

CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *Escherichia coli* O157:H7 EN CANALES DE BOVINOS Y PORCINOS MEDIANTE PCR.

Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates Obtained from Bovine and Porcine Carcasses.

Miguel Gallegos¹, Alberto Morales^{2*}, Genoveva Álvarez², Jesús Vásquez³, Lilia Morales⁴, Irma Martínez⁴ y Jesús Maldonado⁵

¹Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) hasta 31 de diciembre del 2007, actualmente Consorcio Técnico del Noreste, A. C. UGRNL. Teléfono y Fax: 01 81 83674487 Ext. 132. Km 4.5 carretera a Reynosa, Guadalupe, N. L. México.

³Facultad de Ciencias Químicas, UJED. ⁴Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. ⁵Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Núcleo "Héctor Ochoa Zuleta", Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Venezuela.

*E-mail: alberto.morales@labmty-cfppnl.org.mx

RESUMEN

Muchos de los brotes causados por *Escherichia coli* O157:H7 se han asociado al consumo de carne bovina mal cocida, pero también se ha reportado su presencia en la carne de otros animales domésticos. En México existe poca información sobre la presencia de este patógeno en canales de res y de cerdo. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en canales de res y cerdo y su caracterización mediante PCR. De un total de 18 aislados, 12 fueron positivas por PCR para los genes *rfbE* y *fliC* que determinan el serotipo O157:H7. De estos 12, uno de canal de res y tres de canales de cerdo fueron positivos por PCR para los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*, por lo que fueron considerados como enterohemorrágicos. Las diferencias encontradas en el número de canales positivas para los genes caracterizados no fueron estadísticamente significativas, y los resultados señalan que *E. coli* O157:H7 puede ser encontrada en ambos tipos de canal, representando un riesgo para la salud, por lo que se deben tomar medidas más estrictas de higiene y manejo para evitar que canales que no cumplan con el carácter de inocuidad lleguen a los consumidores finales.

Palabras clave: Bovinos, cerdos, *E. coli* O157:H7, enterohemorrágica, caracterización molecular, PCR.

ABSTRACT

Many *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks have been associated to consumption of undercooked beef, but the presence has also been reported in the meat of other domestic animals. In Mexico, little information exists on the presence of this pathogen in bovine and pork carcasses. The objective of this study was to determine the presence and/or absence of *E. coli* serotype O157:H7 in bovine and pork carcasses and their characterization by means of PCR. Of 18 isolates, 12 were positive by PCR to *rfbE* and *fliC* genes, which determine O157:H7 serotype. Of these 12, one from bovine carcass and three of pork carcasses were positive by PCR to *stx1*, *stx2* and *eaeA* genes, therefore, they were considered enterohemorrhagic strains. The differences found in the positive carcass number to any of the genes were not statistically significant. The results show that *E. coli* O157:H7 could be found in both carcasses types, representing a risk for the health, so strict hygienic and handling measures should be taken in order to avoid that carcasses which do not fulfill the food safety aspect might arrive to the final consumers.

Key words: Bovine and pork carcasses, *E. coli* O157:H7, enterohemorrhagic, molecular characterization, PCR.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli O157:H7 ha emergido como un patógeno transmitido por alimentos y es considerado de importancia en salud pública, ya que está implicado en brotes de colitis he-

morrágica y posible aparición posterior del síndrome urémico hemolítico (SUH) [19]. Una característica de *E. coli* O157:H7 es el bajo número de células requeridas para desarrollar la enfermedad de 10 a 100 células [11] por lo que la no detección por los métodos tradicionales microbiológicos no es certeza ni sinónimo de seguridad del alimento. *E. coli* O157:H7 puede estar presente en una gran variedad de animales silvestres y domésticos entre los cuales se encuentran bovinos (*Bos taurus-indicus*), porcinos (*Sus scrofa domestica*) y ovinos (*Ovis aries*) [18], siendo principalmente los rumiantes y sus heces fecales un reservorio natural de este patógeno [17, 20]. Se ha reportado que la transmisión de *E. coli* O157:H7 a los humanos en forma directa o indirecta puede ser por contaminación de los alimentos a partir de material fecal, agua contaminada, y contacto con personas o animales enfermos [4]. Por otro lado, microorganismos patógenos para el humano como *E. coli* O157:H7, que habita naturalmente en el tracto digestivo del ganado bovino, puede eventualmente contaminar la canal durante el proceso de evisceración o en el manejo posterior de la misma [25]. Aunque el serotipo de *E. coli* O157:H7 es determinado por los genes *rfbE* y *flhC* que codifican respectivamente para la biosíntesis del lipopolisacárido O157 y la flagelina, lo que a su vez determina respectivamente los antígenos O y H, la patogenicidad se debe a la expresión de varios genes que codifican para factores de virulencia. Entre estos se encuentran los genes *stx1* y *stx2* que codifican para las verotoxinas 1 y 2, respectivamente, los cuales se encuentran en un bacteriófago integrado al cromosoma bacteriano y que han sido asociados al desarrollo del SUH, particularmente *stx2* [21]. Otro de los genes de virulencia localizado en el locus LEE (locus de efusión en enterocitos) es el gen *eaeA* que codifica para la intimina y que es necesario para el proceso de la adherencia íntima a las células epiteliales del intestino humano [12, 20, 22]. En México existen algunos reportes de la presencia de *E. coli* O157:H7 en muestras comerciales de carne de res, pero no se define si la carne venía contaminada desde el matadero o se contaminó en el manejo posterior [6], y siendo México un país con una producción promedio en los últimos cinco años de 1.473.650 t de carne de bovino y de 1.050.311 t de carne de cerdo [24] y un volumen de exportación combinado de ambos tipos de carne de 38.677,2 t [23], es importante determinar la calidad sanitaria de la canal al momento de salir del matadero. El objetivo del presente estudio consistió en caracterizar cepas de *E. coli* del serotipo O157:H7 aisladas de canales de bovinos y porcinos en plantas procesadoras de productos cárnicos de la Comarca Lagunera, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El estudio fue de tipo longitudinal prospectivo y el período comprendió de febrero a marzo del 2004. Se seleccionaron dos plantas procesadoras de productos cárnicos, una de cerdo

(I) y una de bovino (II) de la Comarca Lagunera, México. Los muestreos se realizaron en dos fechas para cada planta, 20/02/2004 y 15/03/2004 para la planta I y 02/03/2004 y 24/03/2004 para la planta II. A partir de estos se obtuvieron los aislados de *E. coli*.

Obtención de las muestras

La toma y manejo de las muestras se realizó conforme a lo especificado por la Norma Oficial Mexicana NOM-109 SSA1-1994 y con modificaciones a lo propuesto por Gill y Jones [15]. Las canales se muestrearon inmediatamente a su arribo al área de inspección y sellado (15 y 10 minutos en promedio después del inicio del sacrificio del animal hasta la toma de las muestras, respectivamente para canal de bovino y cerdo). En cada planta procesadora se procedió a la selección de 15 canales al azar, para el análisis de superficies vivas, de las cuales se recolectaron las muestras con esponja estéril NASCO®, Whirl-Pak, Speci-Sponge, B01324WA (5x10x1 cm) (Nasco EUA) en tres sitios diferentes: falda (sitio A), costado (sitio B) y cuello (sitio C), para un total de 45 muestras por planta. De las 15 muestras de cada sitio de la canal (A, B, C) se formaron tres grupos de cinco muestras cada uno, para tener nueve muestras compuestas por planta, lo que dio un tamaño final de 18 muestras compuestas.

Aislamiento y confirmación de *E. coli* O157:H7 en muestras compuestas

Cada muestra compuesta se pasó a enriquecimiento en caldo Reveal (NEOGEN®, EUA) y se incubó durante 8 h a 42°C, luego de este tiempo se tomaron 120 µL y se depositaron sobre la placa de lectura del kit. Después de 15 minutos se realizaron las lecturas y de las muestras presuntivas se tomó una asada y se estrío en medio cromogénico CHROMagar® O157 (CHROMagar, Francia). Las colonias características se confirmaron con pruebas bioquímicas utilizando el API® 20 E (Biomereux, Francia) y el serotipo utilizando un kit de serología Difco™ *E. coli* Antiserum (DIFCO, EUA). En las muestras que se confirmó la presencia de *E. coli* O157:H7 se procedió a realizar la obtención de ADN para la caracterización molecular mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Cepa de referencia, condiciones y medio de cultivo

La cepa de referencia de *E. coli* O157:H7 que se usó como control positivo en los ensayos de PCR fue proporcionada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) a través del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), México. La cepa fue activada en caldo infusión cerebro corazón a 35°C por 24 h.

Extracción del ADN

Los aislados de *E. coli* O157:H7 se incubaron en caldo infusión cerebro corazón por 24 h a 37°C. Después de la incubación y a partir de este medio se tomó tres veces 1 mL y se

centrifugó a 3000 rpm durante 1 min (Centrifuga Sigma 1-15K, Alemania) para formar una pastilla en tubos Eppendorf de 1,5 mL y hacer la extracción de ADN con el método CTAB [7] pero omitiendo el uso de polivinilpirrolidona y 2β-mercaptoetanol.

Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando los oligonucleótidos mencionados en la TABLA I. Primero se realizó una reacción para amplificar simultáneamente dos fragmentos correspondientes a los genes *rfbE* y *fliC* [5, 13]. En los aislados que resultaron positivos para los genes anteriores, se realizaron reacciones por separado para amplificar un fragmento en cada uno de los siguientes genes: *stx1*, *stx2* y *eaeA* [1, 14]. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µL, utilizando 1 µL (25 pmoles) de cada uno de los oligonucleótidos, 2,5 µL de los dNTP's (200 µM) (GIBCO-BRL), 0,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 2,5 µL de buffer para PCR (10X) (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM KCl), 2,5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline) y 1 µL de ADN (100 ng). El control negativo de la PCR tenía los mismos ingredientes, excepto el ADN, sustituyéndose este volumen con agua miliQ estéril. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PCR Express (ThermoHybaid, Reino Unido) y las condiciones de corrida para los genes *rfbE* y *fliC* fueron de un ciclo de 1 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 66°C por 30 s y una extensión a 72°C por 75 s, con una extensión final de 10 min a 72°C. Para los genes *stx1* y *stx2* se modificó el paso de alineamiento a 58°C durante 30 s. Para el gen *eaeA* se modificó el paso de alineamiento a 64°C por 30 s. Las demás temperaturas y tiempos fueron iguales. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg mL⁻¹), y visualizados en un transiluminador de luz UV (Spectroline, EUA). Posteriormente fueron fotografiados con una cámara polaroid (película A667, EUA) adaptada con filtro para luz ultravioleta.

Prueba estadística

Se usó la prueba de Ji cuadrado [3] para probar si las diferencias observadas en el número de canales positivas al patógeno de cerdo y de bovino eran estadísticamente significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 18 muestras (nueve de cerdo y nueve de res), seis de cerdo (66,66%) y seis de bovino (66,66%) fueron positivas por PCR para la presencia de *E. coli* serotipo O157:H7, demostrándose así que este patógeno puede estar presente en ambos tipos de canal (TABLA II y FIG. 1). *E. coli* O157:H7 se ha encontrado en una gran variedad de alimentos, tanto de origen vegetal como animal, pero se ha asociado particularmente a la carne del ganado bovino, ya que esta especie se ha considerado como un reservorio natural de este patógeno. Sin embargo existen reportes que mencionan su presencia en otras especies animales como cerdos, ovejas, caballos (*Equus caballus*), venados, perros (*Canis familiaris*) y aves [2, 8, 16]. En relación con la planta I, en su primera fecha de muestreo (20/02/2004) se encontró que, si bien dos aislados resultaron positivos para los genes que codifican para los antígenos O157 y H7, éstos no eran portadores de ninguno de los dos genes que codifican para las verotoxinas; sin embargo, en la segunda fecha de muestreo (15/03/2004), de cuatro aislados positivos para los genes *rfbE* y *fliC*, tres fueron positivos para los genes de las verotoxinas 1 y 2 y el de la intimina. Es importante mencionar que cada uno de estos tres aislados fueron encontrados en cada uno de los tres diferentes sitios de muestreo en la canal, es decir, uno en la cadera, otro en el costado y otro en el cuello, lo que plantea la posibilidad que se tratara de un mismo animal, o bien de animales diferentes pero procedentes de una misma granja o lugar y en la cual existe la presencia de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica.

TABLA I

INICIADORES USADOS EN LAS REACCIONES DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *E. coli* O157:H7 / PRIMERS USED IN THE PCR REACTIONS FOR THE IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *E. coli* O157:H7

Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb)
<i>rfbE</i>	AAGATTGCGCTGAAGCCTTTG CATTGGCATCGTGTGGACAG	497
<i>fliC</i>	GCGCTGTGCGAGTTCTATCGAGC CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625
<i>stx1</i>	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC CGTGGTATAGCTACTGTCCACC	302
<i>stx2</i>	CTTCGGTATCCTATTCCC ^a CTGCTGTGACAGTGACAAAACG ^b	518
<i>eaeA</i>	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	1087

^a Se eliminaron dos guaninas en el extremo 3'. ^b Se eliminó una citosina en el extremo 3'.

TABLA II
RESUMEN DE LA CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE *E. coli* / SUMMARY OF THE CHARACTERIZATION OF *E. coli* ISOLATES

Aislado	Especie	Planta	Sitio de muestreo en la canal	Fecha de muestreo	Genotipo				
					<i>rfbE</i>	<i>fliC</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>
1.1	Cerdo	I	B	20/02/2004	-	-	-	-	-
2.1	Cerdo	I	B	20/02/2004	-	-	-	-	-
3.1	Cerdo	I	C	20/02/2004	+	+	-	-	-
4.1	Cerdo	I	C	20/02/2004	+	+	-	-	-
5.1	Bovino	II	B	2/03/2004	+	+	+	-	-
6.1	Bovino	II	C	2/03/2004	+	+	+	+	+
7.1	Bovino	II	A	2/03/2004	+	+	+	-	-
8.1	Bovino	II	B	2/03/2004	+	+	+	-	-
10.1	Cerdo	I	A	15/03/2004	+	+	+	+	+
11.1	Cerdo	I	B	15/03/2004	+	+	+	+	+
12.1	Cerdo	I	C	15/03/2004	+	+	-	-	-
13.1	Cerdo	I	C	15/03/2004	+	+	+	+	+
14.1	Bovino	II	B	24/03/2004	+	+	-	-	-
15.1	Bovino	II	C	24/03/2004	+	+	-	-	-

A = falda. B = costado. C = cuello. + y - = respectivamente portadores y no portadores del gen en cuestión.

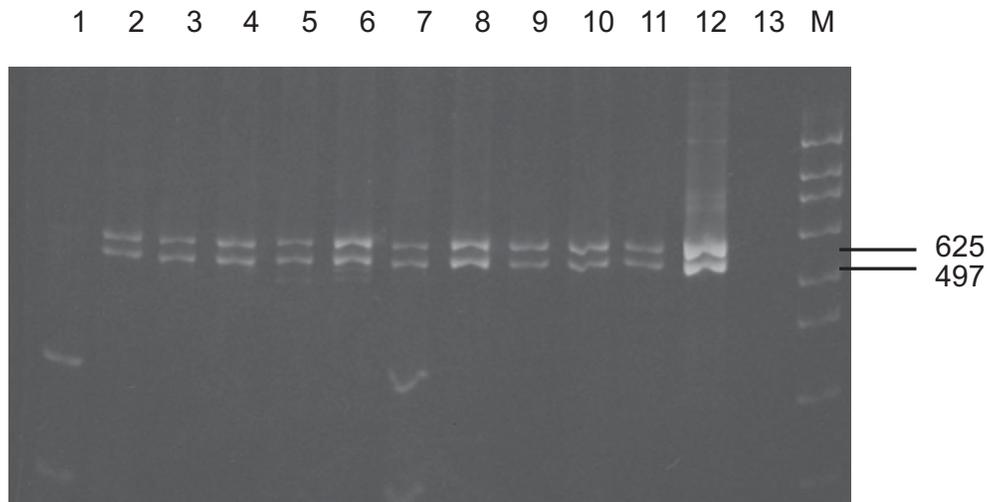


FIGURA 1. PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE LOS GENES *fliC* (625 pb) Y *rfbE* (497 pb) EN AISLADOS DE *E. coli* OBTENIDOS DE CANALES DE CERDO Y BOVINO. CARRILES 1-3 y 8-11 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE CERDO. CARRILES 4-7 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE BOVINO. CARRIL 12 = *E. coli* O157:H7. CARRIL 13 = CONTROL NEGATIVO. CARRIL M = MARCADOR DE PESO MOLECULAR HYPERLADDER 100 PB (BIOLINE)/ PCR PRODUCTS OF *fliC* (625 pb) AND *rfbE* (497 pb) GENES OF *E. coli* ISOLATES OBTAINED OF PORCINE AND BOVINE CARCASSES. LINES 1-3 AND 8-11 = ISOLATES OBTAINED OF PORCINE CARCASSES. LINES 4-7 = ISOLATES OBTAINED OF BOVINE CARCASSES. LINES 12 = *E. coli* O157:H7. LINE 13 = NEGATIVE CONTROL. LINE M = HYPERLADDER MARKER 100 PB (BIOLINE).

Respecto a los seis aislados que fueron encontrados en la planta II y que amplificaron por PCR para los genes que codifican para los antígenos O157 y H7, cuatro fueron portadores del gen de la verotoxina 1, y de estos sólo uno fue portador del gen de verotoxina 2 y el de intimina, y fue obtenido del cuello del animal.

Si bien lo anterior señala el riesgo de encontrar a este patógeno en ambos tipos de canal y representa un riesgo para la salud, no necesariamente implica que el animal sea el portador, sino que pone de manifiesto la ineficiencia de las buenas prácticas higiénicas en el manejo de la canal, puesto que un animal sano puede portar el patógeno en su pelo, piel y tracto

intestinal [2]; o bien la canal contaminada en el proceso de sacrificio contamine a otras canales debido a un deficiente proceso de evisceración. A pesar que el proceso de sacrificio del ganado bovino y porcino es diferente, las diferencias observadas entre el número de canales positivas de cerdo y bovino para cualquiera de los genes no fueron significativas estadísticamente (TABLA III), lo que sugiere la posibilidad de encontrar a *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica indistintamente en ambos tipos de canal, sin embargo, estos datos deben considerarse con reserva, dado el tamaño de muestras analizadas a pesar que se tiene concordancia con otros autores [4] quienes mencionan la posibilidad que los cerdos sean hospederos biológicamente competentes para *E. coli* O157:H7 y otras cepas de *E. coli* verotoxigénicas.

En algunos países como Estados Unidos de Norteamérica, la presencia del serotipo O157:H7 en los alimentos, no importa si es o no verotoxigénica, es motivo de preocupación por el riesgo que ello implica en la salud de los consumidores. Por lo tanto, además de determinar la presencia de *E. coli* O157:H7 en los alimentos es muy importante caracterizarlos en relación con otros factores de patogenicidad. La importancia clínica que tiene *E. coli* O157:H7 como patógeno radica en el hecho que puede ser portadora de uno o ambos genes que codifican para las verotoxinas, así como el gen de la intimina

lo que determina que la cepa sea considerada enterohemorrágica [19]. La FIG. 2 muestra los productos de PCR a partir del gen *stx1* de aislados que fueron positivos para los genes *rfbE* y *fliC*. Se observa que no todos los aislados presentaron este gen, sólo siete de ellos, correspondiendo cuatro a aislados obtenidos a partir de canales de bovino y tres a partir de canales de cerdo. Puesto que los genes *stx1* y *stx2* se encuentran cada uno en un bacteriófago temperado lisogénico, los cuales integran su ADN al cromosoma de *E. coli* O157:H7 [26], se puede explicar porque algunas de las cepas de *E. coli* O157:H7 expresaron sólo una o ambas verotoxinas, lo cual ya ha sido documentado [22].

En otro estudio [10] sobre la presencia de *E. coli* O157:H7 en cerdos, se encontró además del genotipo O157:H7 portador de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*, la presencia del genotipo portador de *stx1* y los genes de virulencia *eaeA* y *hly*, o bien, genotipos portadores de *eaeA*, *stx1* y *stx2*, pero no con los cuatro genes *stx1*, *stx2*, *eaeA* y *hly*. Así mismo otros autores reportaron en canales de bovino, un aislado de *E. coli* O157:H7 que fue negativa por PCR para los genes *stx* pero positiva para los genes de virulencia *ehx* y *eaeA* [9]. De los aislados que fueron caracterizados como portadores del gen *stx1*, cuatro fueron portadores del gen *stx2*, siendo tres de los aislados obtenidos de canales de cerdo y uno de canal de bo-

TABLA III

FRECUENCIA DE AISLADOS DE *E. coli* O157:H7 PORTADORES DE CADA UNO DE LOS GENES *rfbE*, *fliC*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Y DE LOS CINCO GENES POR TIPO DE CANAL / FREQUENCY OF *E. coli* O157:H7 ISOLATES HARBORING EACH OF THE GENES *rfbE*, *fliC*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, AND THE FIVE GENES BY KIND OF CARCASS

Tipo de canal	<i>rfbE</i>	<i>fliC</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	Cinco genes
Bovino	6/9 = 0,666	6/9 = 0,666	4/9 = 0,444	1/9 = 0,111	1/9 = 0,111	1/9 = 0,1111
Cerdo	6/9 = 0,666	6/9 = 0,666	3/9 = 0,333	3/9 = 0,333	3/9 = 0,333	3/9 = 0,3333
Significancia	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS = diferencia no significativa (P ≥ 0,05).

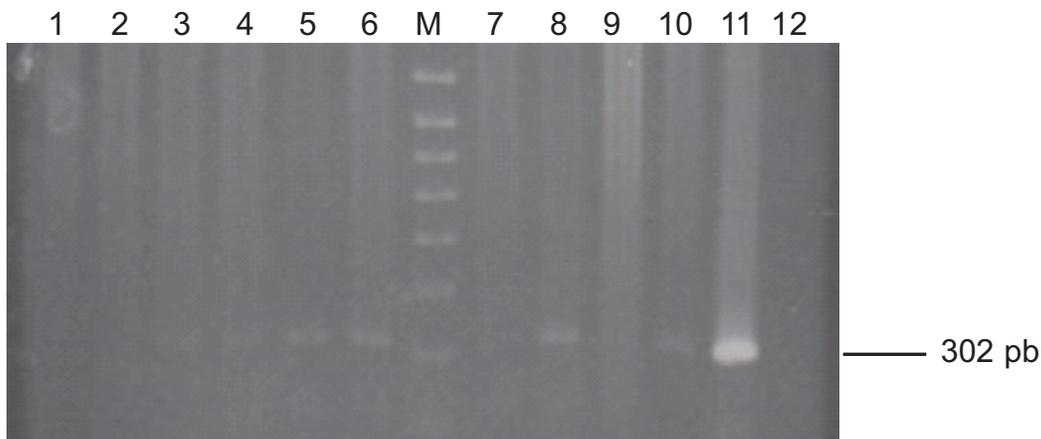


FIG. 2. PRODUCTOS DE PCR DEL *stx1* (302 PB) DE SUPUESTOS AISLADOS DE *E. coli* O157:H7. CARRILES 1-2 Y 7-10 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE CERDOS. CARRILES 3-6 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE BOVINO. CARRIL 11 = *E. coli* O157:H7. CARRIL 12 = CONTROL NEGATIVO. CARRIL M = MARCADOR DE PESO MOLECULAR HYPERLADDER 100 PB (BIOLINE) / PCR PRODUCTS OF *stx1* GENE (302 pb) OF PUTATIVE *E. coli* O157:H7 ISOLATES. LINES 1-2 AND 8-11 = ISOLATES FROM PORCINE CARCASSES. LINES 3-6 = ISOLATES FROM BOVINE CARCASSES. LINE 12 = *E. coli* O157:H7. LINE 13 = NEGATIVE CONTROL. LINE M = HYPERLADDER MARKER 100 PB (BIOLINE).

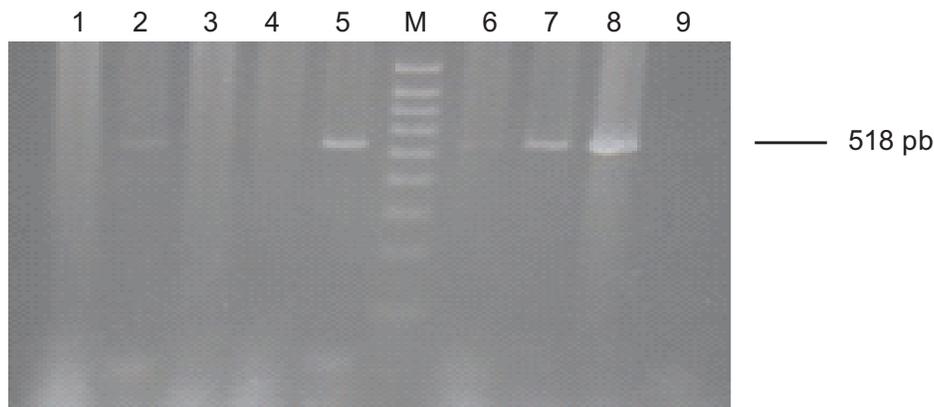


FIG. 3. PRODUCTOS DE PCR DEL GEN *stx2* (518 PB) DE SUPUESTO AISLADOS DE *E. coli* O157:H7. CARRILES 1-4 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE BOVINO. CARRILES 5 Y 6-7 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE CERDO. CARRIL 8 = *E. coli* O157:H7. CARRIL 9 = CONTROL NEGATIVO. CARRIL M = MARCADOR DE PESO MOLECULAR HYPERLADDER 100 PB (BIOLINE) / PCR PRODUCTS OF *stx2* GENE (518 PB) OF PUTATIVE *E. coli* O157:H7 ISOLATES. LINES 1-4 = ISOLATES FROM BOVINE CARCASSES. LINES 5 AND 7-8 = ISOLATES FROM PORK CARCASSES. LINE 9 = *E. coli* O157:H7. LINE 10 = NEGATIVE CONTROL. LINE M = HYPERLADDER MOLECULAR MARKER 100 PB (BIOLINE).

vino (FIG. 3). No obstante se ha reportado una mayor proporción de cepas portadoras del gen *stx2* que del gen *stx1* [9], en el presente trabajo no se encontró la misma proporción, pero sí hubo coincidencia con otros reportes [16] donde mencionan que la mayoría de las cepas portadoras del gen *stx2*, también lo son para el gen *eaeA*, ya que los cuatro aislados portadores del gen *stx2* también fueron portadores del gen *eaeA* (FIG. 4).

CONCLUSIONES

Las canales de bovino y las de cerdo pueden ser portadoras de *E. coli* O157:H7, lo que refleja la habilidad de este patógeno para colonizar también a la especie porcina. Los resultados obtenidos en este trabajo a través de la PCR constituyen un aporte valioso en materia de inocuidad alimentaria y salud pública al demostrar la presencia de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica en estos tipos de alimentos. De gran utilidad resultó la PCR para determinar el grado de virulencia de los aislados ya que permitió identificar los que fueron portadores de los genes de virulencia verotoxinas 1 y 2 y del gen de la intimina, siendo además muy importante desde el punto de vista epidemiológico el hecho de haber encontrado cepas portadoras de los factores de virulencia por ser consideradas patógenas al humano. Debido a que no se obtuvieron muestras ambientales, ni de los trabajadores dentro de los mataderos, así como de las herramientas de corte que ellos utilizan, serán necesarios estudios posteriores para descartar la existencia de fuentes externas de contaminación, así como la posibilidad de contaminación cruzada al momento de la evisceración. De acuerdo con los resultados encontrados, se abre la posibilidad para realizar estudios más a fondo del destino que tendrían el tipo de cepas de *E. coli* O157:H7 sobre la incidencia de enfermedades transmitidas por los alimentos, o si bien, el proceso de cocción es suficiente para eliminar el riesgo de contaminación al momento del consumo de la carne contaminada con dicha bacteria.

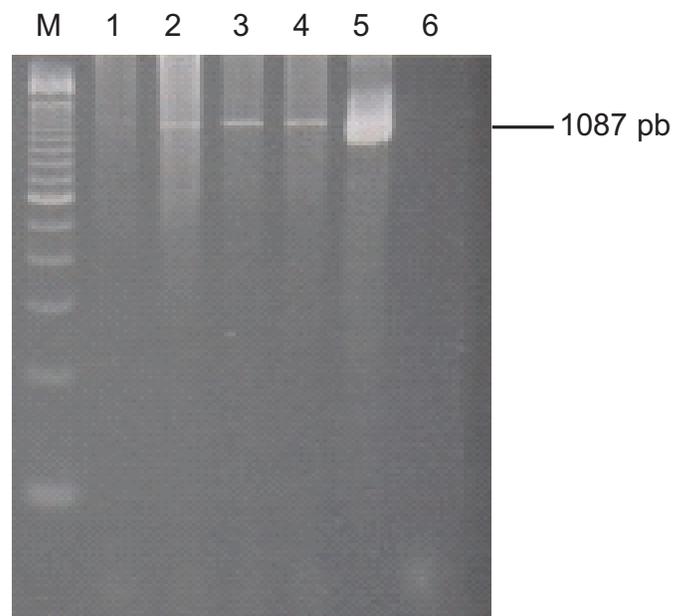


FIG. 4. PRODUCTOS DE PCR DEL GEN *eaeA* (1087 PB) DE SUPUESTOS AISLADOS DE *E. coli* O157:H7. CARRIL M = MARCADOR DE PESO MOLECULAR HYPERLADDER 100 PB (BIOLINE). CARRIL 1 = AISLADO A PARTIR DE CANAL DE BOVINO. CARRILES 2-4 = AISLADOS A PARTIR DE CANALES DE CERDO. CARRIL 5 = *E. coli* O157:H7. CARRIL 6 = CONTROL NEGATIVO / PCR PRODUCTS OF *eaeA* GENE (1087 PB) OF PUTATIVE *E. coli* O157:H7 ISOLATES. LINE M = HYPERLADDER MOLECULAR MARKER 100 PB (BIOLINE). LINE 2 = ISOLATE FORM BOVINE CARCASS. LINES 3-5 = ISOLATES FROM PORK CARCASSES. LINE 6 = *E. coli* O157:H7. LINE 7 = NEGATIVE CONTROL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; REY, J.; ALONSO, M.; HERMOSO, J.; ALONSO, M.P.; DHABI, G.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes and intimin types of shiga toxins (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **J. Clin. Microbiol.** 41: 1351-1356. 2003.
- [2] BOUVET, J.; BAVAI, C.; ROSSEL, R.; LE ROUX, A.; MONTET, M.P.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; ARQUILLIE'RE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in pig carcasses from three French slaughterhouses. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 249-255. 2001.
- [3] CHRISTENSEN, H. B. Datos categóricos y sus pruebas. Novena unidad. En: Houghton Mifflin Co. (Ed) **Estadística paso a paso**. 2a. Ed. Trillas, México. Pp 459-477. 1989.
- [4] CORNICK, N.A.; HELGERSON, A.F. Transmission and Infectious Dose of *Escherichia coli* O157:H7 in Swine. **Appl Environ Microbiol.** 70: 5331-5335. 2004.
- [5] DESMARCHELIER, P.M.; BILGE, S.S.; FEGAN, N.; MILLS, L.; VARY JR, J.C.; TARR, P.I. A PCR specific for *Escherichia coli* O157:H7 based on the *rfb* locus encoding O157 lipopolisaccharide. **J Clin Microbiol.** 36: 1801-1804. 1998.
- [6] DIAZ-CINCO, M.E.; GARCIA, A.; ACEDO, E.; GASTELUM, A. Recuperación e Incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida expandida en el mercado local de la ciudad de Hermosillo, Sonora. *In*: Resúmenes de trabajos libres: microbiología y toxicología. V Congreso del Noroeste, I Nacional, en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Centro de las Artes de la Universidad de Sonora Hermosillo, Sonora. México. 7-12 de noviembre del 2005. En línea: http://www.dipa.uson.mx/wb2/dipa/dipa_congresodelnoroeste. 10/02/2006.
- [7] DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** 19:11-15. 1987.
- [8] DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. **International J. Food Microbiol.** 12: 289-301. 1991.
- [9] ELDER, R.O.; KEEN, J.E.; SIRAGEUA, G.R.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W.W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. **Proceedings of the National Academic of Sciences.** 97: 2999-3003. 2000.
- [10] FEDER, I.; MORGAN, F.; GRAY, J.T.; FRATAMICO, P.; FEDORKA-CRAY, P.J.; PEARCE, R.A.; CALL, J.E.; PERRINE, R.; LUCHANSKY, J.B. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Intact Colon Fecal Samples of Swine. **Emerg. Infect. Dis.** 9: 380-383. 2003.
- [11] FENG, P.; WEAGANT, S.D. Diarrheagenic *Escherichia coli*. 2002. **Bacteriological Analytical Manual**. Chapter 4a. U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S.A. Online: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html#fn1>. 05/01/2006.
- [12] FRATAMICO, P.; SACKITEY, S.K.; WIEDMANN, M.; DENG, M.Y. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.** 33: 2188-2191. 1995.
- [13] GANNON, V.P.J.; D'SOUZA, S.; GRAHAM, T.; KING, R.K.; RAHN, K.; READ, S. Use of the Flagellar H7 Gene as a Target in Multiplex PCR Assays and Improved Specificity in Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains. **J. Clin. Microbiol.** 35: 656-662. 1997.
- [14] GANNON, V.P.J.; RASHED, M.; KING, R.K.; GOSTEYN, E.J. Detection and Characterization of the *eae* Gene of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.** 31: 1268-1274. 1993.
- [15] GILL, C.O.; JONES T. Microbiological sampling of carcasses by excision or swabbing. **J. Food Prot.** 63: 167-173. 2000.
- [16] HEUVELINK, A.E.; SWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.; BEUMER, R.R. DE BOER, E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. **J. Food Protec.** 62: 1115-1122. 1999.
- [17] HEUVELINK, A.E.; VAN DEN BIGGELAAR, F.L.A.M.; SWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.M.; HERBES, R.G.; HUYBEN, R.; NAGELKERKE, N.; MELCHERS, W.J.G.; MONNENS, L.A.H.; DE BOER, E. Occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **J. Clin. Microbiol.** 36: 3480-3487. 1998.
- [18] HUTCHISON, M.L.; NICHOLSON, F.A.; SMITH, K.A.; KEEVIL, C.W.; MOORE, A. **A study on farm manure applications to agricultural land and an assessment of the risks of pathogen transfer into the food chain.** HMSO: MAFF Publications. U.K. Pp. 1-192. 2000.
- [19] MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet** 352: 1207-1212. 1998.
- [20] NATARO, J P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** 11: 142-201. 1998.
- [21] PATON, A.W.; PATON, J.C. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemor-

- rhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*_{O111}, and *rfb*_{O157}. **J. Clin. Microbiol.** 36: 598-602. 1998.
- [22] ROGERIE, F.A.; MARECAT, A.; GAMBADE, S.; DUPOND, F.; BEAUBOIS, P.; LANGE, M. Characterization of Shiga toxin producing *E. coli* and O157 serotype *E. coli* isolated in France from healthy domestic cattle. **Internat. J. Food Microbiol.** 63: 217-223. 2001.
- [23] SAGARPA (SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN). Exportaciones mexicanas de carnes frescas, refrigeradas o congeladas (toneladas). 2002. México. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/expocar.htm>. 21/02/2006.
- [24] SAGARPA (SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN). Estimación del Consumo Nacional Aparente 1990-2004. México. 2005. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/ganind3.htm>. 21/02/2006.
- [25] SCHROEDER, C.M.; WHITE, D.G.; GE, B.; ZHANG, Y.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; ZHAO, S.; MENG, J. Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, EUA. **Internat. J. Food Microbiol.** 85: 197-202. 2003.
- [26] SHAIKH, N.; TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga Toxin-Encoding Bacteriophages: Integrations, Excisions, Truncations, and Evolutionary Implications. **J. Bacteriol.** 185: 3596-3605. 2003.