey sorbitol +

telurito y cefixima y por el método de la FDA 4 cepas se aislaron en Agar *E. coli* O157 y 4 en Agar MacConkey sorbitol + telurito y cefixima, según los datos obtenidos el CHROMagartm fue el mejor medio de cultivo, en un estudio realizado por Bettelheim en 1998 encontró que 93/105 cepas de *E. coli* O157 presentaron el color característico (Rosa) en el CHROMagartm y de estas 90 cepas fueron stx (+), 10 cepas fueron de color azul y stx (-) quizás esto explique en parte el porque algunas cepas no se aislaron en CHROMagartm e incluso por el método de Inmunocaptura.

9. CONCLUSIONES.

1.- Este es el primer reporte en México de *E. coli* productora de toxina tipo shiga O157:H7 y no-O157 aislado en canales de bovino postproceso.

2.- Se detectaron también 6 canales con *E. coli* O157:H7 y 13 canales con *E. coli* O157:NM sin presentar factores de virulencia.

3.- En la zona del eviscerado (postevisceración) 2/10 canales dieron positivo a *E. coli* O157:H7 sin presentar genes de virulencia lo que sugiere un punto de contaminación importante durante el proceso de obtención de la carne.

4.- El 60% de las cepas se aisló por la técnica de Inmunocaptura y solamente el 40% se aisló por la técnica de la FDA no habiendo diferencias significativas entre ellas ($P < .05$), y el CHROMagar® fue el mejor medio de cultivo para recuperar *E. coli* O157 ($P > .05$)

5.- En el total de las canales las BMA postproceso se encuentran como valores inaceptables según lo referido por la USDA.

6.- El aporte de microorganismos indicadores es elevado durante el proceso (desollado, eviscerado, enmantado y refrigeración) siendo la suma de estos y de las malas prácticas de manufactura el factor más importante para que se presenten los recuentos microbianos altos.

7.- No se encontró una correlación positiva entre la presencia de BMA y los coliformes totales, fecales, *E. coli* genérica y *E. coli* O157. Sin embargo, sí existe una alta correlación entre los coliformes totales, fecales y *E. coli* genérica no observándose una correlación positiva entre estos tres grupos indicadores con la presencia de *E. coli* O157.

8.- Los recuentos elevados de microorganismos indicadores y la presencia de *E. coli* STEC enfatizan la importancia de implementar el sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control, así como la necesidad de evaluar, validar e implementar intervenciones con tratamientos antimicrobianos para reducir la presencia de patógenos y el riesgo potencial a la salud pública.

10. Bibliografía.

Anon. 1993 National Advisory committee of microbiological criteria for foods, US Department of Agriculture – Generic HACCP for raw beef. Food Microbiology 10:449-488.

Anónimo. 1991 Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por Alimentos: Actividades Regionales. Bol. Of. Sanit. Panam. 111(3).

Acheson, D.W., R. Moore, S. De Breucker, L. Lincicome, M. Jacewicz, E. Skutelsky, G. T. Keusch. 1996. Translocation of shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. Infect. Immun. 64(8):3294-3300

Aquino Andrade, A., Vázquez Salinas, C. y Quiñónez Ramírez E. 2003. Búsqueda de *Escherichia coli* O157 en agua y alimentos. Quinto Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos. Guadalajara, Jal. Méx.

AOAC. 1998. 8th edition, Bacteriological Analytical Manual (BAM). AOAC International, Arlington VA.

Barckocy-Gallagher, G. A., Terrance, M. A., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., 2003. Seasonal prevalence of shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants. J. Food Prot. 66, 1978-1986.

Bean, N., Griffin, P. M. 1990. Foodborne Disease Outbreaks in the United States, 1973-1987: Patogens, Vehicles, and Trends. Journal of Protection, Vol. 53-804-815.

Bennett, A. R., MacPhee, S., Betts, R. P., 1996. The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of Immunomagnetic separation and immunoassay procedures. Lett. Appl. Microbiol. 22, 237-243.

Bell C. 2002. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). International Journal of Food Microbiology.78: 197-216.

Bell R. G. 1997. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. Journal of Applied Microbiology 82, 292-300

Bolton, E. J., Crozier, L. and Wilkinson, J.K. 1995. Optimization of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from beef-burgers. PHLS Microbiology Digest 12, 67-70.

Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, J. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Wells, J. G. and Griffin, P. M. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh pressed apple cider. JAMA 269:2217-2220

Bettelheim, K. A. 1998. Reliability of CHROMagartm O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. Journal of Applied Microbiology 85:425-428.

Bolton, F. J., Crozier, L., Williamson, J. K., 1996. Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. Letters in Applied Microbiology 23, 317-321.

Borie, C. F., Z. Monreal, J. Arellano, V. Prado. 1997. Detection and characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in slaughtered cattle. Zentralbl. Veterinarmed. 44(5):273-279.

Brown, C.A., Harmon, B. G., Zhao, T. and Doyle, M. P. 1997. Experimental *Escherichia coli* O157:H7 carriage in calves. Appl. Environ. Microbiol. 63:27-32.

Cabrera Díaz E., Márquez González M., Oliva Cervantes F., Zepeda López H., y Torres Vitela M. R. 2000. Frecuencia de aislamiento de *Escherichia coli* O157 en ganado bovino del estado de Jalisco. Memorias del Segundo Congreso Internacional Sobre Inocuidad de Alimentos. Guadalajara, Jal. 10 y 11 de Nov.

Calderwood, S.B. 1994. Section II Overview-Toxin Structure-function, receptors, cell biology in recent advances in Verocitotoxin-Producing *Escherichia coli* infections. Karmali, M. A. And G. Goglio (ed.) Elsevier Science B.V. 119-122

* Campos Bravo C.A. 2001. Análisis de riesgos sanitarios y control de puntos críticos en el proceso de obtención de carnes bovina y porcina. Tesis de maestría en Ciencias Pecuarias. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Campos Bravo C. A., Ramírez Álvarez A. 1993. Recuento de Mesófilos Aerobios por cm² en Canales de Bovino y Porcino. X Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal. 5, y 6 de Noviembre de 1993.

Caprioli, A., Tozzi, A, E. 1998. Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection in Continental Europe. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington, DC, pp. 38-78.

Carl Vanderzant 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. American Public Health Association.

Carnetec 2002. Aturdidor de Ganado EFA. Carnetec Vol. 9 -2 Pág. 5

Castillo Ayala, A; Rodríguez García, M. O.; Corona Munguía, G. y García Barajas, V. 1994. Incidencia de *Aeromonas spp* y *Campylobacter spp* en carnes crudas de res y cerdo obtenidas en carnicerías de Guadalajara. XI Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara Ja. 4 y 5 de Noviembre de 1994.

Castillo, A., Lucia, L.M., Goodson, K.J., Savell, J.W. and Acuff, G. R. 1999. Decontamination of beef carcass surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. J Food Prot. 62(2):146-51.

Castillo, A., Lucia, L.M., Goodson, K.J., Savell, J.W. and Acuff, G.R. 1998. Comparison of water wash, trimming and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. J Food Prot. 61(7):823-8.

CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) 1999. Surveillance for Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection Summary of 1998 Data. Public Health Service. Atlanta, GA. 30333 March 8, 1999 pp 1-4.

Centers for Disease Control., 2002. Foodnet 2000. Annual Report. Foodnet active surveillance project. Available at: http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2000/2000_summary.htm.

Cerqueira, A. M. F., Guth, B. E. C., Joaquin, R. M., Andrade, J. R., 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. Veterinary Microbiology 70, 111-121.

Cornick, A. N., Booher, , L. S. and Moon W. H. 2002. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. Infection and Immunity. 70:2704-2707.

Cray, W. C. and Moon, H. W. 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7 Appl. Environ. Microbiol. 61:1586-1590.

Chaldek, R. B. 1982. A review of Human salmonellosis. III Magistrate of *Salmonella* infection in the United states, rev. Infec. Dis 10:III-124.

Chapman, P. A., Wright, D. J. And Higgins, R. 1993. Untreated milk as a source of verotoxigenic *Escherichia coli*. Veterinary Record 133, 171-172.

Chapman, P. A., Siddons, C. A., Zadik, P. M. and Jewes, L. 1991. An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 . Journal of Medical Microbiology 35: 107-110

Chapman, P. A., Wright, D.J. and Siddons, C.A. (1994) A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. Journal of medical Microbiology 40, 424-427.

Chapman P. A. 2000. Sources of *Escherichia coli* O157 and experiences over the past 15 years in Sheffield, UK. J. Appl. Microbiol. 88 Suppl:51S-60S

Chapman, P. A., Cerdan Malo, A. T., Hellín, M., Ashton, R., Harkin, M. A., 2001. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK. Int. Journal of Food Microbiol. 64, 139-150

Chapman. P. A., A. T. Cerdan Malo, C. A. Siddons, and M. Harkin. 1997. Use of commercial enzyme immunoassay and immunomagnetic separation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples. Applied and Environmental Microbiology Vol. 63 N°7 p. 2549-2553 AOAC 8th edition

Chinen, I., Tanaro, J. D., Miliwebsky, E., Lound, L. H., Chillemi, G., Ledri, S., Baschkier, A., Scarpin, M., Manfredi, E., and Rivas, M. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. Journal of Food Protection, Vol. 64, No. 9 pag. 1346-1351.

Christopher J. L., Murray y Alan D. López. 1995. Patrones de distribución mundial y regional de las causas de defunción en 1990. Bol. Oficina Sanit. Panam. 118(4), 1995.

D'Aoust, J. Y., Park, C. E., Szabo, R. A. 1988. Thermal inactivation of *Campylobacter* species, *Yersinia enterocolitica*, and hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in fluid milk. J. Dairy Sci. 71:3230-3236

Department of Agriculture (USDA) Federal Register, 1996. Appendix E- FSIS Sample Collection guidelines and procedure for isolation and identification of *Salmonella* from Raw Meat and Poultry Products. Vol. 61, No. 144.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2001. Normas para los controles regulares de la higiene realizados por los exploradores de establecimientos, de conformidad con la directiva 64/433/CEE, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios de carne fresca, y con la directiva 71/118/CEE, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios de carnes frescas de aves de corral. 8 de Junio del 2001.

Doyle, M. P. and Schoeni, J. L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Applied and Environmental Microbiology 48:855-856

Doyle, Michael P. 1989. Foodborne Bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc. New York and Base. Pp. 236-271.

Doyle, M.P., Schoeni, J. L. 1984. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Applied and Environmental Microbiology. 48:855-856.

Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A., Koohmaraie, M., Laegreid, W. W., 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2999-3003.

Feng, P. and Monday, S. R. 2000. Multiplex PCR for the detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. Molecular and Cellular Probes Vol. 14, p. 333-337

Feng, P. 1995. *Escherichia coli* serotype O157:H7. Novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. Emerging Infectious Diseases 1(2):47-52

Fernández Escartín, E., Saldaña Lozano, J. y Mireles Hernández, C. 1983. Incidencia de *Salmonella* en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación de microorganismos. Rev. Lat-amer. Microbiol 25: 263-269.

Fernández Escartín, E., Y Mireles Hernández (1983) fuentes de contaminación de *Salmonella* en empacadoras de carne, XIV Congreso Nacional de Microbiología.

Fernández Escartín E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Pág. 217-231

Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological Analytical Manual. AOAC International, Mayland, USA.

Fratamico, P. M., Schultz, F. J., Buchanan, R. L., 1992. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of food using an immunomagnetic separation method. 9, 105-113.

Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., Deng. M. Y., 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33, 2188-2191.

Fratamico, P. M., Strobaugh, T. P., 1998. Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21:92-98.

Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Pepe, T., 2000. A multiplex polymerase Chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine faeces. J. Food. Prot. 62, 1032-1037.

FSIS., 1996. Pathogen reduction: Hazard analysis and critical control point (HACCP) systems: VII final rule. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Washington, D.C. Federal Register. Vol. 61 No. 144, 38806-38989.

Garay Martínez, L. E., Partida Gutierrez, G., Cabrera Díaz, E. y Torres Vitela, M. 2003. Frecuencia de *Listeria* spp. *Escherichia coli* O157:H7 y *Brucella* spp. en leche cruda. Quinto Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos. Guadalajara, Jal. Méx.

Gannon, V. P., D'Souza, S., Graham, T., King, R. K. and Read, S. 1997. Use of the flagellar H7 gene as target in multiplex PRC assay and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 656-662.

Gill, C. O., Landers, C. 2004. Microbiological conditions of detained beef carcasses before and after removal of visible contamination. *Meat. Science* 66:335-342

Grif, K., M. P. Dierich and F. Allerberger. 1998. Dynabeads™ plus 3 M Petrifilm HEC™ Versus Vetek Immunodiagnostic Assay System™ for detection of *E. coli* O157 in minced meat. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 199-204

Griffin, P. M., B. P. Bell, P. R. Cieslak, J. Tuttle, T. J. Barrett, M. P. Doyle, A. M. McNamara, A. M. Shefer, and J. G. Wells. 1994. Large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in the western United States: The big picture, P. 7-12. In M. A.

Griffin, P. M., and Tauxe R. V. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 13:60-98.

Gun, H., Yilmaz, A., Turker, S., Tanlasi, A., Yilmaz, H., 2003. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. *Int. J. Food Microbiol.* 84:339-334.

Gutiérrez Pulido, H., Vara Salazar, R., 2004. Análisis y Diseño de Experimentos. Ed. McGraw Hill Interamericana. P. 3-115

Gyles, Carlton., Roger, Johnson., Anli, Gao., Kim, Ziebell., Denis, Pierard., Stojanka, Aleksic, and Patrick Boerlin. 1998. Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 64 N°11 p. 4134-4141.

Karmali and A. G. Goglio. 1999. Recent Advances in Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Infections. Elsevier, New York.

Karmali, M. A., 1989. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2:15-38.

Kobayashi, Hideki., Jun, Shimada., Muneo, Nakasawa., Tetsuo, Morozumi., Tarja, Pohjanvirta., Sinikka, Pelkonen, and Koshi, Yamamoto. 2001. Prevalence and characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 67 N°1 p. 484-489.

Kauppi, K. L., Tatini, S. R., Harrell, F. Influence of substrate and low temperature on growth and survival of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*. 1996. 13: 397-405.

Hancock, D. D., Rice, D. H., Herriot, D. E. et. al. 1997 Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in cattle. *J. Food Prot.* 60:363-366

Hu, Y., Zhang, Q., and Meitzler, J, C. 1999. Rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces by a multiplex PCR. *J. of Applied Microbiology*. 87:867-876.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) 1996. *Microorganisms in Foods 5 Characteristics of Microbial Pathogens*. De. Blackie Academic and Professional pp. 147-165

Informe Semanal de Epidemiología. 1994. Semana N. 51 del 20 al 26 de Diciembre de 1994. Dirección General de Epidemiología.

Jackson, M. P. and A. D. O'Brien. 1994. Structure-function relationships of shiga toxin and the Shiga-Like to bacterial Enterotoxins and Ribosome-Inactivating proteins. In recent advances in Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* infections. Karmali, M. A. And G. Goglio (ed.) Elsevier Science B.V. 123-130

Johnson J. L., Rose, B. E., Sharar A. K., Ransom G. M. Lattuada C. P, Mcnamara A. M. 1995. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 Associate with a food-borne disease outbreak. *Journal of Food Protection* Vol. 58 N° 6 p. 597-603.

Johnson, R., Clarke, R., Wilson, J., Read, S., Rahn, K., Renwick, S., Sandhu, K., Alves, D., Karmali, M., Lior, H., McEwen, S., Spika, J., Gyles, C., 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 59:1112-1122.

Karpman, D., A. Hakansson, M. T. Perez, C. Isaksson, E. Carlemanlm, A. Caprioli, C. Svanborg. 1998. Apoptosis of renal cortical cell in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo in vitro studies. *Infect. Immun.* 66(2):636-644.

Karmali; M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev* 2: 15-38

Lai, X. H., J. G. Xu, S. Melgar, B.E. Uhlin. 1999. An apoptotic response by j774 macrophage cells in common upon infection with diarrheagenic *Escherichia coli* FEMS Microbiol. Lett. 1;172(1):29-34

Leung, P. H., Yam, C., Ng, W. W., and Peiris, J. S. 2001. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. Epidemiol. Infec. 126:173-179

López, L. E.; Contrini, M. M., and De Rosa M. F. 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain. ASM Press. Pag. 30-35.

López, E. L., M. M. Contrini, S. Devoto, M. F. De Rosa, M. G. Grana, L. Aversa, H. F. Gómez, M. H. Genero, and T. G. Cleary. 1995. Incomplete hemolytic uremic síndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. J. Pediatr. 127:364-367.

Lingwood, C. A. 1994. Verotoxin recognition of its Glycolipid receptor, globotriaosylceramide: role in pathogenesis. 131-137 in recent advances in Verocitotoxin-Producing *Escherichia coli* infections. Karmali, M. A. And G. Goglio (ed.) Elsevier Science.

Lingwood, C. A. Mylvaganam. M., Arab, S., Khine, A., Magnusson, G., Grinstein, S. and P.—G. Nyholm 1998. Shiga Toxin (Verotoxin) binding to its receptor glycolipid: 129-137 in *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Ed. By James B. Kaper and Alison D. O'brien, 1998 American Society for Microbiology, Washington, D.C.

McEvoy, J. M., Doherty, A. M., Finnerty, M., Sheridan, J. J., McGuire, L., Blair, I. S., McDowell, D. A., Harrington, D., 2000. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. Lett. Appl. Microbiol. 30:390-395.

Meng J, Zhao S, Doyle MP, Mitchell SE, Kresovich S. 1997. A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl. Microbiol Mar,24(3):172-176.

Mead, P.S., S Lutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M. and Tauxe, R.V. 1999. Food- related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases p. 607-625.

Miller, Y. R., J. E. Freud. and R. Johnson. 1992. Probabilidad y estadística para ingenieros 4 de. Prentice-Hall México.

Morán Roberto. 2000. Respuesta al Problema de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. II Congreso Internacional de inocuidad de Alimentos, XVII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Guadalajara, Jal. 10 y 11 de Noviembre del 2000

Nabbet. N. H. 1988. The *Salmonellae*, isolation, Occurrence, and Distribution in Lebanon. Dairy and Food Sanitation 8: 8-10.

O'Brien, A.D., M.A. Karmali and S. M. Scotland. 1994. A proposal for rationalizing the nomenclature of the *Escherichia coli* 147-149. In recent advances in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. Karmali, M. A. And A.G. Goglio (ed). Elsevier Science

Organización Panamericana de la Salud. 1983. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Abram S. Benenson (Editor), Washington, D.C., Publicación Científica Número 442.

Organización Panamericana de La Salud .1998. <http://www.phao.org>

Organización Panamericana de La Salud .1996. La epidemiología del cólera en América Latina en 1995. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Año 75, Vol. 121, No. 4

Organización Mundial de la Salud. 1998. [Http://www.who.ch](http://www.who.ch) página consultada el día 18 de marzo de 1988

Padhye, V. N., Doyle M. P., 1992. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. J. food Prot. 55: 555-565.

Park, S., Worobo, R. W., Durst, R. A., 1999, *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. Critical Reviews in food Science and Nutrition 39, 481-502.

Parrilla Cerrillo Mc, Vásquez Castellanos JL. 1993. Brotes de Toxiinfecciones alimentarias de origen Microbiano. Laboratorio Nacional de Salud Pública en México. Vol. No. 5

Parrilla, M. C. 1993 Brotes de intoxicaciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública Méx. 35: 456-463.

Paton, A. W., R. M. Ratcliff, R. M. Doyle, J. Seymour-Murray, D. Davos, J. A. Lanser, and J. C. Paton. 1996. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 34:1622-1627.

Paton, A. W., Paton, J. C., 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays *Stx*₁, *Stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O157}. J. Clin. Microbiol. 36:598-602.

Porter, J., K. Mobbs., C.A. Hart., J. R. Saunders., R. W. Pickup and Edwards 1997. Detection, distribution and probable fate of *Escherichia coli* O157 from asymptomatic cattle on a dairy farm Journal of Applied Microbiology 83, 297-306.

Power, C. A., Johnson, R. P., Mcewen, S. A., McNab, W. B., Griffiths, M W., Usborne, W. R., De Grandis, S. A., 2000. Evaluation of the reveral and SafePath rapid *Escherichia coli* O157 detection tests for use on bovine feces and carcasses. J. Food Prot. 63, 860-866.

Prado, V. 1996. Enterohemorrhagic *E. coli*, the most important cause of HUS in Chilean children. Not. Ist. Superiore Sanita 9 (Suppl. 1):3

Rice, D. H., Ebel, E. D., Nacock, D. D. 1997. *Escherichia coli* O157 in cull dairy cows on farm and at slaughter. J. Food Prot. 60:1386-1387

Richard Kimura, Robert E. Mandrell, John C. Gallard, Doreene Hyatt, Lee W. Riley. 2000. Restriction-site-specific PCR as a rapid test to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, Vol.66 N°6 p. 2513-2519.

Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P., and Lange. 2001. Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. Int. J. Food Microbiol. 63:217-223.

Rowe, M. T., and Kirk, R. 1999. An investigation into the phenomenon of cross-protection in *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiology. 16: 157-164.

Sanderson, M. W., Gay, J. M., Hancock, D. D., Gay, C. C., Fox, L. K., Besser, T. E., 1995. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. J. Clin. Microbiol. 33, 2616-2619.

Schelotto, F., Varela, G., Amorín, M. B., Betancor, L., Selza, V. 1996. *E. coli* Verotóxico en el Uruguay, Relaciones Huésped-Parásito, p. 60-61. In I. Mera (ed.), 1 Simposio de infectología pediátrica del cono sur, Montevideo, Uruguay.

Schurman, R, D., Hariharan, H. Heaney, S, B., and Rahn, K. 2000. Prevalence and characteristics of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef cattle slaughtered on Prince Edward Island. J. of Food Protection. 63:1583-1586.

Sears, C. L., and J. B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol. Rev. 60:167-215.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Norma Oficial Mexicana. NOM-EM-09-ZOO-1994. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Diario Oficial de la Federación. 22 de Dic. 1994 México, D. F.

Secretaría de Agricultura Ganadería y desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-009-ZOO-1994. Proceso Sanitario de la Carne. Diario Oficial de la federación, 16 de Noviembre de 1994. México, D. F.

Secretaría de Agricultura Ganadería y desarrollo rural NOM-008-ZOO-1994. Modificación a la norma oficial Mexicana NOM-008-ZOO-1994 Especificaciones Zoonosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos. Diario Oficial de la federación, 10 de Febrero de 1999. México D. F.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Norma Oficial Mexicana. NOM-EM-003-SARH2-1994. Que establece con carácter de obligatoriedad las especificaciones para la verificación de carne, canales y vísceras en puntos de verificación zoonosanitaria Diario Oficial de la Federación . 27 de Abril de 1994. México. D. F.

Secretaría de Salud. 2000. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, semana 52.

Secretaría de Salud. 2001. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, semana 52.

Secretaría de Salud. 2002. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, semana 52.

Secretaría de Salud. 2003. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, semana 53.

Secretaría de Salud. 2004. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica, semana 52.

Secretaría de Salud 1992. Manual para la vigilancia Epidemiológica del cólera en México.

Semanchek, J.J., and Golden, D.A. 1996. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during fermentation of apple cider. Journal of Food Protection. 59: 1256-1259.

Sumner, J., Petrenas, E., Dean, P., Dowsett, P., West, G., Wiering, R., Raven, G. 2003. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. International Journal of Food Microbiology 81, 255-260.

Spika, J. S., Khakhira, R., Michel, P., Milley, D., Wilson, J., Waters, J. 1988. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Canada. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington, DC, pp. 23-29.

Strockbine, N. A., Wells, J. G., Bopp, C. A., Barrett, T. J., 1988. Overview of detection and subtyping methods. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington, DC, pp. 331-356.

Tanya, L. Maclaurin., Donald, J. Maclaurin and Loi Sho Loi. 2000 Impact of Food-borne illes on food safety concerns of international air travelers. *Tourism Economics*, 6(2). 169-185.

Takahiro Tomoyasu. 1998. Improvement of the Immunomagnetic separation method selective for *Escherichia coli* O157 strains. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 64 N°1 p. 376-382

Tauxe, R. 1992. *Salmonella* on pathogens. *Journal of Food Protection*. Vol. 54.

Tauxe, R. 2002. Emerging foodborne pathogens. *Int. J. Food. Microbiol.* 78(1-2):31-41

Tarr, P. I. 1993 *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: Western United Stated. *Dairy Food Environ. Sanit.* 14:372-373

Tesh, V. L., Burriss, J. A., Owens, J. W., Gordon, V. M., Wadolkowski, E. A., O'Brien, A. D., and Samuel, J. E. 1993. Comparison of the relative toxicities of Shiga-Like toxins type I and Tipe II for mice. *Infect. Immun.* 61:3392-3402.

Thomas A. Cebula, William L. Payne, and Peter 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. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 33 N°1 p. 248-250.

Tilden, J., Jr, Young, W., McNamara, A., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B., Hollingsworth, J. And Morris, J. G., 1996. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health* 86, 1142-1145

Timoney, J. F., And A. Abston. 1984. Acumulation and Elimination of *E. Coli* and *S. typhimurium* by hard clams in an in vitro system. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 1004.

Tsukamoto T, Kawai T. 1998. Identification of *Escherichia coli* O157 antigen by polymerase chain reaction. *Kansenshogaku Zasshi* Jul;72(7):738-741.

Tutenel, A. V., Pierard, D., Vandekerchove, D., Van Hoof, J., De Zutter, L., 2003. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 94, 341-346.

UNAM. 1994. Memorias del curso "Actualización en la tecnología y diseño de mataderos y salas de deshuese" impartido en la facultad de estudios superiores Cuautitlán

USDA. 1994. Nationwide Beef Microbiological Baseline Data Collection Program: Steers and Heifers (October 1992 – September 1993) <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/baseline/contents.htm>

USDA. 1996. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Pathogen reduction: Hazard analysis critical control point (HACCP) system: final rule. *Federal Register*, 61(144), 25 July, 38805-38989.

Vázquez, FG., Sharma, VK., Alexander, VH., Frausto, CA. 1995. Metals in some lagoons of México. *Environmental health perspectives*. 103 Suppl 1:33-4

Whipps, S. C., M. A. Rasmussen and W. C. Cray, Jr. 1994. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1168-1175

Williams, R.D., and Rapley, R. 2000. Agarose gel electrophoresis of nucleic acids, in: *The nucleic acid protocols*. Rapley R. (ed.) Humana press. pp. 67-70.

Whittam, T. S. 1998. Evolution of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-producing *E. coli* strains. Pp. 195-209. In *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains, Ed. By James B. Kaper and Alison D. O'Brien, 1998 American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Witham, Paula. K., Carl, T. Yamashiro., Kenneth, J. Livak, and Carl, A. Batt. 1996. A-PCR-Based assay for the detection of *Escherichia coli* Shiga-Like Toxin Genes in ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 N° 4 p. 1347-1353

World Health Organization. 1982. Guidelines for organization and Management of Surveillance of Foodborne Diseases. Document VHP 82-39. World Health Organization, Geneva

World Health Organization. 1983. Guidelines on prevention and Control of Salmonellosis Document VHP 83-42, World Health Organization, Geneva.

World Health Organization, 1992. Surveillance program for control of foodborne infections and intoxications in Europe. FAO/OMS Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.

World Health Organization. 1997. *World Health Statistics Quarterly*, Vol 50 N° 1/2

World Health Organization, 1999 Food-Borne diseases- possibly 350 times more frequent than reported, <http://who.int/archives/inf-pr-1997/en/pr97-58.html>,. 29 May 1999

Weiss, M., T. Roberts, and H. Listrone. 1993. Food safety issues: modernizing meat inspection . Agric. Outlook, June 1993/AO-197, P. 32-36.

Weagant, S. D., Jagow JA, Jinneman KC, Omiecinski CJ, Kaysner CA, Hill WE. 1999. Development of digoxigenin-labeled PCR amplicon probes for use in the detection and identification of enteropathogenic *Yersinia* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from foods. J. Food Protection 1999 May;62(5)438-443.

Willshaw, G. A., Scotland, S. M., Smith, H. R., Rowe, B., 1992. Properties of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. J. Infect. Dis. 166:797-802.

Zhao, T., Doyle M.P., Shere, J. And Gerber, L. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. Appl. Environ. Microbiol. 61:1290-1293.

Zhou, Z., Nishikawa, Y., Zhu, P., Hong, S., Hase, A., Cheasty, T., Smith H.R., Zheng, M., and Haruki, K. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef and cattle fecal samples in Changchung, China. J. Vet. Med. Sci. 2002. 64:1041-1044.

Zottola, E. a., and Lorraine, B. S. 1990. The microbiology of foodborne disease outbreaks: an update. Journal of food safety 11:13-29

ANEXO 1

Malas prácticas de manufactura y sugerencias al proceso de obtención de la carne en el Rastro Municipal de Guadalajara, Jalisco.

Parte del proceso	Malas prácticas de manufactura	Sugerencias	Bibliografía
1) Corrales	<ul style="list-style-type: none"> * El bovino no tiene el reposo necesario ya que la gran mayoría se sacrifica el mismo día que ingresa al rastro. * El bovino no es bañado al entrar al cajón de sacrificio. 	<ul style="list-style-type: none"> * Colocar regaderas de aspersión para eliminar restos de estiércol en la piel del animal. * Colocar mosquiteros en la rampa. * Reposo del ganado dependiendo del lugar de embarque. * En la entrada del sacrificio de emergencia se debe colocar una puerta corrediza. 	<ul style="list-style-type: none"> * NOM -008-ZOO-1994 * NOM-009-ZOO-1994 * NOM-EM-09-ZOO-1994
2) Insensibilizado	<ul style="list-style-type: none"> * Se introducen hasta tres animales al mismo tiempo lo que origina hematomas en la canal por introducir más de un bovino al cajón sacrificio.. * En ocasiones se aturden los bovinos en la nuca provocando un deficiente desangrado. * La pistola de aturdir inyecta aire al cerebro 	<ul style="list-style-type: none"> * No deberá permitirse que las operaciones de insensibilización y sacrificio de los animales se efectúe con más rapidez que aquella con la que pueden aceptarse las canales para las operaciones de faeneado. * Para aturdir bovinos con perno cautivo se requiere trazar dos líneas imaginarias 	<ul style="list-style-type: none"> * NOM-EM-09-ZOO-1994 * NOM-EM-09-ZOO-1994

... Continua

... Continuación

	ocasionando un desangrado deficiente.	que comienzan en la base de las orejas cruzándose para terminar en el ángulo externo de cada ojo y cuyo punto de aplicación será a 2 cm a un lado del punto de cruce, y para ganado cebú adulto es de 2 a 3 cm abajo del abultamiento de la nuca en medio de los dos cuernos. * Cambiar el tipo de pistola por una Koch, ya que éstas no inyectan aire. * No introducir más de un animal al cajón de aturdido	Carnetec Marzo/Abril 2002 * NOM-008-ZOO-1994
3) Desangrado	* El desangrado es pésimo ya que no se le permite al animal desangrarse completamente ya que se le corta la cabeza inmediatamente. * El lugar del desangrado es incorrecto debido a que la incisión es al centro y no a los costados. * No se retira la piel del área de desangrado y mucho menos se esteriliza el cuchillo.	* Alargar y reforzar el riel del área de desangrado para poder aumentar el número de piales y así contar con más tiempo para el desangrado. * Capacitar al operario * Contar con lavamanos y con un esterilizador.	* NOM-008-ZOO-1994.
4) Cabezas	* Las cabezas se manejan de forma inadecuada, no se	* Colocar fichas a la canal y cabeza para que se pueda	*NOM-009-ZOO-1994

... Continua

... Continuación

	lavan, se descuernan a medias, quedan restos de piel y no pasan en su mayoría por el proceso de inspección	hacer la inspección abajo, así como implementar el lavado y la limpieza de la cabeza.	
5) Desollar las patas traseras Para colocar el gambriel	* No hay lavamanos y esterilizador, el trabajador contamina la parte superior de la canal. * Es un punto de contaminación alto.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994
6) Quitar pial y operar el elevador	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la parte superior de la canal. * Es un punto de contaminación alto.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994
7) Colocar rolas y quitar la pata izquierda	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la parte superior de la canal. * Es un punto de contaminación alto.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994
8) Quita la pata derecha, descuera las piernas	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la parte superior de la canal. * Es un punto de contaminación menor.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994
9) Desollado de la pierna izquierda	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994

... Continua

... Continuación

	parte superior de la canal. * Es un punto de contaminación menor.		
10) Desollado de la pierna derecha, cortar el recto y realiza un corte a la cola.	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la parte superior de la canal. * El recto no se amarra y se llega a romper contaminando la canal. * Es un punto de contaminación importante.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador * Implementar el amarre del recto o comprar un equipo para cortar y engrapar el recto.	* NOM-008-ZOO-1994 * NOM-009-ZOO-1994 * NOM-EM-003-SARH2-1994
11) Desollado de manos.	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la parte inferior de la canal. * Es un punto de contaminación alto.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994
12) Desollado de manos y marcar la canal.	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la parte inferior de la canal. * Es un punto de contaminación alto. * Quedan restos de piel siendo un punto de contaminación importante.	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador * Eliminar restos de piel y pelo	* NOM-008-ZOO-1994 * NOM-EM-003-SARH2-1994
13) Desollado de pecho y costados	* No existe lavamanos ni esterilizador, el trabajador contamina con las manos la	* Colocar esterilizador y lavamanos * Capacitar al operador	* NOM-008-ZOO-1994

... Continua

... Continuación

	<p>parte inferior de la canal. * Es un punto de contaminación bajo.</p>		
14) Retirar el pene y cortar el pecho	<p>* Dejan restos de pene en la canal, no quitan las glándulas mamarias, no se esteriliza la sierra.</p>	<p>* Poner a funcionar un esterilizador así como quitar restos de viril y glándula mamaria.</p>	<p>* NOM-008-ZOO-1994 * NOM-009-ZOO-1994</p>
15) Desollado	<p>* Quedan restos de piel en la canal, así como restos de piel y pelo en la cola. * Es un punto de contaminación importante tomando en cuenta que la piel del animal aporta hasta 10^9 ufc/cm², así como bacterias patógenas. Al momento del lavado de la canal se arrastra la carga microbiana por partes que no fueron contaminadas.</p>	<p>* Eficientar el despielado y contar con cadenas de acero inoxidable para que se puedan estar esterilizando, ya que si se llega a romper una, la víscera con la sierra de pechos se llega a contaminar la cadena y ésta a su vez las canales. * Se debe contar con un lavamanos. * Eliminar restos de piel y pelo.</p>	<p>* NOM-EM-003-SARH2-1994. * NOM-008-ZOO-1994 * NOM-EM-003-SARH2-1994</p>
16) Eviscerado (víscera verde)	<p>* Es el punto de contaminación más importante de todos, ya que la canal sufre una fuerte contaminación por las pésimas prácticas de manufactura, el operario rompe la víscera para poder tener un punto de apoyo</p>	<p>* Eliminar guantes de todo tipo. * Capacitar al operario. * Colocar lavamanos y esterilizador.</p>	<p>* NOM-009-ZOO-1994 NOM-EM-003-SARH2-1994</p>

... Continua

... Continuación

	innecesario para retirar las vísceras, además cuenta con un guante de tela que lo único que provoca es contaminar más la canal		
17) Eviscerado (víscera roja)	* La víscera roja se contamina por acción del guante de tela que usa el operario.	* Eliminar guantes de tela y colocar un lavamanos lo más próximo posible.	* NOM-008-ZOO-1994
18) Corte longitudinal de la canal	* No se cuenta con esterilizador funcionando,	* Reparar esterilizados o colocar uno nuevo.	* NOM-008-ZOO-1994
19) Lavado	* Falta aumentar la presión ya que es insuficiente, quedan restos de sangre estiércol y aserrín en la canal * No existen registros de cloro residual y control microbiológico del agua para el lavado de las canales.	* Colocar un hidroneumático de mayor capacidad para mejorar el lavado. * Contar con una bitácora para el registro diario de los niveles de cloro residual así como realizar análisis periódicos de potabilidad del agua.	* NOM-009-ZOO-1994
20) Enmantado	Las mantas se ven sucias y presentan mal olor, el lavado se observa deficiente, las cargas de BMA son de hasta 2.7×10^7 . No se utiliza sal para mejorar la presentación de la canal.	* Colocar dos lavadoras industriales de gran capacidad, así como tener una línea de agua caliente para que las mantas se laven con agua caliente, cloro y jabón para evitar cargas microbianas y restos de sangre y grasa.	* NOM-009-ZOO-1994
21) Refrigeración	* Coexistencia de carne fría con carne caliente lo que	* Organizar las cámaras de tal forma que contribuya al	UNAM.1994. memorias del curso "Actualización en la

... Continúa

... Continuación

	<p>incrementa las cargas microbianas, ya que el abuso de temperatura es mayor.</p> <ul style="list-style-type: none">* Las cámaras permanecen abiertas durante gran parte de la mañana .* Las piezas que no se comercializan y se almacenan para el siguiente día son colocados en un gancho amontonando las piezas, lo que provoca que la carne no se conserve correctamente.* Los días de alta demanda de sacrificio se saturan las cámaras de refrigeración y los espacios entre las canales en algunas es nulo.	<p>enfriamiento eficiente de la canal y no permitir que la carne fría se mezcle con la carne caliente.</p> <ul style="list-style-type: none">* La temperatura inicial de la canal (cercana a los 40°C) debe ser reducida rápidamente para controlar la multiplicación de los microorganismos, así como fenómenos de putrefacción en las masas profundas. La temperatura “Ideal para la conservación de la carnes es mantenerla de 0°C a 4°C.* La canal se debe enfriar de tal modo que alcance 7°C interior entre las 12 y 22 horas.* Se debe asegurar un espacio mínimo entre canales consecutivas del orden 5 cm.*La velocidad del aire entre canales es de 0.5/3.5m/seg. Se recomienda una humedad relativa entre 85 y 95%.* No exceder la capacidad de diseño de la cámara.* No mantener las puertas abiertas más de lo necesario.* Al iniciar la carga la	<p>tecnología y diseño de mataderos y salas de deshuese”, impartido en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.</p> <p>*NOM-008-ZOO-1994</p>
--	---	--	--

... Continua

		cámara de refrigeración deberá tener la menor temperatura posible y el tiempo de carga no debe superar las 3 horas.	
--	--	---	--

Malas prácticas de manufactura observadas en el personal:

1. No se lavan las manos antes y durante el proceso.
2. El supervisor no trae uniforme y fuma dentro de su área de trabajo.
3. Algunos operadores traen relojes y anillos.
4. Existe personal sin uniforme en áreas de trabajo (ajeno al proceso).
5. Tallan la chaira con estiércol.
6. Se percibe una gran falta de cultura sanitaria y capacitación.

Instalaciones (deficiencias en base a la norma NOM-008-ZOO-1994)

1. Faltan vidrios en toda la planta y no están a la altura recomendada (2 mts).
2. Baños, lavamanos y jaboneras inapropiados e insuficientes.
3. Piso agrietado y sin trampas en las líneas de drenaje.
4. El techo de la planta no es el apropiado, carece de ángulos redondeados así como no son de fácil acceso para su limpieza y desinfección.
5. No existen trampas para el control de insectos y roedores (mosquiteros, mallas etc).
6. Se utiliza aceite para motor de combustión interna para lubricar rolas y rieles.
7. Los ganchos de las rolas no son de acero inoxidable.
8. El anden de carga se encuentra abierto a la intemperie.
9. No existe área de lavado de camiones.
10. No existe gabinete para el lavado de cabezas y la percha para inspección de cabezas es insuficiente, el descorne no es en la base y queda resto de cuerno y piel.
11. Todas las cabezas se manejan en el piso y éstas no se lavan (belfos presentes).
NOM-009-ZOO-1994
12. Las vísceras se encuentran en el piso, no hay dónde colgar (carros percha).
13. No existen carros percha para la inspección de vísceras.
14. No existe una delimitación de áreas de trabajo y debido a esto se presenta contaminación cruzada.
15. No hay tapetes sanitarios en las entradas de la planta.
16. No hay gabinete para el lavado de botas y mandiles.
17. Se carece de lavamanos y esterilizadores en las áreas de proceso (debe existir por lo menos uno por operación).
18. El cajón de matanza no cumple las especificaciones de la norma (flujo de agua con drenaje).
19. Los procesos de las matanzas de cerdos y bovinos no están separados.
20. No existe baño de aspersion antes del sacrificio.

ANEXO II

Isolation and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico.

Abstract

The contamination of beef carcasses with shiga toxin-producing O157:H7 and Non-O157 *Escherichia coli* (STEC) was investigated in a slaughter plant in Guadalajara, Mexico. A total of 258 beef carcasses were sampled from March 2002 through March 2003. Carcass samples were collected by sponging following the United States Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service (FSIS) guidelines. All samples were assayed for STEC by selective enrichment in modified tryptone soy broth containing cefixime, cefsulodin and vancomycin, followed by plating on Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAC) supplemented with cefixime and tellurite, as well as by immunomagnetic separation (IMS) then plating onto CT-SMAC and CHROMagar®. The identification of *E. coli* isolates was achieved by biochemical tests using the API 20E system. Identification of the O157:H7 serotype was achieved by agglutination with anti-O157 and H7 antisera. The presence of the *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hly₉₃₃* genes, recognized as major virulence factors of STEC, was tested in O157:H7 and non-O157 *E. coli* isolates by multiplex polymerase chain reaction (PCR). STEC was detected in two (0.8%) of the 258 beef carcasses sampled. One of these STEC isolates corresponded to serotype O157:H7 showing *Stx2*, *eaeA* and *hly₉₃₃* genes and the other to non-O157 STEC presenting only the *Stx1* gene. Thirteen carcasses (5%) were positive for nonmotile *E. coli* O157 and 6 (2.3 %) were positive for *E. coli* O157:H7. However, none of the two bacteria presented virulence factors. The presence of O157:H7 and non-O157 STEC on beef carcasses in this slaughter plant in Guadalajara, Mexico, emphasizes the importance of implementing the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system, as well as the need for evaluating, validating and implementing antimicrobial interventions to reduce the presence of potential pathogens which could be of risk to human health.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7; *Escherichia coli* non-O157; Carcasses; Beef; México.

* Corresponding author. Tel. (392)92 526 45; Fax: (392) 92 530 99
E-mail address: jvarela@cuci.udg.mx

1. Introduction

Escherichia coli O157:H7 was first identified as a human pathogen capable of causing food-borne diseases in 1982 (Riley, 1983). Common symptoms caused by *E. coli* O157:H7 include hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome (HUS), and thrombotic thrombocytopenic purpura (Karmali, 1989). Since 1982, several outbreaks of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome associated with this pathogen have been reported worldwide following the ingestion of contaminated foods of bovine origin (Belongia et al., 1991; O'Brien, 1993; Chapman et al., 1993). Pathogenic features of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) include the production of Shiga toxin (*stx*₁) and/or Shiga toxin 2 (*stx*₂), the production of hemolysin mediated by the *hly* gene, and the ability to adhere intimately to the intestinal mucosa by an attaching and effacing mechanism partially mediated by the *eae* A gene (Kaper, 1988; Nataro and Kaper, 1988). Cattle are an important reservoir of *E. coli* O157 and non-O157 STEC (Wells et al., 1991; Whipp et al., 1994; Bettelheim, 2000). The microorganism is carried as part of the native microbiota in the intestine of cattle and can contaminate meat and the slaughterhouse environment (Bell, 1997). Different studies have reported the direct role of animal carriage in cross contamination of carcasses. Several studies have reported the frequency of *E. coli* O157:H7 from beef carcasses at different stages in the slaughter process: the microorganism has been isolated from 3.1% to 43.4% of carcasses prior to evisceration, from

1.0% to 17.8% post evisceration and from 1.0% to 3.2% following antimicrobial interventions (Elder et al., 2000; Tuteneil et al., 2003; McEvoy et al., 2003; Rivera-Betancourt et al., 2004). Feces and hides are significant sources of bacterial carcass contamination (Elder, 2000; McEvoy et al. 2000; Gun et al. 2003) however antimicrobial interventions can significantly reduce the number of bacteria of fecal origin on beef carcasses (Castillo et al., 1998; Castillo et al., 1999; Rivera-Betancourt, 2004). The aim of this study was to determine the occurrence of Shiga Toxin-Producing *E. coli* O157:H7 and non-O157 in beef carcasses at a slaughterhouse in Guadalajara city, Mexico and to characterize the obtained isolates based on the presence of *Stx*₁, *Stx*₂, *eaeA* and *hly*₉₃₃ genes.

2. Material and methods

2.1 characteristics of the slaughterhouse and cattle

The samples were obtained from a municipal slaughter plant located in the city of Guadalajara, México. This facility does not meet the requirements for being federally inspected. All the beef cattle processed in this plant were fed only with pasture. The slaughter plant processes approximately 500 heads per day at a chain speed of 65 animals per hour. After carcass evisceration and splitting two water rinses are performed to remove gross contamination (the water is used at room temperature). During the slaughter process no antimicrobial interventions are applied.

2.1.1 Sample Collection

Carcass samples ($n = 258$) were randomly collected on a weekly basis from the sides of refrigerated carcasses at least 12 hours after slaughter. The samples were taken during a 12-month period. The samples were collected using sterile polyurethane sponges (BioPro® Sampling System) moistened with buffered water (25 ml). Each sample was taken by scrubbing a 100-cm² area at three different sites which included rump, flank, and brisket regions of each carcass side, for a total area of 300-cm² (FSIS, 1996). Sponges were placed in sterile bags (Whirl-Pak®) and packed in pre-chilled insulated containers for transportation to the laboratory for testing between 4 h and 24 h after sampling.

2.2. Isolation and identification of *E. coli* O157 and non-O157

All samples were examined for the presence of *E. coli* O157 and non-O157 by a selective enrichment and then comparatively using a direct plating procedure and an immunomagnetic separation (IMS) technique. Each sample was placed in a sterile stomacher bag and enriched in 225 ml of modified tryptone soy broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA.) supplemented with cefixime (0.05 mg/L, Dynal Biotech, Norway), cefsulodin (10.00 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) and vancomycin (8.00 mg/L, Sigma-Aldrich, USA), pummeled for 2 min with a stomacher (BagMixer®400ml Interscience, France) and then incubated at 37 °C for 24 h.

2.2.1 Enrichment-plating procedure

After 6 and 24 h of incubation, each sample was pummeled again as described above and then 0.1 ml of appropriate decimal dilutions of the enrichment broth were surface spread onto sorbitol MacConkey agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA) supplemented with potassium tellurite and cefixime (25 mg/ml and 50 ng/ml respectively; Dynal Biotech supplement) (TC-SMAC). Additionally, one loopful of the enrichment broth was streaked onto TC-SMAC. All plates were incubated at 37 °C for 18-24 h (FDA, 1998).

2.2.2 Immunomagnetic separation (IMS) procedure

After 6 h of enrichment, 1 ml was separated from the enrichment system and used to perform IMS with Dynabeads® anti-*E. coli* O157 (Dynal Biotech, Norway). One milliliter of each broth was mixed for 10 minutes with 20 µl of immunomagnetic beads coated with anti-*E. coli* O157 antibody. The immunomagnetic bead suspensions were washed three times in 1 ml phosphate buffered saline, pH 7.4 with tween 20 (PBS) (Sigma-Aldrich, USA) on a magnetic separation rack (Dynal Biotech, Norway). After the final wash, the beads were resuspended in 100 µl of PBS. 50 µl of this suspension was streaked onto TC-SMAC and CHROMagar O157 (Dynal Biotech, Norway) and the plates then were incubated at 37 °C for 18-24 h.

2.2.3. Biochemical and serological tests for identification of isolates

Typical colonies of *E. coli* were picked from TC-SMAC and CHROMagar and subjected to biochemical and serological identification. At least 5 colonies from each selective agar plate were transferred to trypticase soy agar slants (Bioxon, México), incubated at 37 °C overnight and screened using IMViC tests. Presumptive positive *E. coli* isolates were confirmed with API 20E system (bioMérieux, France). Confirmed isolates were serotyped using specific O157 antiserum (Difco Laboratories, USA). Those isolates showing a positive reaction with the O157 antiserum were subsequently tested for agglutination with H7 antiserum (Difco). H7-negative isolates were examined for motility by wet-mount microscopy. Nonmotile isolates that were H7-negative were considered *E. coli* O157:NM. *E. coli* O157:H7 (ATCC 43895) reference strain was used as positive control for both biochemical and serological tests.

2.2.4 Identification of virulence factors

All isolates of *E. coli* O157:H7, O157:NM and non-O157 were subject to multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay to determine the presence of Shiga toxin (*stx1*, *stx2*), intimin *eaeA* and hemolysin *hly₉₃₃* genes, recognized as major virulence factors of STEC. The primer sequences, genetic targets and the expected sizes of the amplification products from the multiplex PCR assay are shown in Table 1. These primers were obtained from a specialized company (Invitrogen, Life Technologies, Cal. USA). PCR conditions were standardized so that the reaction mix

included the following components per 50 µl: 400 µM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTPs, Invitrogen), 0.50 µM of all primers (except AE22 and AE20-2, which were used at 0.25 µM), 1x PCR buffer (50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 (Invitrogen) and 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The DNA template was prepared by suspending a single colony in 100 µl of TE buffer, which was then heated for 5 min in a boiling water bath, chilled on ice for 5 min and centrifuged to remove debris. 5 µl of template was added to 45 µl of the PCR reaction mix. The PCR reaction samples were heated at 94 °C for 2 min and then subjected to 35 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 57 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min in a Techne Genius® FGEN02TP thermal cycler (Duxford, Cambridge England). Products from the multiplex PCR were visualized following electrophoresis through 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide.

2.3 Statistical analysis.

Data obtained from carcass testing were reported as percent *E. coli* O157 and non-O157 positive samples. A T-student test was performed to compare the effects of cold and warm seasons. All statistical analyses were conducted using SPSS 11.1.

3. Results

Escherichia coli O157:NM and *E. coli* O157:H7 were isolated from 13 (5%) and 7 (2.7%) of the 258 beef carcasses sampled, respectively. In addition, one carcass (0.4%) tested

positive for non-O157 STEC after testing for virulence factors. A total of 146 isolates of *E. coli* O157:H7 ($n = 11$), O157:NM ($n = 16$) and non-O157 ($n = 119$) were collected from all carcasses and tested for virulence factors by multiplex PCR. Only two *E. coli* isolates (1.4%) showed virulence factors. One isolate, corresponding to serotype O157:H7, showed *Stx2*, *eaeA* and *hly₉₃₃* genes, and the other, corresponding to *E. coli* non-O157, showed the *Stx1* gene only. Each of these isolates was obtained from a different carcass. As reported, none of these isolates showed both *Stx1* and *Stx2* genes (Table 2).

Data in Table 3 show the effect of the season in the frequency of detection of *E. coli* O157:H7, *E. coli* O157:NM or *E. coli* non-O157 on beef carcasses. Fifteen carcasses (5.8%) tested positive for these organisms during the warm months (March to September), while 6 carcasses (2.3%) tested positive for *E. coli* O157:H7 and *E. coli* O157:NM during the cool months (October to February). These differences were significant ($P < 0.05$).

Of the 21 carcasses that tested positive for O157 or non-O157 *E. coli*, 12 (57%) tested positive only by the IMS procedure and 8 (38%) only by the enrichment-plating procedure. Only one sample tested positive by both methods (Table 4). The efficacy of the two procedures in detecting O157 or non-O157 *E. coli* (detection ratio) was calculated as the ratio of the amount of positive samples detected with each procedure by the total number of samples testing positive for *E. coli* O157 or non-O157 (Tutenel et al., 2003). The detection ratio for the IMS procedure was 0.62,

while for the enrichment-plating procedure this ratio was 0.43. These two values were not significantly different; however, regardless of the lack of statistically significant differences in the ability of both methods to detect *E. coli* O157, it is interesting to note that all but one sample the detection occurred by only one of the two methods; 8 samples tested positive by enrichment-plating only and 12 samples tested positive by IMS procedure only.

4. Discussion

A number of studies have reported the prevalence of *E. coli* O157:H7 on beef carcasses. Barkocy-Gallagher et al. (2003) recovered *E. coli* O157:H7 from 1.2% of carcasses sampled at chilling after the application of an antimicrobial (post-intervention) in commercial beef processing plants in the US. In the same country, Elder et al. (2000) detected O157 STEC in 2% of 330 beef carcasses, while non-O157 STEC was isolated from 8.3% of 326 beef carcasses (Terrance et al., 2002). In Canada, Power et al. (2000) isolated *E. coli* O157:H7 from 1.6% of 125 beef carcasses. The differences in the reported prevalence in different studies may be due to the use of different sampling and isolation procedures and to variability in the sampled populations. *E. coli* O157:H7 and other STEC strains are not naturally present in carcasses, but they can be present as the direct result of cross-contamination with feces during the slaughter process. This contamination can occur by different mechanisms during processing. The presence of the pathogen in hides and feces has been found to correlate with

carcass contamination (Elder et al., 2000; Gun et al., 2003).

The pathogenesis of *E. coli* O157:H7 is linked to different potential virulence factors such as Shiga-like toxins (Stx1, Stx2), intimin (involved in the attaching and effacing adherence phenotype) and enterohemolysin (Nataro and Kaper, 1998). STEC strains that produce Stx2 are more commonly associated with HUS than strains that produce only Stx1 (Strockbine et al., 1988; Griffin and Tauxe, 1991). In our study, the genes coding for these virulence factors were detected in only 2 isolates. While one of these isolates was identified as *E. coli* O157:H7, carrying *stx2*, *eaeA* and *hly₉₃₃* genes, the other isolate did not belong in the O157 group. Although this isolate carried the *stx1* gene, it did not have the accessory intimin and hemolysin virulence factors. *E. coli* O157:H7 strains without virulence factors have been isolated from feces and beef carcasses (Cerqueira et al., 1999; Guyon et al., 2001; Rogerie et al., 2001; Genevieve et al., 2004). In other studies, most *E. coli* O157 isolates obtained from beef carcasses have been found to be *stx1*, *stx2* and *eae* positive (Elder et al., 2000; McEvoy et al., 2003; Barkocy-Gallagher et al., 2004). Isolates not possessing these major virulence factors are not considered to be pathogenic (Melton-Celsa and O'Brien, 1998). However, non-O157 *E. coli* isolates are clearly associated with human diseases and do not possess either *eae* or the pO157 plasmid (Willshaw et al., 1992; Johnson et al., 1996; Paton and Paton, 1998). One of the most commonly reported *eae*-negative STEC serogroups associated with human

disease is O113, particularly serotype O113:H21 (Karmali, 1989; Paton, et al., 1998).

No significant differences were found between the Enrichment-plating and IMS procedures for detecting *E. coli* O157. This finding is similar to that reported by Sanderson et al. (1995) when comparing these two methods for recovering *E. coli* O157:H7 inoculated on calf carcasses. In contrast, other researchers have reported that IMS resulted in a greater detection rate *E. coli* O157 in inoculated or non-inoculated beef and bovine feces when compared to enrichment-plating (Chapman et al., 1994; Bennett et al., 1996; Fratamico et al., 1992; Fratamico et al., 2000; Tutenel et al., 2003). The remarkable observation in this regard was that in most instances it was necessary to use both enrichment-plating and IMS methods to ensure detection of *E. coli* O157. Despite the reported higher detection rate of IMS in comparison to enrichment-plating, using only IMS procedure would have resulted in a lower frequency of detection in this study.

In this study the prevalence of *E. coli* O157 and non-O157 *E. coli* was similar to the study reported by Barkocy-Gallagher et al. (2003), who found a higher prevalence of *E. coli* O157:H7 in pre-eviscerated carcasses in spring and summer ($p < 0.05$). Chapman et al. (2001) also reported the highest isolation rate of *E. coli* O157 from animals, carcasses and meat samples during the summer. On the other hand, human cases of *E. coli* O157:H7 and non O157 STEC disease tend to peak during the warmer months (CDC, 2002).

To our knowledge this is the first report of STEC O157 and non-O157

isolation from beef carcasses in Mexico. The prevalence of STEC was not as high when compared to similar studies in other countries. This indicates that the presence of low levels of this pathogen can be expected even after having Good Manufacturing Practices (GMPs) in place. The importance of developing, validating and establishing carcass interventions to reduce the presence of potential pathogens must be emphasized. It must be emphasized that these interventions should not be used as a replacement of GMPs but as a further step for reducing pathogens that are present in spite of the application of GMPs. Additionally, further research should be conducted in Mexican abattoirs to determine the frequency, distribution and characteristics of STEC in cattle and beef, as well as to develop strategies for minimizing cross-contamination during the process.

Acknowledgements

This project was funded by the Centro Universitario de la Ciénega, University of Guadalajara. The technical assistance of Nubia Maleny, Cesar Antonio Martinez, Juana del Rocio Rojas and Joel Hinojosa is acknowledged.

References

- Armstrong, G. A., Hollingsworth, J., Morris, J. G. 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. *Epidemiol. Rev.* 18, 29-51.
- Barckocy-Gallagher, G. A., Terrance, M. A., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., 2003. Seasonal prevalence of shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* including O157:H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants. *J. Food Prot.* 66, 1978-1986.
- Bell, R. G., 1997. Distribution and sources of microbial contamination on beef carcasses. *J. Appl. Microbiol.* 82, 292-300.
- Belongia, E. A., MacDonald, K. L., Parham, G. L., White, K. E., Korlath, Lobato, M. N., Strand, S. M., Casale, K. A., Osterholm, 1991. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J. Infect. Dis.* 164, 338-343.
- Bennett, A. R., MacPhee, S., Betts, R. P., 1996. The isolation and detection of *Escherichia coli* O157 by use of Immunomagnetic separation and immunoassay procedures. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 237-243.
- Bettelheim, K. A., 2000. Role of non-O157 VTEC. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 29:38S-50s.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruch, 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.
- Castillo, A., Lucia, L.M., Goodson, K.J., Savell, J.W. and Acuff, G.R., 1999. Decontamination of beef carcass surface tissue by steam

vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. *J Food Prot.* 62, 146-151.

Castillo, A., Lucia, L.M., Goodson, K.J., Savell, J.W. and Acuff, G.R., 1998. Comparison of water wash, trimming and combined hot water and lactic acid treatments for reducing bacteria of fecal origin on beef carcasses. *J Food Prot.* 61, 823-828.

Centers for Disease Control., 2002. Foodnet 2000 annual report. Foodnet active surveillance project. Available at: http://www.cdc.gov/foodnet/annual/2000/2000_summary.htm.

Cerqueira, A. M. F., Guth, B. E. C., Joaquin, R. M., Andrade, J. R., 1999. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 70, 111-121.

Chapman, P. A., Wright, D. J., Higgins, R., 1993. Untreated milk as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Vet. Rec.* 133, 171-172.

Chapman, P. A., Wright, D. J., Siddons, C. A., 1994. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* 40, 424-427.

Elder, R. O., Keen, J. E., Siragusa, G. R., Barkocy-Gallagher, G. A., Koohmaraie, M., Laegreid, W. W., 2000. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during

processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2999-3003.

FDA. USA Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, Revision A, 1998(b). Chapter 4A. Diarrheagenic *Escherichia coli*. P. Feng and S.D. Weagant. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>

Fratamico, P. M., Schultz, F. J., Buchanan, R. L., 1992. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of food using an immunomagnetic separation method. 9, 105-113.

Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., Deng, M. Y., 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2188-2191.

Fratamico, P. M., Strobaugh, T. P., 1998. Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21:92-98.

Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Pepe, T., 2000. A multiplex polymerase Chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine faeces. *J. Food. Prot.* 62, 1032-1037.

FSIS. Food Safety and Inspection Service. U.S. Department of Agriculture. 1996. Pathogen Reduction: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. *Federal Register.* 61, 38806-38989.

- Genevieve, A., Barkocy-Gallagher, Terrance, M. A., Mildred Rivera-Betancourt., Xiangwu Nou., Steven D. Shackelford, Tommy, L. Wheeler., Mohammad Koochmaraie., 2004. Characterization of O157:H7 and other *Escherichia coli* isolates recovered from cattle hides, feces, and carcasses. *J Food Prot.* 67, 993-998.
- Griffin, P. M., Tauxe, R. V., 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 13:60-98.
- Gun, H., Yilmaz, A., Turker, S., Tanlasi, A., Yilmaz, H., 2003. Contamination of bovine carcasses and abattoir environment by *Escherichia coli* O157:H7 in Istanbul. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 339-334.
- Guyon, R., Dorey, F., Malas, J., Leclercq, A. 2001. Hazard analysis of *Escherichia coli* O157:H7 contamination during beef slaughtering in Calvados, France. *J. Food. Prot.* 64, 1341-1345.
- Johnson, R., Clarke, R., Wilson, J., Read, S., Rahn, K., Renwick, S., Sandhu, K., Alves, D., Karmali, M., Lior, H., McEwen, S., Spika, J., Gyles, C., 1996. Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 59, 1112-1122.
- Kaper, J. B., Elliott, S., Sperandio, V., Perna, N. T., Mayhew, G. F., Blattner, F. R., 1998. in *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. Coli* Strains, eds. Kaper, J. B. and O'Brien, A. D. (Am. Soc. Microbiol., Washington. DC), pp. 163-182.
- Karmali, M. A., 1989. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15-38.
- López, E. L., Contrini, M. M., De Rosa, M. F., 1998. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in South America. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C., pp. 30-37.
- Mariani-Kurkdjian, P., Denamur, E., Milton, A., Picard, B., Cave, H., Lambert-Zechovsky, N., Loirat, C., Goulet, P., San-sonetti, P. J., Elion, J., 1993. Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J. Clin. Microbiol.* 31, 296-301.
- Melton-Celsa, A., O'Brien A. D. 1998. Structure, Biology, and relative toxicity of shiga toxin family members for cells and animals. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, ASM Press, Washington, DC, pp. 121-125.
- McEvoy, J. M., Doherty, A. M., Finnerty, M., Sheridan, J. J., McGuire, L., Blair, I. S., McDowell, D. A., Harrington, D., 2000. The relationship between hide cleanliness and bacterial numbers on beef carcasses at a commercial abattoir. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 390-395.

- McEvoy, J. M., Doherty, A. M., Sheridan, J. J., Thomson-Carter, F. M., Garvey, P., McGuire, L., Blair, I. S., McDowell, D. A., 2003. The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. *J. Appl. Microbiol.* 95, 256-266.
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M. P., Mitchell, S. E., Kresovich, S., 1997. A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 172-176.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
- O'Brien, A. D., Melton A. R., Schmitt, C. K., McKee, M. L., Batts, M. L., Griffin, D. E., 1993. Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger-bone outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2799-2801.
- Paton, A. W., Paton, J. C., 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays *Stx*₁, *Stx*₂, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb*_{O157}. *J. Clin. Microbiol.* 36, 598-602.
- Paton, A. W., Woodrow, M. C., Doyle, R. M., Lanser, J. A., Paton J. C., 1999. Molecular characterization of a shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3357-3361.
- Power, C. A., Johnson, R. P., Mcewen, S. A., McNab, W. B., Griffiths, M W., Osborne, W. R., De Grandis, S. A., 2000. Evaluation of the reveral and SafePath rapid *Escherichia coli* O157 detection tests for use on bovine feces and carcasses. *J. Food Prot.* 63, 860-866.
- Riley L.W., Remis R.S., Helgerson S.D., McGee H.B., Wells J.G., Davis B.R., Hebert R.J., Olcott E.S., Johnson L.M., Hargrett N.T., Blake P.A., Cohen M.L., 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 308, 681-5.
- Rogerie, F., Marecat, A., Gambade, S., Dupond, F., Beaubois, P., Lange, M., 2001. Characterization of shiga toxin producing *E. coli* O157 serotype isolated in France from healthy domestic cattle. *Int. J. Food Microbiol.* 63, 217-223.
- Sanderson, M. W., Gay, J. M., Hancock, D. D., Gay, C. C., Fox, L. K., Besser, T. E., 1995. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2616-2619.
- Strockbine, N. A., Wells, J. G., Bopp, C. A., Barrett, T. J., 1988. Overview of detection and subtyping methods. In: Kaper, J. B., O'Brien, A. D. (Eds.). *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington, D.C., pp. 331-356.
- Terrance M. A., Barkocy-Gallagher, G. A., Rivera-Betancourt, M., Koohmaraie, M., 2002. Prevalence and characterization of non-O157

Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4847-4852.

Tutenel, A. V., Pierard, D., Vandekerchove, D., Van Hoof, J., De Zutter, L., 2003. Sensitivity of methods for the isolation of *Escherichia coli* O157 from naturally infected bovine faeces. *Vet. Microbiol.* 94, 341-346.

Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E.G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. D., Martin, M. L., Griffin, P. M., Ostroff, S. M., Potter, M. E., Tauxe, R. V., Wachsmuth, I. K., 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29, 985-989.

Willshaw, G. A., Scotland, S. M., Smith, H. R., Rowe, B., 1992. Properties of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of human origin of O serogroups other than O157. *J. Infect. Dis.* 166, 797-802.

Whipp, S. C., Rasmussen, M. A., Cray, W. C. Jr., 1994. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, 1168-1175.

Zhou, Z., Nishikawa, Y., Zhu, p., Hong, S., Hase, A., Cheasty, T., Smith, H., Zheng, M., Haruki, K. 2002. Isolation and characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork and cattle fecal samples in Changchun, China. *J. Vet. Med. Sci.* 64(11), 1041-1044.

Table 1.
Oligonucleotide primers used for STEC virulence genes identification

Primers	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Target gene	Prod uct size ^a	Reference
SLTI-F	TGTA ACTGGAAAGGTGGAGTATACA	<i>stx1</i>	210	Meng et al., 1997
SLTI-R	GCTATTCTGAGTCAACGAAAATAAC			
SLTII-F	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	<i>stx2</i>	484	Meng et al., 1997
SLTII-R	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC			
AE22	ATTACCATCCACACAGACGGT	<i>eaeA</i>	397	Fratamico and
AE20-2	ACAGCGTGGTTGGATCAACCT			Strobaugh, 1998
MFS1-F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	<i>hly₉₃₃</i>	166	Fratamico et al.,
MFS1-R	CTTCACGTCACCATACATAT			1995

^abase pairs.

Table 2

Escherichia coli O157 and non-O157 isolated from beef carcasses

	No. positive		No. isolates		No. isolates with	
	carcasses (n=258)	%	(n=146 ^a)	%	virulence factors	%
<i>E. coli</i> non-O157	53	20.5	119	81.5	1 ^d	0.7
<i>E. coli</i> O157:NM	13	5.0	16	11.0	0	0.0
<i>E. coli</i> O157:H7	7	2.7	11	7.5 ^b	1 ^c	0.7
Total	73	28.2	146	100	2	1.4

^a Total number of *E. coli* isolates obtained from TC-SMAC and CHROMagar plates from 21 carcasses.

^b Proportion related to the total number of isolates (n=146).

^c *stx2*, *eaeA* and *hly₉₃₃* genes.

^d *stx1* gene.

Table 3. Prevalence of *E. coli* O157 and non-O157

	Positive carcasses and climate	
	Warm ^a	Cold ^b
	(n=128)	(n=130)
<i>E. coli</i> O157:H7	5	1
<i>E. coli</i> O157:NM	8	5
<i>E. coli</i> non-O157 STEC	1	0
Total	15	6

^a March to September.

^b October to February.

Table 4

Sensitivity of procedures for isolating *E. coli* O157 and non-O157

Isolation procedure	No. positive Samples	<i>E. coli</i>			Detection ratio ^a (Confidence interval $\alpha = 0.05$)
		O157:H7	O157:NM	non-O157 STEC	
Enrichment-planting ^b	9	1	7	1	0.43 (22, 64)
IMS ^c	13	6	7	0	0.62 (41, 83)

^aProportion of positive samples detected over the total number of samples at least once positive for *E. coli* O157 and non-O157 (n=21).

^bEnrichment in trypticase soy broth supplemented with cefixime, cefsulodin and vancomycin for 6 and 24 h, then plating on TC-SMAC.

^cEnrichment in trypticase soy broth supplemented with cefixime, cefsulodin and vancomycin for 6 h followed by immunomagnetic separation, then plating on TC-SMAC and CHROMagar.