



# Universidad Nacional Autónoma de México

## Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal

---

CARÁCTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. EN TRES ETAPAS DE LA CADENA PRODUCTIVA DE CARNE DE BOVINO

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL

### PRESENTA

**JORGE ALFREDO DE LA GARZA GARCÍA**

### TUTOR PRINCIPAL

**Dra. María de la Salud Rubio Lozano**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM

### COMITÉ TUTOR

**M en C. Enrique de Jesús Delgado Suárez**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM

**Dra. María del Carmen Wachter Rodarte**  
Facultad de Química – UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatorias

---

A mi familia y amigos, por su apoyo eterno.

A Kimba, por su gran ayuda en la elección de una profesión.

## Agradecimientos

---

Se agradece enormemente al Dr. Rigoberto Hernández Castro, Investigador del Área de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Manuel Gea González”, por su indispensable apoyo en la realización del presente trabajo.

Al M. en C. Enrique Delgado Suárez (Laboratorio de Ciencia de la Carne, CEIPSA, UNAM), miembro del Comité Tutorial, por su valiosísima tutela y gran apoyo en cada una de las etapas de este proyecto.

A la Dra. María Salud Rubio Lozano (la Tutora Principal) y a la Dra. Carmen Wachter Rodarte (Facultad de Química, miembro del Comité Tutorial), por guiar el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Armando Navarro y al personal del Laboratorio de Serología de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina (Delia, Luis y Gabriel), por permitirnos realizar y apoyarnos con la serotipificación de cepas.

A la MVZ. Erika Ornelas, por su apoyo constante en el proyecto y fuera de él.

Al MVZ. Carlos Navarro (Jefe de Control de Calidad) y al Ing. Héctor Montaña Haro (Gerente General) y a su compañía por permitirnos el ingreso a su planta y por todas las facilidades brindadas durante la toma de muestras.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por permitirnos el uso de sus instalaciones durante la realización del muestreo.

## Resumen

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) provocadas por *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* son una de las principales preocupaciones de salud pública a escala global. Ambos patógenos están plenamente asociados con la carne de bovino, el segundo tipo de carne más consumido en México. La caracterización de las cepas presentes en la cadena productiva, constituye una información estratégica para la gestión de riesgos a la salud pública. La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar fenotípica y molecularmente a las cepas circulantes de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., en tres etapas de la cadena de producción de carne de bovino: heces del animal, canales antes de la refrigeración y cortes. Las cepas aisladas de *E. coli* y *Salmonella* spp. fueron identificadas bioquímicamente y corroboradas por PCR (empleando los genes *gadA* e *invA*, respectivamente). Además, las cepas de *E. coli* se evaluaron para factores de virulencia correspondientes a los patotipos STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*), ETEC (*estA*, *eltA*) y EPEC (*eae*, *bfp*); y para grupos filogenéticos mediante la Clasificación de Clermont por PCR vigente. Se lograron aislar 45 cepas de *E. coli*, 34 de canales (n=100) y 11 de cortes (n=100), presentes a una concentración promedio de 0.12 log UFC/cm<sup>2</sup> en canales y 0.329 log UFC/cm<sup>2</sup> en cortes. No se encontraron cepas portadoras de factores de virulencia y el 42.22% de las mismas no fue tipificable mediante serología convencional. Los principales serogrupos detectados fueron O8 (20%), O71 (11.11%) y O1 (6.67%). Respecto a los grupos filogenéticos, se encontró un predominio de los grupos A (60%) y B1 (26.67%). Para *Salmonella* spp. se halló una prevalencia general del 13.6% (n=300) obteniéndose 41 cepas, 35 de heces, 4 de canales y 2 de cortes. El serotipo predominante fue Montevideo (70.73%), además de Newport (7.32%) y Reading (4.88%), mientras que 7 cepas no fueron tipificables.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Carne de bovino, EPEC, ETEC, STEC, Filogrupos, Serotipos

## Abstract

Foodborne diseases caused by *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* are important concerns for public health at global scale. Both pathogens are associated with beef, the second more consumed type of meat in Mexico. The characterization of beef chain production circulating strains constitutes strategic information for the risk assessment on public health. The objective of the present research was the phenotypical and molecular characterization of *E. coli* and *Salmonella* spp. strains present at three levels of the meat production chain: feces, carcasses (pre-chilling) and retail cuts. The isolated strains of both pathogens were identified biochemically and corroborated by PCR (with *gadA* and *invA* genes, respectively). Moreover, *E. coli* strains were evaluated for virulence factors corresponding to the patotypes: STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*), ETEC (*estA*, *eltA*) and EPEC (*eae*, *bfp*); additionally, the Clermont phylogenetic classification was also established for these strains. Forty-five *E. coli* strains were isolated: 34 from carcasses (n=100) and 11 from retail cuts (n=100), with an average concentration of 0.12 log UFC/cm<sup>2</sup> and 0.329 log UFC/cm<sup>2</sup> respectively. Strains carrying virulence factors were not found and 42.22% were non-typeable by conventional serology; the most prevalent serogroups were: O8 (20%), O71 (11.11%) and O1 (6.67%). Regarding *Salmonella* spp., it was found a general prevalence of 13.6% (n=300); 41 strains were obtained: 35 from feces, 4 from carcasses and 2 from retail cuts. The leading serotype was Montevideo (70.73%), followed by Newport (7.32%) and Reading (4.48%), while 7 strains were non-typeable.

**Key words:** *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., Beef, EPEC, ETEC, STEC, Phylogroups, Serotypes

## Contenido

Resumen.....	III
Abstract.....	IV
1. Introducción.....	1
2. Objetivo.....	2
3. Revisión Bibliográfica.....	3
3.1 Ganadería del bovino de carne en México.....	3
3.1.1 Engorda.....	5
3.1.2 Rastros.....	6
3.2 Principales retos y desafíos en materia de inocuidad.....	7
3.3 Legislación aplicable: México, E.E.U.U y Europa.....	9
3.4 <i>Escherichia coli</i> .....	11
3.4.1 Clasificación.....	12
Clasificación serológica.....	12
Clasificación por patotipos.....	13
Otras formas de clasificación (Clasificación molecular).....	13
3.4.2 Principales patotipos asociados con carne de bovino.....	15
STEC (EHEC) .....	15
EPEC.....	18
ETEC.....	19
3.4.3 Factores de riesgo en la cadena de producción de carne de bovino.....	20
Dieta.....	20
Tiempo de engorda.....	22
Estacionalidad.....	23
3.4.4 Epidemiología de <i>E. coli</i> patógenas.....	24
3.5 <i>Salmonella spp.</i> .....	27
3.5.1 Epidemiología de <i>Salmonella spp.</i> .....	30
4. Material y Métodos.....	31
4.1 Plan de Muestreo.....	31
4.2 Caracterización bioquímica.....	37
4.3 Caracterización molecular.....	38
4.4 Serotipificación.....	40
4.4.1 <i>Salmonella spp.</i> .....	40
Preparación de antígenos.....	40
4.4.2 <i>Escherichia coli</i> .....	42
Preparación de antígenos.....	43
Clasificación por filogrupos.....	43
4.5 Análisis de datos.....	45

<b>5. Resultados.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 <i>Salmonella</i> spp. ....</b>	<b>46</b>
5.1.1 Caracterización.....	46
5.1.2 Serotipificación.....	47
<b>5.2 <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>49</b>
5.2.1 Caracterización.....	49
5.2.2 Concentración (Placas 3M Petrifilm®).....	50
5.2.3 Serotipificación.....	52
5.2.4 Evaluación de factores de virulencia.....	54
5.2.5 Grupos filogenéticos.....	56
<b>6. Discusión.....</b>	<b>58</b>
<b>6.1 <i>Salmonella</i> spp. ....</b>	<b>58</b>
Por PCR se confirmaron 41 <i>Salmonella</i> spp. con BQ sólo 39.....	58
Alta frecuencia <i>Salmonella</i> spp. ....	60
Serología: Predomiiio de un serotipo de <i>Salmonella</i> spp. ¿Problema local? ¿metodología empleada?.....	61
7 aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. no tipificables.....	65
Relación entre cepas.....	66
<b>6.2 Coliformes.....</b>	<b>67</b>
<b>6.3 <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>68</b>
Identificación bioquímica.....	68
Concentraciones en canales y cortes.....	69
La mayoría de las cepas no fueron tipificables por serología.....	70
<i>E. coli</i> , no patógenas pero con predominio de serogrupos asociados a patotipos.....	71
Filogrupos.....	75
<b>7. Implicaciones y recomendaciones.....</b>	<b>77</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>78</b>
<b>9. Referencias.....</b>	<b>80</b>



## Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Límites máximos permitidos para <i>E. coli</i> genérica en carne en México.....	10
<b>Cuadro 2.</b> Límites máximos y planes de muestreo establecidos por la legislación europea para canales y carne en relación a Enterobacterias generales, <i>Salmonella</i> spp. y <i>Escherichia coli</i> .....	11
<b>Cuadro 3.</b> Revisión de algunos estudios sobre <i>Escherichia coli</i> en la cadena productiva de carne de bovino en México.....	26
<b>Cuadro 4.</b> Investigaciones referentes a <i>Salmonella</i> spp. en la cadena de producción de carne de bovino en México.....	29
<b>Cuadro 5.</b> Batería de pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de <i>E. coli</i> .....	37
<b>Cuadro 6.</b> Batería de pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de <i>Salmonella</i> spp. ....	37
<b>Cuadro 7.</b> Genes e iniciadores empleados para la caracterización molecular de <i>Salmonella</i> spp. y <i>E. coli</i> .....	38
<b>Cuadro 8.</b> Condiciones empleadas para las reacciones de PCR.....	39
<b>Cuadro 9.</b> Posibles resultados para el esquema de Spicer-Edwards para la identificación de antígenos flagelares de <i>Salmonella</i> spp. ....	42
<b>Cuadro 10.</b> Condiciones para las reacciones del método de Clermont para grupos filogenéticos.....	44
<b>Cuadro 11.</b> Concentraciones de coliformes encontradas en Cortes (en general y por tipo de corte) y Canales detectadas con placas 3M Petrifilm® ECC.....	50
<b>Cuadro 12.</b> Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> en Cortes (general y por tipo de corte) y canales detectadas mediante las placas 3M Petrifilm® ECC.....	51
<b>Cuadro 13.</b> Distribución de aislamientos serotipificados de <i>E. coli</i> (parciales y totales) según origen de la muestra.....	52
<b>Cuadro 14.</b> Frecuencia y distribución de serotipos parcial o totalmente identificados de <i>E. coli</i> en el total de aislamientos.....	53

## Figuras

<b>Fig 1.</b> Toma de muestra de medias canales empleando esponjas y marcos de 10x 10 cm <sup>2</sup> estériles.....	33
<b>Fig 2.</b> Toma de muestras en sala de cortes (pierna, falda, pecho) .....	33
<b>Fig 3.</b> Bolsas y esponjas empleadas para la toma y transporte de muestras.....	35
<b>Fig 4.</b> Placas 3M Petrifilm ® ECC empleadas para cuantificación de coliformes y <i>E. coli</i> .....	35
<b>Fig 5.</b> Colonias sospechosas a <i>Salmonella</i> spp. (productoras de ácido sulfhídrico) .....	36
<b>Fig 6.</b> Medios semisólidos para inducción de antígenos flagelares de <i>Salmonella</i> spp. de fase II .....	41
<b>Fig 7.</b> Controles y estandarización del PCR cuádruplex para establecer grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> . .....	45
<b>Fig 8.</b> Porcentaje de positivos a <i>Salmonella</i> spp. conforme al origen de la muestra ....	46
<b>Fig 9.</b> Ejemplo del proceso de confirmación molecular de cepas sospechosas de <i>Salmonella</i> spp. mediante PCR con la detección del gen <i>invA</i> . .....	47
<b>Fig 10.</b> Frecuencia de los serotipos identificados en los aislamientos de <i>Salmonella</i> spp. ....	48
<b>Fig 11.</b> Distribución de serotipos de <i>Salmonella</i> spp. de acuerdo al origen de muestra .....	48
<b>Fig 12.</b> Ejemplo del proceso de confirmación molecular de cepas sospechosas de <i>Escherichia coli</i> con la detección del gen <i>gadA</i> . .....	49
<b>Fig 13.</b> Ejemplos de la detección de factores de virulencia en aislamientos de <i>E. coli</i> . .....	55
<b>Fig 14.</b> Ejemplo de la caracterización de los grupos filogenéticos de los aislamientos mediante la clasificación de Clermont, por PCR de reacción cuádruple. ....	56
<b>Fig 15.</b> Reacción suplementaria con iniciadores específicos para filogrupos E y C. ....	57

## Gráficos

<b>Gráfica 1.</b> Medias de las concentraciones de coliformes presentes en cortes y canales. ....	51
<b>Gráfica 2.</b> Medias de las concentraciones de <i>Escherichia coli</i> encontradas en canales y cortes. ....	52
<b>Gráfica 3.</b> Frecuencia de serotipos hallados en los aislamientos de <i>E. coli</i> .....	54
<b>Gráfica 4.</b> Distribución de grupos filogenéticos de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i> .....	57
<b>Gráfica 5.</b> Asociación entre serogrupos y grupos filogenéticos de los aislamientos de <i>Escherichia coli</i> .....	58

## 1. Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) provocadas por *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* se encuentran entre las principales preocupaciones de Salud Pública a escala global, ambos contemplados dentro de la lista de patógenos prioritarios en alimentos de la OMS, organismo que desde el 2001 contempla en su planeación estratégica la vigilancia de estas enfermedades (OMS, 2008, 2002, 2000). Mientras que *Salmonella* spp. es la ETA más frecuente en el mundo (NIAID, 2014; Mead *et al.* 1999), la emergencia de cepas de *E. coli* productoras de toxinas tipo Shiga (STEC) altamente patógenas, como la O157:H7, ha motivado la realización de un gran número de investigaciones sobre el tema (CDC, 2013; OMS, 2008).

Tanto *Salmonella* spp. como *E. coli* se asocian con carne de diferentes especies (CDC, 2013; Croxen *et al.* 2013; Kaper *et al.* 2004), entre ellas la de bovino, que es la segunda más consumida en México (Consejo Mexicano de la Carne, 2013). Aunque se han realizado algunos estudios sobre ambos patógenos en el país, estos por lo general se enfocan en los puntos de venta o en el rastro, sin contemplar varios puntos de la cadena productiva. Por ejemplo, Zaidi *et al.* (2006) reportó altas frecuencias de *Salmonella* spp. (54% del total de muestras) en la carne de bovino, en el estado de Yucatán, proveniente de diversos puntos de venta (mercados, carnicerías y supermercados); reportando como serotipos más frecuentes en la zona a *Salmonella* Meleagridis, Anatum y Reading. Por su parte, Gragg *et al.* (2013), trabajando a nivel de rastro con muestras de pieles, heces y linfonodos, reportó también altas frecuencias (55.4%, 100% y 94.1% respectivamente), con los serotipos Kentucky, Anatum y Reading como los más frecuentes.

Para el caso de *E. coli*, de igual manera, los estudios suelen enfocarse a una sola etapa (cortes, canales o punto de venta), además de limitarse a la detección de cepas enterohemorrágicas (EHEC), principalmente del serotipo O157:H7. Callaway *et al.* (2004), reportaron una frecuencia de *E. coli* O157:H7 en heces de 1.2% en estados del centro de México. En contraste, en la Comarca Lagunera, Gallegos (2009) reportó una frecuencia

para el mismo patógeno del 66.6% en muestras de canales de bovino (con detección molecular por PCR y trabajando con muestras compuestas de 5 canales), igualmente en nuestro país. Por su parte, Amézquita-López (2012) estudió la presencia de este patógeno en granjas rurales, hallando una frecuencia de 3.3% en heces, en el Valle de Culiacán.

El conocer las cepas presentes en la cadena productiva, así como las características fenotípicas y moleculares de las mismas, constituye una información estratégica para identificar las vías de ingreso y posterior diseminación de ambos patógenos, así como medidas para la gestión de estos riesgos con respecto a la Salud Pública. Por tanto, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar fenotípica y molecularmente a las cepas circulantes en México de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., en tres etapas de la cadena de producción de carne de bovino: heces del animal, canales antes de la refrigeración y cortes.

## **2. Objetivo**

Caracterizar fenotípica y molecularmente a las cepas circulantes de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., en heces, canales y cortes de bovino en una planta parcialmente integrada.

### **3. Revisión Bibliográfica**

#### **3.1 Ganadería del bovino de carne en México**

La actividad ganadera de bovinos es de gran importancia en nuestro país y cuenta con un importante hato ganadero, mismo que ha ido en aumento constante por más de 10 años y que, para el 2013, se estimaba en 29,992,172 cabezas de ganado (SIAP 2014) . Del hato nacional, sólo un 15% es sólo de carne, aunque se estima que un 11% es de doble propósito y que el 57% se encuentra en desarrollo o en engorda. Estos datos permiten estimar la gran cantidad de cabezas destinadas directa o indirectamente a la industria de la carne (FMVZ-UNAM, 2012).

El desarrollo de la ganadería en México ha sido históricamente basado en modelos extensivos, estando normalmente su crecimiento y rentabilidad fundados en la extensión de superficie de pastoreo. Esta situación perduró sin grandes cambios hasta la década de los 80s. Sin embargo, en las últimas décadas se dio un gran desarrollo de la ganadería con sistemas de producción intensivos, iniciando en la ganadería de leche, pero alcanzando finalmente a la de carne. La adopción de estos cambios en la producción generó la aparición de nuevos retos para la creciente industria ganadera, entre ellos la presentación de problemas, más asociados a la producción intensiva, que van desde el impacto ambiental severo hasta algunas patologías (Hernández L, 2001).

En la actualidad, en términos de producción ganadera, el país se encuentra dividido en tres regiones ecológico-ganaderas: la región Árida y Semiárida (estados del norte como Sonora, Chihuahua, Coahuila, etc.), que aporta el 34% de la producción de carne del país; la región de Trópico Seco y Húmedo (estados en costa como Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, etc.) con una participación productiva del 37% y finalmente la región templada, el Centro del país, con un 29% de aportación al total nacional. De estas regiones, es en el Centro y Norte del país donde se concentra la producción especializada, con predominio claro de sistemas intensivos (principalmente mediante corrales de engorda). En contraste, las regiones tropicales, debido a sus condiciones climáticas,

conservan más los sistemas extensivos de producción de carne a pastoreo, en conjunto con los sistemas de doble propósito empleando cruza de razas cebuinas (Brahman, Gyr, Indobrasil, etc.) con razas europeas (principalmente Holstein y Pardo Suizo) (FMVZ-UNAM, 2012).

Estos datos evidencian la coexistencia de los sistemas de producción extensiva e intensiva en México, en gran medida por las condiciones ambientales (y sociales, pues la producción intensiva suele darse en zonas con mayor desarrollo económico) de las regiones del país; sin embargo, a partir de los años 70, se impulsó fuertemente la engorda de tipo intensivo, principalmente en la región Árida y Semiárida. Situación que continúa en la actualidad, siendo el norte del país el bastión de la ganadería tecnificada y una de las principales regiones ganaderas del país.

En materia de inocuidad, los riesgos biológicos se incrementan en países donde el bajo ingreso de la nación coincide con periodos de rápido crecimiento industrial y agrícola, como aquellos ocurridos en México. En este contexto existen mayores riesgos, pues se generan sectores bajo vigilancia estricta (como el sistema TIF) mientras que, en contraste, se tienen sistemas con poca o nula vigilancia, como los rastros municipales. Este fenómeno incrementa los riesgos a la población en países como el nuestro (OMS, 2002).

Actualmente, la producción intensiva es de suma importancia en materia de producción de carne, pues permite generar grandes cantidades de producto en menor tiempo que los sistemas de pastoreo. Este tipo de producción ha tenido una gran expansión en nuestro país, lo que ha permitido al sector ganadero mexicano mantener una competitividad a nivel global.

La carne de bovino ocupa el segundo lugar en producción y en consumo del país, con una participación en la producción total de carne del 30.4%, sólo después de la carne de pollo (47.7%). La producción de carne bovina en canal, para el 2014 se estimó en 1,835,000 Toneladas. Sin embargo, cabe destacar que el principal ingreso de la industria cárnica es la exportación de ganado en pie; situación que deja ver grandes áreas de

oportunidad en este ramo e indica que debe fomentarse la producción y transformación de productos en el país, con lo que se dejaría de ser un país exportador de ganado en pie y consumidor de bienes procesados (productos cárnicos diversos) (FMVZ-UNAM, 2012).

Para varios autores la exportación masiva de ganado en pie también obedece a las fuerzas de oferta y demanda generadas con la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), agravado con fenómenos como las sequías (por ejemplo la de 1993-1995). Sin embargo, México sigue manteniéndose como uno de los 10 países más competitivos en materia de producción de carne bovina a nivel mundial (Consejo Mexicano de la Carne, 2013).

En cuanto al sector de producción de carne, México destaca aportando un 9.5% de la producción pecuaria total del país y con una participación a nivel mundial del 2.5% de la producción global de cárnicos; siendo México el 6° (8° según Consejo Mexicano de la Carne) productor mundial de carne de bovino, ocupando el sitio 17° en exportaciones. (SIAP, 2014b; Consejo Mexicano de la Carne, 2013).

La industria de la carne es de gran importancia también a nivel nacional, de cada tres kilogramos de carne producida en México, uno es de carne de bovino; siendo la tercera industria más importante tras la de los lácteos y la del pan. A nivel de consumo, la carne de bovino es la tercera más consumida, promediando un consumo *per cápita* de 15.6 kg (15.1 kg de acuerdo al Consejo Mexicano de la Carne). A nivel global, nuestro país ocupa el 8° lugar en consumo de carne bovino. (SIAP, 2014; Consejo Mexicano de la Carne 2013; FMVZ-UNAM, 2012)

### **3.1.1 Engorda**

En México se practica la engorda de ganado para carne en dos modalidades: en pradera (sistema extensivo) y en corrales de engorda (intensivo); siendo esta última modalidad la predominante.



El tiempo de engorda correlaciona con varios factores que van desde la calidad de la carne (terneza y marmoleo) hasta (en conjunción con la dieta) con la preselección de cierta microbiota en el bovino, como cepas STEC (Russell JB *et al.* 2000).

### **3.1.2 Rastros**

En México, el sistema de centros de sacrificio contempla la existencia de rastros de dos tipos: Tipo Inspección Federal (TIF) y Municipales. La diferencia entre estos consiste en que los TIF están sujetos a una vigilancia federal permanente que los obliga a cumplir con los estándares vigentes establecidos por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), esto con la finalidad de garantizar la inocuidad de los productos.

Por su parte, los rastros Municipales están únicamente sujetos al control a nivel estatal y, desafortunadamente, suelen tener deficiencias en materia de inocuidad. Signorini *et al.* (2006), en un estudio con 306 establecimientos, de 259 municipios de todos los estados del país, reportan que el 31% de los rastros municipales evaluados son catalogados como de riesgo sanitario alto y muy alto, mientras que el 52% es de riesgo medio y sólo el 17% alcanza la categoría de riesgo bajo. Asimismo, indican que anualmente se procesaban (para 2006) 111,870 Toneladas de carne de bovino en rastros municipales considerados como de riesgo sanitario alto o muy alto; estimándose que esta carne alcanzaría a 7'103,402 personas como consumidores finales. Estos datos reflejan claramente el inadecuado estatus sanitario del sistema de rastros municipales.

El total de sacrificio de bovinos en México se realiza principalmente en rastros TIF (43%) y en Municipales (43%), con una pequeña participación *in situ* (14%). En materia de inocuidad esto es de importancia, pues la mayor parte del sistema nacional no cuenta con una vigilancia federal constante. Esta situación limita el comercio, pues la capacidad nacional de exportación se ve limitada a aquella producción que es generada en el sistema TIF.

En México se cuenta con un total de 1,144 rastros entre los TIF (112), privados (143) y municipales (889); mismos que tienen una capacidad instalada para el sacrificio de bovinos de 381,889, 88,679 y 404,698 cabezas de ganado respectivamente; para un total de 875,226 animales. Sin embargo, esta capacidad se emplea únicamente al 56% al mes; siendo claro que se subutiliza la infraestructura nacional destinada al sacrificio de bovinos. De esta manera, la infraestructura ya existente en el país podría emplearse (con adaptación de algunos establecimientos y la desaparición de otros) para lograr, de manera paulatina, procesar dentro del sistema TIF un porcentaje mayor de la carne nacional; hecho que impactaría positivamente en cuanto a la inocuidad alimentaria en México. (SIAP, 2014c)

### **3.2 Principales retos y desafíos en materia de inocuidad**

La inocuidad de los alimentos debe ser una responsabilidad compartida entre los productores, la industria que procesa alimentos, los consumidores y las autoridades (NSF International, 2014; FAO-ONU, 2005; FAO Animal Production and Health, 2004). Este concepto aún no se encuentra del todo inculcado en nuestro país, donde la exigencia a la industria tiene pocos años y no se realiza al nivel de otros países; si bien es digna de mención la labor realizada con los establecimientos TIF.

Otro factor actual de importancia en la inocuidad de los alimentos es el proceso de globalización. Este ha provocado una mayor demanda de mayor variedad de alimentos, lo que provoca el traslado masivo de productos alimenticios (los cárnicos incluidos) desde lugares remotos. La globalización del comercio de alimentos, así como de los movimientos humanos están modificando los patrones de producción, distribución y consumo de los alimentos. El comercio global de la carne de origen bovino no es la excepción a este fenómeno, que ha mostrado una tendencia al aumento en producción y en comercialización internacional. Como ejemplo de esto, se puede mencionar el incremento en la producción de 10.2 millones de toneladas en el 2013 en comparación con el 2011, y de 4.2 millones de toneladas en comparación con el 2012. Asimismo, el comercio ha mostrado un aumento menor, pero constante, con 29, 29.7 y 30.1 millones de toneladas comercializadas

globalmente en 2011, 2012 y 2013, respectivamente; siendo de consideración que dichos incrementos se concentran y se concentrarán en los países en desarrollo, como México (FAO, 2013).

Este fenómeno favorece el desarrollo económico y la disponibilidad de alimentos más variados, lo que contribuye a mejores dietas y un mejor estado de salud general. Sin embargo, esto también ha permitido la dispersión y magnificación de enfermedades transmitidas por alimentos ya existentes, e incluso, la generación de nuevas (por ejemplo el brote de *E. coli* O104:H4 que tuvo lugar en Alemania en 2011) (ECDC-EFSA, 2011). En el escenario actual globalizado, una sola fuente de contaminación puede diseminarse y tener consecuencias globales.

De igual forma, los cambios que se suscitan en la cría de animales y en la producción del alimento que se les brinda, tienen un impacto en la emergencia y diseminación de enfermedades zoonóticas, varias de ellas transmisibles por alimentos (OMS, 2013)

La vigilancia es la base para la creación de estrategias nacionales de reducción de los riesgos asociados a los alimentos. Esta reducción, de acuerdo a la estrategia global de inocuidad de la OMS, debe lograrse mediante tres líneas de acción: el desarrollo de sistemas de inocuidad sostenibles e integrados (generados bajo el enfoque de análisis de riesgos), la generación de medidas fundamentadas científicamente y que actúen a lo largo de toda la cadena de producción que eviten el contacto con los patógenos y la evaluación y gestión de riesgos con cooperación entre diversos sectores (industria, investigación, consumidores, gobiernos, etc.) (OMS, 2002).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) han sido bien documentadas en todos los continentes, con brotes serios de enfermedad en todos ellos en la última década, hecho que ilustra la importancia de estas, tanto a nivel de Salud Pública como a nivel económico y social (OMS 2013, 2014).

La diarrea es la manifestación más común causada por ETAs provocadas por patógenos, aunque estas mismas enfermedades pueden provocar otro tipo de daños como el hepático y renal, trastornos neurológicos, artritis o la muerte. Sobre este último rubro, las ETAs diarreicas provocan un estimado de 2.2 millones de muertes anuales en el mundo, la mayor parte de esta cifra es, tristemente, conformada por niños (OMS 2013).

Las enfermedades diarreicas fueron, para el 2012, la 5ª. causa de muerte prematura en hombres y mujeres a nivel mundial, así como de Años de Vida Perdidos (OMS, 2014). Dentro de estas enfermedades muchas se incluyen el grupo de las enfermedades transmisibles por alimentos (ETAs), que son de gran importancia a nivel mundial.

La inocuidad alimentaria es un componente crítico del desarrollo sustentable de un país o comunidad. Los alimentos inocuos impactan favorablemente en la reducción de enfermedad, en la productividad y en la calidad de vida. Adicionalmente, cuando se logra la inocuidad de acuerdo a estándares internacionales, se favorece el comercio y la actividad económica (OMS, 2013).

### **3.3 Legislación aplicable: México, E.E.U.U. y Europa**

**México:** En nuestro país existe legislación aplicable al estado sanitario de la carne. Esta se incluye en la Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004 (Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos). Esta norma establece una tolerancia cero para *Salmonella* spp. en carne (sea congelada, refrigerada, molida o empacada al alto vacío o en atmósfera modificada), tomando en consideración muestras de 25 gramos.

En contraste, para *Escherichia coli* genérica (como indicador), se establecen los límites en UFC/g mostrado en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Límites máximos permitidos para *E. coli* genérica en carne en México.

<b>PRODUCTO</b>	<b><i>E. coli</i> UFC/g Límite máximo</b>
Congelado	No aplica
Refrigerado	1000 (3 log)
Carne molida refrigerada	5000
Envasado al vacío o en atmósfera modificada	No aplica

\*Tomado de la NOM-194-SSA1-2004

Cabe destacar que no se tienen límites establecidos específicos para canales y que no se realiza vigilancia para patotipos o serotipos específicos (como el caso de *E. coli* O157:H7 en otros países).

#### **EEUU:**

El Título 9 del Código Federal de Regulaciones (CFR 9) establece que, en rastros, deben tomarse muestras con una frecuencia proporcional al volumen de producción; siendo para el bovino lo recomendado 1 canal por cada 300, o al menos una muestra por semana de operación.

Para *Escherichia coli* en bovino se establecen 100 UFC/cm<sup>2</sup> como el límite máximo permisible, con un máximo de 3 canales positivas (c) en 13 (n).

En el caso de *Salmonella* spp. se cuenta con un límite de 2.7% de positivos para vacas y toros de abasto o bien, máximo 2 positivos (c) en 50 (n).

#### **Unión Europea:**

Para La Unión Europea, el Reglamento CE 852/2004 (relativo a la higiene de los productos alimenticios) establece que los operadores de la empresa de alimentos son los principales responsables de la inocuidad de los mismos, por lo que deben cerciorarse del cumplimiento de los requisitos de higiene en cada etapa de la cadena productiva (en

materia de criterios microbiológicos, mantenimiento de la cadena fría, muestreos y análisis o cumplimiento de objetivos, según sea el caso). Para esto, se establecen los lineamientos mínimos de higiene (limpieza y desinfección adecuadas, reducción de contaminación transmitida por el aire, evitar el contacto con materiales tóxicos, etc. Además, los operadores de plantas de alimentos deben implementar y mantener siempre un sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control, HACCP, por sus siglas en inglés).

Los criterios microbiológicos se establecían anteriormente con el Reglamento CE 2073/2005 (relativo a los criterios microbiológicos aplicables a productos alimenticios), mismo que fue modificado por el Reglamento CE 1441/2007 que establece los límites para la carne de bovino mostrados en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Límites máximos y planes de muestreo establecidos por la legislación europea para canales y carne en relación a Enterobacterias generales, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli*

<b>Categoría</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Muestreo (n/c)</b>	<b>Límites (m/M)</b>
Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas (después de faenado, previo al enfriamiento)	<i>Salmonella</i> spp.	5/2	Ausencia en la zona examinada por canal
Carne picada y preparados de carne para consumo crudo	<i>Salmonella</i> spp.	5/0	Ausencia en 25g
Carne picada y preparados para consumo cocinado	<i>Salmonella</i> spp.	5/0	Ausencia en 10g
Carne separada mecánicamente	<i>Salmonella</i> spp.	5/0	Ausencia en 10g
Canales de bovinos, ovinos, caprinos y equinos	Enterobacterias	-----	1.5/ 2.5 log UFC/cm <sup>2</sup> , media logarítmica diaria
Carne picada y carne separada mecánicamente, al final del proceso de fabricación	<i>E. coli</i>	5/2	50 UFC/g/ 500 UFC/g
Preparados cárnicos	<i>E. coli</i>	5/2	500/ 5000 UFC/g ó cm <sup>2</sup>

\*Tomado y modificado del Reglamento CE 1441/2007

### **3.4 *Escherichia coli***

Es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, no esporulado, catalasa positivo, anaerobio facultativo que normalmente fermenta la lactosa; puede ser inmóvil o móvil con flagelos peritricos. Forma parte de la microbiota normal intestinal de una vasta cantidad de especies (incluidos todos los mamíferos y otros) y está presente a una concentración estimada en heces de  $\sim 10^6$  bacterias/g. *E. coli* está considerada dentro del grupo de los coliformes (siendo la bacteria prototipo del grupo) y suele emplearse como marcador de contaminación fecal; además cuenta con una amplia variedad de serotipos y algunas cepas tienen la capacidad de provocar diversos cuadros clínicos ya que presentan una gama de factores de virulencia como: hemolisinas, lipopolisacárido (LPS) y otros tipos de toxinas (Gyles CL *et al.* 2010).

#### **3.4.1 Clasificación**

La clasificación de *Escherichia coli* puede hacerse por varios métodos, como: la serotipificación, la división por patotipos (exclusiva para cepas patógenas, de acuerdo al tipo de daño provocado), la fagotipificación, la caracterización de colicinas y más recientemente, la genotipificación, los marcadores de virulencia y los perfiles filogenéticos, entre otros.

#### **Clasificación serológica**

Esta clasificación involucra la detección y caracterización de los antígenos: O (somático), K (capsular), H (flagelar) y F (fimbrial). Para el AgO existen actualmente 174 grupos reconocidos (del O1 al O181, exceptuando O31, O47, O67, O72, O93, O94 y O122, que fueron removidos por ser un grupo ya existente como el O31 igual a O1, o por pertenecer a otros géneros como *Citrobacter* spp.), para el K, el principal antígeno de superficie, se han reportado 80 tipos distintos y para el H se mencionan 53 tipos diferentes, desde H1 a H56, salvo H13, H22 y H50. No obstante, pocos laboratorios cuentan con la capacidad de determinar el antígeno capsular, por lo que comúnmente se emplean sólo los

antígenos O y H en la actualidad. A esta combinación O:H se le llama serotipo. Dentro de las limitantes de este método se encuentran la reactividad cruzada entre algunas variedades antigénicas y la presencia de cepas catalogadas como “No identificables”, que no muestran reacciones específicas para algún antígeno. (Orskov I *et al.* 1977, 1984; Scheutz F *et al.* 2004; DebRoy C *et al.* 2011 ; Whitfield C *et al.* 1999, 2003).

### **Clasificación por patotipos**

En la división por patotipos, específica para cepas patógenas, se toman en cuenta las combinaciones de factores de virulencia de las cepas así como el tipo de daño que provocan. En animales, los principales patotipos son: *E. coli* Enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Productora de toxina Shiga (STEC) que incluye al subgrupo *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* Extraintestinal patógena (EXPEC). En cuanto al humano los principales patotipos asociados son 7: STEC (con el subgrupo EHEC), EPEC, ETEC, *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Difusamente Adherente (DAEC) y *E. coli* Adherente Invasiva (AIEC), la más reciente. Las cepas ExPEC también se asocian a enfermedad humana, principalmente las cepas uropatógenas (UPEC). Los patotipos asociados al humano pueden provocar 3 cuadros clínicos: enfermedad diarreica/intestinal, infección de tracto urinario y sepsis/meningitis. (Gyles CL *et al.* 2010; Kaper JB *et al.* 2004; Wang L *et al.* 2003 ; Croxen MA *et al.* 2013).

En el caso particular del bovino, los patotipos que se asocian a esta especie son EPEC, ETEC, STEC y en menor medida, EIEC; siendo los 3 primeros los que constituyen un riesgo de contaminación potencial para los productos alimenticios derivados de esta especie, que es considerada reservorio de los mismos; mientras que los riesgos por EIEC proveniente de bovinos aún son discutidos (Croxen *et al.* 2013).

### **Otras formas de clasificación (Tipificación Molecular)**

Para estudios de tipo epidemiológico, la técnica de Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE) es considerada como la prueba estándar. Esta permite descartar o vincular



aislamientos relacionados a brotes. Sin embargo, esta técnica toma al menos 3 días en ser completada y requiere de personal capacitado y con experiencia, lo que limita su empleo en muchos países y en muchas regiones (Peters TM, 2009).

El análisis multilocus de secuencias (Multilocus Sequence Typing, MLST), que involucra la secuenciación de regiones conservadas distribuidas a lo largo del genoma bacteriano, es bastante empleado para la tipificación; principalmente de cepas patógenas. Si bien es uno de los métodos de mayor precisión para establecer parentescos entre cepas y establecer conexiones filogenéticas, su desventaja principal es el alto costo que tiene la secuenciación empleada por esta técnica, así como la infraestructura requerida para esto (Chaudhuri RR *et al.* 2012).

Actualmente, se emplean métodos moleculares como la amplificación vía PCR de los genes involucrados en la síntesis de los antígenos O y H (*wzx* y *wzy* para O y *fliC* para H) que detectan diferencias en estos componentes y permiten atribuir el aislamiento a un serogrupo o serotipo específico. No obstante, cabe destacar que este tipo de técnicas aún no cubre a todos los posibles serotipos, pues no se dispone de las secuencias e iniciadores de cada uno (Anklam KS *et al.* 2012; Li Y *et al.* 2015).

Finalmente, el sistema más empleado para la genotipificación es la llamada Clasificación de Clermont. Este sistema, desde su primera publicación con 3 genes en 2000, revolucionó la filogenética de *E. coli* al ser una opción económica y técnicamente viable para muchos laboratorios, incluidos muchos de países en vías de desarrollo (Clermont *et al.* 2000) El método actualizado se basa en una reacción de PCR cuádruple inicial con una reacción doble complementaria (sólo si el resultado del cuádruplex sugiere ciertas cepas poco comunes). Esta técnica permite dividir a los aislamientos de *E. coli* en 8 grupos filogenéticos: A, B1, B2, C, D, E y F; estrictamente *E. coli* y el octavo grupo, correspondiente al Clado Críptico I. Y se ha estimado que un 95% de las cepas, procesadas con este método de PCR cuádruple, pueden ser correctamente asignadas, en comparación con MLST de 13

genes; lo que representa una mejora notable en relación al método anterior de 3 genes, cuya precisión para asignar cepas a un filogrupo oscilaba entre el 80 y 85% (Clermont *et al.* 2013; Gordon DM *et al.* 2008).

La clasificación de los aislamientos de *E. coli* por grupos filogenéticos es de gran utilidad. Esta permite comprender parentescos entre cepas, procesos de dispersión y evolución de algunos grupos. Adicionalmente, los filogrupos permiten agrupar ciertos patotipos que suelen asociarse a grupos específicos, por ejemplo ETEC y EAEC, asociados comúnmente a los grupos A y B1 o a los grupos A, B1, B2 y D, respectivamente (Escobar-Páramo P *et al.* 2004).

Una aplicación más reciente de estas técnicas es su empleo para determinar, con cierto grado de certeza, el posible origen de contaminación. Si bien hace falta más trabajo en el área, ya se tienen ciertas asociaciones de filogrupos a especies que podrían actuar como posibles orígenes de contaminación. Como ejemplo de esto, se ha relacionado a los grupos D y B1 como compartidos por *E. coli* de origen de cerdo y de humano; el subgrupo A<sub>0</sub> principalmente a aves, el subgrupo B<sub>1</sub> se asocia en gran medida a rumiantes, mientras que el subgrupo B<sub>23</sub> se ha reportado como exclusivo de humano (Carlos C *et al.* 2010)

### **3.4.2 Principales patotipos asociados con carne de bovino**

#### **STEC (EHEC)**

En esta clasificación se incluyen las cepas de *E. coli* que hayan adquirido 1 ó 2 genes (*stx1* y/o *stx2*) codificantes para las toxinas Shiga, los cuales típicamente son adquiridos a partir de bacteriófagos lamboides; mismos que pueden estar presentes en gran cantidad de ambientes que van desde el intestino de diversos animales hasta aguas residuales y muestras de alimentos. Este material genético de origen viral es incorporado en el

cromosoma de la bacteria, en forma de profagos crípticos, confiriéndole capacidad de producir toxinas. (Naylor SW *et al.* 2005; Hallewell J *et al.* 2014).

Si bien, existen alrededor de 400 serotipos identificados como STEC, sólo algunos son capaces de producir enfermedad en el humano. Dentro de estos, el cuadro clínico puede variar desde diarreas leves hasta cuadros severos hemorrágicos, provocados por un subgrupo conocido como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) (Blanco JE *et al.* 2004).

En términos generales se suele definir a EHEC como aquellas cepas que provocan Colitis Hemorrágica o Síndrome Urémico Hemolítico en humanos y que poseen: 1) toxinas codificadas por bacteriófagos (toxinas Shiga, también llamadas Verocitotoxinas o Verotoxinas), 2) El locus LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*), generalmente evidenciado por la presencia del gen de la intimina, *eaeA*, y 3) el plásmido EHEC de virulencia o plásmido pO157 en el que se codifica la enterohemolisina (*ehx*), un sistema de secreción tipo II (*etpC* a *etpO*), una proteasa extracelular (*espP*) y un producto homólogo (*toxB*) entre otros. Sin embargo, la presencia de los factores de virulencia asociados en elementos de alta movilidad puede llevar al surgimiento de cepas con características intermedias entre algunos patotipos o cepas que comparten factores de virulencia de dos grupos (Naylor SW *et al.* 2005; Croxen MA *et al.* 2013; Johnson TJ *et al.* 2009 ; Martínez-Castillo A *et al.* 2014).

Se considera que la mayor parte de las cepas EHEC que afectan al humano tienen su origen en fuentes animales, ya que no se consideran estas cepas como habitantes regulares en intestino humano. Actualmente, se considera al ganado bovino como la principal de estas fuentes, sobre todo para el serogrupo O157, aunque también éste ha sido aislado y caracterizado en otros rumiantes como el ovino y la cabra. Sin embargo, en el bovino estas cepas carecen de patogenicidad, pudiendo permanecer como un comensal exitoso; este fenómeno se atribuye a la presencia de diversos patrones de expresión del receptor para la toxina Stx, Globotriaosilceramida, Gb3 (también conocido como CD77) en el bovino; así

como a la ausencia del mismo en el endotelio vascular de esta especie, a diferencia del humano, donde al ingresar la toxina a células vasculares intestinales, se genera una colitis hemorrágica. Por otra parte, durante el tráfico intracelular en las células del bovino, las toxinas (Stx y Stx1) no siguen su tránsito retrógrado desde el endosoma temprano hacia el aparato de Golgi (dependiente de GPP130), sino que son excluidas del retículo endoplásmico y localizadas en lisosomas, donde son degradadas (el mecanismo preciso aún se desconoce). Esta modificación a la vía normal de acción de las toxinas parece inactivarlas sin provocar daños al hospedero (Stephan R *et al.* 2000; Kudva IT *et al.* 1996; Bielaszewska L *et al.* 1997; Elaine Hoey DE *et al.* 2003).

Además del serotipo O157:H7, actualmente existen 6 serogrupos identificados como patógenos emergentes en productos cárnicos, estos son conocidos como STEC no O157 y son: O26, O45, O103, O111, O121 y O145 (también referidos coloquialmente como los *Big Six*, o “los grandes seis”).

Algunos estudios han demostrado la transmisión directa de este tipo de patógenos del ganado a humanos mediante el uso de Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE) (Louie M *et al.* 1999).

A nivel de rastro, se considera que el contenido intestinal y las pieles sucias de los animales son las principales fuentes de contaminación de canales durante la matanza y el procesamiento de la carne en rastro, siendo la evisceración y el desollado puntos críticos en el proceso. Al respecto, se ha observado que existe una relación positiva entre la contaminación observada visualmente de las canales y una mayor frecuencia del patógeno y el hecho de que los animales positivos suelen serlo sólo en la piel o en heces, pero rara vez en ambos muestreos; por lo anterior, en la actualidad se toman medidas de prevención en rastro como corte de zonas contaminados (referido en ocasiones como “trimeo”, de la palabra inglesa *trimming*) (Nastasijevic I *et al.* 2009).

Adicionalmente, cabe destacar el papel que podría tener la mosca doméstica (*Musca domestica*) en la diseminación de este y otros patógenos a nivel de granja y de rastro. En la actualidad se reconoce que las moscas (tanto domésticas como de la fruta) no sólo actúan como simples vectores mecánicos. Se ha demostrado, tras la inoculación experimental de moscas con *Escherichia coli* O157:H7, el crecimiento y replicación de la bacteria en estos insectos, así como su excreción sobre superficies por hasta 4 días. Asimismo, en una escuela de Japón, en un brote de *Escherichia coli* O157:H7 ocurrido en septiembre de 1996, se pudo probar la asociación de las moscas con la transmisión de la enfermedad, al aislarse la misma cepa de las moscas presentes en la escuela y las provenientes de granjas que se hallaban a alrededor de 30 metros de distancia (Sasaki T et al. 2000; Kobayashi M, 1999).

## **EPEC**

Estas cepas corresponden a bacterias con la capacidad de provocar lesiones de “unión y borrado” (*attaching and effacing* (A/E), en inglés) de microvellosidades a nivel del epitelio intestinal, característica compartida con las cepas STEC y brindada por el locus LEE. Esta similitud es debida a que las cepas EPEC son las precursoras de las cepas de STEC. (Croxen MA et al. 2013).

Las cepas EPEC se clasifican actualmente en típicas y atípicas, según la presencia o ausencia del plásmido de factor de adherencia (pEAF, por sus siglas en inglés) que codifica para el pili formador de agregados (*bfp*, *bundle forming pilus*). Aquellas cepas que contienen a pEAF son denominadas como típicas (tEPEC); mientras que las que carecen del plásmido, son consideradas como atípicas (aEPEC) (Croxen MA et al. 2013).

Las cepas típicas son asociadas a enfermedades infantiles diarreicas leves y moderadas y se sabe que la susceptibilidad a estas cepas disminuye con la edad, sólo estando asociadas a riesgo severo en niños de 0 a 11 meses. Estas cepas no son frecuentes en animales, siendo el humano la única especie considerada reservorio, lo que prácticamente las excluye en materia de inocuidad de la carne.

Las cepas atípicas son las más emparentadas con las cepas STEC LEE+ en serotipos, genética y virulencia. Se piensa que *E. coli* O157:H7 divergió de aEPEC O55:H7 hace aproximadamente 400 años. Los serotipos más frecuentes para aEPEC son: O51, O145, O26, O111 y O119 (puede observarse que algunos son compartidos con el grupo de las “grandes 6” de STEC). Además, muchas cepas correspondientes a aEPEC por caracterización molecular y patológica no son clasificables mediante el sistema de antígenos O/H.

Las aEPEC son encontradas con gran frecuencia en animales como el perro, el bovino, el conejo, primates, ovejas, así como de fuentes humanas, y se sabe que las infecciones por esta variedad superan a las provocadas por la típica tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y se considera que existe transmisión interespecies de estas cepas (Croxen MA *et al.* 2013).

## **ETEC**

Estas cepas, principales causantes de la llamada diarrea del viajero, tienen por característica esencial la habilidad de producir una toxina termolábil (LT) y/o una toxina termoestable (ST); así como la presencia de diversos factores de colonización (CF's, por sus siglas en inglés) que permiten su adherencia al epitelio intestinal.

Las toxinas termoestables se dividen en dos tipos (ST-I y ST-II), siendo la tipo II la más con mayor frecuencia se asocia a cepas que colonizan animales. La toxina termolábil o LT, también se divide en dos tipos I y II (este último subdividido en a, b y c; y caracterizado por su expresión a nivel cromosomal, por adquisición de material de bacteriófagos, a diferencia del tipo I que suele ser plasmídico.

Se conocen al menos 78 antígenos O y 34 H asociados a este patotipo. Los serotipos más frecuentes son: O6:H16 (LT/ST), O8:H9 (ST), O25:NM (LT), O78:H12 (ST), O148:H28 (ST) y O153:H45 (ST). En cuanto a los CF's, se han caracterizado 23 diferentes, mismos que pueden ser fimbriales, afimbriales, helicoidales o fibrilares y cuyos genes se hallan principalmente en plásmidos de virulencia.

Se estima que hay 840 millones de casos al año en países en vías de desarrollo (de los cuales 240 millones se estima que son niños menores a 4 años) y alrededor de 800,000 muertes por este patógeno. Además, se cree que 325,000 niños mueren anualmente por ETEC y que existen 46.6 millones de niños portadores asintomáticos (Croxen MA *et al.* 2013 ; Johnson TJ *et al.* 2009).

### **3.4.3 Factores de riesgo en la cadena de producción de carne de bovino**

**Dieta:** Este factor ha cobrado mucho interés pues se ha observado que puede influir de manera significativa en la presencia de determinadas cepas. Principalmente se ha estudiado para su manipulación en el control de *E. coli* O157:H7.

- Inicialmente, una dieta de los bovinos basada en grano, predispondrá a un incremento en la población total de *E. coli* en colon, lo que incrementa la posibilidad de que el bovino albergue cepas potencialmente patógenas para el hombre. Este fenómeno se explica porque al alimentar con grano, una cantidad considerable de polisacáridos vegetales (como celulosa, hemicelulosa y almidones) no será degradada en rumen y llegará hasta el colon. Si bien *E. coli* no es capaz de degradar estos compuestos, se sabe que en el colon existen bacterias capaces de degradar almidones vegetales, lo que genera maltosa y maltodextrinas como subproductos; mismos que sí pueden emplearse fácilmente por las cepas de *E. coli*. Esto es bastante lógico considerando que las vacas son deficientes en la producción de amilasa, por lo que los almidones alcanzarían con mayor facilidad regiones distales del tracto gastrointestinal. Algunos estudios muestran que el ganado alimentado con predominio de grano de maíz crudo muestra hasta 1000 veces más *E. coli* que los hatos alimentados a base de heno (Diez-González F *et al.* 1998; Russell JB *et al.* 2000).
- Por otra parte, la dieta a base de granos puede influir en la generación de un fenotipo resistente al ácido en las cepas presentes de *E. coli*. Dicho fenotipo podría ser beneficioso para la bacteria al llegar al tracto gastrointestinal humano, donde la

primera barrera a cruzar, para poder colonizar, será el bajo pH gástrico, mismo que alcanza en promedio un pH de 2 (Diez-González F *et al.* 1998).

Se sabe que las dietas ricas en grano son fermentadas con mayor rapidez en rumen y generan una mayor cantidad de ácidos grasos volátiles (como el butírico y el propiónico, generados en grandes cantidades en rumen). Estos ácidos promueven el desarrollo de una resistencia extrema a condiciones ácidas en algunas cepas de *E. coli*. Los bovinos con dieta alta en grano tienen un pH hasta dos unidades inferior y una concentración de ácidos grasos volátiles en colon de hasta 90% más que los animales alimentados con mayor contenido de heno. De esta manera, una dieta alta en grano no sólo podría incrementar la cantidad presente de *E. coli* en intestino, sino que podría generar que estas cepas mostraran un fenotipo de extrema resistencia a condiciones ácidas, provocado por la exposición previa a un ambiente ácido, que facilitaría su ingreso al intestino humano y por ende, su colonización (Diez-González F *et al.* 1998; Russell JB *et al.* 2000). Este fenómeno cobra gran importancia si se considera que las cepas de STEC pueden estar presentes en el bovino sin provocarles un cuadro clínico.

Adicionalmente a la dieta, se conoce que *E. coli* cuenta con varios sistemas adaptativos para condiciones ácidas. Dentro de estos, se han descrito bien algunas aminoácido descarboxilasas como las enzimas glutamato descarboxilasa y arginina descarboxilasa, ambas con regulación genética positiva ante el choque ácido (Diez-González F *et al.* 1998; Russell JB *et al.* 2000; Tchaptchet S *et al.* 2013).

Otro punto a considerar, en materia de alimentación de los animales, son los periodos de ayuno prolongados, que suelen practicarse en algunos rastros. Se ha mostrado que el ayuno por uno o más días (al que suelen someterse animales con traslados largos previo a la matanza) incrementa la detección de patógenos como *E. coli* y *Salmonella* spp. en heces. Asimismo, se sabe que los becerros en ayuno son más propensos a adquirir la infección y a eliminar *E. coli* O157:H7 (Russell JB *et al.* 2000; Cray *et al.* 1998).



En la actualidad, se piensa que podrían emplearse cambios de dieta previos a la matanza con la finalidad de reducir la cantidad de *E. coli* resistentes al ácido (cepas que se mostrarían más competentes para infectar al hombre). En el estudio realizado por Diez-González *et al.* (1998) se logró disminuir 1000 veces el contenido de *E. coli* genérica y las cepas resistentes a ácido disminuyeron hasta 10 células viables por gramo de heces, al cambiar la dieta de grano a heno por 5 días. Esto es consistente con la hipótesis de generación de sustratos (maltosa y maltodextrina) con las dietas altas en granos.

**Tiempo de engorda:** Para el proceso de engorda en corrales en México, se realizan ciclos promedio de 90 a 120 días de engorda, en la mayor parte del país; sin embargo, varios lugares promedian los 190 días de engorda (como el sitio donde se realizó el presente estudio); mientras que en sistemas de trópico (donde suelen emplearse sistemas de doble propósito y cruza de razas europeas y cebuinas) se emplean de 180 hasta 270 días (FMVZ-UNAM, 2012). Este factor podría actuar en combinación con el efecto de una dieta alta en granos (que generará ambientes más ácidos). Si se toma en cuenta esto y el hecho de que los tiempos de engorda empleados en México suelen ser más cortos que los utilizados en EEUU o Canadá, podría existir cierta relación entre una mayor presencia de cepas STEC y los tiempos de engorda más prolongados. La dieta rica en grano de esos países, aunada a un mayor tiempo para seleccionar cepas ácido resistentes, podría ser una explicación plausible a la mayor frecuencia de cepas EHEC (particularmente O157:H7) en corrales de países altamente tecnificados.

Además, el tiempo de engorda podría tener participación a través de la edad de los animales al ir a rastro. Esto podría tener cierta relevancia pues se ha demostrado que los animales jóvenes, becerros de 4 a 8 meses de edad, son los reservorios más importantes de cepas STEC *eae+*, que son de gran importancia para la patogenia en humanos (Blanco M *et al.* 2004). Sin embargo, hacen falta estudios que profundicen en el efecto de esta variable sobre la selección de cepas patógenas.

**Estacionalidad:** Varios estudios han demostrado la existencia de estacionalidad en el caso de *E. coli*, principalmente para O157:H7, serotipo que presenta una mayor frecuencia fecal en los meses más calurosos (en verano), con disminuciones significativas de la carga hacia el invierno. De la misma manera, los brotes humanos de EHEC O157:H7 mantienen el mismo patrón de la estacionalidad bovina. Normalmente se implicaba a la temperatura para explicar este fenómeno, pues los meses de verano suelen tener las temperaturas promedio más elevadas del año; sin embargo, se ha observado que lugares con temperaturas inferiores y de latitudes más al Norte de EEUU y Canadá son los que presentan mayor número de brotes (Edrington TS *et al.* 2006).

A partir de estas observaciones, algunos estudios han deducido que la variable responsable de la estacionalidad es el fotoperiodo, pues estos lugares situados más al Norte tienen días notablemente más largos en verano. Al incrementar artificialmente la luz de los corrales de bovinos, semejando las horas luz del verano, se han logrado obtener incrementos de hasta 3 veces en la frecuencia fecal de *E. coli* O157:H7, comparado con controles sin iluminación adicional artificial (Edrington TS *et al.* 2006).

Actualmente se piensa que la melatonina y la señalización de esta hormona, podría tener un efecto en las poblaciones bacterianas presentes en el animal (Sperandio V *et al.* 2003). Esto cobra especial interés si se considera que la producción de esta hormona ya ha sido reportada en tracto gastrointestinal. Esta hormona se encuentra implicada en una gran variedad de procesos fisiológicos como el mantenimiento de biorritmos, estados de vigilia, control de funciones biliares, regulación del sistema inmune, actividad contra células de cáncer, etc; por lo que su papel en las poblaciones de *E. coli* en bovino requiere de una mayor investigación (Sperandio V *et al.* 2003).

Por otra parte, otras hormonas como las catecolaminas, en particular la epinefrina o adrenalina, han sido reportadas como agentes efectores sobre las dinámicas de población bacterianas. Se ha reportado que la adrenalina y otras catecolaminas logran intervenir en los llamados sistemas de autoinducción (*Quorum Sensing*, en inglés). En el caso de O157:H7,

la epinefrina participa en el encendido de genes de virulencia. Esto abre aún más el abanico de posibilidades de situaciones que favorecerían el desarrollo bacteriano, como por ejemplo podrían ser situaciones de estrés con liberación de catecolaminas (Edrington TS *et al.* 2006; Sperandio V *et al.* 2003).

#### **3.4.4 Epidemiología de *E. coli* patógenas**

En EEUU, se estimaron entre 2000 y 2008, 203,000 casos de enfermedad provocada por *E. coli* procedente de alimentos, de los cuales 63,000 se atribuyeron a *E. coli* O157:H7, 110,000 a cepas STEC no O157, 18,000 a cepas ETEC y 12,000 por otras cepas diarreogénicas no ETEC ni STEC (CDC, 2009).

El último brote asociado a carne de bovino en EEUU fue reportado el 20 de junio de 2014 y fue provocado por *E. coli* O157:H7 asociada a carne molida. Este brote se presentó en 4 estados y generó 12 casos de enfermedad, de los cuales 4 terminaron en hospitalización; asimismo, se requirió hacer el llamado de casi 1.8 millones de libras de carne contaminada (CDC, 2014).

Existen más ejemplos de brotes recientes ocurridos en EEUU y reportados por su sistema de vigilancia como: el brote ocurrido en 2012, provocado por *E. coli* O145 de origen no identificado que provocó 18 casos, 4 hospitalizaciones y 1 muerte en 9 estados afectados (CDC, 2012); el brote de enero de 2010, asociado a *E. coli* O157:H7 en carne de bovino, con 21 infectados en 9 estados y cerca de 248,000 libras de carne contaminada retirada del mercado (CDC, 2010); o el brote de 2009 provocado por *E. coli* O157:H7 en carne de bovino, afectando 9 estados con 23 enfermos y más de 400,000 libras de productos cárnicos retirados del mercado (CDC, 2009b).

Para 2011, *E. coli* O157:H7 ocupaba el 5º lugar en etiologías de ETAs que provocaron hospitalizaciones, con alrededor de 2,138 casos reportados (CDC, 2011).

En contraste, en México, estudios realizados en niños, animales y alimentos, han mostrado tener bajas frecuencias en comparación con países como EEUU, tanto para el serogrupo O157 como para el serotipo O157:H7. Además, en la población mexicana no se han reportado casos de Síndrome Hemolítico Urémico (HUS, por sus siglas en inglés) asociado a infecciones por O157. Y este fenómeno de baja frecuencia ha sido hallado también en otras naciones en vías de desarrollo como Laos y Brasil (Torres AG, 2010).

Por lo anterior, se ha sugerido que existen procesos de selección de cepas EHEC O157:H7 en los países desarrollados, en los que podrían influir factores como: las diferencias en la producción de alimentos (dietas y tiempos de engorda en los animales), los fotoperiodos (de mayor relevancia en latitudes al Norte), así como la circulación de patógenos o enterobacterias en el ambiente (mayor en los países en vías de desarrollo). Respecto a este último punto, se ha sugerido que las cepas O157 podrían no ser suficientemente competitivas en ambientes como grandes cantidades de enterobacterias circulantes, incluyendo otras cepas de *E. coli* patógenas y comensales.

Adicionalmente, se tiene bien documentada la reactividad cruzada entre el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* O157 y los antígenos somáticos (O) de *Yersinia enterocolitica* O9, *Citrobacter freundii*, *Escherichia hermannii* e incluso de *Brucella abortus* (Stuart FA *et al.* 1982; Chart H *et al.* 1992). Este fenómeno de reactividad cruzada también ha sido descrito en el suero de bovinos de hatos del centro de México, de los que un 71% presentaba respuesta bactericida contra O157, mostrando que la alta circulación ambiental de otras enterobacterias podría ser determinante en este fenómeno también en poblaciones animales (Navarro A *et al.* 2007).

**Cuadro 3.** Revisión de algunos estudios sobre *Escherichia coli* en la cadena productiva de carne de bovino en México.

Segmento de la cadena	Autor(es) / Año	Información reportada
Animales vivos	Callaway <i>et al.</i> 2004	- Frecuencia de 1.25% (O157:H7) en las muestras de bovino - Mayor frecuencia en verano
Canales	Hernández-San Juan S <i>et al.</i> 2007	Coliformes en canales (83%), con máxima en log UFC/cm <sup>2</sup> de 6.01. <i>E. coli</i> en canales (69%), con una máxima en los UFC/ml de 0.98.
Canales	Varela-Hernández JJ <i>et al.</i> 2006	- <i>E. coli</i> no O157, <i>E. coli</i> O157:NM y <i>E. coli</i> O157:H7 con frecuencia de 20.5%, 5% y 2.7%, respectivamente, de 258 canales evaluadas. - Genes para factores de virulencia sólo en una cepa O157:H7 ( <i>stx2+</i> , <i>eaeA+</i> y <i>hly<sub>933+</sub></i> ) y en una no O157 (sólo <i>stx1+</i> ). - Frecuencia mayor en meses calientes (5.8%), que en fríos (2.3%),
Canales	Gallegos MA <i>et al.</i> 2009	- Frecuencia del 66.66% (O157:H7) por PCR. - Sólo el 0.111% de las muestras de bovino presentó los genes para O157 y H7 más los 3 factores de virulencia buscados ( <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> ).
Animales vivos	Amézquita-López <i>et al.</i> 2012	- Mayor frecuencia de STEC y O157:H7 al usar Separación Inmunomagnética (IMS), (15.83 y 15%, respectivamente) que al usar plaqueo directo (5 y 3.33%, respectivamente). - Serotipos de cepas STEC no O157: O111:H8, O8:NT, O8:H19, O146:H21, O146:H8, O15:NT, O20:H4, O73:H4, O73:NT, O168:NT y O75:H8 (el más prevalente). 85% de estas <i>ehxA</i> +, sólo 10.8% <i>eae</i> +. - Frecuencia total de STEC O157:H7 de 5.4%, STEC no O157 de 7.1%.
Canales	Pérez-Montaña JA <i>et al.</i> 2012	<i>Escherichia coli</i> genérica (como marcador) en el 96% de las canales tras el lavado final en concentraciones de 1.5 a 4 log UFC/cm <sup>2</sup> .
Animales vivos, canales, pieles y superficies	Narváez-Bravo <i>et al.</i> 2012	Frecuencias de <i>E. coli</i> O157:H7 en piel (11.7%) que en heces (5.2%), en corrales (2%) y canales (0.53%). Estacionalidad significativa (P<0.05), más aislamientos en verano.
Carne molida	Gómez-Aldapa CA <i>et al.</i> 2013	- Frecuencia del 10% <i>E. coli</i> O157:H7. - Predominio de falsos positivos con los kits VIP Gold y REVEAL. - No se hallaron cepas portadoras de los genes de virulencia <i>stx1</i> y <i>stx2</i> ; y sólo una fue positiva para <i>eae</i> .

### 3.5 *Salmonella* spp.

*Salmonella* spp. es un bacilo Gram negativo, oxidasa negativo, no esporulado, anaerobio facultativo, generalmente con motilidad mediada por flagelos peritricos, productor de ácido sulfhídrico, no fermentador de lactosa ni sucrosa. Es el agente causal de la salmonelosis, una de las ETAs de reporte más común en el mundo (CDC, 2013; OMS, 2015).

El género *Salmonella* sólo cuenta con dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Esta última es subdividida a su vez en 6 subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *houtenae*, e *indica*. Cabe destacar que la mayor parte de los casos clínicos corresponden a *S. enterica* subespecie *enterica*. Para esta última se emplea la clasificación de Kauffmann-White-Le Minor, basada en la serotipificación de los antígenos O (somático), H (flagelar) si existe (*S. Pullorum* y *S. Gallinarum* carecen de este), y ocasionalmente el antígeno capsular Vi (de “virulencia”, esencial en el caso de *S. Typhi*) (SSNISM, 1934). Con esta clasificación, actualizada regularmente, se tienen alrededor de 2579 serotipos (Weill FX *et al.* 2007). En cuanto a los antígenos somáticos (O) existen dos tipos (APHL, 2006; Gyles CL *et al.* 2010):

- Los antígenos de Grupo O son los principales para determinar el serotipo y son codificados por la región *rfb* y están presentes en todas las enterobacterias.
- Los antígenos Secundarios (o *Ancillary Antigens*, en inglés) son codificados por elementos extracromosomales como fagos o plásmidos y aparecen sólo en algunos grupos O específicos. Estos pueden variar en un mismo serotipo.

Para la determinación de serogrupos O se emplea el primer tipo. De este, actualmente se tienen 46 serogrupos, designados por números; aunque anteriormente se referían con letras (por lo que en la actualidad en ocasiones se expresa el número y la letra).

Cabe mencionar que no todas las cepas de *Salmonella* spp. reaccionan de la misma manera, ejemplos de estas son las cepas rugosas que no expresan este antígeno y las cepas altamente mucoides que no permiten su detección.

En el antígeno H igualmente existen dos formas, o fases que se coordinan y tienen una expresión normalmente excluyente. La fase 1 es codificada por el gen *fliC*, que tiene homólogos en otras enterobacterias como *E. coli*. Para esta fase se tienen 8 subfactores mayores (f, g, m, p, q, s, t, u). Mientras tanto, la fase 2 del antígeno H es codificada por otro gen, *fljB*, ubicado en una región específica del genoma de *Salmonella* spp.

En total, tomando en cuenta ambas fases, existen 119 variedades de antígeno H de *Salmonella* spp. Estas se designan normalmente con letras minúsculas salvo las variedades que llevan números (como 1,2; 1,5; 1,7; etc. o los antígenos  $Z_{4,Z6}$ ,  $Z_{10}$ ,  $Z_{15...Z89}$ ). Y típicamente se manifiesta un antígeno en común dominante más un secundario, de modo que se forman complejos (por ejemplo: g.m; g, m, s; f, g, t; f, g, s; 1,2; 1,5; 1,7; etc.) (APHL, 2006).

Es digno de mención que existen serotipos o variantes monofásicas, que únicamente expresan una de las fases, incluso cuando se esperan dos. Esto puede deberse a mutaciones, en el caso de serotipos que expresan ambas fases, u ocurrir de manera natural en algunos serotipos normalmente monofásicos como Enteritidis, Berta y Typhi (SSNISM, 1934; Weill FX *et al.* 2007).

Dentro de los serotipos de importancia en Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) se encuentran: Typhi, Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Dublin, Montevideo, Braenderup, Derby, Heidelberg, Seftenberg, Ohio, Kingston, Virchow, Rissen, Hillingdon, Haardt, Newport, Agona, Kentucky, etc. Y reportados como emergentes en los últimos años: Paratyphi A, Anatum, Weltevreden, Othmarschen, London (CDC 2009,2013).

**Cuadro 4.** Investigaciones referentes a *Salmonella* spp. en la cadena de producción de carne de bovino en México.

Segmento	Autor(es) /Año	Información reportada
Canales	Varela-Guerrero JA <i>et al.</i> 2013	- <i>Salmonella</i> spp. con frecuencia de 8.3%. Serotipos: Typhimurium (48%), Typhi (41%), Enteritidis (4%), No Tipificables (7%)
Canales	Hernández-San Juan S <i>et al.</i> 2007	<i>Salmonella</i> spp. en canales (14%) y 11% el total del estudio para línea bovina.
Animales vivos y cortes	Zaidi MB <i>et al.</i> 2008	- Frecuencia en intestinos y carne de res (20.9% y 29.9%, respectivamente). - <i>Salmonella</i> spp. en cortes varía entre 21.3 y 36.4% - Serotipos en carne de res: Anatum (17.7%), Meleagridis (13%), Agona (7.3%) y Typhimurium (6.85%), Muenchen (2.5%) - Animales son la principal fuente de salmonelosis en México de acuerdo a estudios de Electroforesis por Campos Pulsados (PFGE).
Cortes	Zaidi MB <i>et al.</i> 2006	- Frecuencia total de <i>Salmonella</i> spp. en carne de res de 54%. - Frecuencia en carne de res de mercados (94%), carnicerías (91%) y supermercados (23%). - Serotipos en carne de res: Meleagridis (27.9%), Anatum (16.3%), Reading (10.6%), Agona (8.7%), Worthington (6.7%), Cerro (5.8%). El 6.3% de muestras con $\geq 3$ serotipos, el 15.9% 2 y 31.7% sólo uno.
Animales vivos, linfonodos y pieles	Gragg <i>et al.</i> 2013	- <i>Salmonella</i> spp. en el 100% de las pieles, 94.1% de heces, 91.2 de linfonodos mesentéricos, 76.5% de subilíacos, 55.9% de mandibulares y 7.4% de mediastínicos, con un total en linfonodos de 55.9%. - 8 serotipos encontrados: Kentucky (32.2%), Anatum (29.9%), Reading (17.2), Meleagridis (12.6%), Cerro (4.6%), Muenster (1.1%), Give (1.1%) y Mbandaka (1.1%). Con un 4.4% de no tipificables. Sólo Reading se aisló de todos los tipos de muestra. - Posibilidad de la entrada transdermal de <i>Salmonella</i> spp.
Carne molida	Cabrera-Díaz E <i>et al.</i> 2013	Frecuencia general de 56.7%. Más aislamientos (68.5%) en meses calientes. Se identificaron 25 serotipos y 8 serogrupos. Los principales fueron: Anatum (8.9%), Agona (6.7%), Infantis (6.7%), Havana (5.9%), Typhimurium (5.9%), Derby (5.2%), Sinstorf (4.4%) y Panama (3.7%).
Cortes	Miranda JM <i>et al.</i> 2009	Frecuencia de <i>Salmonella</i> spp. del 15.1% en carne de res. Mayor en tiendas (21.9%) que en supermercados (9.8%).
Canales	Pérez-Montaño JA <i>et al.</i> 2012	- <i>Salmonella</i> spp. se aisló en el 15.5% de canales tras el lavado final. Con más aislamientos en temporada de lluvias (22%) que en secas (5.5%). - 13 serotipos y 4 serogrupos (identificación parcial). Estos fueron: Give (24.4%), Typhimurium (17.9%), Infantis (10.3%), Anatum (5.1%), Bovismorbificans (3.8%), Montevideo (3.8%), Havana (2.6%), Muenster (2.6%), Enteritidis (1.3%), Livingstone (1.3%), Oranienburg (1.3%), Panama (1.3%) y Sinstorf (1.3%).
Animales vivos, canales, pieles y superficies	Narváez-Bravo <i>et al.</i> 2012	<i>Salmonella</i> spp. total en corral y planta (52.5%). Frecuencia mayor en pieles (92.4%), que en heces (46.8%) y canales pre-eviscerado (49%). De 1620 aislamientos se serotipificó el 7.6%, hallándose 10 serotipos: Anatum, Montevideo, Tennessee, Kentucky, Muenster, Give, Reading, Mbandaka, Meleagridis y Fresno.



### 3.5.1 Epidemiología de *Salmonella* spp.

En EEUU, entre 2000 y 2008, se estimó 1 millón de casos anuales por salmonelosis no tifoideas de origen alimentario, con un estimado de 19,000 hospitalizaciones y 380 muertes anuales (CDC, 2009).

Para el 2011 la estimación de casos anuales se mantuvo casi igual con 1,027,561 casos, contribuyendo para el 11% de los casos de ETAs adquiridas en casa, ocupando el segundo lugar (sólo tras las infecciones por Norovirus); pero siendo aún la etiología número uno en causas de hospitalización y muertes provocadas por ETAs, con 19,336 y 378 casos registrados y confirmados para ese año (CDC, 2011). Asimismo, la salmonelosis es la segunda ETA más frecuente en EEUU (Marler Clark Firm, 2014), siendo el serotipo Typhimurium el asociado con mayor frecuencia a enfermedades transmitidas por alimentos (University of Nebraska-Lincoln, 2014).

En EEUU el último brote asociado a carne de bovino ocurrió en 2013, cuando se reportaron casos debidos a la presencia de *Salmonella* Typhimurium en carne molida en 6 estados (Arizona, Illinois, Iowa, Michigan, Pennsylvania y Wisconsin); con un total de 22 casos y 7 hospitalizaciones. Esto provocó el llamado de cerca de 1050 libras de carne molida contaminada (CDC, 2013).

En 2012, en EEUU, tuvo lugar otro brote asociado a carne molida contaminada con *Salmonella* Enteritidis, mismo que afectó a los estados de Maine, Massachusetts, New Hampshire, New York, North Carolina, Rhode Island, Vermont, Virginia y West Virginia. Este brote provocó 46 casos de enfermedad y 17 hospitalizaciones, así como el llamado de 29,339 libras de carne contaminada (CDC, 2012).

En 2011 se registró un brote provocado por *Salmonella* Typhimurium asociada a carne molida de origen bovino. Este brote afectó a 7 estados, provocando 20 casos de enfermedad (CDC, 2011).

En el caso de México, se carece de información certera sobre los brotes y serotipos circulantes. Esto en gran medida se debe a que nuestro país cuenta con un sistema pasivo de vigilancia epidemiológica en el que no se realizan muestreos apropiados ni se logra la trazabilidad entre fuentes de contaminación y casos. A esto, se puede sumar la falta de búsqueda de atención médica por parte de pacientes con enfermedades diarreicas y la falta de reporte y seguimiento adecuado para los brotes y casos por parte de las autoridades de salud. En un estudio efectuado por Zaidi *et al.* (2008) se ha demostrado que los animales podrían ser la principal fuente de salmonelosis en el humano en México.

#### 4. Material y métodos

##### 4.1 Plan de muestreo

Para dar cumplimiento al objetivo del trabajo se realizó un plan de muestreo representativo para 3 etapas de la cadena productiva: heces de los animales (representativas de los bovinos de engorda en etapa de finalización previa al sacrificio), canales calientes y cortes. Cada etapa se consideró como un muestreo por separado puesto que no fue posible tener trazabilidad desde el animal vivo hasta los cortes (debido a la logística y tiempos de procesamiento de la planta).

El tamaño de muestra para cada etapa a evaluar fue calculado mediante la fórmula estadística para determinar el tamaño de muestra para una proporción de una población, cuando no conocemos el número de elementos en esa población. Esto se realizó como se muestra a continuación: (Jekel JF *et al.* 2007)

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * pp * qq}{d^2} \quad ; \text{ donde:}$$

$d^2$   
n= número de muestra

$Z_{\alpha}^2$ = Valor de Z en una distribución normal  $Z_{\alpha} = 1.96$  cuando  $\alpha = 0.05$

p = proporción aproximada de la población que presenta la característica estudiada (si se desconoce se emplea 0.5, como en este caso)

q= proporción aproximada de la población que no presenta la característica estudiada (1-p)

d= error o precisión deseada, que se fijó en 10%

$$n = \frac{(1.96^2)(0.5)(0.5)}{10^2} = 96 \rightarrow 100 \text{ (se redondeó el resultado)}$$

De esta manera, se determinó un total de 96 muestras por etapa, valor que se redondeó a 100 para un total de 300 muestras en el estudio.

El muestreo se realizó en una empresa integrada verticalmente de manera parcial (puesto que carece de cría propia) de producción de carne de bovino, que comprende desde corrales de engorda hasta la sala de corte. Los animales explotados en la engorda provienen de 8 estados de la República Mexicana (Jalisco, Zacatecas, Tabasco, Chiapas, Nayarit, San Luis Potosí, Estado de México y Veracruz) y son engordados durante 190 días en promedio. La empresa fue seleccionada por sus características de integración parcial (desde engorda hasta cortes), que permiten tener una noción del flujo de los patógenos en la cadena productiva. Los puntos a muestrear fueron los siguientes:

- Canales terminadas antes de refrigeración: Se empleó la metodología del Nationwide Sponge Microbiological Baseline Data Collection del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA-FSIS, 1998) de EEUU con modificaciones: se muestrearon canales calientes, antes de la refrigeración y se empleó el agua peptonada de una muestra para la detección de ambos patógenos (*E. coli* y *Salmonella* spp.). Se muestrearon medias canales (lado derecho) empleando esponjas y marcos estériles desechables de 10 x 10 cm<sup>2</sup> (Meat/Turkey Carcass Sampling Kit, NASCO®) en tres puntos de la canal (pierna, falda y pecho) para dar un total de superficie de 300 cm<sup>2</sup> por canal.



**Fig 1.** Toma de muestra de medias canales empleando esponjas y marcos de 10x 10 cm<sup>2</sup> estériles.

- Cortes mayoristas (Espaldilla, Pierna y Falda): Fueron muestreados antes del empaclado, en la sala de cortes, de manera aleatoria. De igual manera se empleó el método de EEUU utilizando las esponjas y los marcos estériles de 10 x 10 cm<sup>2</sup> (Meat/Turkey Carcass Sampling Kit, NASCO®). Se tomó un solo marco por corte (pierna, falda o pecho), con una superficie total de 100 cm<sup>2</sup> por muestra (USDA-FSIS, 1998).



**Fig 2.** Toma de muestras en sala de cortes. Se seleccionaron cortes provenientes de los tres puntos que se muestrearon en canales (pierna, falda, pecho)

- Heces: Debido a los flujos y a la logística de la planta, se decidió muestrear heces provenientes de rectos, post-eviscerado. Esto se realizó aprovechando el sitio de inspección oficial colocado en la rampa de eviscerado. Las muestras se tomaron en este punto (aproximadamente a los 20 minutos de sacrificado el animal). Se retuvieron momentáneamente los paquetes de vísceras, se abrió la ligadura del recto y se colectaron las muestras de heces con guantes nuevos de nitrilo, mismos

que fueron depositados en bolsas estériles para su posterior procesamiento. En cada muestra se realizó el cambio de guantes.

Estos puntos fueron seleccionados para dar noción de la circulación de los patógenos en estudio a lo largo del proceso, así como por cuestiones logísticas, pues se trató de no alterar, hasta donde fue posible, el flujo normal de trabajo de la planta. El esquema de muestreo fue el siguiente:

BACTERIA	Muestras		
	Canales	Cortes	Rectos
<i>Salmonella spp.</i>	100	100	100
<i>Escherichia coli</i>	*100	*100	----- **
<b>PUNTOS DE MUESTREO</b>			

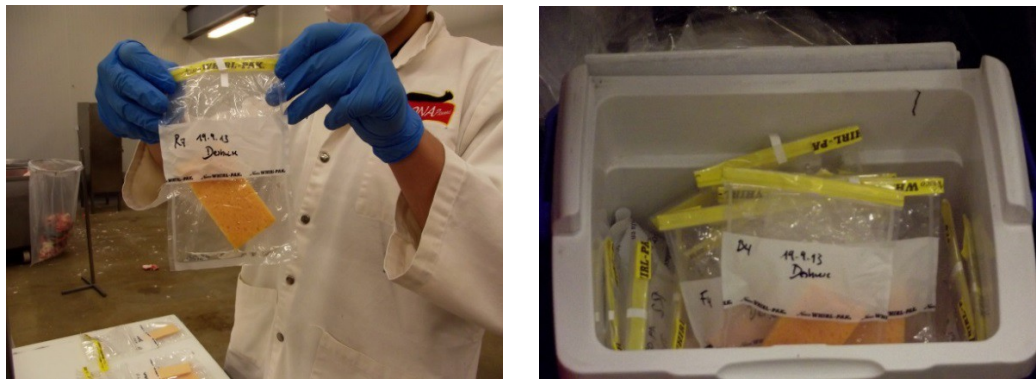
\* La concentración para *E. coli* fue estimada a partir de la misma muestra tomada con la esponja. Se tomó parte del medio para procesarlo en placas Petrifilm 3M® ECC (3M, EEUU).

\*\* Se decidió no muestrear rectos para *E. coli*, pues todos resultarían positivos con un gran conteo de esta bacteria; puesto que la misma forma parte de la microbiota normal del bovino.

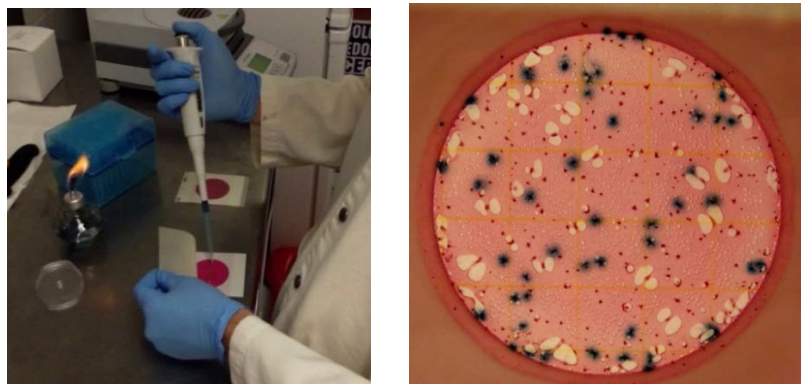
Una vez tomadas las muestras, las esponjas fueron selladas en bolsas estériles de plástico y guardadas en hieleras con geles refrigerantes para su traslado en refrigeración al laboratorio de la planta (Fig.3). De los 10 ml de agua peptonada se inocularon por triplicado agares *Salmonella-Shigella* (SS) (MCD Lab®, PRONADISA-CONDA®, España), tomando 100 µl para inocular cada caja; esto para estimar la concentración de *Salmonella spp.* viables. Del volumen restante del agua peptonada, de igual forma en esterilidad, se tomó 1 ml para cada placa rehidratable 3M Petrifilm® *E. coli*/Coliformes (3M, EEUU), para estimar la concentración de *Escherichia coli* genérica y de coliformes

(Fig.4). Tanto las placas de agar SS como las placas Petrifilm fueron incubadas a 37°C por 24 horas en una incubadora bacteriológica.

Las placas 3M Petrifilm® *E. coli*/Coliformes fueron revisadas conforme a las instrucciones del fabricante, a las 24 y 48 horas, para conteos de coliformes y *E. coli* totales, respectivamente. Se empleó el medio CHROMAgar ECC (CHROMAgar®, Paris, Francia) para aislar las cepas identificadas en las placas 3M Petrifilm® ECC. Para las pruebas de identificación y caracterización de los aislamientos se emplearon las cepas sembradas en el medio TSA.



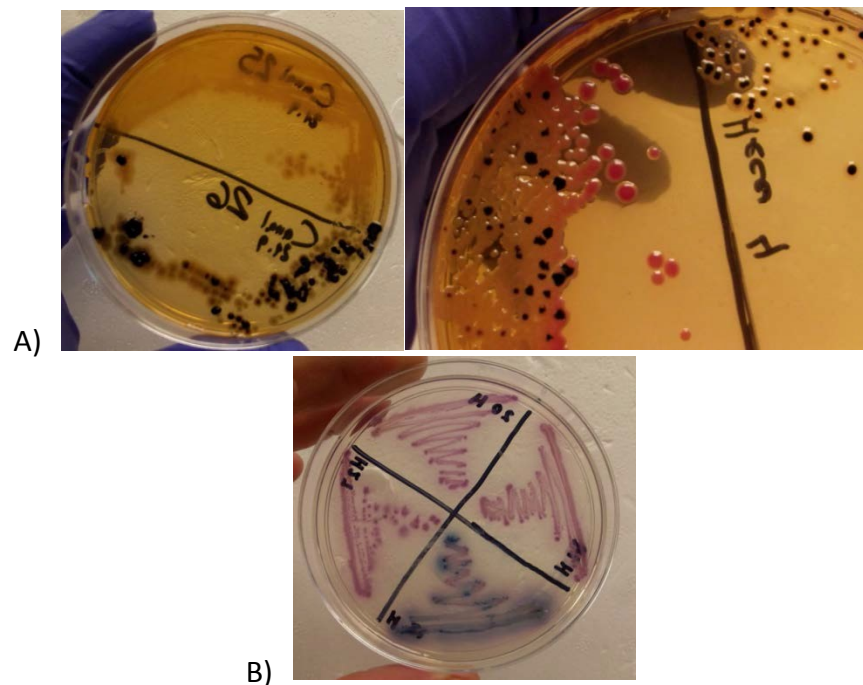
**Fig 3.** Bolsas y esponjas empleadas para la toma y transporte de muestras.



**Fig 4.** Placas 3M Petrifilm® ECC empleadas para cuantificación de coliformes y *E. coli*.

Para las muestras de heces, se emplearon hisopos estériles para realizar la siembra directa en medio Salmonella-Shigella.

En el caso del Agar SS, aquellas colonias con morfología sugerente de *Salmonella* spp. (con producción de ácido sulfhídrico, colonias redondeadas, convexas de borde regular) (Fig.5) fueron resembradas en medio CHROMAgar Salmonella Plus (CHROMAgar®, París, Francia) para su purificación y confirmación. Una vez crecidos en este medio, los aislamientos puros y confirmados con el medio selectivo y diferencial, fueron sembrados en agares tripticaseína de soya (TSA) (MCD Lab®, PRONADISA-CONDA®, España) para su identificación. Todas las colonias sugerentes a *Salmonella* spp. (productoras de ácido sulfhídrico o de coloración morada en CHROMAgar Salmonella Plus) fueron recuperadas.



**Fig 5.** Colonias sospechosas a *Salmonella* spp. (productoras de ácido sulfhídrico) en: A) medio *Salmonella-Shigella*, y B) CHROMAgar *Salmonella* Plus (coloración morada).

La conservación de las cepas se realizó de dos modos: primero se elaboraron inóculos de 1 ml tomando colonias frescas y mezclándolas en caldo Infusión-cerebro-corazón (BHI) con 10% de glicerol y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador. Por otra parte, se realizó un respaldo de los aislamientos en medio Gelosa Especial, guardado a temperatura ambiente.

## 4.2 Caracterización bioquímica

Las cepas obtenidas fueron posteriormente caracterizadas bioquímicamente. (Quinn PJ *et al.* 1999; Mc Faddin JF *et al.* 2004; Scheutz F *et al.* 2005). Inicialmente fueron evaluadas para oxidasa y teñidas con Gram.

Para *E. coli* se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

**Cuadro 5.** Batería de pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de *E. coli*

Prueba	Características a evaluar	Resultado esperado
Triple Azúcar Hierro (TSI, por sus siglas en inglés)	Fermentación de azúcares (principalmente lactosa), producción de ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S) y producción de gas.	Fermentación positiva (color amarillo), sin producción de H <sub>2</sub> S y con producción opcional de gas.
Ácido Sulfhídrico-Indol-Motilidad (SIM, por sus siglas en inglés)	Producción de H <sub>2</sub> S, motilidad y presencia de la enzima triptofanasa (Indol)	H <sub>2</sub> S negativo, motilidad variable, normalmente positiva (crecimiento observable más allá del sitio de inoculación), Indol positivo (color rojo con reactivo de Kovacs)
Citrato de Simmons	Utilización del citrato como única fuente de carbono	Negativo (sin cambios)
Urea	Presencia de la enzima ureasa	Negativo (sin cambios)
Rojo de Metilo-Voges-Proskauer (RM-VP)	Detección de cepas altas productoras de ácido. Producción de acetoina a partir de glucosa	RM: positivo (anillo rojo en superficie) VP: Negativo (sin cambios)
Malonato-Fenilalanina	Uso del malonato como única fuente de carbono y sulfato de amonio como única fuente de nitrógeno.	Malonato: Negativo; Fenilalanina: Negativo
Gluconato	Capacidad para oxidar el gluconato, única fuente de carbono, y degradarlo a 2-cetogluconato, compuesto reductor evidenciado con sulfato de cobre.	Negativo (sin cambios tras hervir con sulfato de cobre, color azulado)

En el caso de *Salmonella* spp. las pruebas empleadas fueron las siguientes:

**Cuadro 6.** Batería de pruebas bioquímicas empleadas para la identificación de *Salmonella* spp.

Prueba	Resultado esperado
TSI	Fermentación negativa, producción de H <sub>2</sub> S (precipitado color negro), sin producción de gas
SIM	Motilidad positiva (salvo Gallinarum y Pullorum), producción de H <sub>2</sub> S, Indol negativo
Citrato de Simmons	Positivo (coloración azul)
Urea	Negativo (sin cambios)
RM-VP	RM: Positivo
Malonato-Fenilalanina	Malonato: Negativo; Fenilalanina: Negativo
Gluconato	Negativo (sin cambios)
Presencia de enzimas descarboxilasas de Aminoácidos (Arginina, Ornitina, Lisina y Testigo)	Normalmente positivos, con algunas variaciones (coloración morada del medio)



### 4.3 Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó mediante PCR de punto final, se utilizaron iniciadores contra secuencias específicas de los genes que se muestran en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Genes e iniciadores empleados para la caracterización molecular de *Salmonella* spp. y *E. coli*.

Patógeno	Gen	Función	Secuencia de Iniciadores 5'→3'	Otras características
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i> (284 pb) (a)	Gen cromosomal de <i>Salmonella</i> spp. Codifica para una invasina, necesaria en el proceso establecimiento de la bacteria en el hospedero.	139 GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA  141TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	Compartido por prácticamente todo el género.
<i>Escherichia coli</i>	<i>gadA</i> (670 pb) (b)	Glutamato descarboxilasa; enzima útil para mantener un pH fisiológico a nivel local. Caracterizado como marcador para la especie <i>Escherichia coli</i> .	<i>gadA1</i> ACCTGCGTTGCGTAAATA <i>gadA2</i> GGGCGGGAGAAGTTGATG	Enzima codificada por dos genes virtualmente iguales <i>gadA</i> y <i>gadB</i> (g)
	<i>eaeA</i> (890 pb) (c)	Intimina; Proteína importante para la adhesión, mediante el receptor translocado de intimina (Tir).	EAE1:GTGGCGAATACTGGCGAGACT EAE2:CCCCATTCTTTTCACCGTCTG	Proteína compartida por los patotipos EPEC y STEC (con EHEC).
	<i>stx1</i> (582 pb) (c)	Toxina Shiga 1; una de las toxinas generadas por las cepas de STEC. Estas pueden presentar ambos tipos de toxina o sólo uno.	STX1F:ACACTGGATGATCTCAGTGG STX1R:CTGAATCCCCCTCCATTATG	Toxinas del tipo AB <sub>5</sub> , por tener una subunidad A y un pentámero de subunidades B.
	<i>stx2</i> (255 pb) (c)	Toxina Shiga 2	STX2F:GGCACTGTCTGAAACTGTCC STX2R:TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	
	<i>estA</i> (190 pb) (d)	Toxina Termoestable (ST); Una de las dos toxinas que pueden hallarse en las cepas ETEC.	STa-F CTAATGTTGGCAATTTTTATTCTGTA STa-R AGGATTACAACAAAGTTCACAGCAGTA A	Suele ser la más frecuente en aislamientos ETEC, estando sola o en combinación con LT. (f)
	<i>eltA</i> (132 pb) (d)	Toxina Termolábil (LT); la otra toxina que puede hallarse en las cepas ETEC.	LT-1 AGCAGGTTCCACCGGATCACCA LT-2GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	Al igual que ST es codificada en plásmidos, salvo las variedades LT-II, que han sido reportadas en ocasiones en cromosoma. (f)
	<i>bfp</i> (324 pb) (e)	Pili formador de cúmulos ( <i>Bundle forming pilus</i> ), participa en la adhesión.	EP1,CAATGGTGCTTGCGCTTGCT EP2,GCCGCTTTATCCAACCTGGT	Encontrado en cepas EPEC típicas, ausente en atípicas. (f)

(a): Rahn *et al.* 1992; (b): Mc Daniels AE *et al.* 1996 ; (c) : DebRoy C *et al.* 2006 ; (d) : Bisi-Johnson MA *et al.*, 2011 ; (e) : Thornieport *et al.* 1995 ; (f) : Croxen *et al.* 2013 ; (g) : Grant *et al.* 2001.

Se realizaron reacciones de 25µl y se utilizaron los reactivos del Top *Taq* Master Mix Kit de la marca QIAGEN®, con las siguientes concentraciones finales: 1.25 Unidades de *Taq* Polimerasa, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Buffer para PCR, 200µM de cada dNTP.

Las condiciones empleadas para cada reacción se resumen en el siguiente cuadro:

**Cuadro 8.** Condiciones empleadas para las reacciones de PCR

Microorganismo	Gen	Condiciones*
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	94°C 3 min, (95°C 30'; 55°C 30'; 72°C 30') x 30 ciclos; 72°C 5 min.
<i>E. coli</i>	<i>gadA</i>	95°C 4 min, (94°C 1min; 58°C 1 min; 72°C 1 min.) x 30 ciclos; 72°C 5 min.
	<i>eae</i>	<b>Reacción Doble:</b>
	<i>stx1</i>	94°C 5 min, (94°C 30', 56°C 30', 72°C 45') x 33 ciclos; 72°C 7 min.
	<i>stx2</i>	94°C 5 min, (94°C 45'; 58°C 45'; 72°C 45') x 33 ciclos; 72°C 7 min.
	<i>estA</i>	<b>Reacción Doble:</b>
	<i>eltA</i>	95°C 5 min, (95°C 30'; 60°C 30'; 72°C 30') x 30 ciclos; 72°C 5 min.
	<i>bfp</i>	94°C 5 min, (94°C 1 min; 56°C 1 min; 72°C 1 min) x 30 ciclos; 72°C 7 min.

\*Condiciones: Desnaturalización inicial; (Desnaturalización; Alineamiento; Extensión) por 30 ciclos; Extensión Final.

Los productos de amplificación por PCR fueron procesados por electroforesis en agarosa (SeaKem® LE Agarose, Lonza, ME, EEUU) al 1 ó 2% de acuerdo al peso molecular de los productos esperados (2% para aquellos productos pequeños, por ejemplo aquellos de los genes *eltA* y *staA*). Los geles fueron corridos a voltaje constante a 80 V por 50 minutos y la visualización y digitalización de imágenes se realizó en un fotodocumentador Gel Logic 2200 con el software Care Stream®.

## **4.4 Serotipificación**

### **4.4.1 *Salmonella* spp.**

Para el caso de *Salmonella* spp. se empleó el método de antisueros de conejo (Difco™ *Salmonella* Antisera) con el esquema de Kaufmann-White-Le Minor, para la asignación de serotipos, avalado por la OMS y el Instituto Pasteur, en su novena edición de 2007 (Weill FX *et al.* 2007).

#### **Preparación de antígenos**

Las cepas fueron inicialmente sembradas, por la técnica de aislamiento en cultivo puro, en placas de medio Mc Conkey (Oxoid®, Reino Unido) . A partir de este medio, se seleccionó una colonia aislada y se resembró en tubos (13 x 100mm con tapón de rosca) con agar tripticasa soya en pico de flauta (tubo de trabajo). Estos fueron incubados a 37°C en una incubadora bacteriológica por 24 horas. A partir de este crecimiento se trabajaron todas las reacciones necesarias para la serotipificación.

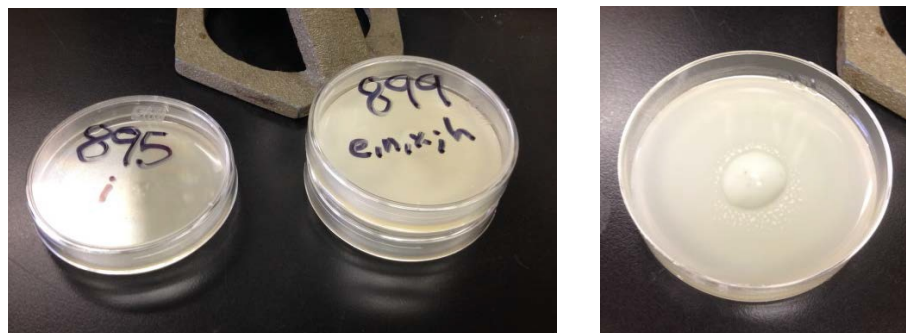
La obtención del antígeno somático (Ag O) se realizó sembrando la cepa, a partir del tubo de trabajo, en tubos (16 x 150mm) con agar tripticasa soya en pico de flauta. Estos se incubaron 24 horas a 37°C en una incubadora bacteriológica. Posteriormente, se les agregó 10 ml de solución salina (8.75g/L), dejando humedecer las colonias. Por agitación y con ayuda de un asa microbiológica estéril, se removió en lo posible, el crecimiento del tubo, diluyéndolo en la solución salina. Esto se recolectó en otro tubo de 16 x 150 mm y se hirvió a 110°C por una hora con vapor fluyente. Una vez hervido y a temperatura ambiente, se agregó formalina para fijar el antígeno. Esta solución se empleó para la determinación de antígenos somáticos.

Inicialmente se probaron los antígenos somáticos con antisueros Poli A y Poli B, y contra factores: O2, O4, O5, O9, O6,7, O6,8 (C<sub>3</sub>), O8 (C<sub>2</sub>) y O7 (C<sub>1</sub>). Posteriormente, y en caso de ser necesario, fueron confirmados con sueros contra otros factores o combinaciones de estos.

Para el antígeno H o flagelar, se realizó la siembra en medio semisólido de Colindale adicionado con Infusión-Cerebro-Corazón (BHI), en tubos de 16 x 150 mm con una varilla de vidrio en su interior. Estos fueron inoculados por picadura con asa en el interior de la varilla de vidrio y posteriormente incubados a 37°C por 24 horas. Tras este periodo, los cultivos que presentaban motilidad fueron resembrados en caldo BHI e incubados nuevamente a 37°C por 24 horas. El caldo ya crecido fue fijado con formalina y homogenizado. Esta solución se empleó para la determinación de los antígenos flagelares de fase I.

Se inició con el esquema comercial de Spicer-Edwards (*Salmonella* H Antiserum Spicer-Edwards, BD Difco®) como prueba tamiz, más antisueros Poli H, L, EN e I; realizándose posteriormente las pruebas confirmatorias para cada cepa.

La inducción de fase II del antígeno flagelar se realizó empleando medio semisólido (con base de caldo casoy con nitrato de potasio y agar-agar) con presencia de anticuerpos contra la fase I del antígeno H (Fig.6). Este medio se sembró por picadura y se incubó a 37°C por 24 horas, para posteriormente, recuperar, de la región más periférica, una asada y transferirla a caldo Infusión-Cerebro-Corazón (BHI, por sus siglas en inglés). Posteriormente, el caldo se fijó con formalina y se volvió a evaluar mediante al igual que la fase I con el esquema de Spicer-Edwards más Poli H, EN, L e I. Aquellas cepas que presentaban cambios con respecto a las reacciones de fase I fueron evaluadas con sueros específicos dependiendo de la reacción de Spicer-Edwards obtenida. (Cuadro 9)



**Fig 6.** Medios semisólidos para inducción de antígenos flagelares de *Salmonella* spp. de fase II

**Cuadro 9.** Posibles resultados para el esquema de Spicer-Edwards para la identificación de antígenos flagelares de *Salmonella* spp.

<b>Sueros Spicer-Edwards</b>				
<b>Factores Ag H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>A</b>	+	+	+	-
<b>B</b>	+	+	-	+
<b>C</b>	+	+	-	-
<b>D</b>	+	-	+	+
<b>e,h</b>	+	-	+	-
<b>Complejo G</b>	+	-	-	+
<b>I</b>	+	-	-	-
<b>K</b>	-	+	+	+
<b>R</b>	-	+	-	+
<b>Y</b>	-	+	-	-
<b>Z</b>	-	-	+	+
<b>Complejo Z4</b>	-	-	+	-
<b>Z10</b>	-	-	-	+
<b>Z29</b>	-	+	+	-

#### **4.4.2 *Escherichia coli***

Para *E. coli*, se usó el esquema de Kaufmann-Orskov-Scheutz, que considera 174 antígenos O distintos (aunque suelen evaluarse con varios de *Shigella* spp., dado el parentesco entre estas bacterias) más 53 antígenos H (Kauffmann F, 1946, 1947; Orskov F *et al.* 1984; Scheutz F *et al.* 2004).

#### **Preparación de antígenos**

Los antígenos somáticos de *E. coli* fueron preparados de la misma manera descrita anteriormente para *Salmonella* spp. Posteriormente, estos fueron desafiados en placas de 96 pozos (Nunc®), contra sueros de conejo específicos para los 174 antígenos O de *E. coli* y los siguientes antígenos de *Shigella* spp.: Dysenteriae 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8a, 8b, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, Flexneri 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 1037, x, y; Boydii 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20; Sonnei 1, 2; 29733, 44037, 49766, 56836, 64474, 108308, 108414, 110538, 112198 y 117308.

Las cepas positivas a uno o varios antígenos de este esquema fueron desafiadas nuevamente con diluciones del mismo antígeno (dobles seriadas: 1:100, 1:200, 1:400,

1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400). Posteriormente, el título obtenido se comparó a los títulos obtenidos con antígenos de cepas de referencia y, de alcanzar un título semejante, se consideraban positivos. Tras este paso, se confirmaba cada antígeno positivo empleando sueros puros específicos (obtenidos por procesos de absorción con otros antígenos), empleando de igual forma diluciones (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200). Del mismo modo, se comparaban los títulos de la cepa evaluada con los obtenidos con cepas de referencia para determinar o descartar su positividad.

Los antígenos flagelares de *E. coli* fueron preparados inoculando, a partir del tubo de trabajo de TSA, medios semisólidos Colindale en tubos de 16 x 150 mm con una varilla de vidrio en su interior. Estos se sembraron por picadura con asa recta en el interior del tubo y se incubaron a 31°C por hasta 21 días, con revisiones periódicas. Aquellos cultivos que desarrollaron el flagelo fueron sacados de la incubación, resembrados en caldo biotriptasa e incubados a 31° C por 24 horas. Este caldo fue fijado con formalina y esta solución se empleó para evaluar los antígenos flagelares. Para esto se emplearon placas de 96 pozos (Nunc®).

Se empleó el mismo método que con los antígenos flagelares para comprobar la positividad a los antígenos flagelares: inicialmente se usaron diluciones dobles seriadas con sueros iniciales y posteriormente se realizaron diluciones con sueros puros.

### **Clasificación por filogrupos**

Para las cepas de *E. coli* se realizó la clasificación en grupos filogenéticos mediante PCR, empleando la técnica vigente de Clermont *et al.* (2013), misma que consiste en una reacción de PCR cuádruple inicial, contra los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y TSPE4.C2; más un PCR dúplex adicional en caso de obtener resultados sugerentes de filogrupos E y C, dirigido hacia una variante alélica del gen *arpA* (específica del grupo E) o bien una variante alélica del gen *trpA* (específica para el grupo C), más un control interno dirigido para el gen *trpBA*.

Las reacciones se llevaron a cabo directamente, a partir de colonias frescas crecidas 24 horas en agar tripticasa soya (TSA).

Para las reacciones cuádruples se empleó el reactivo Multiplex PCR Kit (QIAGEN®, EEUU) con reacciones ajustadas a 25µl: 12.5 Master Mix, 1µl de cada iniciador (para el caso de *arpA*, *chuA*, *yjaA*) y 1.5µl para TSPE4.C2, más el volumen restante para 25µl de agua libre de nucleasas.

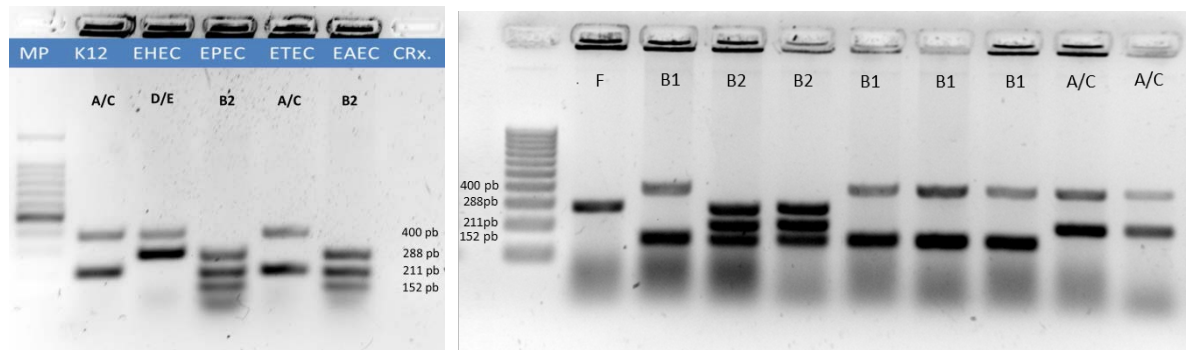
Para las reacciones de confirmación de los grupos E y C, se empleó la misma reacción a 25µl con 1µl de iniciadores para *arpAgpE* más el control interno *trpBA*, en el caso de grupo E; o iniciadores para *trpA* más el control interno *trpBA*, para el grupo C. Las condiciones empleadas se muestran a continuación (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Condiciones para las reacciones del método de Clermont para grupos filogenéticos.

PCR	Condiciones
Cuádruple	94°C x 4 min; (94°C x 30s, 58°C x 30s, 72°C x 30s) x 30 ciclos; 72°C x 5 min.
Grupo E	94°C x 4 min; (94°C x 5s, 57°C x 20s, 72°C x 45s) x 30 ciclos; 72°C x 5 min.
Grupo C	94°C x 4 min; (94°C x 5s, 58°C x 20s, 72°C x 45s) x 30 ciclos; 72°C x 5 min.

\*Condiciones: Desnaturalización inicial; (Desnaturalización; Alineamiento; Extensión) por 30 ciclos; Extensión Final. (Clermont O *et al.* 2013)

Los productos de amplificación por PCR fueron procesados por electroforesis en agarosa (SeaKem® LE Agarose, Lonza, ME, EEUU) al 2%, corriendo a voltaje constante a 80 V por 50 minutos. La visualización y digitalización de imágenes se realizó en un fotodocumentador Gel Logic 2200, con el programa Care Stream®.



**Fig 7.** Controles y estandarización del PCR cuádruplex para establecer grupos filogenéticos de *E. coli*. De izquierda a derecha, Gel 1. Carril 1: Marcador de peso molecular; 2: Cepa de referencia *E. coli* K12; 3: EHEC\*; 4: EPEC\*; 5: ETEC\*; 6: EAEC\*; 7. Control de Reacción (sin ADN). Gel 2. Carril 1: Marcador de peso molecular (100bp), 2-10: Cepas *E. coli* que ya contaban con caracterización previa por filogrupos (F, B1, B2, A y C). \*Cepas empleadas como controles provenientes de aislamientos clínicos provenientes del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, previamente caracterizados bioquímicamente con el equipo VITEK2 (Biomérieux®), por factores de virulencia y para grupos filogenéticos con la clasificación anterior de Clermont (2000).

#### 4.5 Análisis de Datos

Se calculó la frecuencia para ambos patógenos y la concentración en el caso de *E. coli*, así como la frecuencia por serotipo en general y por etapa de la cadena producción. En el caso de las placas 3M Petrifilm® se convirtieron los valores a log UFC/cm<sup>2</sup> tanto para coliformes como para *E. coli*.

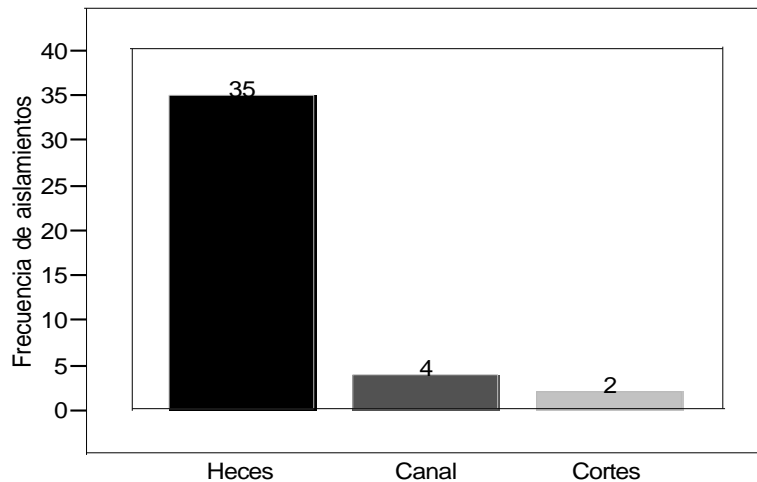
### 5. Resultados

De las 300 muestras obtenidas en total (200 empleadas para detectar ambos patógenos: *E. coli* y *Salmonella* spp; y 100 de heces sólo empleadas para detectar *Salmonella* spp.) se logró un total de 86 aislamientos, 41 de *Salmonella* spp. y 45 de *Escherichia coli*. Sólo una de las muestras positivas presentó la coexistencia de ambos patógenos, una proveniente de canales. A continuación se presentan los resultados para cada uno de ellos:



### 5.1 *Salmonella* spp.

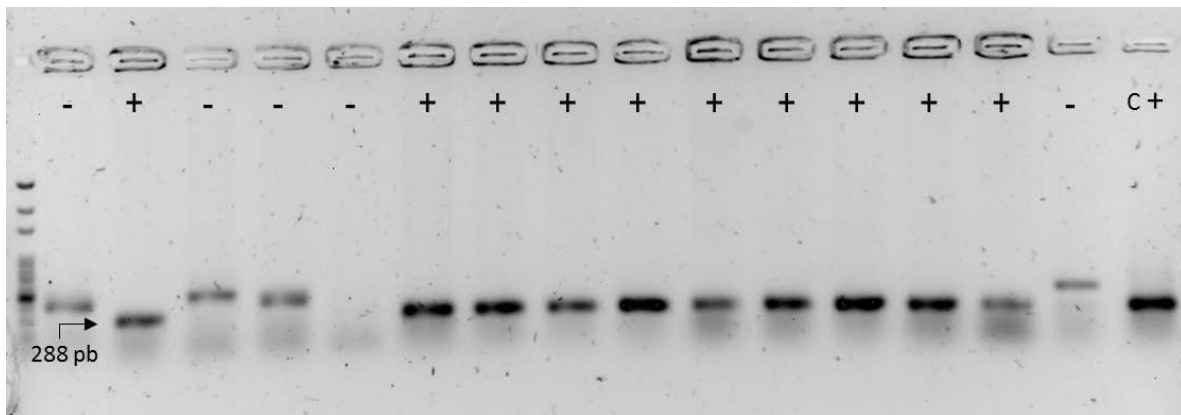
La frecuencia más alta se observó en heces con un 35%, mientras que en canales y cortes la frecuencia fue menor al 5%, como se ilustra a continuación en la Figura 8.



**Fig 8.** Porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* spp. conforme su origen (n= 100 por tipo de muestra).

#### 5.1.1 Caracterización

Todos los aislamientos fueron caracterizados con las pruebas bioquímicas, descritas anteriormente, y molecularmente, mediante la detección por la técnica de PCR, del gen específico *invA*. (Fig 9.) Todos los aislamientos (41) fueron determinados como pertenecientes al género *Salmonella* spp. por PCR. Para las pruebas bioquímicas 39 aislamientos presentaron el perfil clásico de para el género *Salmonella* spp., mientras que 2 aislamientos mostraron ciertas diferencias: una muestra proveniente de canales negativa a aminoácidos y negativa a Ácido Sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) en SIM (no así en TSI); y una cepa proveniente de heces, negativa a ornitina y lisina, así como a la producción de ácido sulfhídrico.



**Fig 9.** Ejemplo del proceso de confirmación molecular de cepas sospechosas de *Salmonella* spp. mediante PCR con la detección del gen *invA* (288 pb). Marcador de Peso Molecular 100 pb. Aquellas cepas con amplificación de productos de mayor peso molecular que el esperado fueron descartadas como negativas a *Salmonella* spp.

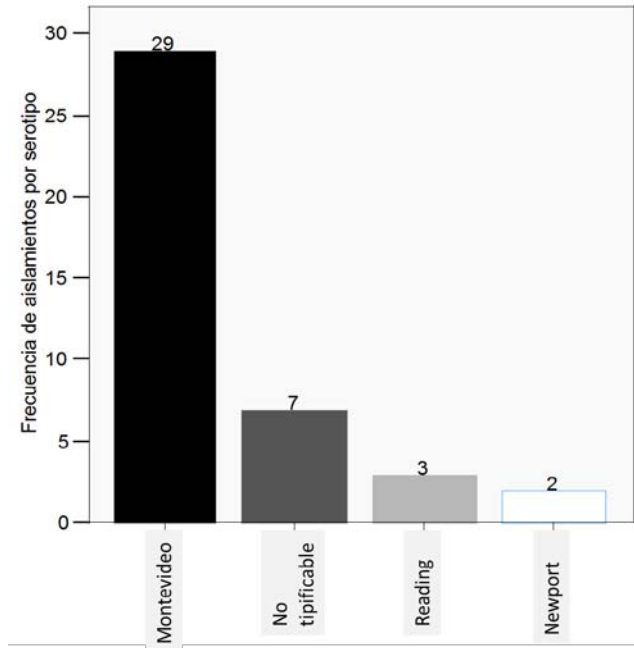
### 5.1.2 Serotipificación

De los 41 aislamientos obtenidos se lograron serotipificar, empleando serología convencional con sueros de conejo y con el esquema de White-Kaufmann-Le Minor, 29 cepas correspondientes al serotipo Montevideo, 3 Newport y 2 Reading, como se puede observar en la Figura 10. El serotipo Montevideo, junto con cepas no tipificables, fue hallado en los tres tipos de muestras (heces, canales y cortes), mientras que Newport y Reading sólo se hallaron en heces. Esta distribución de los serotipos por origen de muestra se ilustra en la Figura 11.

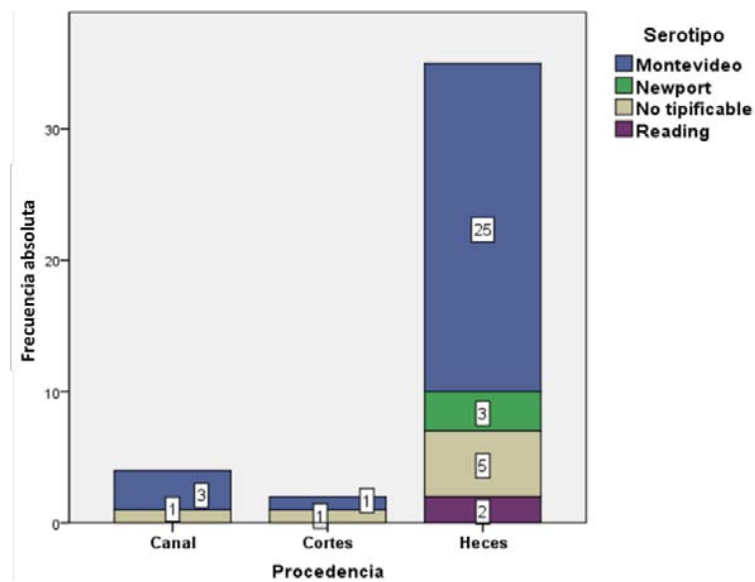
Siete aislamientos no fueron tipificables, 2 no presentaron reactividad a ninguno de los sueros empleados, mientras que 5 fueron tipificados sólo parcialmente (se identificó el Antígeno H), pues presentaban un Antígeno O rugoso. De estas cepas, una sólo mostró fase I con reactividad al factor i, mientras que en 4 cepas se logró la identificación de ambas fases del antígeno flagelar: 3 aislamientos mostraban la fórmula OR: e,h: 1,2 ; mientras que uno mostraba la fórmula OR: e,h: 1,5.

Todos los aislamientos correspondientes al serotipo Montevideo fueron monofásicos para el Antígeno H y se pudieron encontrar dos subgrupos, diferenciados por la presencia o ausencia del factor p en sus fórmulas antigénicas. Veintidós aislamientos

Montevideo tuvieron la fórmula 6,7: g, m, s: - mientras que sólo 6 aislamientos, todos provenientes de heces, presentaban la fórmula 6,7: g, m, **p**, s: -, siendo predominante la ausencia del factor p.



**Fig 10.** Frecuencia de serotipos identificados en los aislamientos de *Salmonella* spp. (n=41)



**Fig 11.** Distribución de serotipos de *Salmonella* spp. de acuerdo al origen de muestra. (n= 100 en cada tipo de muestra).

## 5.2 *Escherichia coli*

Se obtuvieron 45 aislamientos con las siguientes frecuencias: 34/100 en canales, 11/100 en cortes (5/34 en pecho; 3/33 en falda y 3/33 en pierna). Todos los aislamientos sospechosos a *Escherichia coli* (en CHROMAgar ECC y Placas Petrifilm) fueron confirmados molecularmente por PCR, empleando al gen *gadA* como marcador para esta especie. Un ejemplo de la identificación molecular para *E. coli* se muestra en la Figura 12. Aquellas cepas que no presentaban *gadA* fueron descartadas.

### 5.2.1 Caracterización

Del total de aislamiento (45) 41 cepas mostraron un fenotipo, por pruebas bioquímicas, concluyente para esta especie. 4 aislamientos presentaron características atípicas, pese a haber sido confirmadas molecularmente como *Escherichia coli*. Estas fueron: 3 cepas provenientes de canales, lentas fermentadoras de la lactosa, indol negativas y una cepa, también de canal, positiva a citrato, malonato y celobiosa.

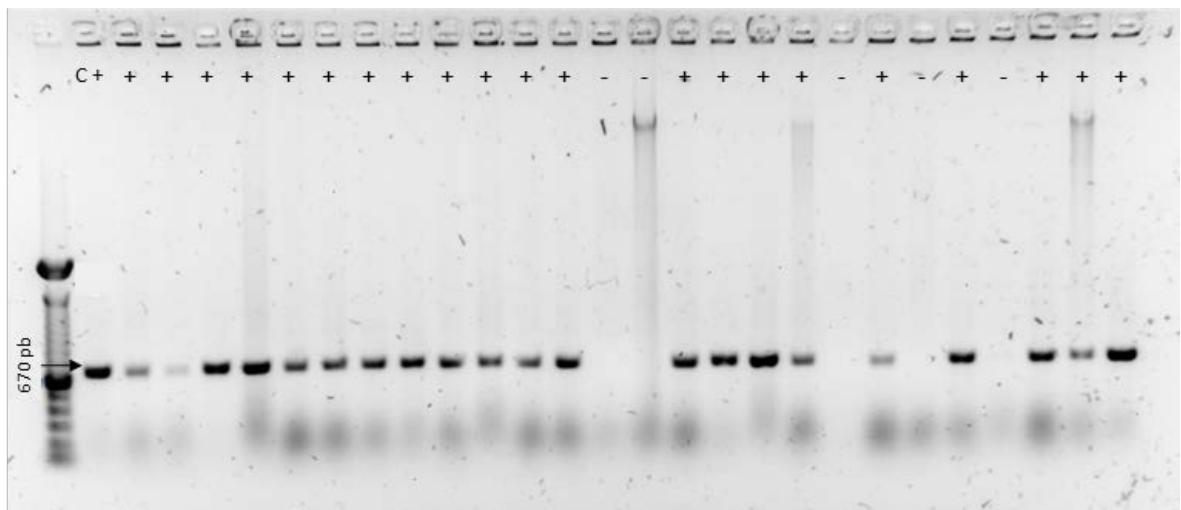


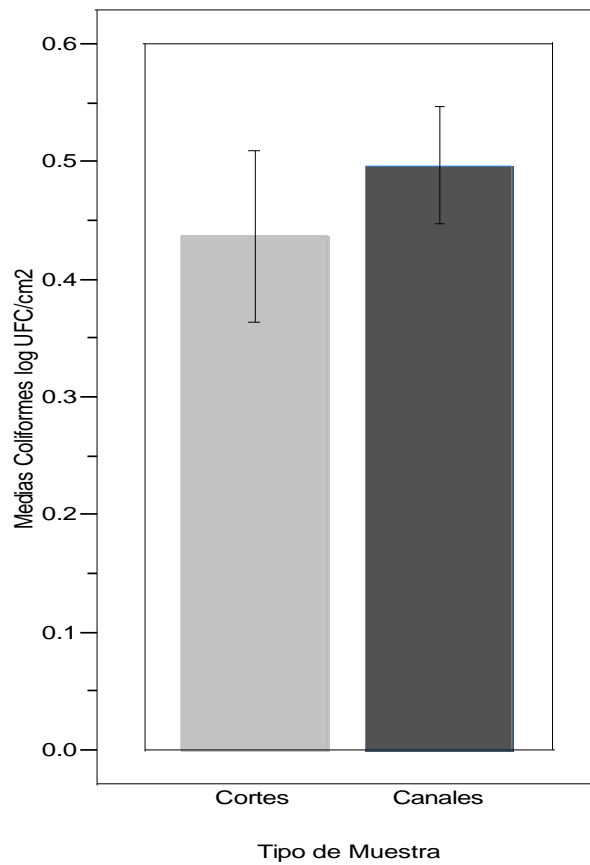
Fig 12. Ejemplo del proceso de confirmación molecular de cepas sospechosas de *Escherichia coli* con la detección del gen *gadA*, con peso molecular de 670 pares de bases, mediante PCR. Marcador de Peso Molecular 100 pb. Aquellos aislamientos, como los carriles 14,15, 20, 22 y 24, negativos a este marcador, fueron descartados como negativos a *E. coli*.

### 5.2.2 Concentración (Placas 3M Petrifilm)

Las frecuencias y concentraciones halladas mediante el empleo de las placas 3M Petrifilm *E. coli*/ Coliformes<sup>®</sup> para coliformes, presentes en cortes y canales, fueron de 0.437 y 0.497 log UFC/cm<sup>2</sup>, con frecuencias del 64.94 y 99% de positivos, respectivamente (como se muestra en el Cuadro 11 y en la Gráfica 1); mientras que las concentraciones reportadas para *Escherichia coli* fueron de 0.012 log UFC/cm<sup>2</sup>, en canales y 0.329 log UFC/cm<sup>2</sup> en cortes, con 41 y 10.97% de positivos, respectivamente (como puede apreciarse en el Cuadro 12 y la Gráfica 2).

**Cuadro 11.** Frecuencia de coliformes encontrada en Cortes (en general y por tipo de corte) y en Canales detectadas con placas 3M Petrifilm<sup>®</sup> ECC.

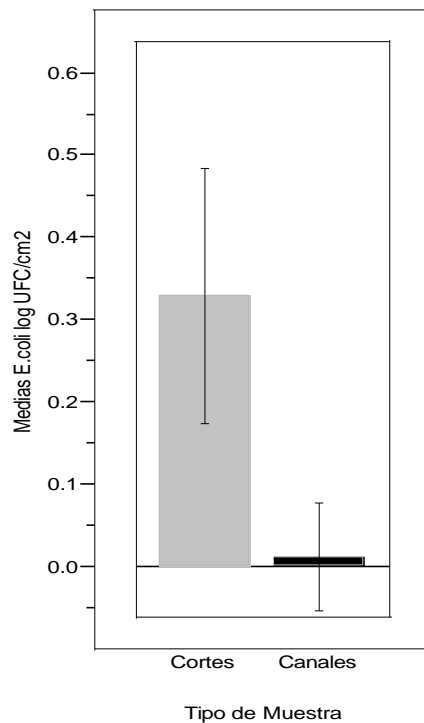
COLIFORMES		
Muestra	N	Positivos
Cortes	Pecho	34   70.58%
	Falda	33   45.45%
	Pierna	33   78.78%
	<b>Total</b>	<b>100</b>   <b>64.94%</b>
<b>Canales</b>	<b>100</b>	<b>99%</b>



**Gráfica 1.** Medias de las concentraciones de coliformes presentes en cortes y canales, 0.437 y 0.497 log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente, con errores estándar con intervalo de confianza al 95%.

**Cuadro 12.** Frecuencia de *E.coli* hallada en Cortes (general y por tipo de corte) y canales detectadas mediante las placas 3M Petrifilm® ECC.

<b><i>Escherichia coli</i></b>			
<b>Muestra</b>		<b>N</b>	<b>Positivos</b>
<b>Cortes</b>	Pecho	34	14.7%
	Falda	33	9.1%
	Pierna	33	9.1%
	<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>10.97</b>
<b>Canales</b>		<b>100</b>	<b>41%</b>



**Gráfica 2.** Medias de las concentraciones de *E.coli* encontradas en canales (0.012 log UFC/cm<sup>2</sup>) y cortes (0.329 log UFC/cm<sup>2</sup>), con errores estándar en un intervalo de confianza del 95%.

### 5.2.3 Serotipificación

De 45 aislamientos confirmados, se logró identificar, mediante el esquema de Kaufmann-Orskov-Scheutz, a un total de 31 aislamientos, de manera parcial (sólo un antígeno) o total (antígenos O y H), como se muestra a continuación en el Cuadro 13.

**Cuadro 13.** Distribución de aislamientos serotipificados (parciales y totales) de *E. coli*, según origen de la muestra. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de cepas serotipificadas, parcial o totalmente, de acuerdo al origen

Total de aislamientos de <i>E. coli</i>		45
Serotipificadas (parcial o totalmente)		31 [100%]
Distribución por origen	Canales	22 [70.96%]
	Pierna	1 [3.22%]
	Pecho	5 [16.1%]
	Falda	3 [9.67%]

Se logró identificar 21 serotipos distintos (tomando en cuenta a tres cepas que mostraron un Antígeno O rugoso). Los serotipos y su frecuencia por sitio se muestra en el Cuadro 14.

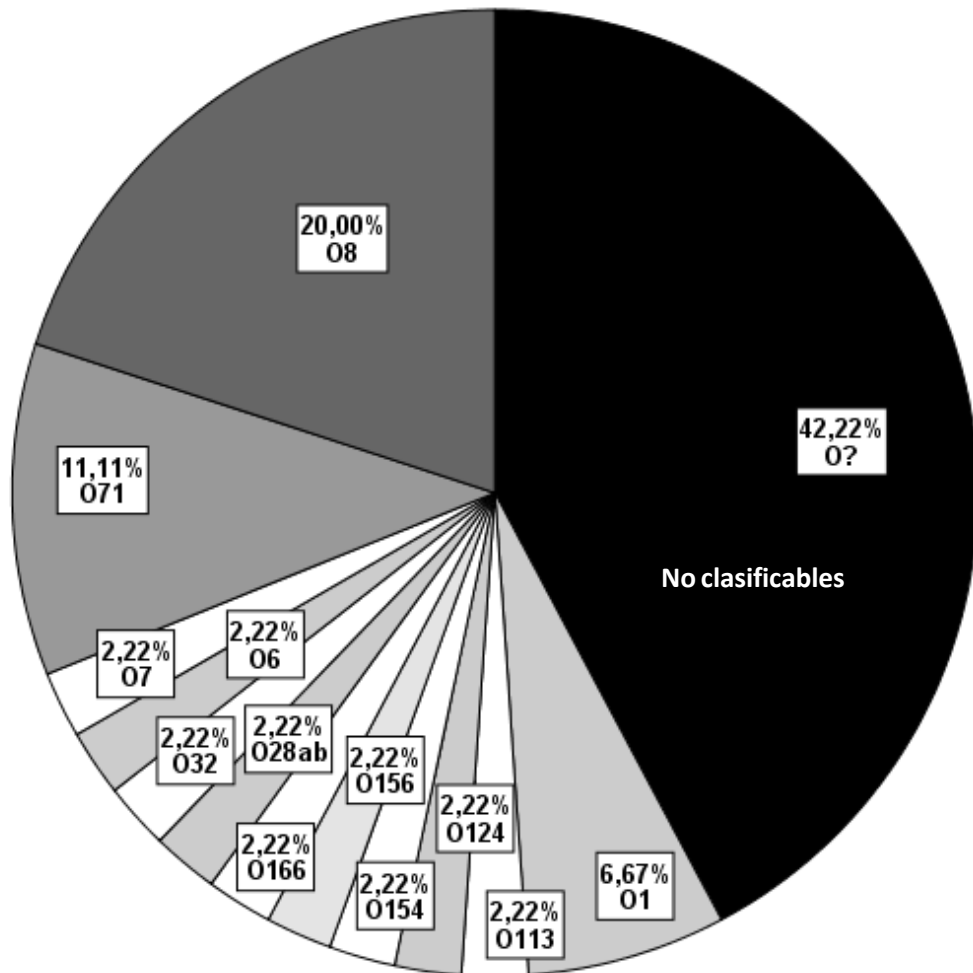
**Cuadro 14.** Frecuencia y distribución de serotipos parcial o totalmente identificados de *E. coli* en el total de aislamientos.

Sitio	Serotipos	Cantidad
Canal	O28ab:NM	1
	OR:H30	3
	OR:H32	1
	O1:H6	3
	O113:NM	1
	O154:H21	1
	O156:NM	1
	O166:H21	1
	O32:NM	1
	O6:NM	1
	O8:NM	5
	O8:H19	1
	O8:H2	1
	O8:H21	1
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>	
Pierna [R]	OR:H32	1
	<b>TOTAL</b>	<b>1</b>
Pecho [B]	O124:NM	1
	O71:NM	1
	O71:H12	2
	O8:H8	1
	<b>TOTAL</b>	<b>5</b>
Falda [F]	O7:H39	1
	O71:H12	2
	<b>TOTAL</b>	<b>3</b>

Del total de aislamientos, con base en el serogrupo, el 42.22% (19 aislamientos) no fueron tipificables (para 5 cepas sólo se obtuvo el Ag H). Los serogrupos más frecuentes



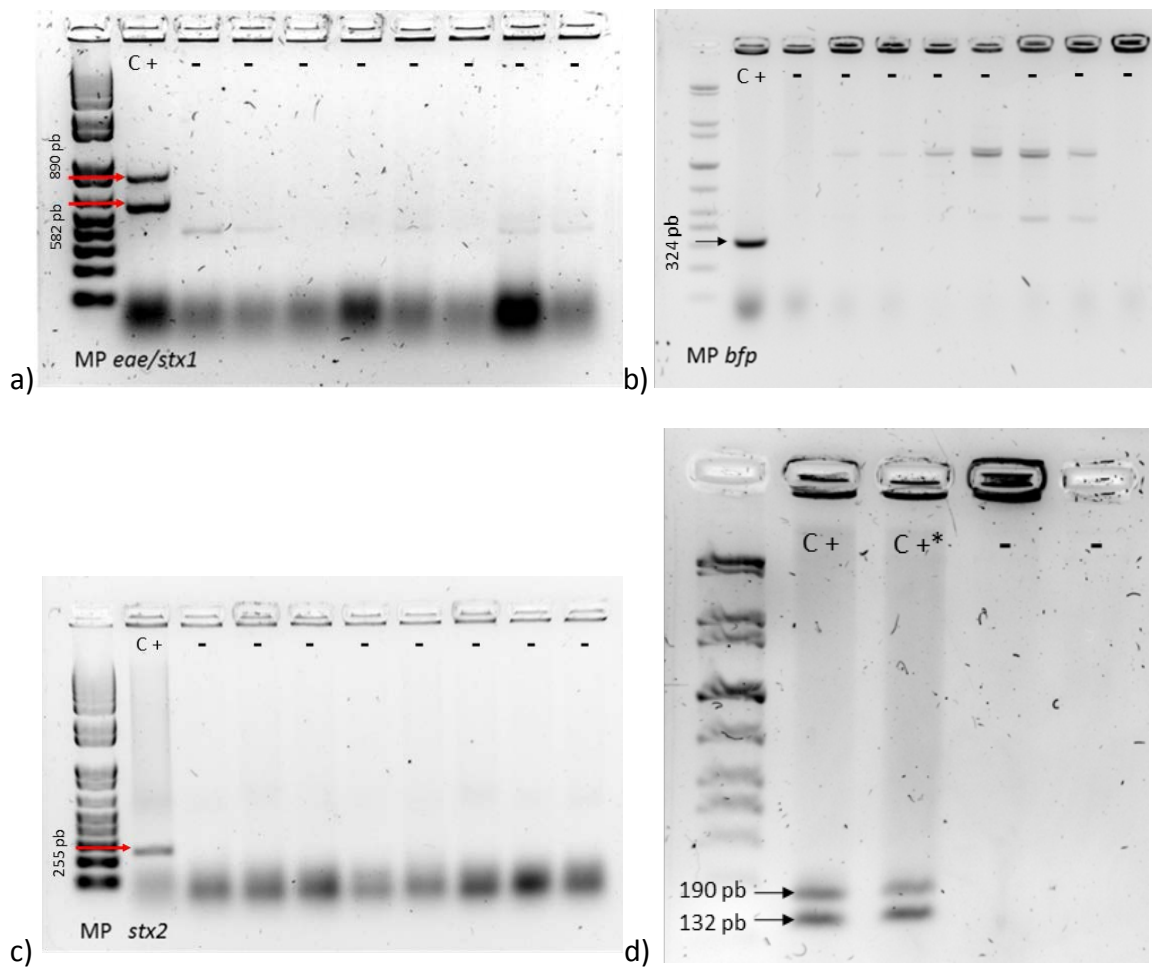
fueron, por orden: O8 (20%), O71 (11.11%) y el serotipo O1:H6 (6.67%). El total de serogrupos aislados con su frecuencia se muestra en la Gráfica 3.



**Gráfica 3.** Frecuencia de serogrupos hallados en los aislamientos de *E. coli*.

#### 5.2.4 Evaluación de factores de virulencia

En ninguno de los aislamientos fue posible detectar factores de virulencia asociados a STEC, EPEC o ETEC (*stx1*, *stx2*, *eae*, *bfp*, *eltA* y *estA*). Pese a que la mayoría de los serogrupos hallados se encuentran asociados a estos patotipos, los aislamientos encontrados carecían de factores de virulencia. En la Figura 13 se aprecian ejemplos de la ausencia de factores de virulencia en los aislamientos obtenidos, con la detección de cada uno de ellos en las cepas control.

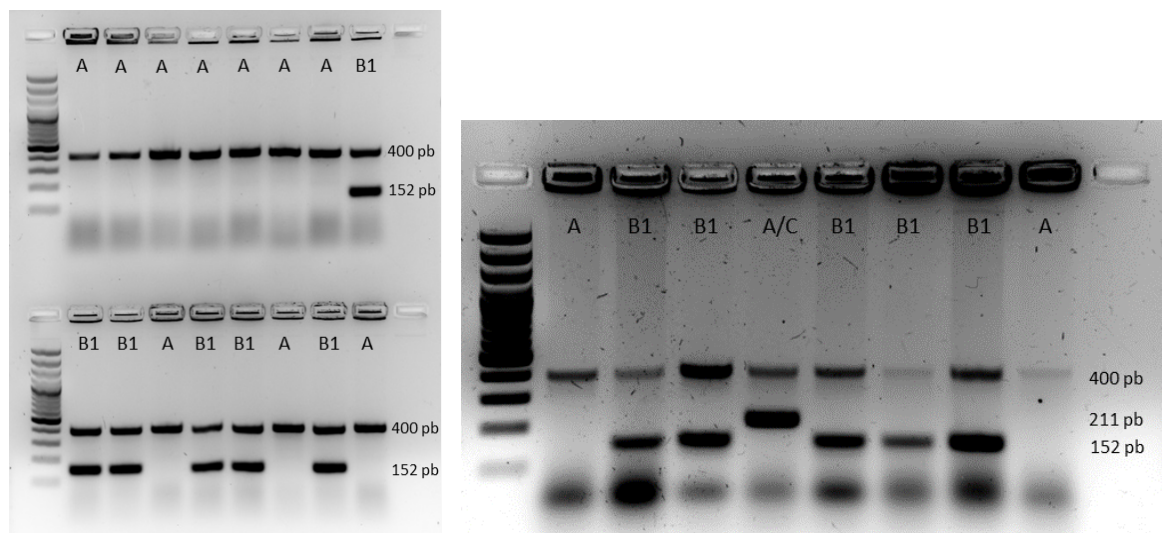


**Fig 13.** Ejemplos de la detección de factores de virulencia en aislamientos de *E. coli*. A) Reacción de PCR dúplex para *eae/stx1* de 890 y 582 pb, respectivamente (EPEC, STEC). B) Reacción para *bfp*, de 324 pb (EPEC). C) Reacción para *stx2*, de 255 pb (STEC). D) Reacción dúplex para *estA* y *staA* de 190 y 132 pb, respectivamente (ETEC). Marcador de peso molecular 100 pb.

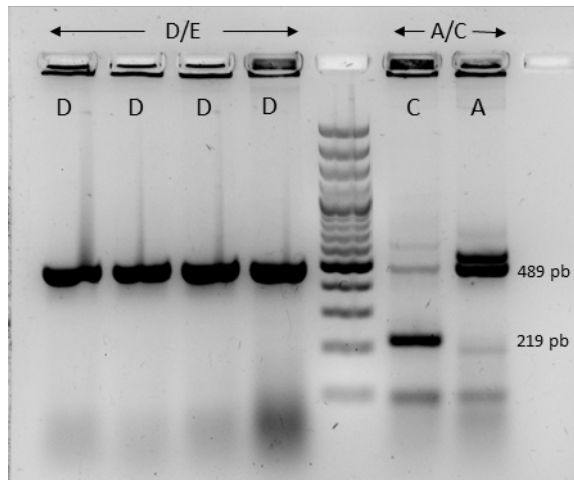
### 5.2.5 Grupos filogenéticos

En la Figura 14 se muestran ejemplos del proceso de discriminación para las cepas. Aquellas cepas que en la primera fase eran determinadas como filogrupo A/C o D/E requirieron de una segunda etapa de selección con otra reacción, mostrada en la Figura 15.

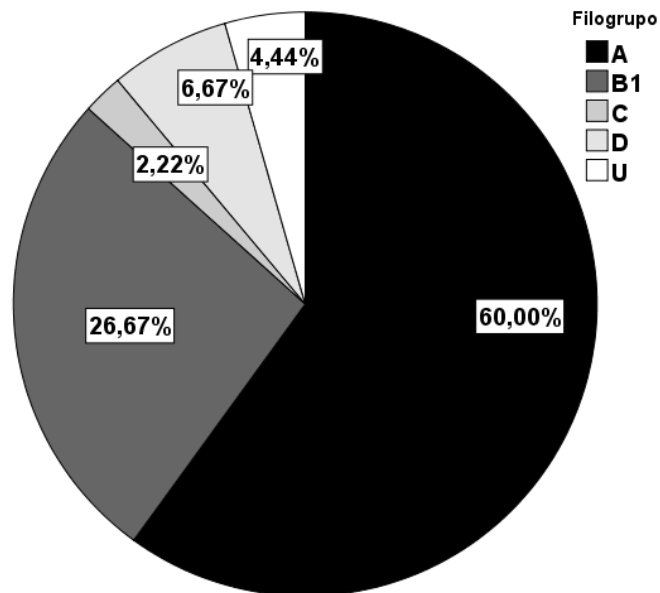
Los filogrupos predominantes fueron el A y el B1, con 60% y 26.67%, respectivamente. También se hallaron miembros de los grupos C y D, en menor medida, mientras que el grupo B2, no se encontró. Las frecuencias de estos se observan en la Gráfica 4.



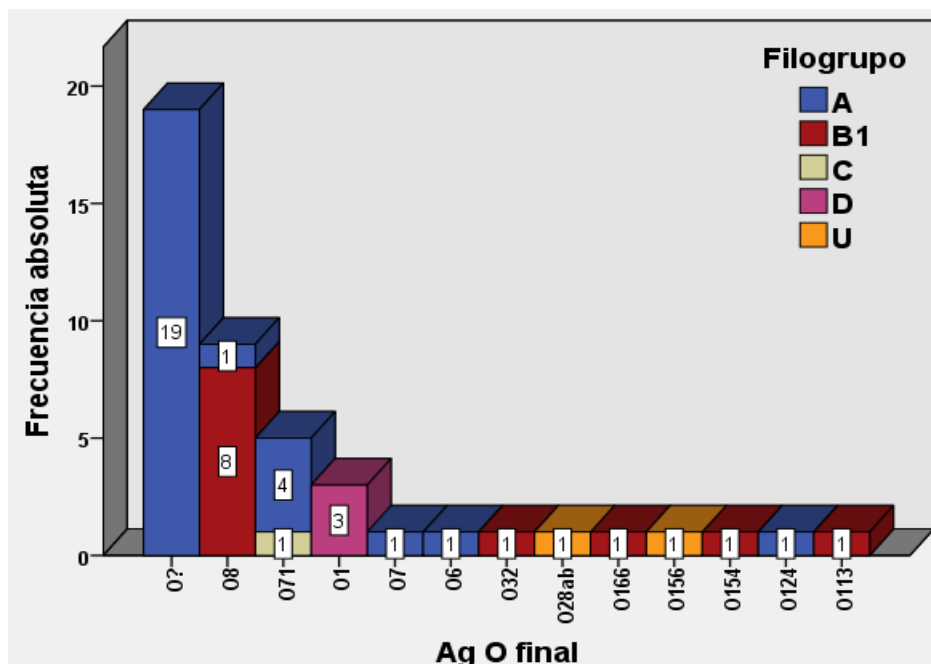
**Fig 14.** Ejemplo de la caracterización de los grupos filogenéticos de los aislamientos mediante la clasificación de Clermont, por PCR de reacción cuádruple. Filogrupo A: *arpA+*, *chuA-*, *yjaA-*, *TSPE4.C2-*; Filogrupo B1: *arpA+*, *chuA-*, *yjaA-*, *TSPE4.C2+*; Cepas A/C (requieren confirmación con un segundo PCR, ver siguiente figura): *arpA+*, *chuA-*, *yjaA+*, *TSPE4.C2-*.



**Fig 15.** Reacción suplementaria con iniciadores específicos para filogrupos E y C. Carriles 1-4: cepas confirmadas como D, al obtenerse el producto del control interno *trpBA* de 489 pb, que descarta al grupo E. Carril 5: Marcador de peso molecular (100 pb). Carril 6: Cepa confirmada como grupo C, tras la amplificación del gen *trpA* con el alelo específico del filogrupo. Carril 7: Cepa confirmada como grupo A, tras amplificarse únicamente el control interno *trpBA* de 489 pb, que descarta al grupo C. Carril 8, control de reacción sin ADN.



**Gráfica 4.** Distribución de grupos filogenéticos de los aislamientos de *Escherichia coli*.



**Gráfica 5.** Asociación entre serogrupos y grupos filogenéticos de los aislamientos de *E. coli*.

## 6. Discusión

### 6.1 *Salmonella* spp.

- **41 cepas de *Salmonella* spp. confirmadas por PCR, sólo 39 por pruebas bioquímicas**

La detección de 2 cepas más mediante métodos moleculares corresponde, sin duda, a su mayor especificidad y sensibilidad para la detección de agentes, pues el PCR funciona a partir de la presencia de moléculas de ADN que contengan la secuencia blanco, mientras las pruebas bioquímicas requieren al organismo en estado metabólicamente activo y en cantidad suficiente para detectar metabolitos (Viljoen GI *et al.* 2005). Adicionalmente, se ha demostrado que existe una gran variación en las características fenotípicas de las bacterias al evaluarse mediante pruebas bioquímicas convencionales (Barrow GI *et al.* 1993; Quinn PJ *et al.* 1999). Ejemplo de esto son las discrepancias entre las subespecies de *Salmonella* spp. o incluso, entre diferentes variedades de *S. entérica* subsp. *enterica*, o bien, la

presencia de cepas fermentadoras de lactosa, incluso ya en ganado bovino (Mc Donough PL *et al.* 2000) Para el caso del H<sub>2</sub>S, desde hace tiempo se ha reportado la existencia de cepas negativas en el género *Salmonella* spp., pese a considerarse la producción de este metabolito como una marca bioquímica distintiva del género (Wilson WJ, 1948; Olitzky *et al.* 1956). Por otra parte, la presencia de este tipo de cepas en las cadenas productivas también ha sido descrita; por ejemplo Lin D *et al.* (2014) encontraron que 33 (40.2%) de 82 aislamientos de *Salmonella* spp., provenientes de 114 muestras de pollo y 204 de cerdo, fueron negativas a la producción de ácido sulfhídrico. Adicionalmente, en el 42% de estas cepas H<sub>2</sub>S (-) se reportó la presencia del marcador *spvC*, gen correspondiente con el plásmido de virulencia de *Salmonella* spp. asociado a cepas que provocan salmonelosis no tifoidea, mismas que se asocian a orígenes animales (Derakhshandeh A *et al.* 2013).

Esta evidencia muestra que las cepas de *Salmonella* spp. negativas a la producción de ácido sulfhídrico están reportadas como presentes en las cadenas de producción de pollo y cerdo; hecho que sugeriría también su presencia en la cadena de producción de carne de bovino, en la que es frecuente aislar *Salmonella* spp. La presencia de este tipo de cepas podría deberse al empleo de diversos químicos como desinfectantes en las mismas plantas. Se sabe que la exposición a algunos de estos, como el hipoclorito de sodio, en ciertas condiciones, pueden seleccionar cepas H<sub>2</sub>S negativas, como lo demostrado por Lannigan R y Hussain Z (1993), quienes lograron generar, *in vitro* y a partir de una cepa aislada de una herida, cepas de *Salmonella* Typhimurium negativas a la producción de ácido sulfhídrico.

Adicionalmente, se tienen reportes de casos clínicos provocados por este tipo de cepas. En China, se ha reportado un aumento en la frecuencia de una variante atípica de *Salmonella* entérica serotipo Seftenberg, H<sub>2</sub>S negativo, en casos clínicos (Yi S *et al.* 2014), mientras que Albert MJ *et al.* (2014) han reportado el aislamiento de una variedad de *Salmonella enterica* serotipo Kentucky ST 198 no productora de ácido sulfhídrico, aislada de un paciente junto con la variedad H<sub>2</sub>S (+). Esto ha puesto en consideración a este tipo de

aislamientos, pues podrían estar implicados en materia de Salud Pública e Inocuidad Alimentaria.

- **Frecuencia *Salmonella* spp.**

En el presente estudio se encontró una frecuencia total para *Salmonella* spp. del 13.6% para todas las muestras. Como era esperado, la mayor frecuencia se presentó en las heces (35%), con subsecuentes reducciones en las canales (4%) y cortes (2%). Dicho fenómeno puede explicarse por los pasos del proceso y por las distintas intervenciones que se realizan en la planta como los lavados con agua a presión, la aplicación de vapor a las canales y el “trimeo” o corte de zonas sucias de la canal.

De los estudios realizados en México la mayoría muestra resultados para un solo punto o etapa de la cadena de producción, lo que limita la comparación de resultados. Por ejemplo, Hernández-San Juan S *et al.* (2007) reportó una frecuencia general del 8.3% en un estudio en canales, personal, utensilios y aguas de un rastro de bovinos, teniendo una frecuencia en canales del 23%; mientras que Varela-Guerrero JA *et al.* (2013) han reportado una frecuencia total del 11%, trabajando con canales de rastro municipal. En otros ejemplos, en cuanto a los puntos de venta, el estudio de Zaidi MB *et al.* (2006), reporta una 54% de frecuencia total en cortes de bovino en Yucatán, describiendo diferencias significativas de acuerdo al origen de la muestra (mercado, carnicerías o supermercado; siendo estos últimos los de menor frecuencia); mientras que, el realizado por Cabrera-Díaz *et al.* (2013), reporta una frecuencia general del 56.7% en carne molida en Jalisco. Esta heterogeneidad en las condiciones de los estudios en México, en los que se emplean métodos diferentes con sensibilidades variables, así como en el enfoque a sólo un sector de la cadena dificulta el análisis de la información disponible para cada patógeno a lo largo de la cadena productiva.

Pocos son los estudios en México que se han realizado tomando en cuenta la cadena completa de producción, destacando entre estos el estudio de Narváez-Bravo CA *et al.*

(2012), quizá el más completo realizado hasta la fecha. Este estudio muestra frecuencias generales para *Salmonella* spp. del 52.5%, tras haberse evaluado la frecuencia individual en pieles (92.4%), canales calientes (49%), canales tras 24 horas de refrigeración (24.8%), corrales (55.6%) y heces (46.8%).

En todos los reportes sobre México se registran frecuencias siempre mayores al 10%, sin importar si son estudios enfocados sólo a un punto de la cadena productiva (como cortes, canales, animales vivos); siendo mucho más frecuente hallar frecuencias cercanas al 50%. La información anterior sugiere que la frecuencia general encontrada en este estudio es baja, con respecto a lo publicado por la mayoría de los reportes sobre el tema en nuestro país (lo que podría ser influenciado por las diferencias de sensibilidad en las metodologías empleadas), pero es alta comparada a otros países como Estados Unidos, Irlanda, Inglaterra y Bélgica (Roades JR *et al.* 2009).

Adicionalmente, cabe mencionar que la frecuencia hallada de *Salmonella* spp. fue alta pese a que se empleó un sistema de siembra directa en medios selectivos. Este tipo de sistemas se ha empleado ya en estudios sobre la cadena productiva de carne de bovino con éxito, aunque se considera que su sensibilidad es menor a la lograda con el empleo de un enriquecimiento previo (Brichta-Harhay DM *et al.* 2007); de modo que es probable que la frecuencia de *Salmonella* spp. fuese aún mayor con el uso de métodos con enriquecimiento en medios selectivos. No obstante, el método empleado permitió aislar y caracterizar un número considerable de cepas, por lo que la información así obtenida fue de utilidad en relación con los objetivos.

- **Serología: Predominio de un serotipo de *Salmonella* spp. ¿Problema local? ¿metodología empleada?**

Se encontró un alto predominio, no esperado, de un solo serotipo, siendo *Salmonella* Montevideo el 70.73% (29/41) del total. Los otros serotipos identificados fueron Newport y Reading con el 7.32% (3/41) y 4.88% (2/41) del total, respectivamente. 7



aislamientos no fueron tipificables. Considerando el hecho de que la planta estudiada adquiere sus animales en 8 estados diferentes de la República Mexicana, con distancias geográficas considerables y de productores no emparentados comercialmente, se esperaba encontrar una gama diversa de serotipos de *Salmonella* spp. Adicionalmente y en apoyo a lo anterior, existe una gran variación en los principales serotipos reportados en la cadena productiva de carne de bovino de acuerdo a la región. Por ejemplo, Pérez-Montaña JA (2012), trabajando en plantas en el estado de Jalisco reportó, como los serotipos más prevalentes de *Salmonella* spp. los siguientes: Give (24.4%), Typhimurium (17.9%), Infantis (10.3%) y Anatum (5.1%), mientras que Cabrera-Díaz E *et al.* (2013) reportaron, en plantas del mismo estado, los siguientes serotipos como los más prevalente en su estudio: Anatum (8.9%), Agona (6.7%), Infantis (6.7%), Havana (5.9%) y Typhimurium (5.9%). Para el Estado de México (cabe mencionar que en rastros municipales) se ha descrito a Typhimurium (48%), Typhi (41%) y Enteritidis (4%) como los principales serotipos hallados (Varela-Guerrero JA, 2013). En el estado de Yucatán, Zaidi *et. al.* (2006) reportó en carne de mercados a los serotipos Meleagridis (27.9%), Anatum (16.3%), Reading (10.6%) y Agona (8.7%) como los más frecuentes.

Por su parte, en el estudio de Narváez-Bravo CA *et al.* (2012), en el Norte del país (no se especifica el estado) se hallaron a Anatum, Montevideo, Tennessee, Kentucky. Muenster, Give, Reading, Mbandaka, Meleagridis y Fresno (a partir del 7.6% que fue serotificado del total de aislamientos) como los serotipos más frecuentes. En otro estudio realizado en plantas de nuestro país se reportaron Kentucky (32.2%), Anatum (29.9%), Reading (17.2%), Meleagridis (12.6%) y Cerro (4.6%) como los principales serotipos encontrados (Gragg SE *et al.* 2013).

En el estudio realizado por Gutiérrez-Cogco L *et al.* (2000) sobre los serotipos de *Salmonella* spp. identificados por los servicios de salud del país se encontró que, de los aislamientos obtenidos de muestras no humanas, los serotipos más prevalentes fueron Derby, Anatum, Agona, Typhimurium y Enteritidis.

Con base en la evidencia anteriormente presentada, no se esperaba el dominio de un solo serotipo en una planta que recibe animales de diversas regiones geográficas del país, puesto que en ninguno de los estudios citados se observa una frecuencia tan elevada como la encontrada en el presente estudio para un serotipo (70.73%). El predominio tan claro del serotipo Montevideo podría ser debido a problemas locales en los corrales de engorda, donde dicho serotipo podría ser enzoótico, siendo preservado en suelos, forrajes o residuos de heces, e infectando al ganado nuevo que llegase al lugar.

Por otra parte, se ha descrito bien la presencia de animales infectados con *Salmonella* spp. capaces de actuar como “súper diseminadores”, en un fenómeno similar al ampliamente descrito en los humanos infectados con *S. Typhi*, de los cuales el 1-6% se vuelve portador y diseminador del patógeno (Gopinath S *et al.* 2012; Vogelsang TM *et al.* 1948). Estos animales se definen, en estudios hechos en ratón, como animales infectados con *S. Typhimurium* que diseminan sobre  $10^8$  UFC/g heces, condición que puede variar de acuerdo al hospedador y al serotipo de *Salmonella* spp. (Gopinath S *et al.* 2012). En el bovino se tiene estudiado este fenómeno con modelos de infección por *S. Typhimurium* y *S. Dublin*. Para el primer serotipo, se ha reportado la excreción del patógeno por hasta 71 días post-infección, sin haberse caracterizado el nivel de diseminación (Gopinath S *et al.* 2012); mientras que para *S. Dublin*, se ha descrito la diseminación de  $10^3$ - $10^5$  UFC/g heces por largo tiempo de hasta 400 días (Wray C *et al.* 1981). Así como el mismo fenómeno se ha reportado para *E.coli* O157:H7, *S. Dublin* en ganado bovino, *S. Typhimurium* en ganado bovino, en pollos y en cerdos y en *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* en pollos; no se descarta que lo mismo ocurra con otros serotipos de *Salmonella* spp. (Van Immerseel F *et al.* 2004; Williams Smith H *et al.* 1980; Rigby CE *et al.* 1978). De este modo, la presencia de un animal “súper diseminador” en el corral de engorda podría explicar la persistencia y predominio de un solo serotipo en la planta estudiada. El estudio de este tipo de animales y su comportamiento, en hatos de nuestro país, es un área de oportunidad para la investigación futura, que permitiría elucidar la dinámica de la transmisión cruzada de *Salmonella* spp. entre el ganado y los productos cárnicos.

Otra posibilidad es la selección de serotipos mediante los medios empleados en este estudio. Se ha descrito que tanto los medios de enriquecimiento como los selectivos pueden ejercer presiones de selección en el tipo de cepas o serotipos aislados de una muestra. Al tener la presencia de dos cepas distintas en una muestra, la metodología empleada para su aislamiento podría favorecer el crecimiento de una en particular, cubriéndose así la presencia de la otra. Gorski (2012) demostró que en el enriquecimiento con Rappaport-Vassiliadis (RV) y variedades del mismo, se lograban patrones distintos de dominio de serogrupos de *Salmonella* spp., siendo los grupos C1 (O6,7), C2 (O6,8) y E (O3,10; O1,3,19) los predominantes (hasta un 90% del cultivo a partir de RV). Asimismo, ella describió una variación de hasta 2 log en la densidad final de cada cepa, pese a iniciar el estudio en condiciones de igualdad para cada cepa y serogrupo. (Singer RS *et al.* 2009; Gorski L, 2012). En un estudio en cerdos, Rostagno MH *et al.* (2005) demostraron que el método usado para detectar *Salmonella* spp. en heces naturalmente contaminadas generaba diferencias en los serotipos aislados de una misma muestra.

Dentro de los aislamientos pertenecientes al serotipo Montevideo se hallaron, de manera interesante, y de acuerdo a la fase I del antígeno flagelar, dos variedades de cepas. La fórmula antigénica para el serotipo Montevideo es I. 6,7,14: g, m, [p], s: [1,2,7]. Todas las cepas encontradas fueron monofásicas, mostrando la mayoría la fórmula: I. 6,7: g, m, s: - ; mientras que algunas cepas mostraron adicionalmente la presencia del factor p, teniendo por fórmula I. O 6,7: g, m, p, s: - . Este hecho sugeriría que podría tratarse de dos poblaciones distintas del mismo serotipo; sin embargo, estudios más detallados tendrían que llevarse a cabo para responder a esta pregunta.

Respecto al serotipo predominante, Montevideo ha sido reportado con frecuencia como circulante en el país a nivel de heces, corrales y pieles (Narváez-Bravo CA *et al.* 2012), en canales (Pérez-Montaña JA *et al.* 2012), así como en cortes.

Los otros serotipos identificados también han sido también reportados con anterioridad como presentes en la cadena de producción de carne de bovino. Por ejemplo,

S. Reading fue reportado en varios puntos de la cadena (Narváez-Bravo CA *et al.* 2012), en carne (cortes) en el estado de Yucatán por Zaidi *et al.* (2006) y en linfonodos por Gragg S *et al.* (2013); adicionalmente, se reportó junto con Montevideo en distintas etapas (canales, linfonodos y heces), mediante el empleo de tipificación por la técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE, en inglés) (Ayala D *et al.* 2013), y en carne molida en el estado de Jalisco por Cabrera-Díaz E *et al.* (2013); mientras que el serotipo Newport fue hallado en intestino de ganado bovino (así como de casos clínicos y subclínicos de humano) en el estado de Yucatán (Zaidi MB *et al.* 2008).

Adicionalmente, los 3 distintos serotipos hallados en este estudio fueron reportados por Gutiérrez-Cogco L *et al.* (2000) en su estudio sobre serotipos de *Salmonella* spp. identificados por los Sistemas de Salud en México. En su análisis de 24,394 cepas de *Salmonella* spp., aisladas entre 1972 y 1999, encontró los mismos 3 serotipos hallados en nuestro estudio, tanto en muestras no humanas (alimentos, agua y muestras ambientales) como en los aislamientos clínicos de humano; esta situación sugiere que estos serotipos son de importancia clínica y de Salud Pública, además de que pueden estar fuertemente vinculados a orígenes animales (tras ser hallados en agua, alimentos y el medio ambiente). Sin embargo, es necesaria la realización frecuente de estudios nacionales sobre los serotipos de *Salmonella* spp. circulantes, pues esto genera información sobre los serotipos dominantes y de mayor importancia en el país, aquellos que son emergentes o exóticos, además de dar indicios de su dinámica entre la población humana, animal y el medio ambiente.

- **7 aislamientos de *Salmonella* spp. no tipificables**

De los aislamientos de *Salmonella* spp. obtenidos, 7 (17.07%) fueron considerados como no tipificables (categoría donde se incluyeron los aislamientos parcialmente tipificados), principalmente por la presencia de antígenos somáticos (AgO) rugosos, mismos que dificultan evaluar las reacciones antígeno anticuerpo o que suelen presentar mayor cantidad de reacciones cruzadas. No parece haber un porcentaje estándar de este tipo de

cepas, pues los estudios varían. Por ejemplo, en el estudio realizado por Cabrera-Díaz E *et al.* (2013), se obtuvieron 2 cepas no tipificables y 34 parcialmente identificadas para un total de 36 cepas de 135 (26.67%) combinando las categorías. En contraste, Gragg S *et al.* (2013) reportaron sólo un 4.4% de cepas no tipificables, mientras que Varela-Guerrero JA *et al.* (2013) hallaron sólo un 7% en esta categoría. En el presente estudio se obtuvieron 2 cepas no tipificables y en 5 parcialmente identificables (en las que sólo se logró identificar al antígeno flagelar). De estas 5, en 4 casos se identificó la fórmula OR: e,h: 1,2 ; mientras que uno mostró la fórmula OR: e,h: 1,5. Sin embargo, esta información es muy limitada para estas cepas, pues las combinaciones obtenidas pueden coincidir con varios serotipos. Por ejemplo, las cepas OR: e,h: 1,2 podrían coincidir con serotipos como Ferruch (O8), Kottbus (O6,8), Waedenswil (O9,46), Muenster (O3.{10},{15}{15,34}), Saboya (O16), etc. (Weill F *et al.* 2007). El estudio y vigilancia continuos de los serotipos circulantes en los animales y la cadena productiva es de gran importancia para establecer patrones de comportamientos del patógeno, sus reservorios y su transmisión. Es necesario que se establezcan sistemas de vigilancia para *Salmonella* spp. en México, donde se pueda detectar a varios niveles (incluidos los serotipos) las cepas circulantes en hatos, alimentos y pacientes del país.

#### - **Relación entre cepas**

La presencia de un serotipo dominante sugiere que los aislamientos podrían tener un mismo origen (por ejemplo en el corral de la planta) y por tanto, estar relacionados entre sí. Asimismo, la presencia de dos variedades, de acuerdo a la serología, de cepas Montevideo (con y sin factor *p*) podría sugerir de igual forma, la presencia de dos ramas del mismo serotipo. Sin embargo, para establecer este tipo de relaciones hace falta realizar otro tipo de pruebas como la Electroforesis en Campos Pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) o el Análisis de Secuencias Multilocus (MLST, por sus siglas en inglés). Estas pruebas permitirían conocer si los aislamientos de Montevideo son clonales o están emparentados, o bien, tienen orígenes diversos. Lamentablemente, se cuenta con muy poca información sobre esto, en la revisión bibliográfica para este estudio se hallaron pocos trabajos sobre la

tipificación y clonalidad de aislamientos de *Salmonella* spp. en México. De estos, destaca el realizado por Ayala D *et al.* (2013) que tipificaron aislamientos de heces, linfonodos y canales de bovino en México mediante PFGE. Este estudio, aún no publicado como artículo, mostró que existe una alta concordancia entre los serotipos y los patrones obtenidos por PFGE en los aislamientos (90.3%), hallándose también gran variedad inter e intra-serotipos. Además, este estudio encontró que Kentucky era el serotipo más clonal, con todas sus cepas mostrando patrones indistinguibles; mientras que Muenster era el más diverso, con 11 subtipos hallados. Otros estudios son los realizados por Zaidi MB *et al.* (2008, 2012), que han demostrado la asociación de cepas de origen animal y alimentario con casos clínicos, destacando su investigación realizada en la comunidad rural de Buctzotz en el Estado de Yucatán, México, en la que logró vincular claramente, mediante PFGE, la transmisión de cepas de origen animal y/o alimentario con casos clínicos y subclínicos de salmonelosis. Los patrones obtenidos de los aislamientos clínicos y subclínicos eran indistinguibles de aquellos con origen en animales y alimentos. En este estudio se reportó a *S. Agona*, *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* como los principales serotipos presentes. Este tipo de información, aplicada a un contexto nacional, tendría gran importancia para la epidemiología local e incluso global, así como para conocer el proceso de incorporación de *Salmonella* spp. a la cadena de producción, su evolución y poseer herramientas más eficaces para vincular casos clínicos con las fuentes de contaminación.

## **6.2 Coliformes**

Es comúnmente aceptado que el análisis cualitativo de bacterias indicadoras puede proveer información útil para predecir, en cierto grado, la probabilidad de contaminación con un patógeno. Es por esto que las bacterias coliformes (enterobacterias rápidas fermentadoras de la lactosa) son empleadas como marcador para contaminación de origen fecal en la industria.

Para el caso de *Salmonella* spp. se han realizado estudios donde se prueba que existe correlación entre la presencia/ausencia de coliformes con la ausencia del patógeno en una

misma muestra, habiéndose incluso propuesto el uso de conteos de coliformes como indicadores predictivos para la presencia de *Salmonella* spp. por el beneficio económico y de tiempo que esto tendría para la industria. Sin embargo, esta medida no ha sido adoptada por la presencia de muestras negativas a coliformes pero positivas para *Salmonella* spp. y por el riesgo que representaría dejar de registrar directamente la presencia de un patógeno tan importante y cuya dispersión puede tener serias consecuencias (Ruby JR *et al.* 2009). Este tipo de asociaciones también es aplicable, en cierta medida, a *Escherichia coli*, pues esta bacteria es el miembro prototípico de las bacterias coliformes, además de estar también asociada su presencia a los conteos de mesófilos aeróbicos totales de una muestra (Siragusa GR *et al.* 1998; Baylis C *et al.* 2011).

En términos generales, los resultados sugieren que el corral de engorda es el sitio con mayor frecuencia para *Salmonella* spp. en los puntos evaluados de la cadena productiva de carne de bovino. Sin embargo, es en este sitio en donde menos intervenciones se llevan a cabo en la producción de carne. Si bien, es notoria la disminución de *Salmonella* spp. conforme avanza la cadena productiva, las medidas de reducción de patógenos desde las primeras etapas de la producción, aunadas a las intervenciones realizadas en etapas más tardías, podría asegurar una frecuencia mucho más baja del patógeno en los productos que llegan al consumidor. La exploración de medidas de reducción de patógenos desde los corrales, así como del proceso de diseminación de los mismos (por ejemplo presencia y dinámica de los animales “súper diseminadores” en el país), sería de gran utilidad para la inocuidad de los productos cárnicos.

### **6.3 *Escherichia coli***

#### **- Identificación Bioquímica**

Conforme a lo esperado, la gran mayoría de los aislamientos mostró resultados típicos para *E. coli* en las pruebas bioquímicas, siendo sólo 4 cepas las excepciones. De estas, 3 coinciden con un mismo serotipo asociado previamente a APEC y a UPEC, O1:H6, cuyo

perfil bioquímico suele ser variable y normalmente fermentadoras lentas de la lactosa (como las cepas halladas en el presente estudio) (Ibarra-Valencia MA *et al.* 2013). Mientras que la última presentó reacciones atípicas no consideradas para la especie como citrato +, malonato + (Barrow GI *et al.* 1993; Scheutz F *et al.* 2005). Si bien, debe tomarse en cuenta que *E. coli* es una especie con una muy alta variabilidad fenotípica, habiéndose reportado cepas “atípicas” desde hace décadas. Ejemplo de esto son los reportes de cepas de *E. coli* productoras de ácido sulfhídrico reportadas por Lautrop H *et al.* (1971) inicialmente y confirmadas por Layne *et al.* (1971) como un fenómeno dependiente de material extracromosomal en esas cepas. Asimismo, Washington JA II *et al.* (1976) describieron una enterobacteria con las características de *E. coli* pero capaz de utilizar al citrato como única fuente de carbono, misma que fue reportada como inclasificable para la época (pues no se disponía de medios moleculares como los de hoy en día). Otro ejemplo, es la descripción de grupos asociados a *E. coli* que presentaban un biotipo positivo a malonato y a citrato, que actualmente conforma a uno de los biotipos de la especie *E. blattae*, identificada en intestino de cucarachas *Blattella* spp. (Burgess NRH *et al.* 1972). De esta manera, es probable que exista un pequeño porcentaje de cepas con variantes fenotípicas en poblaciones de *E. coli*, obstáculo que puede ser sorteado en la actualidad mediante el empleo de técnicas moleculares, como en el presente estudio en el que todos los aislamientos fueron confirmados como *E. coli* molecularmente mediante PCR.

#### - **Concentraciones en canales y cortes**

La concentración de coliformes fue constante en canales y cortes, con promedios de 0.497 y 0.437 log UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente, un fenómeno esperado; sin embargo, la concentración para *E. coli* fue mayor en el caso de los cortes (0.329 log UFC/cm<sup>2</sup>) en contraste con las canales (0.012 log UFC/cm<sup>2</sup>). Esto podría explicarse por el manejo que recibe la canal hasta llegar a los cortes. Como ejemplo de este, está el hecho de que las canales que salen de las cámaras hacia la sala de cortes entraban en contacto con la misma persona, quien movía las canales. Al usar los mismos guantes y utensilios para desplazar



todas las canales, podría haber un cúmulo de residuos, mismo que podría llevar a la contaminación o el incremento de la carga microbiana de los cortes. Adicionalmente, la temperatura de la sala de cortes en ocasiones alcanzaba los 8° C, temperatura que podría permitir el crecimiento microbiano.

- **La mayoría de las cepas no fueron tipificables por serología**

Un 39.58% de los aislamientos de *E. coli* no fue completamente tipificable por serología convencional. Estas dificultades para tipificar se han reportado ya en estudios con cepas de origen animal (Comunicación personal, Dr. Armando Navarro, Facultad de Medicina, UNAM) y pueden deberse a distintas causas. Una de ellas es la presencia de un antígeno O rugoso (OR), en el cual hay una ausencia de cadenas laterales del polisacárido, lo que evita su adecuado reconocimiento por los anticuerpos específicos. Por otra parte, se cree que podrían existir grupos O desconocidos en las cepas animales, pues normalmente las cepas de referencia empleadas para elaborar los sueros específicos son de origen humano.

Otro punto de consideración es la presencia de cepas con alta producción de ácido colánico. Este, es un polisacárido extracelular (polímero de glucosa, galactosa, fucosa y ácido glucurónico con grupos acetato y piruvato) (Sutherland IW, 1969), que ha mostrado proveer de protección a las bacterias durante su vida fuera del hospedero, tanto en la formación de biopelículas como en condiciones de desecación. Recientemente, se ha asociado la producción de este polisacárido a la protección contra el suero y sus componentes que presentan las cepas de *E. coli* extraintestinal (ExPEC) (Miajlovic H *et al.* 2014). La presencia abundante de ácido colánico y otros polisacáridos extracelulares (como la celulosa bacteriana 1,4- $\beta$  glucano y el polímero 1,6- $\beta$ -N-acetilglucosamina, PGA), a parte del LPS, podría “enmascarar” a los antígenos O de una cepa, evitando el correcto reconocimiento del mismo con los anticuerpos específicos. Este tipo de moléculas es muy frecuente y se ha descrito tanto en cepas patógenas como en comensales de *E. coli*; y tiene diversas funciones en la interacción bacteria-ambiente, desde la adhesión entre bacterias y

a superficies hasta la formación de biopelículas y cápsulas. Se han descrito 4 grupos de estos componentes en *E. coli*, el 1 y 4 suelen asociarse a aislamientos que provocan cuadros intestinales, mientras que el 2 y el 3 se asocian más a cepas ExPEC (Ferrières L *et al.* 2007).

Sobre las cepas parcialmente identificadas, aquellas en las que sólo se logró determinar uno de los dos antígenos, se pueden deber a la presencia de antígenos OR, explicada antes ya, o bien, a la ausencia de motilidad. Desde hace tiempo se han reportado cepas de *E. coli* inmóviles (Matsumoto H *et al.* 1967), en cepas que incluso pueden contener el locus necesario para la expresión del antígeno H. Investigaciones recientes explican la regulación del flagelo de *E. coli* en distintos ambientes, sabiéndose ahora que, durante el periodo de transición hacia la formación de una biopelícula, la expresión del flagelo se reduce hasta anularse por completo (Guttenplan SB *et al.* 2013). Este hecho explicaría también la presencia de cepas inmóviles en carne y otros sustratos presentes en plantas de alimentos, donde comúnmente se ha reportado la formación de biopelículas.

#### - **Serogrupos de *E.coli* asociados a patotipos**

En el presente estudio no se encontraron cepas patógenas de *E. coli* (que llevaran genes para factores de virulencia correspondientes a los patotipos STEC/EHEC, EPEC y ETEC). Sin embargo, la serotipificación de las mismas reveló la presencia de serotipos frecuentemente asociados con los patotipos STEC/EHEC y ETEC. Esto coincide con algunos estudios como el de Varela-Hernández JJ *et al.* (2006), quien obtuvo 146 aislamientos con serogrupos asociados a STEC (O157 y no O157), obteniendo sólo dos cepas con presencia de factores de virulencia, a pesar de que en este estudio se emplearon métodos más sensibles como la Separación Inmunomagnética y la posterior detección molecular por PCR.

La ausencia de marcadores para STEC en el presente estudio podría deberse a las características intrínsecas de la cría y sistemas de engordas del país. Dentro de estas, la dieta y el tiempo de engorda podrían ejercer cierta presión de selección en las cepas presentes en los bovinos listos para rastro. En la planta en estudio se promedia un periodo

de 190 días para la etapa de engorda, mientras que en el país el promedio oscila entre los 90 y los 120 días. Tanto en la media nacional como en el rastro en estudio, el grano en la dieta no constituye el ingrediente principal (FMVZ-UNAM, 2012). En contraste, los Estados Unidos promedian engordas de 3-6 meses (90-180 días) en etapa de finalización, con dietas con alto contenido en grano (entre 70 y 90%), pudiendo llegar hasta los 250 (incluso más) días de engorda (Beef USA, 2014; Cattlemen's Beef Board and National Cattlemen's Beef Association, 2014), de igual forma, en Canadá se promedian 200 días de engorda (OMAFRA, 2010), también con alto contenido de grano. Esta diferencia podría explicar la menor frecuencia de cepas STEC, incluidas las O157:H7, en México, en comparación con EEUU y Canadá. Se sabe que una dieta alta en grano provoca incrementos de hasta 1000 veces en las poblaciones de *E. coli* del bovino, además de seleccionar cepas resistentes a ambientes ácidos (lo que facilita su ingreso al tracto digestivo humano, haciendo a estas más propensas a generar infecciones) lo que incrementa asimismo la posibilidad de acarrear alguna cepa patógena. Adicionalmente, se ha logrado reducir la carga, hasta 1000 veces, de *E. coli* genérica y de cepas resistentes a condiciones ácidas evitando el ayuno previo a la matanza y empleando dietas de heno por 5 días antes del sacrificio de los animales (Diez-González F *et al.* 1998; Russell JB *et al.* 2000). La dieta, aunada al mayor tiempo de engorda empleado en EEUU, podría estar favoreciendo un incremento en la población general de *E. coli* y ejerciendo una presión de selección sobre ciertas cepas, algunas de ellas patógenas; esto explicaría la menor frecuencia de cepas STEC en México como 0.53% en canales y 5.2% en heces para O157:H7 (Narváez-Bravo CA *et al.* 2012). Un tiempo de engorda mayor, utilizado en EEUU para lograr un mayor marmoleo, cualidad altamente apreciada en el mercado, permitiría a este tipo de selección actuar de manera más evidente que en México.

Por otra parte, la ausencia de cepas STEC también podría verse influenciada por los ya descritos fenómenos de estacionalidad para este tipo de cepas, pues las muestras fueron tomadas en las últimas semanas de septiembre, mes en que el fotoperiodo empieza a acortarse (Edrington TS *et al.* 2006; Sperandio V *et al.* 2003). Asimismo, la edad de los animales también podría jugar un papel. Ejemplo de esto es la asociación que se tiene entre

una mayor presencia de cepas STEC conteniendo el gen *eae* y los animales jóvenes de 4 a 8 meses. Esto podría tener implicaciones en los procesos de selección de cepas con determinados factores de virulencia (Blanco M *et al.* 2004).

Respecto a la presencia de *E. coli* O157:H7, el presente estudio se encontraba limitado para su detección, que normalmente requiere una metodología especial (como empleo de medios SMAC, enriquecimientos con telurito de potasio, separación inmunomagnética, etc.), ya que el diseño empleado pretendía detectar cepas STEC en general, por ser estas más diversas y prevalentes en el ganado bovino que O157:H7; habiéndose aislado más de 400 serotipos distintos de STEC de esta especie (Blanco M *et al.* 2004; Bettelheim KA, 2007). De tal forma, estaba dentro de las expectativas el que no se haya detectado su presencia.

Los serogrupos más frecuentes fueron O8, O71 y el serotipo O1:H6, asociados extensamente a ETEC, EHEC y APEC/UPEC, respectivamente. Aunque prácticamente todos los serogrupos hallados han sido asociados a patotipos ETEC o STEC/EHEC, de importancia en enfermedades transmisibles por alimentos. El serogrupo predominante dentro de los aislamientos tipificables fue O8, que ha sido ampliamente asociado a ETEC. Wolf MK (1997) menciona en su revisión de reportes de ETEC en más de 15 países, a O6 y a O8 dentro de los serogrupos más frecuentemente reportados para este patotipo. Ambos fueron hallados en el presente estudio junto con otros también asociados como O7 y O166 (Mc Connell MM *et al.* 1989; De Boy JM 2<sup>nd</sup> *et al.* 1980; Hamond Regua-Mangia A *et al.* 2004; Peruski LF *et al.* 1999; Danbara H *et al.* 1988). Adicionalmente, Wolf MK (1997) encontró que el serogrupo O8 es capaz de coexistir con una gran variedad de antígenos H, no estando asociado a alguno en particular. Esto explica la diversidad de serotipos encontrados en este estudio: O8:H8, O8:H21, O8:H19, O8:H2 y O8:NM; habiéndose reportado H21 como uno de los antígenos flagelares más comunes en cepas ETEC.

Por otra parte, en una revisión sobre cepas STEC no O157 en el mundo en animales, alimentos y humanos, realizada por Bettelheim KA (2007), aparecen todos los serogrupos

hallados en el presente estudio (salvo O1) reportados como STEC no O157. Los grupos O6, O8, O113 y O156 aparecen dentro de los principales, habiendo sido reportados cuando menos 30 veces en la literatura; por su parte O32, O39, O71, O28, O154, O166 y O124 aparecen en el listado con menos de 30 reportes en la literatura. Con esto, se puede concluir que varios de los serogrupos hallados podrían estar asociados a varios y no sólo a un patotipo, lo que incrementaría las posibilidades de los mismos de incorporar algún factor de virulencia.

En esa misma revisión, se realiza una asociación fuerte de los serotipos O8:H19, principalmente y O8:H21 como los serotipos STEC no O157 más frecuentes pertenecientes a O8. Ambos serotipos fueron hallados en el presente estudio (Bettelheim KA, 2007).

Sobre los otros serotipos hallados en el presente estudio, se encontraron O71, O156, O154 y O113 como plenamente asociados con cepas enterohemorrágicas (EHEC) (CDC, 2012c; De Moura C *et al.* 2012; Bettelheim KA *et al.* 2005; Monaghan *et al.* 2011), sólo un serogrupo asociado a EIEC y en ocasiones a EHEC, O124 (Chearty T *et al.* 1983; Gomes-Oliveira M *et al.* 2008) y 3 aislamientos con el serotipo O1:H6, asociado a UPEC en humanos y a APEC, patógeno de las aves (Ibarra-Valencia MA *et al.* 2013; Ewers C *et al.* 2004; Dho-Moulin M *et al.* 1999). La presencia de serotipos asociados a STEC ha sido reportado desde hace tiempo tanto en animales sanos como en enfermos, así como en alimentos (Montenegro MA *et al.* 1990; Parma AE *et al.* 2000). También se sabe que el bovino es reservorio de estas cepas, siendo capaz de albergarlas sin mostrar signología clínica, gracias a poseer receptores modificados para la toxina (isoformas distintas de Gb3) y procesarla de manera distinta, logrando llevarla a los lisosomas para su destrucción (Elaine Hoey DE *et al.* 2003). El becerro pareciera ser el principal reservorio de cepas STEC *eae+*, lo que abre la posibilidad de que la edad del animal juegue un papel importante en la frecuencia de cepas STEC (Blanco M *et al.* 2004).

Sobre la cepa O113:NM aislada, asociada a STEC/EHEC, también cabe mencionar que este serotipo es el más frecuente en cepas STEC pertenecientes al serogrupo O113,

habiéndose reportado que las cepas O113:NM, al evaluarse su genotipo para *fliC* (gen codificante de la flagelina) corresponden a O113:H4 y no a O113:H21, los dos siguientes serotipos por orden de frecuencia (Bettelheim KA *et al.* 2007).

La mayoría de los serotipos asociados a STEC aislados de bovino corresponden con los serotipos de STEC asociados a enfermedad humana (Blanco JE *et al.* 2004). Se tiene poco estudiado el papel que podrían jugar las cepas de estos serotipos que no son portadoras de genes asociados a factores de virulencia; si bien, no se pueden descartar por su potencial para adquirir estos factores con mayor facilidad.

#### - **Filogrupos**

Los filogrupos obtenidos para los aislamientos concuerdan completamente con lo reportado, habiendo un predominio claro de los grupos A (60%) y B1 (26.67%), comúnmente reportado para aislamientos animales (Clermont O *et al.* 2011; Carlos C *et al.* 2010). De manera adicional, se encontró una cepa perteneciente al grupo C (del serogrupo O71) y 3 pertenecientes al D (serotipo O1:H6). Estas podrían ser de interés, pues tanto el serogrupo O71 como el filogrupo C han sido asociados a cepas EHEC de origen animal (CDC 2012c; Clermont O *et al.* 2011); mientras que el serotipo O1:H6 podría ser de importancia pues se ha reportado tanto como patógeno animal, catalogado como el patógeno aviar APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) así como patógeno humano, estando ligado al patotipo uropatogénico (UPEC, Uropathogenic *E. coli*) (Ibarra-Valencia MA *et al.* 2013; Ewers C *et al.* 2004, Dho-Moulin M *et al.* 1999). La presencia de cepas como estas circulando en la cadena de producción de alimentos podría tener implicaciones en la salud pública e incluso en la de otras especies. Sin embargo, son pocos los estudios disponibles al respecto.

Escobar-Páramo *et al.* (2004) clasifican a los factores de virulencia de *E. coli* en 3 tipos mayores:

a) aquellos capaces de instalarse y expresarse en fondos genéticos distintos de *E. coli*, como aquellos asociados a enfermedad crónica leve, como la diarrea del viajero provocada por EPEC o aquellas patologías por EAEC y DAEC.

b) factores que llegan a distintos fondos genéticos, pero que, asociados a una patología, suelen tener una preferencia por un fondo genético (como los factores de virulencia asociados a enfermedad extraintestinal).

c) Factores de virulencia que requieren de un fondo genético particular para instalarse y expresarse; estos suelen ser los factores asociados con enfermedad severa y aguda, como las provocadas por las toxinas LT y ST de ETEC o las toxinas STX1 y STX2 de EHEC, ambos patotipos, frecuentes en alimentos.

Las cepas obtenidas en este estudio muestran serotipos y grupos filogenéticos propicios para la adquisición de factores de virulencia de ETEC y EHEC, considerados dentro del tercer grupo y de alta relevancia en materia de alimentos. Al ser necesario un fondo genético particular para llevar a cabo la incorporación y expresión de factores de virulencia, el hecho de tener los serotipos y filogrupos adecuados para su inserción circulando en la cadena de producción de carne de bovino, debe ser considerado como un factor adicional de riesgo; pues cualquiera de estas cepas podría adquirir, expresar y posteriormente diseminar factores de virulencia, generándose así cepas patógenas. Este hecho se ha evidenciado al analizar cepas patógenas de origen animal y humano, habiéndose encontrado que, para aquellas que provocan enfermedades intraintraestinales, existe un fondo genético común y suelen estar filogenéticamente emparentadas, siendo imposible distinguir el origen humano o animal de las mismas (Clermont *et al.* 2011). Aunado a esto, los factores de virulencia de ETEC y STEC se encuentran presentes en elementos altamente móviles como los plásmidos para ETEC (transferibles fácilmente por conjugación) y los bacteriófagos (para STEC). En estos últimos, se ha reportado ya su presencia en alimentos, aguas y heces de animales incluso sin la presencia de cepas STEC, lo que supone un riesgo aún mayor de que cepas con el fondo fenotípico y genotípico adecuado incorporen las toxinas

Shiga (Martínez Castillo A *et al.* 2014; Oot RA *et al.* 2007; Hallewell J *et al.* 2014). Hace falta estudiar el impacto que tendría el ingreso de una cepa o de elementos portadores, con factores de virulencia en poblaciones genética y fenotípicamente adecuadas para incorporar dichos elementos. Esto permitiría entender mejor las dinámicas de generación de cepas patógenas y la dispersión de factores de virulencia.

## **7. Implicaciones y recomendaciones**

En general, los resultados de este trabajo demuestran que el área de corrales es el principal reservorio de *Salmonella* spp, lo que genera una gran presión para las intervenciones que se aplican en rastro, las cuales se podrían ver rebasadas por las altas frecuencias del patógeno en los animales vivos. Al respecto, sería conveniente estudiar posibles intervenciones contra este patógeno a nivel de corral, que es donde menos se realizan a pesar de ser el origen del problema. Por ejemplo, la evaluación de la frecuencia de *Salmonella* spp. en los becerros que se compran para la engorda, el manejo de animales enfermos y sospechosos, así como la evaluación de posibles reservorios del patógeno dentro de la misma granja (ej. silos, graneros, pastos, depósitos de agua y bebederos) y la limpieza y desinfección periódica de las distintas áreas de la granja y corrales.

Otra opción es el uso de bacteriófagos y/o probióticos. Los primeros se encuentran disponibles de manera comercial para el control de *E. coli* O157:H7 y otras STEC, con los que se han observado reducciones de >1 log UFC en la piel de bovinos tras una hora de incubación (Elanco, 2015). Por su parte, algunos probióticos han demostrado ser efectivos en la reducción de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. (Loneragan GH *et al.* 2005). Finalmente, se han desarrollado algunos trabajos para evaluar la efectividad de la vacunación (Bioniche Life Sciences, 2008; Cox E *et al.* 2014; Epitopix, 2014; Trent Fox J *et al.* 2009) y del uso de aditivos químicos inhibidores de estos patógenos en la dieta de los animales (FSRIO-USDA, 2014; Smith D, 2005; Edrington TS *et al.* 2009)



Además de las intervenciones con potencial para el control de patógenos en granja, sería conveniente realizar estudios moleculares sobre la clonalidad de las cepas aisladas. Esto permitiría establecer los posibles orígenes de las cepas dominantes y dado que un solo serotipo dominó ampliamente en el estudio, determinar si todos los aislamientos correspondientes al mismo comparten un mismo origen o están emparentados; o bien, si tienen diversos orígenes (lo que sugeriría distintos sitios de proveniencia).

Por último, en materia de legislación debe considerarse el cúmulo de información científica sobre las condiciones en México para reestructurar las normas vigentes, principalmente aquellas que regulan a *Salmonella* spp. en canales y cortes. La legislación actual contempla una política de tolerancia cero para este patógeno, hecho que debiera ser reconsiderado. En contraste, legislaciones de países desarrollados contemplan márgenes de aceptación de canales y cortes positivos, dado que la presencia del patógeno en la cadena productiva es alta.

## **8. Conclusiones**

En este estudio se comprobó que el bovino es un importante reservorio de serotipos de *Salmonella* spp. y *E. coli* y que las intervenciones que se aplican en rastro logran disminuir notablemente la presencia de ambos patógenos, mas no anularla completamente. Lo anterior implica un peligro latente de diseminación de estos patógenos, a través de la carne, a lo largo de la cadena productiva. De ahí la importancia de realizar estudios posteriores sobre los factores fenotípicos y genéticos que condicionan la colonización del bovino por ambas bacterias, para una gestión más eficiente de los riesgos.

El predominio de *Salmonella* Montevideo observado en este estudio evidencia la importancia de realizar futuras investigaciones a nivel molecular, que permitan profundizar sobre los factores genéticos que determinan la colonización de bovinos por serotipos específicos de este patógeno.

Aparentemente, la incidencia de cepas patógenas de *E. coli* en el bovino es baja. No obstante, existe potencial para la modificación genética de las cepas que cuenten con un perfil genético-fenotípico adecuado, con las cuales podrían adquirir virulencia. Esto constituye una posible fuente latente de patógenos que debe tomarse en cuenta.

Finalmente, otro factor de importancia a considerar en los estudios de este tipo es la metodología empleada y su sensibilidad, misma que llega a ser variable entre estudios y dificulta las comparaciones entre los mismos.

## 9. Referencias

1. Albert MJ, Al Obaid K, Alfouzan W, Sheikh AR, Udo E, Izumiya H, *et al.* 2014. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Kentucky Strain ST 198 and its H2S negative variant from a Patient: Implications for Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 52; 11: 4090-3
2. Amézquita-López BA, Quiñones B, Cooley MB, León-Félix J, Castro-del Campo N, Mandrell RE, *et al.* 2012. Genotypic analyses of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *PLoS One.* 7; 12: e51565.
3. Anklam KS, Kanankege KS, Gonzales TK, Kaspar CW, Döpfer D. 2012. Rapid and reliable detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time multiplex PCR. *J Food Prot.* 75; 4: 643-50.
4. Association of Public Health Laboratories APHL. (2006) *Presentación de la ponencia: Salmonella Serotyping, impartida por la Dra. Patricia Fields, del National Salmonella Reference Lab, CDC, en el marco de la 10ª. Reunión Anual de Actualización de PulseNet, realizada el 5 de Abril de 2006.* [En línea]. Disponible en: [http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2006\\_10th\\_Annual\\_Pulse\\_Net\\_Update\\_Meeting/22\\_Fields\\_Salm\\_Sero.pdf](http://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2006_10th_Annual_Pulse_Net_Update_Meeting/22_Fields_Salm_Sero.pdf). [Consultado: 28 Enero 2015]
5. Ayala, D. *et al.* (2013) *Pulsed-Field Electrophoresis Subtyping of Salmonella spp. Isolates from Carcasses, Lymph Nodes, and Fecal Samples from Cattle at Slaughter Facilities in Mexico. Resumen de trabajo doctoral de la Universidad Texas Tech expuesto en el Annual Meeting International Association for Food Protection (IAFP) 2013, el 31 de Julio de 2013 en el Charlotte Convention Center en Charlotte, North Carolina, USA.* [En línea]. Disponible en: <https://iafp.confex.com/iafp/2013/webprogram/Paper4580.html>.
6. Barrow GI, Feltham RKA. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria.* 3a ed. Cambridge University Press; Reino Unido.
7. Baylis C, Uyttendaele M, Joosten H, Davies A, Baylis C. 2011. *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry.* International Life Sciences Institute; Bélgica.
8. Beef USA. (2014) *Fact Sheet: Feedlot Finishing Cattle.* [En línea]. Disponible en: [http://www.beefusa.org/uDocs/Feedlot%20finishing%20fact%20sheet%20FINAL\\_4%2026%2006.pdf](http://www.beefusa.org/uDocs/Feedlot%20finishing%20fact%20sheet%20FINAL_4%2026%2006.pdf). [Consultado: 28 Febrero 2015]
9. Bettelheim KA, Kuzevski A, Gilbert RA, Krause DO, McSweeney CS. 2005. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. *J Appl Microbiol.* 98; 3; 699-709.
10. Bettelheim KA. 2007. The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-Rated Pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 33; 1: 67-87.
11. Bielaszewska M, Janda J, Bláhová K, Minariková H, Jíková E, Karmali MA, *et al.* 1997. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect.* 119; 3; 299-305.

12. Bioniche Life Sciences Inc. (2008) *World's First Cattle Vaccine to Reduce E. coli O157 Threat Receives Full Licensing Approval in Canada*. [En línea]. Disponible en: [http://www.bioniche.com/news\\_item.cfm?id=2193](http://www.bioniche.com/news_item.cfm?id=2193). [Consultado: 06 Noviembre 2014]
13. Bisi-Johnson MA, Obi CL, Vasaikar SD, Baba KA, Hattori T. 2011 Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathog.* 10; 3; 1: 9.
14. Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. 2004. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol.* 42; 1: 311-319.
15. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, *et al.* 2004. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (*eae-ξ*). *J Clin Microbiol.* 42; 2: 645-651.
16. Brichta-Harhay DM, Arthur TM, Bosilevac JM, Guerini MN, Kalchayanand N, Koohmaraie M. 2007. Enumeration of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, cattle carcass, hide and faecal samples using direct plating methods. *J Appl Microbiol.* 103; 5: 1657-1668.
17. Burgess NRH, McDermott SN, Whiting J. 1973. Aerobic bacteria occurring in the hind-gut of the cockroach, *Blatta orientalis*. *J Hyg Camb.* 71; 1: 1-7.
18. Cabrera-Díaz E, Barbosa-Cardenas CM, Perez-Montañón JA, Gonzalez-Aguilar D, Pacheco-Gallardo C, Barba J. 2013. Occurrence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in ground beef at retail stores in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot.* 76; 12; 2004-2010.
19. Callaway TR, Anderson RC, Tellez G, Rosario C, Nava GM, Eslava C, *et al.* 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and swine in central Mexico. *J Food Prot.* 67; 10; 2274-2276.
20. Carlos C, Pires MM, Stoppe NC, Hachich EM, Sato MI, Gomes TA, *et al.* 2010. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol.* 1; 10; 161.
21. Cattlemen's Beef Board and National Cattlemen's Beef Association. (2014) *Modern Beef Production Fact Sheet*. [En línea]. Disponible en: [http://www.explorebeef.org/cmdocs/explorebeef/factsheet\\_modernbeefproduction.pdf](http://www.explorebeef.org/cmdocs/explorebeef/factsheet_modernbeefproduction.pdf). [Consultado: 28 Febrero 2015]
22. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2009) *Pathogens causing US foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths, 2000-2008*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/pathogens-complete-list-01-12.pdf>. [Consultado: 14 Junio 2014]

23. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2009b) *Multistate Outbreak of E. coli O157:H7 Infections Associated with Beef from JBS Swift Beef Company*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/0701.html>. [Consultado: 14 Junio 2014]
24. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2010) *Multistate Outbreak of E. coli O157:H7 Infections Associated with the Beef from National Steak and Poultry*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ecoli/2010/0105.html>. [Consultado: 14 Junio 2014]
25. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2011) *Estimates of foodborne illness in the United States*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. [Consultado: 14 Junio 2014]
26. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2011b) *Multistate Outbreak of Salmonella Typhimurium Infections Linked to Ground Beef*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-groundbeef/index.html>. [Consultado: 11 Marzo 2015]
27. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2012) *Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing Escherichia coli O145 Infections (Final Update)*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O145-06-12/index.html>. [Consultado: 14 Junio 2014]
28. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2012b) *Multistate Outbreak of Salmonella Enteritidis Infections Linked to Ground Beef (Final Update)*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis-07-12/index.html>. [Consultado: 11 Marzo 2015]
29. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2012c) *National Enteric Disease Surveillance : Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) Annual Report 2012*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/national-stec-surv-summ-2012-508c.pdf>. [Consultado: 06 Noviembre 2014]
30. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2013) *Foodborne illness and outbreak investigations*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/foodsafety/investigations.html>. [Consultado: 28 Enero 2015]
31. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2013b) *Multistate Outbreak of Salmonella Typhimurium Infections Linked to Ground Beef (Final Update)*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/salmonella/typhimurium-01-13/index.html>. [Consultado: 28 Enero 2015]
32. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades CDC. (2014) *Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Ground Beef (Final Update)*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/index.html>. [Consultado: 14 Junio 2014]
33. Consejo Mexicano de la Carne CoMeCarne. (2013) *Compendio Estadístico de la Carne 2013*. [En línea]. Disponible

en: <http://infocarne.comecarne.org/compendio/visualizar?comp=5>. [Consultado: 28 Enero 2015]

34. Chaudhuri RR, Henderson IR. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol.* 12; 2; 214-226.
35. Chart H, Okubadejo A, Rowe B. 1992. The serological relationship between *Escherichia coli* O157 and *Yersinia enteocolitica* O9 using sera from patients with brucellosis. *Epidemiol Infect.* 108; 1: 77-85.
36. Cheasty T, Rowe B. 1983. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia coli* O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152 and O164 and *Shigella* O antigens. *J Clin Microbiol.* 17; 4: 681-684.
37. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Appl Environ Microbiol.* 66; 10: 4555-4558.
38. Clermont O, Olier M, Hoede C, Diancourt L, Brisse S, Keroudean M, *et al.* 2011. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infect Genet Evol.* 11; 3: 654-62.
39. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep.* 5; 1: 58-65.
40. Cox, E. *et al.* (2014) Vaccines against enteric *Escherichia coli* infections in animals. En: *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*. [En línea] Bélgica. Disponible en: <https://biblio.ugent.be/record/4264637>. [Consultado: 06 Noviembre 2014]
41. Cray WC Jr, Casey TA, Bosworth BT, Rasmussen MA. 1998. Effect of dietary stress on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in calves. *Appl Environ Microbiol.* 64: 5: 1975-1979.
42. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 26; 4: 822-880.
43. da Silva FF, Horvath MB, Silveira JG, Pieta L, Tondo EC. 2014. Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. *Brazilian J Microbiol.* 45; 1: 17-23.
44. Danbara H, Komase K, Arita H, Abe H, Yoshikawa M. 1988. Molecular Analysis of Enterotoxin Plasmids of Enterotoxigenic *Escherichia coli* of 14 different O Serotypes. *Infect Immun.* 56; 6: 1513-1517.
45. De Boy JM 2<sup>nd</sup>, Wachsmuth IK, Davis BR. 1980. Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect Immun.* 29; 2: 361-368.
46. De Moura C, Ludovico M, Valadares GF, Gatti MSV, Leite DS. 2012. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy feces of dairy calves in Brazil. *Arq Inst Biol. Sao Paulo.* 79; 2: 273-276.
47. DebRoy C, Roberts C. 2006. Screening petting zoo animals for the presence of potentially pathogenic *Escherichia coli*. *J Vet Diagn Invest.* 18; 6: 597-600.
48. DebRoy C, Roberts E, Fratamico PM. 2011. Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Anim Health Res Rev.* 12; 2: 169-185.

49. Derakhshandeh A, Firouzi R, Khoshbakht R. 2013. Association of three plasmid-encoded *spv* genes among different *Salmonella* serotypes isolated from different origins. *Indian J Microbiol.* 53; 1: 106-110.
50. Dho-Moulin M, Fairbrother JM. 1999. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res.* 30; 2-3: 299-316.
51. Diario Oficial de la Unión Europea Eur-LEx. (2004) *Reglamento CE 852/2004 (relativo a la higiene de los productos alimenticios)*. [En línea] 2004 Abril 29. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:ES:PDF>. [Consultado: 14 Junio 2014]
52. Diario Oficial de la Unión Europea Eur-Lex. (2005) *Reglamento CE 2073/2005 (relativo a los criterios microbiológicos aplicables a productos alimenticios)*. [En línea] 2005 Noviembre 15. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:ES:PDF>. [Consultado: 14 Junio 2014]
53. Diario Oficial de la Unión Europea Eur-Lex. (2007) *Reglamento CE 1441/2007 (que modifica al Reglamento CE 2073/2005)*. [En línea] 2007 Diciembre 05. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&from=ES>. [Consultado: 14 Junio 2014].
54. Diez-Gonzalez F, Callaway TR, Kizoulis MG, Russell JB. 1998. Grain Feeding and the Dissemination of Acid-Resistant *Escherichia coli* from Cattle. *Science.* 281; 5383: 1666-1668.
55. Edrington TS, Callaway TR, Ives SE, Engler MJ, Loope ML, Anderson RC, *et al.* 2006 Seasonal Shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in Ruminants: A New Hypothesis. *Foodborne Pathog Disease.* 3; 4: 413-421.
56. Edrington, TS. *et al.* (2009) *Evaluation of Sodium Chlorate, with and without Nitroethane, on Salmonella and E. coli O157:H7 in Cull Dairy Cattle*. [En línea]. Disponible en: [http://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/Safety\\_Project\\_Summaries/FY08\\_Evaluation\\_of\\_Sodium\\_Chlorate.pdf](http://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/Safety_Project_Summaries/FY08_Evaluation_of_Sodium_Chlorate.pdf). [Consultado: 11 Marzo 2015]
57. Elanco. (2014) *Elanco Food Solutions: Finalyse*. [En línea]. Disponible en: <https://www.elanco.us/products-services/food-safety/finalyse/>; [Finalyse:https://www.elanco.us/pdfs/finalyse\\_detailer.pdf](https://www.elanco.us/pdfs/finalyse_detailer.pdf). [Consultado: 06 Noviembre 2014]
58. Epitopix - Life Science Innovations. (2014) *SRP as Vaccines*. [En línea]. Disponible en: <http://www.epitopix.com/srp-vaccines>. [Consultado: 06 Noviembre 2014]
59. Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguéne C, Denamur E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol;* 21; 6: 1085-1094.
60. European Center for Disease Prevention and Control - European Food Safety Authority ECDC-EFSA. (2011) *Technical report. Shiga toxin/Verotoxin-producing Escherichia coli in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104*. [En línea]. Disponible

en: <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/166e.pdf>. [Consultado: 24 Noviembre 2014]

61. Ewers C, Janssen T, Kiessling S, Philipp HC, Wieler LH. 2004. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet Microbiol.* 104; 1-2: 91-101.
62. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia MVZ-UNAM (2012) *Introducción a la Zootecnia*. 2° edición. México, D.F.
63. Ferrières L, Aslam SN, Cooper RM, Clarke DJ. 2007. The *yjbEFGH* locus in *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding proteins involved in exopolysaccharide production. *Microbiology.* 153; 4: 1070-1080.
64. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO (2013). *Food Outlook Biannual Report on Global Food Markets*. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/019/i3473e/i3473e.pdf> [Consultado: 12 Abril 2015]
65. Food Safety Research Information Office – United States Department of Agriculture FSRIO-USDA. (2014) *Evaluation of Sodium Chlorate, With and Without Nitroethane, on Salmonella and E. coli O157:H7 in Cull Dairy Cattle*. [En línea]. Disponible en: [http://fsrio.nal.usda.gov/nal\\_web/fsrio/printresults.php?ID=8196](http://fsrio.nal.usda.gov/nal_web/fsrio/printresults.php?ID=8196). [Consultado: 27 Octubre 2014]
66. Fox JT, Thomson DU, Drouillard JS, Thornton AB, Burkhardt DT, Emery DA, Nagaraja TG. 2009. Efficacy of *Escherichia coli* O157:H7 Siderophore Receptor/Porin Proteins-Based Vaccine in Feedlot Cattle Naturally Shedding *E. coli* O157. *Foodborne Pathog Dis.* 6; 7: 893-9.
67. Gallegos M, Morales A, Álvarez G, Vásquez J, Morales L, Martínez I, *et al.* 2009. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. *Rev Cient.* 19; 2: 139-146.
68. Gómez-Aldapa CA, Díaz-Cruz CA, Cerna-Cortes JF, Torres-Vitela Mdel R, Villarruel-López A, Rangel-Vargas E, *et al.* 2013. *Escherichia coli* O157 in ground beef from local retail markets in Pachuca, Mexico. *J Food Prot.* 76; 4: 680-684.
69. Gopinath S, Carden S, Monack D. 2012. Shedding light on *Salmonella* carriers. *Trends Microbiol.* 20; 7: 320-327.
70. Gordon GM, Clermont O, Tolley H, Denamur E. 2008. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogentic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol.* 10: 2484-2496.
71. Gorski L. 2012. Selective enrichment media bias the type of *Salmonella enterica* strains isolated from mixed strain cultures and complex enrichment broths. *PLOS One.* 7; 4: e34722.
72. Gragg SE, Loneragan GH, Nightingale KK, Brichta-Harhay DM, Ruiz H, Elder JR, *et al.* 2013. Substantial Within-Animal Diversity of *Salmonella* Isolates from Lymph Nodes, Feces, and Hides of Cattle at Slaughter. *Appl Environ Microbiol.* 79; 15: 4744-4750.



73. Grant MA, Weagant SD, Feng P. 2001. Glutamate Decarboxylase Genes as a Prescreening Marker for Detection of Pathogenic *Escherichia coli* Groups. *Appl Environ Microbiol.* 67; 7: 3110-3114.
74. Guttenplan SB, Kearns DB. 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev.* 37: 849-871.
75. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO. 2010. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals.* 4<sup>th</sup> ed. EEUU: Wiley-Blackwell.
76. Hallewell J, Niu YD, Munns K, McAllister TA, Johnson RP, Ackermann HW, *et al.* 2014. Differing populations of endemic bacteriophages in cattle shedding high and low numbers of *Escherichia coli* O157:H7 bacteria in feces. *Appl Environ Microbiol.* 80; 13: 3819-3825.
77. Hernández L. 2001. *Historia Ambiental de la Ganadería en México.* Institut de Recherche pour le Développement (IRD)-Instituto de Ecología A.C. Xalapa, Veracruz, México.
78. Hernández-San Juan S *et al.* 2007. Condiciones microbiológicas en el proceso de sacrificio en un rastro municipal del estado de Hidalgo, México. *Vet Méx.* 38; 2: 187-195.
79. Hoey DE, Sharp L, Currie C, Lingwood CA, Gally DL, Smith DG. 2003. Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity. *Cellular Microbiology.* 5; 2: 85-97.
80. Ibarra-Valencia, MA. *et al.* (2014) *Relación entre los grupos filogenéticos y las características microbianas de Escherichia coli aislada de infección de tracto urinario. Memorias del V Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud "Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamientos" 5 a 7 de Junio 2014 en Tonantzintla, Puebla, México.* [En línea]. Disponible en: [http://www-optica.inaoep.mx/tecnologia\\_salud/2014/1/memorias/Resumenes/MyT2014\\_69\\_E.pdf](http://www-optica.inaoep.mx/tecnologia_salud/2014/1/memorias/Resumenes/MyT2014_69_E.pdf). [Consultado: 11 Marzo 2015]
81. Jekel JF. 2007. *Epidemiology, Biostatistics and Preventive Medicine.* 3<sup>th</sup> ed. EEUU, Saunders, Elsevier Inc.
82. Johnson TJ, Nolan LK. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Molec Biol Rev.* 73; 4: 750-774.
83. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev.* 2: 123-140.
84. Kauffmann F. 1946. Studies on the serology of the *Escherichia coli* group. *J Bacteriol.* 51: 126.
85. Kaufmann F. 1947. The Serology of the Coli Group. *J Immunol.* 57; 1: 71-100.
86. Kobayashi M. 1999. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Trop Med Hyg.* 61; 4: 625-629.
87. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. 1996. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of the sheep. *J Clin Microbiol.* 34: 431-433.
88. Lannigan R, Hussain Z. 1993. Wound isolate of *Salmonella* Typhimurium that became chlorate resistant after exposure to Dakin's solution concomitant loss of hydrogen sulfide production, gas production, and nitrate reduction. *J Clin Microbiol.* 31; 9.

89. Lautrop H, Orskov I, Gaarslev K. 1971. Hydrogensulfide producing variants of *Escherichia coli*. Acta Pathol Microbiol Scand. B Microbiol Immunol. 79; 5: 641-650.
90. Layne P, Hu ASL, Balows A, Davis BR. 1971. Extrachromosomal nature of hydrogen sulfide production in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 106; 3: 1029-1030.
91. Lin D, Yan M, Lin S, Chen S. 2014. Increasing prevalence of hydrogen sulfide negative *Salmonella* in retail meats. Food Microbiol. 43; 1-4.
92. Liu Y, Yan X, DebRoy C, Fratamico PM, Needleman DS, Li RW, et al. 2015. *Escherichia coli* O-Antigen Gene Clusters of Serogroups O62, O68, O131, O140, O142 and O163: DNA Sequences and Similarity between O62 and O68, and PCR-Based Serogrouping. Biosensors. 5: 51-68.
93. Loneragan GH, Brashears MM. 2005. Pre-harvest interventions to reduce carriage of *E. coli* O157 by harvest-ready feedlot cattle. Meat Sci. 71; 1: 72-78.
94. Louie M, Read S, Louie L, Ziebell K, Rahn K, Borczyk A, Lior H. 1999. Molecular typing methods to investigate transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from cattle to humans. Epidemiol Infect. 123: 17-24.
95. Marler Clark Firm - Food Safety News. (2011) *Pfizer-owned E. coli Vaccine gets big push*. [En línea]. Disponible en: <http://www.foodsafetynews.com/2011/01/now-pfizer-owned-vaccine-for-o157-getting-big-push/#.VL6ohUeG-So>. [Consultado: 28 Enero 2015]
96. Marler Clark Firm - Food Poisoning Lawyers and Attorneys. (2014) *Salmonella*. [En línea]. Disponible en el sitio: [http://www.foodborneillness.com/salmonella\\_food\\_poisoning/](http://www.foodborneillness.com/salmonella_food_poisoning/). [Consultado: 28 Enero 2015]
97. Martínez-Castillo A, Muniesa M. 2014. Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 4; 46.
98. Matsumoto H, Tadakatu T. 1967. Latent H Locus in Non-Motile *Escherichia coli*. Japan J Microbiol. 11; 1: 13-23.
99. McConnell MM, Chart H, Field AM, Hibberd M, Rowe B. 1989. Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O166. J Gen Microbiol. 135; 5: 1135-1144.
100. Mc Daniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, Stelma GN. 1996. Confirmational Identification of *Escherichia coli*, a Comparison of Genotypic and Phenotypic Assays for Glutamate Decarboxylase and  $\beta$ -D-Glucuronidase. Appl Environ Microbiol. 62; 9: 3350-3354.
101. Mc Donough PL, Shin SJ, Lein DH. 2000. Diagnostic and Public Health Dilemma of Lactose-Fermenting *Salmonella* enterica Serotype Typhimurium in Cattle in the Northeastern US. J Clin Microbiol. 38; 3: 1221-6.
102. Mc Faddin JF et al. 2004. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª. ed. México: Editorial Médica Panamericana.
103. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. 1999. Food-related Illness and Death in the United States. Emerg Infect Dis. 5; 5: 607-625.

104. Miajlovic H *et al.* 2014. Response of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* to Human Serum Reveals a Protective Role for Rcs-Regulated Exopolysaccharide Colonic Acid. *Infection and Immunity*. 82; 1; 298-305.
105. Miranda JM *et al.* 2009. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Different Raw Foods in Mexico. *J Food Prot.* 72; 5: 966-971.
106. Monaghan A *et al.* 2011. Serotypes and Virulence Profiles of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Bovine Farms. *Appl Environ Microbiol.* 77; 24: 8662-8668.
107. Montenegro MA *et al.* 1990. Detection and characterization of fecal Verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J Clin Microbiol.* 28; 6: 1417-1421.
108. Narváez-Bravo CA *et al.* 2012 *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence in Cattle and on Carcasses in a Vertically Integrated Feedlot and Harvest Plant in Mexico. *J Food Prot.* 76; 5: 786-795.
109. Nastasijevic I, Mitrovic R, Buncic S. 2009. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science*. 82: 101-102.
110. National Institute of Allergy and Infectious Diseases NIAID. (2014) *Salmonellosis*. [En línea]. Disponible en: <http://www.niaid.nih.gov/topics/salmonellosis/pages/default.aspx>. [Consultado: 27 Octubre 2014]
111. Navarro A, Eslava C, García de la Torre G, León LA, Licona D, León L. 2007. Common epitopes in LPS of different *Enterobacteriaceae* are associated with an immune response against *Escherichia coli* O157 in bovine serum samples. *J Medical Microbiol.* 56: 1447-1454.
112. Naylor SW, Gally DL, Low JC. 2005. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. *Review. International J Med Microbiol.* 295: 419-441.
113. NOM-194-SSA1-2004 (Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos).
114. Nutrition Physiology Company NPC. (2015) Bovamine Defender, The Proven Probiotic. [En línea]. Disponible en: <http://www.bovamine.com/feedlot-cattle/>. [Consultado: 06 Noviembre 2014]
115. Olitzky I, Rosenthal MH, Copeland JR. 1956. Family infection with multiple *Salmonella* types including two H<sub>2</sub>S negative variants. *J Bacteriol.* 72; 4: 569-70.
116. Oliveira MG, Brito JR, Gomes TA, Guth BE, Vieira MA, Naves ZV, *et al.* 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. *Int J Food Microbiol.* 127; 1-2: 139-146.
117. Oot RA, Raya RR, Callaway TR, Edrington TS, Kutter EM, Brabban AD. 2007. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 infecting bacteriophages in feedlot cattle faeces. *Lett Applied Microbiol.* 45: 445-453.
118. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs OMAFRA. (2010) *Typical Beef Feedlot and Background Diets. Fact Sheet*. [En línea]. Disponible

- en: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/beef/facts/06-017.htm>. [Consultado: 28 Febrero 2015]
119. Organización Mundial de la Salud OMS. (2000) *Resolución WHA53.15 OMS*. [En línea]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/WHA53.15\\_sp.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/WHA53.15_sp.pdf). [Consultado: 14 Junio 2014]
120. Organización Mundial de la Salud OMS. (2002) *Estrategia global de la OMS para la Inocuidad de los Alimentos*. [En línea]. Disponible en: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2002/9243545744.pdf>. [Consultado: 14 Junio 2014]
121. Organización Mundial de la Salud OMS. (2008) *WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases*. [En línea]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/FERG2\\_report.pdf](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/FERG2_report.pdf). [Consultado: 14 Junio 2014]
122. Organización Mundial de la Salud OMS. (2013) *Strategic Plan for Food Safety Including Foodborne Zoonoses, 2013-2022*. [En línea]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/101542/1/9789241506281\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/101542/1/9789241506281_eng.pdf). [Consultado: 24 Noviembre 2014]
123. Organización Mundial de la Salud OMS. (2013b) *Salmonella no tifoidea*. [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>. [Consultado: 28 Enero 2015]
124. Organización Mundial de la Salud OMS. (2014) *Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014*. [En línea]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO\\_HIS\\_HSI\\_14.1\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO_HIS_HSI_14.1_spa.pdf). [Consultado: 28 Enero 2015]
125. Organización Mundial de la Salud OMS. (2014b) *Code of Federal Regulations. Title 9 Animals and Animal Products (CFR 9)*. [En línea]. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO\\_HIS\\_HSI\\_14.1\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112817/1/WHO_HIS_HSI_14.1_spa.pdf). [Consultado: 28 Enero 2015]
126. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO. (2004) *Good Practices for the Meat Industries. Manual FAO Animal Production and Health*. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5454e.pdf>. [Consultado: 28 Enero 2015]
127. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO-ONU. (2005) *Codex Alimentarius. Código de Prácticas de Higiene para la Carne (CAC/RCP 58/2005)*. [En línea]. Disponible en: [www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP\\_058s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_058s.pdf). [Consultado: 28 enero 2015]
128. Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K Antigens of *E. coli*. *Bacteriol Rev.* 41; 3: 667-710.
129. Orskov F, Orskov I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. En: *Methods in Microbiology*. Academic Press: London.

130. Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, Blanco J, Viñas MR, Blanco M, *et al.* 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol.* 16; 8: 757-762.
131. Pérez-Montaño JA *et al.* 2012. Frequency and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serotypes on Beef Carcasses at Small Abattoirs in Jalisco State, Mexico. *J Food Prot.* 75; 5: 867-873.
132. Peruski LF Jr, Kay BA, El-Yazeed RA, El-Etr SH, Cravioto A, Wierzba TF, *et al.* 1999. Phenotypic Diversity of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains from a Community-Based Study of Pediatric Diarrhea in Periurban Egypt. *J Clin Microbiol.* 37; 9.
133. Peters TM. 2009. Pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiology of food pathogens. *Methods Mol. Biol.* 551: 59-70.
134. Quinn PJ *et al.* 1999. *Clinical Veterinary Microbiology.* Mosby, London, UK.
135. Rahn *et al.* 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molec Cell Probes;* 6: 271-279.
136. Regua-Mangia AH, Guth BC, da Costa Andrade JR, Irino K, Pacheco AB, Ferreira LC, *et al.* 2004. Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 40; 2: 155-162.
137. Rhoades JR, Duffy G, Koutsomanis K. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiol.* 26: 357-376.
138. Rice EW, Sowers EG, Johnson CH, Dunnigan ME, Strockbine NA, Edberg SC. 1992. Serological Cross-Reactions between *Escherichia coli* O157 and Other Species of the Genus *Escherichia*. *J Clin Microbiol.* 30; 5: 1315-1316.
139. Rigby CE, Pettit JR. 1978. Some factors affecting *Salmonella* Typhimurium infection and shedding in chickens raised on litter. *Avian Dis.* 23; 2: 442-455.
140. Rostagno MH, Gailey JK, Hurd HS, Mckean JD, Leite RC. 2005. Culture methods differ on the isolation of *Salmonella enterica* serotypes from naturally contaminated swine fecal samples. *J Vet Diagn Invest.* 17: 80-83.
141. Ruby JR, Ingham SC. 2009. Use of *Enterobacteriaceae* Analysis Results for Predicting Absence of *Salmonella* Serovars on Beef Carcasses. *J Food Prot.* 72; 2: 260-266.
142. Russell JB, Diez-Gonzalez F, Jarvis GN. 2000. Potential effect of cattle diets on the transmission of pathogenic *Escherichia coli* to humans. *Microbes and Infection,* 2, 45-53.
143. Sasaki T, Kobayashi M, Agui N. 2000. Epidemiological Potential Excretion and Regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the Dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 in Food. *J Medical Entomology.* 37; 6: 945-949.
144. Scheutz F *et al.* 2004. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS.* 112; 9: 569-584.

145. Scheutz F, Strockbirne NA. 2005. Genus 1. *Escherichia*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2a ed. Vol 2. Springer and Bergey's Manual Trust, Michigan, EEUU: 607-623.
146. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) SAGARPA. (2014). Población Ganadera. [En línea]. Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/Bovinos\\_carne.pdf](http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/Bovinos_carne.pdf) [Consultado: 13 Abril 2015]
147. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA. (2014b) *Atlas Agroalimentario 2013*. [En línea]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/atlas2013/index.html>. [Consultado: 27 Octubre 2014]
148. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA. (2014c) *Capacidad instalada para sacrificio de especies pecuarias*. [En línea]. Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/opt/estadistica/pecuaria/int\\_rastros2014.pdf](http://www.siap.gob.mx/opt/estadistica/pecuaria/int_rastros2014.pdf). [Consultado: 27 Octubre 2014]
149. Singer RS *et al.* 2009. Do the microbial interactions and cultivation media decrease the accuracy of *Salmonella* Surveillance Systems and outbreak investigations? J Food Prot. 4: 707-713.
150. Siragusa GR *et al.* 1998. The incidence of *Escherichia coli* on beef carcasses and its association with aerobic mesophilic plate count categories during the slaughter process. J Food Prot. 61; 10: 1269-1274.
151. Smith, D. (2005) *Project Summary: Determination of a Sodium chlorate dose that results in safe concentrations of tissue residues in beef cattle*. [En línea]. Disponible en: [http://www.beefissuesquarterly.com/CMDocs/BeefResearch/Safety\\_Project\\_Summaries/FY04\\_Determination\\_of\\_a\\_sodium\\_chlorate\\_dose.pdf](http://www.beefissuesquarterly.com/CMDocs/BeefResearch/Safety_Project_Summaries/FY04_Determination_of_a_sodium_chlorate_dose.pdf). [Consultado: 11 Marzo 2015]
152. Sperandio V *et al.* 2003. Bacteria-host Communication: The Language of Hormones. Proc Nat Acad Sci USA, 100: 8951-8956.
153. Stephan R, Ragettli S, Untermann F. 2000. Prevalence and characteristics of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in stool samples from asymptomatic human carriers working in the meat processing industry in Switzerland. J Appl Microbiol. 88, 335-341.
154. Stuart FA, Corbel MJ. 1982. Identification of a serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157. Veterinary Record. 110; 9: 202-203
155. Sutherland IW. 1969. Structural Studies on Colanic Acid, the Common Exopolysaccharide Found in the *Enterobacteriaceae*, by Partial Acid Hydrolysis. Biochem J. 115: 935-945.
156. Tchaptchet S *et al.* 2013. Inflammation-induced Acid Tolerance Genes *gadAB* in Luminal Commensal *Escherichia coli* Attenuate Experimental Colitis. Infect Immunity. 81; 10.
157. The Public Health and Safety Organization NSF. (2014) *Food Safety is a Shared Responsibility*. [En línea] 2014 Julio 31. Disponible en: <http://www.nsf.org/newsroom/food-safety-is-a-shared-responsibility>. [Consultado: 28 Enero 2015]

158. The *Salmonella* Subcommittee of the Nomenclature of the International Society of Microbiology SSNISM. 1934. The Genus *Salmonella* Lignières 1900. Journal of Hygiene (London). 34; 3: 333-350.
159. Tornieporth NG, John J, Salgado K, de Jesus P, Latham E, Melo MC, *et al.* 1995. Differentiation of Pathogenic *Escherichia coli* Strains in Brazilian Children by PCR. J Clin Microbiol. 33; 5: 1371-1374.
160. Torres, AG. (2010) *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. [En línea] Texas: Bentham eBooks. Disponible en: [http://books.google.com/books/about/Pathogenic\\_Escherichia\\_Coli\\_in\\_Latin\\_Ame.html?id=651HFhtY748C](http://books.google.com/books/about/Pathogenic_Escherichia_Coli_in_Latin_Ame.html?id=651HFhtY748C). [Consultado; 28 Enero 2015]
161. University of Nebraska-Lincoln UNL Food. (2014) *Salmonella*. [En línea]. Disponible en el sitio: <http://food.unl.edu/safety/salmonella>. [Consultado: 28 Enero 2015]
162. United States Department of Agriculture- Food Safety and Inspection Service USDA -FSIS. (1998) *Nationwide Sponge Microbiological Baseline Data Collection Program: Cattle (Report June 1997- May 1998)*. [En línea]. Disponible en: [http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/197ddb9c-1fa5-411e-ab3f-3d253c879370/Baseline\\_Data\\_Cattle.pdf?MOD=AJPERES](http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/197ddb9c-1fa5-411e-ab3f-3d253c879370/Baseline_Data_Cattle.pdf?MOD=AJPERES). [Consultado: Septiembre 2013].
163. Van Immerseel F, De Buck J, Pasmans F, Bohez L, Boyen F, Haesebrouck F, Ducatelle R. 2004. Intermittent Long-Term Shedding and Induction of Carrier Birds After Infection of Chickens Early Posthatch with a Low or High Dose of *Salmonella* Enteritidis. Poultry Science 83: 1911-1916.
164. Varela-Hernández JJ, Cabrera-Díaz E, Cardona-López MA, Ibarra-Velázquez LM, Rangel-Villalobos H, Castillo A, *et al.* 2006. Isolation and characterization of Shiga Toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. Int J Food Microbiol. 113; 2: 237-241.
165. Varela-Guerrero JA *et al.* 2013. Phenotypic-genotypic resistance in *Salmonella* spp. isolated from cattle carcasses from the north central zone of the State of Mexico. Trop Anim Health Prod. 45; 4: 995-1000.
166. Viljoen GJ, Nel LH, Crowther JR. 2005. Molecular Diagnostic PCR. Springer. Dordrecht, Países Bajos.
167. Vogelsang TM, Johs B. 1948. Temporary and chronic carriers of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi B. J Hyg. 46; 3; 252-261.
168. Wang L, Rothmund D, Curd H, Reeves PR. 2003. Species-Wide Variation in the *Escherichia coli* Flagellin (H-Antigen) Gene. J Bacteriol. 185; 9: 2936-2943.
169. Washington JA II, Timm JA. 1976. Unclassified, citrate-positive member of the *Enterobacteriaceae* resembling *Escherichia coli*. J Clin Microbiology. 4; 2: 165-167.
170. Weill FX, Grimont PAD. 2007. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. 9a ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur; Paris, France.

171. Whitfield C, Roberts IS. 1999. Structure, Assembly and Regulation of Expression of Capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 31; 5: 1307-1319.
172. Whitfield C, Paiment A. 2003. Byosynthesis and Assembly of Group 1 Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli* and Related Extracellular Polysaccharides in Other Bacteria. *Carbohydrate Research.* 338; 2493-2502.
173. Williams Smith H, Tucker JF. 1980. The virulence of *Salmonella* strains for chickens: their excretion by infected chickens. *J Hyg Camb.* 84: 479.
174. Wilson WJ. 1948. The Production of H<sub>2</sub>S-negative strains of *Salmonella*. *J Hyg (Lond);* 46; 1: 70-3.
175. Wolf MK. 1997. Occurrence, distribution and associations of H and O serogroups, CFAs, and toxins of ETEC, *Clin Microb Rev.* 10: 4:569.
176. Wray C, Sojka W. 1981. *Salmonella* Dublin infection of calves: use of small doses to simulate natural infection on the farm. *J Hyg (Lond.);* 87, 9.
177. Yi S, Xie J, Liu N, Li P, Xu X, Li H, *et al.* 2014. Emergence and prevalence of non H<sub>2</sub>S-producing *Salmonella* enterica serovar Seftenberg isolates belonging to novel Sequence Type 1751 in China. *J Clin Microbiol.* 52; 7: 2557-2565.
178. Zaidi M, McDermott PF, Fedorka-Cray P, Leon V, Canche C, Hubert SK, *et al.* 2006. Nontyphoidal *Salmonella* from Human Clinical Cases, Asymptomatic Children, and Raw Retail Meats in Yucatán, México. *Clin Infect Dis.* 42: 1: 21-18.
179. Zaidi MB, López Macías C, Calva E. 2006. Estudios mexicanos sobre *Salmonella*: epidemiología, vacunas y biología molecular. *Rev Lat Microbiol.* 48. 2: 121-125.
180. Zaidi MB, Calva JJ, Estrada-Garcia MT, Leon V, Vazquez G, Figueroa G MB, *et al.* 2008. Integrated Food Chain Surveillance System for *Salmonella* spp. in Mexico. *Emerg Infect Dis.* 14; 3 : 429-435.
181. Zaidi MB1, Campos FD, Estrada-García T, Gutierrez F, León M, Chim R, *et al.* 2012. Burden and Transmission of Zoonotic Foodborne Disease in a Rural Community in Mexico. *Clin Infect Dis.* 55; 1: 51-60.