

Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa

Microbiological quality of beef sold in the municipal market of Culiacan, Sinaloa

Maribel Jiménez Edeza* Cristóbal Chaidez Quiroz** Josefina León Félix**

Abstract

The microbiological quality of raw meat was evaluated in 18 retail units of the municipal market in Culiacan, Sinaloa. The levels of *E. coli* were measured using methods from the Bacteriological Analytical Manual, and the O157 serogroup and the H7 antigen were also evaluated using chromogenic media and PCR, respectively. The results were confirmed using real time-PCR (PCR-TR) and PCR to detect virulence genes (*vt1*, *vt2*, *eaeA* and *hlyA*). Of the samples tested, 31.5% were positive for *E. coli*, with concentrations between 100 and 700 CFU/g of beef. Nine suspected *E. coli* O157:H7 strains were isolated from 16 samples, which were then discarded by the PCR-TR test. The virulence genes were not detected. The microbial contamination of beef could indicate the presence of pathogens from fecal sources. To guarantee the quality of these products, it is important to incorporate food safety programs.

Key words: FOOD SAFETY, NOM-194-SSA1-2004, BEEF.

Resumen

Se evaluó la calidad microbiológica de carne de res en 18 comercios del mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. Para determinar *E. coli* se usó la metodología del Manual Bacteriológico Analítico, y para evaluar el serogrupo O157 y antígeno H7, se usaron medios cromogénicos y PCR, respectivamente. La confirmación se hizo por PCR tiempo real (PCR-TR) y la detección de genes de virulencia (*vt1*, *vt2*, *eaeA* y *hlyA*), por PCR. El 31.5% de muestras resultaron positivas para *E. coli*, con concentraciones entre 100 y 700 UFC/g. Se aislaron nueve cepas presuntivas de *E. coli* O157:H7 de 16 muestras, las cuales fueron descartadas con la técnica PCR-TR. No se detectaron genes de virulencia. La contaminación microbiana de la carne de res podría indicar la presencia de patógenos provenientes de fuentes fecales. Por ello es importante incorporar programas de inocuidad para garantizar la calidad de estos productos.

Palabras clave: INOCUIDAD ALIMENTARIA, NOM-194-SSA1-2004, CARNE DE RES.

Recibido el 13 de enero del 2012 y aceptado el 9 de noviembre de 2012.

*Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Josefa Ortiz de Domínguez y Blvd. de las Américas S/N, Ciudad Universitaria, 80013, Culiacán, Sinaloa, México.

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos. Carretera a Eldorado Km 5.5 Campo El Diez, 80129, Culiacán, Sinaloa, México.

Responsable de correspondencia: Josefina León-Félix, Teléfono: (667) 7605536, extensión 236, correo electrónico: ljosefina@ciad.mx

Introduction

Foodborne diseases (FBD) constitute a major public health problem worldwide. Their incidence is related to deficiencies in hygiene, the sanitation of food during processing, and the use of contaminated raw materials.¹ Bovine meat products may be contaminated at any stage of processing; because cattle are a natural reservoir of intestinal microbiota and human pathogens, their feces are a significant source of microorganisms.^{2,3} Therefore, fresh meat may be contaminated in the slaughterhouse at the time of sacrifice, leaving pathogens on the surface of the meat that are able to penetrate into the muscle tissue with the use of a utensil.⁴ NOM-194-SSA1-2004 is the only tool available to verify the safety of beef in Mexico and is limited to measuring *E. coli* as an indicator organism of fecal contamination, with a permissible limit of 1000 CFU/g in refrigerated meat and 5000 CFU/g in ground beef. NOM-194-SSA1-2004 also specifies the absence of *Salmonella* in 25 g of meat.⁵ However, a group of enteropathogenic *E. coli* strains responsible for a large number of gastrointestinal infections has been reported,⁶ wherein the O157:H7 serotype of *E. coli* is considered to be one of the major pathogens associated with outbreaks from the consumption of contaminated meat. This pathogen has been observed mainly among rural populations in the United States of America and Scotland and in countries with very clear seasonal patterns, such as Australia.⁷ It has been established that beef provides a highly nutritious environment for contaminant microflora and can sustain its persistence and growth.⁸

Escherichia coli O157:H7 belongs to the group of enterohemorrhagic bacteria capable of producing the toxins that cause hemorrhagic colitis. The toxic infection is characterized by abdominal pain, watery diarrhea with blood, and little or no fever. Some infected people (especially children) can develop hemolytic uremic syndrome (HUS), a serious disease characterized by kidney failure and temporary anemia.⁹ In Mexico, there are no records of HUS cases associated with infection by *E. coli* O157:H7, a situation that has not yet been explained.¹⁰ Moreover, the Single Information System for Epidemiological Surveillance considers infections by this pathogen using ill-defined intestinal criteria, without determining the specifics regarding the identity of the organism.¹¹ The low infectious dose of this pathogen (10-100 CFU) makes it a public health risk.¹² Although most meat products need to be properly cooked before consumption, the presence of *E. coli* O157:H7 in meat puts consumers at risk because this pathogen can persist due to deficiencies or preferences in cooking.¹³ In addition, cross-contamination can occur from hands, utensils,

Introducción

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) constituyen uno de los principales problemas de Salud Pública en el mundo. La incidencia de éstas se relaciona con deficiencias higiénico-sanitarias de los alimentos durante su procesamiento, o por el uso de materia prima contaminada.¹ Los productos cárnicos de origen vacuno pueden contaminarse en cualquiera de las etapas de procesamiento, ya que este tipo de ganado es un reservorio natural de microbiota intestinal y patógenos para el humano, por lo que sus heces son fuente significativa de microorganismos.^{2,3} Así, la carne fresca puede resultar contaminada en el ambiente del rastro al momento del sacrificio, por lo que los agentes patógenos pueden permanecer en la superficie de la carne o penetrar con algún utensilio en el tejido muscular.⁴ La NOM-194-SSA1-2004 es el único instrumento para verificar la inocuidad de la carne bovina en México, y se limita a inspeccionar *E. coli* como microorganismo indicador de contaminación fecal, con un límite permisible de 1000 UFC/g en carne refrigerada y 5000 UFC/g en carne molida; además, especifica la ausencia de *Salmonella* en 25g de carne.⁵ Sin embargo, se ha descrito un grupo de cepas de *E. coli* enteropatógenas, que son responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales,⁶ en el que el serotipo de *E. coli* O157:H7 es considerado como uno de los principales patógenos relacionados con brotes por el consumo de carne contaminada, principalmente en poblaciones rurales de Estados Unidos de América y Escocia, y en países con patrones estacionales muy claros, como Australia.⁷ Actualmente se establece que la carne de res ofrece un ambiente altamente nutritivo a la microflora contaminante, pudiendo satisfacer las necesidades básicas para su persistencia y crecimiento.⁸

Escherichia coli O157:H7 pertenece al grupo de bacterias enterohemorrágicas productoras de toxinas que ocasionan colitis hemorrágica. La toxi-infección se caracteriza por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre. Algunas personas infectadas (sobre todo cuando ocurre en los niños) pueden desarrollar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una enfermedad grave en humanos, caracterizada por insuficiencia renal y anemia temporal.⁹ En México, no existen registros que asocien los casos de SUH con infecciones por *E. coli* O157:H7, situación que aún no se ha explicado.¹⁰ Por otra parte, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica considera las infecciones por este patógeno dentro de las afecciones intestinales mal definidas, sin precisar información sobre la incidencia del microorganismo.¹¹ La baja dosis infectiva de este agente patógeno (10-100

and surfaces to products that will not be sufficiently heated before consumption.¹⁴ For the above reasons, the aim of this study was to detect and quantify the presence of *Escherichia coli* in beef that is sold in the municipal market of Culiacan, Sinaloa as a measure of its microbiological quality according to the official Mexican guideline NOM-194-SSA1-2004 and to characterize the isolates through the detection of virulence genes and the presence of the pathogenic O157:H7 serotype of *E. coli* to determine whether beef poses a health risk for consumers.

Materials and methods

Sampling

Eighteen of the 36 retail units engaged in meat trade in the municipal market of Culiacan were selected. The selections were made according to the total local distribution to obtain a representative sample of the entire market (Figure 1). The meat samples were collected over two sampling periods, in July (summer) and October (fall) 2008. During each period, three samples were taken from each selected business location, with a between-sample interval of four days. Therefore, 108 samples were obtained for analysis. The meat was handled by the vendor and placed in commercial plastic bags by each retail unit. The samples were placed in cold storage for shipment to the Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Culiacan, Sinaloa, and processed over a period no longer than 4 h.

Presence and quantification of *E. coli*

The methodology proposed in the Bacteriological Analytical Manual (BAM) was used.¹⁵ Twenty-five grams of meat were weighed and placed in a sterile bag with a tight seal. Next, 225 ml of 1% peptone* was added and stirred vigorously for 5 min to release the microorganisms from the meat matrix into the culture broth. Finally, 0.1 ml of the culture broth was removed and inoculated on ECC* chromogenic agar using the spread plate technique. The plates were incubated for 24 h at 45 °C. Quantification of *E. coli* was performed based on the appearance of medium sized colonies (2-3 mm diameter) with blue coloration, as described by the manufacturer of the medium. For each experiment, *E. coli* O157:H7 CECT 4076 was tested as a positive control to evaluate the effectiveness of the technique; a negative control (sterile distilled water) was used to verify the absence of cross-contamination during the procedure.

UFC) lo convierte en un riesgo de relevancia para la salud pública.¹² Aunque la mayoría de los productos cárnicos deben estar adecuadamente cocinados antes de su consumo, la presencia de *E. coli* O157: H7 en la carne pone a los consumidores en situación de riesgo, ya que este patógeno puede persistir por deficiencias o preferencias de cocción.¹³ Además, puede ocurrir una contaminación cruzada de manos, utensilios o superficies a productos que no recibirán tratamientos térmicos antes de su consumo.¹⁴ Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue detectar y cuantificar la presencia de *Escherichia coli* en carne de res que se comercializa en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa, como parámetro de calidad microbiológica según la Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, así como caracterizar los aislamientos por detección de genes de virulencia y presencia del serotipo patógeno *E. coli* O157:H7, para determinar si la carne de res representa un factor de riesgo para la salud de los consumidores de este tipo de productos.

Material y métodos

Toma de muestras

Se seleccionaron 18 de los 36 locales que se dedican al comercio de carne en el mercado municipal de Culiacán; la selección se hizo de acuerdo con la distribución total de los locales, con el fin de obtener muestras representativas de todo el mercado (Figura 1). Las muestras de carne se recolectaron en dos periodos de muestreo, en julio (verano) y octubre (otoño) de 2008, respectivamente. En cada periodo se tomaron tres muestras de cada local comercial seleccionado, con una frecuencia de cuatro días. Así, se obtuvieron 108 muestras para analizar. La carne fue manipulada por el vendedor y depositada en una bolsa plástica de manejo comercial por cada local. Posteriormente, las muestras se colocaron en un depósito frío para su traslado al Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Culiacán, y se procesaron en un plazo no mayor de 4 h.

Presencia y cuantificación de *E. coli*

Se utilizó la metodología propuesta en el Manual Bacteriológico Analítico (BAM, siglas en inglés).¹⁵ Se pesaron 25 g de la muestra de carne y se depositaron en una bolsa estéril con cierre hermético; se agregaron 225 ml de agua de peptona al 1%* y se agitó vigorosamente durante 5 min para liberar los microorganismos de la

*BD Difco ®, Estados Unidos de América.

Isolation of *E. coli* O157 strains

Twenty-five grams of meat were weighed in a sterile bag, and 225 ml of *E. coli* selective broth was added, which was supplemented with the antibiotic Novobiocin (n) (MEC+n)** at a concentration of 20 µg/ml. The culture was shaken vigorously for 5 min and incubated at 37°C for 24 h. After this time, a portion was taken from the culture broth with a sterile platinum loop and inoculated in the cross groove of chromogenic agar BBL O157,* which was supplemented with potassium tellurite to a concentration of 2.5 mg/l. The plates were incubated at 37°C for 24 h; the typical *E. coli* O157 serotype colonies were then selected (mauve or lilac colonies, as specified by the manufacturer) and purified by successive passes on chromogenic agar. Presumptive strains were grown in tryptic soy broth (TSB) and stored in 40% glycerol in triplicate at -20°C for confirmation using the analyses described below.

Detection of the *fliCH7* gene using polymerase chain reaction (PCR)

For this process, the methodology proposed by Cagney *et al.* was used.¹⁶ DNA from each presumptive strain was obtained by cell lysis of 1.5 ml of bacteria deposited in an Eppendorf tube and subjected to heat shock at 100°C for 1 min, followed by cooling on ice. The PCR reaction mixture consisted of 50 µl, of which 5 µl was bacterial DNA. A pair of primers was used to detect the gene encoding the flagellar antigen *fliCH7* (Table 1) at a concentration of 25 µM mixed with 10X magnesium-free PCR amplification buffer,* 3 mM MgCl₂, 100 µM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dTTP, and dCTP), and sterile nanopure water to complete the reaction volume of 50 µl. Amplification was carried out in a gradient-capable thermal cycler** with an initial cycle of 2 min at 94°C; 35 cycles of 20 s at 94°C for denaturation, 1 min at 57°C for hybridization, and 1 min at 72 °C for extension; and a final cycle of extension at 72°C for 10 min. Finally, the reaction was stabilized at 4°C. The PCR products were separated on a 1% (w/v) agarose gel with 1X TAE buffer** at 70 V and stained using ethidium bromide (0.33 mg/ml). The obtained fragments were visualized on a UV transilluminator, and the presence of the flagellar antigen gene was determined by the presence of a band of the expected molecular size (Table 1).

Detection of virulence genes using multiplex PCR (M-PCR)

The detection of virulence genes also used the methodology proposed by Cagney *et al.*¹⁶ The PCR re-

matriz cárnica hacia el caldo de cultivo. Finalmente se tomó 0.1 ml del caldo de cultivo y se inoculó en agar cromogénico ECC* utilizando la técnica de extensión en placa. Las placas se incubaron por 24 h a 45°C, finalmente se realizó la cuantificación de *E. coli* con base en la aparición de colonias medianas (2-3 mm de diámetro) con coloración azul, tal como la describe el fabricante del medio de cultivo. Para cada ensayo se empleó un testigo positivo de *E. coli* O157:H7 CECT 4076, para evaluar la eficacia de la técnica utilizada; además, se utilizó un testigo blanco (agua destilada estéril) para determinar posibles fuentes de contaminación cruzada durante el procedimiento.

Aislamiento de cepas *E. coli* O157

Se pesaron 25 g de la muestra de carne en una bolsa estéril y se le adicionaron 225 ml del caldo selectivo *E. coli*, el cual fue modificado con el antibiótico Novobiocina (n) (mEC+n)** a una concentración de 20 µg/ml. El cultivo se agitó vigorosamente durante 5 min y se incubó a 37°C por 24 h. Transcurrido este tiempo, se tomó una porción del caldo de cultivo con un asa de platino estéril y se inoculó por estría cruzada en el agar cromogénico BBL O157,* el cual se complementó con telurito de potasio a una concentración de 2.5 mg/L. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h; posteriormente se seleccionaron colonias típicas del serotipo *E. coli* O157 (colonias color malva o lila, según el fabricante) y se purificaron por pases sucesivos sobre el mismo agar cromogénico. Las cepas presuntivas se cultivaron en caldo de soya y tripticaseína (TSB, siglas en inglés) y se almacenaron en glicerol al 40% por triplicado a -20°C para su confirmación según los análisis descritos a continuación.

Detección del gen *fliCH7* por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para este proceso, se utilizó la metodología propuesta por Cagney *et al.*¹⁶ La obtención del ADN de cada cepa presuntiva se llevó a cabo por lisis celular de 1.5 ml de cultivo bacteriano depositados en un tubo eppendorf y llevado a choque térmico de agua a 100° C por 1 min, seguido por enfriamiento en hielo. La mezcla de reacción de PCR fue de 50 µl, de los cuales 5 µl fueron de ADN bacteriano. Se utilizó un par de iniciadores para la detección del gen que codifica el antígeno flagelar *fliCH7* (Cuadro 1) a una concentración de 25 µM mezclados con el amortiguador de amplificación para PCR

*CHROMagar®, Francia.

**BD Difco®, Estados Unidos de América.

action mixture volume was 50 µl, of which 10 µl was DNA obtained by bacterial cell lysis (described above). Four primer pairs (Table 1) were used at the following concentrations: *vt1*, 10 µM; *vt2*, 10 µM; *eaeA*, 12.5 µM; and *hlyA*, 25 µM. For the PCR amplification, the following reagents were used: 1X magnesium-free buffer,* 2 mM MgCl₂, 100 µM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dTTP, and dCTP), and sterile nanopure water to complete the specified volume of the reaction. Amplification was carried out in a gradient thermal cycler** with an initial cycle of 2 min at 94°C; 35 cycles of 20 s at 94°C for denaturation, 1 min at 57°C for hybridization, and 1 min at 72°C for extension; and a final extension cycle at 72°C for 10 min. The reaction was then stabilized at 4°C. The PCR products were separated on 2% (w/v) agarose gels in TAE 1X buffer* at 70 V and stained using ethidium bromide (0.33 mg/ml). The fragments obtained were visualized on a UV transilluminator and the presence of virulence genes was determined by the presence of bands of the expected molecular sizes (Table 1).

Confirmation of *E. coli* O157:H7 by real-time PCR (RT-PCR)

For confirmation using real time PCR, the Applied Biosystems TaqMan® for *E. coli* O157:H7 commercial detection system was used in a MiniOpticon thermocycler.* The RT-PCR reaction mixture consisted of 15 µl of EMM Master Mix, 3 µl of TAM target mixture (both included in the detection system), and 12 µl of DNA obtained using bacterial lysis (described above). The amplification consisted of one cycle for activation of the Taq DNA polymerase enzyme at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s for denaturation and 60°C for 1 min for annealing and extension. The interpretation of the results was carried out using the Opticon Monitor 3 software, with the cycle threshold #14 obtained by the positive control as the reference, in accordance with the two fluorochromes: FAM (specific signal for the target sequence) and VIC (specific signal for the internal control).

Results

Presence and quantification of *E. coli*

E. coli was detected in 31.5% (34/108) of the meat samples analyzed and in 72.2% (13/18) of the selected retail units, the microorganism was identified in at least one sample. The highest incidence of *E. coli* in beef occurred during the summer period, with 48.1% (26/54) positive samples, whereas in the fall, only 14.8% (8/54) of the samples were contaminated.

10X libre de magnesio,* 3 mM de MgCl₂, 100 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) y agua nanopura estéril hasta completar el volumen de reacción indicado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de gradiente** con un ciclo inicial de 2 min a 94°C y 35 ciclos de 20 s a 94°C para desnaturalización, 1 min a 57°C para hibridación, 1 min a 72°C para extensión, y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Finalmente, la reacción se estabilizó a 4°C. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 1 % (p/v) con amortiguador TAE 1X** a 70 V y se tiñeron con bromuro de etidio (0.33 mg/ml). Los fragmentos obtenidos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se determinó la presencia del gen para el antígeno flagelar según el tamaño molecular esperado (Cuadro 1).

Detección de genes de virulencia por PCR múltiple (PCR-M)

Para la detección de genes de virulencia se utilizó también la metodología propuesta por Cagney *et al.*¹⁶ La mezcla de reacción de PCR fue de 50 µl, de los cuales 10 µl fueron de ADN bacteriano obtenido por lisis celular (descrito anteriormente). Se utilizaron cuatro pares de iniciadores (Cuadro 1), de los cuales la concentración del *vt1* fue de 10 µM, de *vt2* 10 µM, de *eaeA* 12.5 µM y de *hlyA* 25 µM. Se usó un amortiguador de amplificación para PCR 1X libre de magnesio,* 2 mM de MgCl₂, 100 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) y agua nano pura estéril hasta completar el volumen de reacción indicado. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de gradiente** con un ciclo inicial de 2 min a 94°C y 35 ciclos de 20 s a 94°C para desnaturalización, 1 min a 57°C para hibridación, 1 min a 72°C para extensión y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min; finalmente, la reacción se estabilizó a 4°C. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2 % (p/v) con amortiguador TAE 1X* a 70 V y se tiñeron con bromuro de etidio (0.33 mg/ml). Los fragmentos obtenidos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se determinó la presencia de genes de virulencia según el tamaño molecular esperado (Cuadro 1).

Confirmación de *E. coli* O157:H7 por PCR en tiempo real (PCR-TR)

Para la confirmación por PCR en tiempo real se utilizó el sistema de detección comercial de Applied Biosystems TaqMan® para *E. coli* O157:H7 en un termoci-

*Promega®, Estados Unidos de América.

**Eppendorf, Estados Unidos de América.

CUADRO 1

Detalles de los iniciadores utilizados para la PCR

Details of the primers used for PCR

Primer	Sequence of bases 5'-3'	Amplicon ^c	Virulence factor
<i>vt1</i> ^a <i>vt1</i> ^b	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC AGAACGCCCACTGAGATCATC	180	Shiga toxin 1
<i>vt2</i> ^a <i>vt2</i> ^b	GGCACTGTCTGAACTGCTCC TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	225	Shiga toxin 2
<i>eaeA</i> ^a <i>eaeA</i> ^b	GACCCGGCACAAGCATAAGC CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384	Intimin
<i>hlyA</i> ^a <i>hlyA</i> ^b	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534	Hemolysin
<i>fliCh7</i> ^a <i>fliCh7</i> ^b	GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC CAAC GGTGACTTTATCGCCATTCC	625	Flagellar antigen H7

^a Sense^b Antisense^c Base pairs

The levels of contamination by *E. coli* ranged from 100 to 700 CFU/g of beef evaluated. Only three samples showed the highest concentration of bacteria (700 CFU/g); these samples corresponded to three locations (9, 12, and 30) but were collected during the summer and on the same sampling date (M2). The retail units 15 and 32 were contaminated only once and at lower contamination levels (100 CFU/g) (Table 2).

Isolation of *E. coli* O157 strains

Twenty-eight strains of *E. coli* O157 were isolated from 47% (13/34) of the meat samples that tested positive for generic *E. coli*. Fifty percent (9/18) of the selected retail units showed contamination by this bacterium. During the summer, this bacterium was detected in nine of the selected retail units, whereas only two units exhibited this type of contamination in the fall. The highest incidence of contaminated meat was observed during the summer period, with 81.3% (13/16) of the contaminated samples. The majority of isolates were also detected during the summer, with 64.3% (18/28) of the total strains obtained. Only retail units 5 and 22 were contaminated with *E. coli* O157 during both sampling cycles (Table 3).

Confirmation of the H7 flagellar antigen by PCR

The strains isolated were subjected to PCR analysis to detect the presence of the *fliCH7* gene encoding the flagellar H7 antigen. The results of this test revealed the

clador de sistema MiniOpticon.* La mezcla de reacción de PCR-TR consistió en 15 µl de mezcla maestra EMM, 3 µl de mezcla blanco TAM (ambas incluidas en el sistema de detección) y 12 µl de ADN bacteriano obtenido por lisis (proceso descrito anteriormente). La amplificación consistió en un ciclo para la activación de la enzima Taq ADN polimerasa de 95° C por 10 min seguida de 45 ciclos de 95° C por 15 s para desnaturalización y 60° C por 1 min para hibridación y extensión. La interpretación de resultados se hizo con el software Opticon Monitor 3, utilizando como referencia el ciclo umbral #14 obtenido por el testigo positivo, de acuerdo con los dos fluorocromos; FAM (señal específica para la secuencia blanco) y VIC (señal específica para el control interno).

Resultados

Presencia y cuantificación de *E. coli*

Se determinó la presencia de *E. coli* en 31.5% (34/108) del total de muestras de carne analizadas, y en 72.2% (13/18) de los locales seleccionados se identificó este microorganismo en, al menos, una ocasión. La mayor incidencia de *E. coli* en carne de res se presentó en el periodo de verano con 48.1% (26/54) de muestras positivas; mientras que en otoño, sólo 14.8% (8/54) de las muestras resultaron contaminadas. Los niveles de contaminación por *E. coli* oscilaron entre 100 y 700 UFC/g de carne de res evaluada. Solamente tres muestras mostraron la más alta concentración de la bacteria

*BIO-RAD, Estados Unidos de América.

amplification of a non-specific DNA fragment of approximately 550 bp, instead of the expected 625 bp fragment, in 32.1% (9/28) of the isolated strains (Table 3).

Confirmation of *E. coli* O157:H7 by real time PCR (RT-PCR)

The RT-PCR technique was used to confirm the serotype of *E. coli* O157:H7. The strains that were subjected to this test were those that showed an amplicon for the *fliCh7* gene. Because none of the strains amplified the expected fragment, the nine strains that produced a non-specific fragment were tested to confirm that these isolates were not *E. coli* O157:H7. The results of the RT-PCR indicated that all of the strains tested were negative, thereby confirming the absence of this bacterial strain in the beef samples obtained from the municipal market (Figure 2).

(700 UFC/g) y correspondieron a tres locales diferentes (9, 12 y 30); sin embargo, las muestras se obtuvieron en verano en la misma fecha de muestreo (M2). Los locales 15 y 32 resultaron contaminados solamente en una ocasión y con los niveles de contaminación más bajos (100 UFC/g) (Cuadro 2).

Aislamiento de cepas de *E. coli* O157

Se aislaron 28 cepas de *E. coli* O157 a partir de 47% (13/34) de las muestras de carne que resultaron positivas a *E. coli* genérica. El 50% (9/18) de los locales seleccionados mostraron contaminación por esta bacteria. En verano se detectó esta bacteria en nueve locales seleccionados, mientras que en otoño sólo dos locales mostraron este tipo de contaminación. La mayor incidencia de carne contaminada ocurrió en el periodo de verano, con 81.3% (13/16) de muestras contaminadas. El mayor número de aislamientos también ocurrió en verano, con 64.3% (18/28) del total de cepas

CUADRO 2

Presencia y cuantificación de *E. coli** en carne por ciclo de muestreo

Presence and quantification of *E. coli** in meat by sampling cycle

Retail unit	Number of samples (% positive)	M1*	M2*	M3*	Number of samples (% positive)	M1*	M2*	M3*	Total
1	3 (100)	100	150	200	3 (0)	0	0	0	6 (50)
3	3 (0)	0	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (0)
5	3 (33)	0	200	0	3 (33)	0	200	0	6 (33)
7	3 (0)	0	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (0)
9	3 (100)	150	700	400	3 (0)	0	0	0	6 (50)
12	3 (33)	0	700	0	3 (33)	0	0	200	6 (33)
14	3 (0)	0	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (0)
15	3 (33)	100	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (17)
18	3 (0)	0	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (0)
24	3 (67)	100	100	0	3 (0)	0	0	0	6 (33)
20	3 (67)	100	100	0	3 (33)	0	0	100	6 (50)
22	3 (67)	50	200	0	3 (100)	100	300	100	6 (83)
26	3 (100)	600	550	100	3 (33)	0	0	100	6 (67)
34	3 (100)	200	500	100	3 (0)	0	0	0	6 (50)
35	3 (67)	100	50	0	3 (0)	0	0	0	6 (33)
28	3 (0)	0	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (0)
30	3 (67)	200	700	0	3 (33)	100	0	0	6 (50)
32	3 (33)	100	0	0	3 (0)	0	0	0	6 (17)
Total									

* *E. coli* CFU/g of meat.

M: The letter followed by a number represents the sampling number in each cycle.

Shaded rows represent butcheries contaminated with *E. coli*.

Detection of virulence genes using multiplex PCR

None of the tested strains produced amplification fragments that corresponded to the virulence genes tested (Table 3).

Discussion

In this study, the microbiological quality of meat was determined according to the presence and quantification of *E. coli*. The results indicate that the levels of contamination by this organism in the evaluated beef samples fell within the permissible limits (1000 CFU/g of chilled meat) that have been established by NOM-194-SSA1-2004. However, Hernandez *et al.*¹⁷ evaluated the microbiological quality of carcass meat in a mu-

obtenidas. Los locales 5 y 22 fueron los únicos que resultaron contaminados con *E. coli* O157 en ambos ciclos de muestreo (Cuadro 3).

Confirmación de antígeno flagelar H7 por PCR

Las cepas aisladas fueron sometidas al análisis por PCR, para determinar la presencia del gen *fliCH7* que codifica para el antígeno flagelar H7. Los resultados obtenidos de esta prueba mostraron la amplificación de un fragmento de ADN inespecífico de aproximadamente 550 pb, en lugar del fragmento de 625 pb esperado en 32.1% (9/28) de las cepas aisladas (Cuadro 3).

CUADRO 3

Aislamiento de cepas de *E. coli* O157, presencia de genes de virulencia y su confirmación por pruebas moleculares
Isolation of *E. coli* O157 strains, presence of virulence genes and their confirmation by molecular tests

Retail unit	No. of strains (M) ^ψ	<i>fliC</i>	Summer				Real time PCR	No. of strains (M) ^ψ	<i>fliC</i>	Fall				Real time PCR
			<i>vt1</i>	<i>vt2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>				<i>vt1</i>	<i>vt2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	
1	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
3	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
5	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg
7	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
9	8 (3)	7*	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
12	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
14	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
15	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
18	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
24	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
20	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
22	2 (2)	-	-	-	-	-	Neg	9 (2)	-	-	-	-	-	Neg
26	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
34	2 (2)	2*	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
35	1 (1)	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
28	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
30	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
32	0	-	-	-	-	-	Neg	0	-	-	-	-	-	Neg
Total	18 (13)	9	-	-	-	-	0	10 (3)	-	-	-	-	-	0

^ψThe number in the parentheses represents the number of samples (M) from which the strains were isolated.

*Presence of an unexpected amplification fragment.

Shaded rows represent butcherries contaminated with *E. coli*.

municipal slaughterhouse of Hidalgo, Mexico and found levels of *E. coli* that posed a health risk to consumers. Frequently, *E. coli* is identified at low levels in meat processing areas and during meat distribution because this bacterium is part of the normal intestinal flora of cattle.¹⁸ However, it is important to consider that the detection of *E. coli* indicates fecal contamination and is considered to indicate poor food quality due to improper handling, either during processing or during marketing. It also raises the suspicion of pathogenic microorganisms from the same source.¹⁹ The results showed a seasonal effect, since an increased incidence of *E. coli* was observed in the summer compared to the fall, with 48.1% and 14.8% positive samples, respectively. Chapman *et al.*²⁰ and McEvoy *et al.*²¹ also reported a high incidence of *E. coli* O157:H7 in the meat found in a retail environment and on the surface of meat carcasses, respectively, during the spring and summer, which is an expected outcome because the environmental conditions during the summer favor microbial growth. Additionally, meat *per se* is an excellent source of nutrients and moisture, enabling the retention and multiplication of microorganisms that are pathogenic to humans.²² This study also aimed to identify *E. coli* O157:H7 in evaluated beef samples because it shares a primary habitat with *E. coli*; however, none of the results indicated the presence of this pathogen. Other

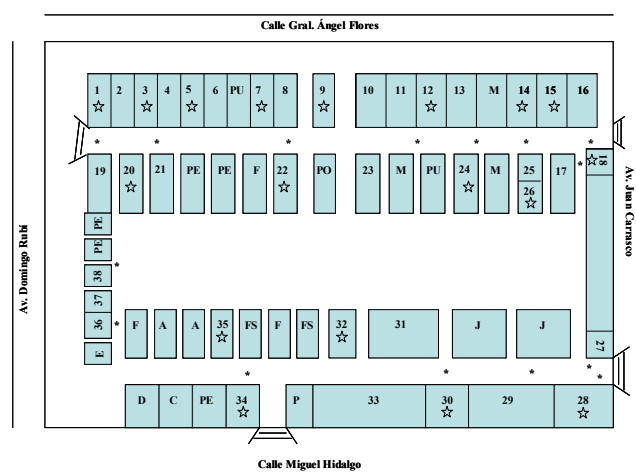


FIGURA 1. Distribución de locales en el mercado municipal de la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Los números representan los puestos que comercializan carne de res y las estrellas (☆) los locales seleccionados. Las letras representan los diferentes tipos de comercio, A: Abarrote; C: Creamería; D: Dulcería; F: Frutería; FS: Fruta seca; M: Menudo; PE: Pescadería; PO: Venta de carne de pollo; PU: Venta de carne de puerco. El asterisco (*) representa las alcantarillas.

FIGURE 1. Distribution of the retail units in the municipal market of Culiacán, Sinaloa. The numbers represent the stalls that sell beef, and the stars (☆) correspond to the selected retail units. The letters represent the different types of trades, A: Grocery, C: Creamery, D: Sweets, F: Fruit, FS: Dried fruit, M: "Menudo" or tripe soup stand, PE: Fish, PO: Chicken, PU: Pork. The asterisks (*) represent the sewers.

Confirmación de *E. coli* O157:H7 por PCR en tiempo real (PCR-TR)

Para confirmar el serotipo de *E. coli* O157:H7 se utilizó la técnica de PCR-TR. Las cepas que se sometieron a esta prueba fueron aquellas que mostraron un fragmento de amplificación del gen *fliCh7*. Como no se obtuvieron cepas que amplificaran el fragmento esperado, se sometieron a esta prueba las nueve cepas que produjeron un fragmento inespecífico, con el fin de confirmar que estos aislamientos no correspondían a *E. coli* O157:H7. Los resultados de la PCR-TR mostraron que todas las cepas evaluadas fueron negativas, por lo que no se confirmó la presencia de esta bacteria en las muestras de carne de res obtenidas del mercado municipal (Figura 2).

Detección de genes de virulencia por PCR múltiple

Ninguna de las cepas evaluadas produjo fragmentos de amplificación para la determinación de genes de virulencia (Cuadro 3).

Discusión

En el presente trabajo se determinó la calidad microbiológica de la carne de acuerdo con la presencia y cuantificación de *E. coli*. Los resultados indican que los niveles de contaminación por este microorganismo en la carne de res evaluada se encuentran dentro de límites permisibles (1000 UFC/g de carne refri-

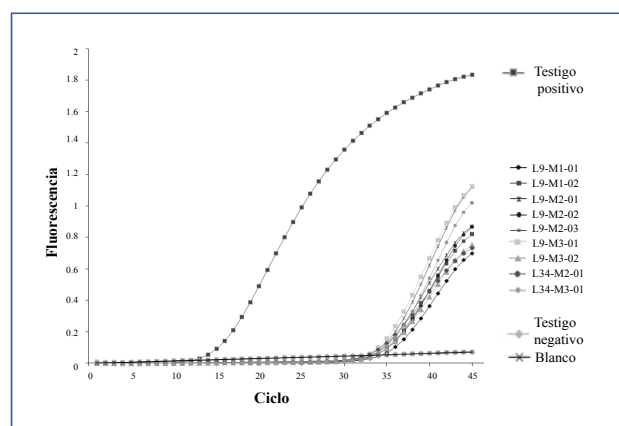


FIGURA 2. Gráfica de la fluorescencia emitida por cada una de las cepas evaluadas. El rótulo de cada cepa evaluada se compone de la letra L, M y un número al final que representan el local, la muestra y el número de aislamiento.

FIGURE 2. Graph of the fluorescence emitted by each of the tested strains. The label of each strain follows a format in which L, M, and numbers represent the retail unit, the sample, and the isolation number, respectively.

studies carried out in Mexico have detected *E. coli* O157:H7 in beef.^{3,23,24} Meanwhile, Varela-Hernandez *et al.*²³ reported *E. coli* O157:H7 in 2.7% (7/258) of the samples analyzed. The prevalence of the organism in these studies is comparable to that observed in France, the United Kingdom, Switzerland and Argentina, with prevalence rates of 0.12%, 1.1%, 2.3% and 3.8%, respectively.^{20,25-27} Although its prevalence appears to be low, this pathogen poses a major health risk; in the United States of America, 350 outbreaks have been reported due to infection with *E. coli* O157:H7 between 1982 and 2002, of which 52% were foodborne.²⁸ Contaminated beef remains the main food involved, as reported in the epidemiological outbreak caused by this bacterium in November 2009 that led to the sickening of 26 people across eight states.²⁹ In Mexico, there are no records of disease outbreaks caused by *E. coli* O157:H7; however, an appropriate diagnostic routine for diseases has yet to be established. It is therefore important to achieve timely and accurate detection of this organism because it is usually found at low concentrations, it is easily outnumbered by competing flora, and its isolation is time consuming and depends on the sensitivity of the media and techniques used.³⁰ In the present study, selective enrichment (MEC+n) was used in addition to a chromogenic agar (CHROMagar O157) that has shown high sensitivity and specificity in the recognition of *E. coli* O157 strains.³¹ The results confirmed the presence of 16 strains within this serotype, but identification of the *fliCh7* gene corroborating serotype O157:H7 failed. However, a nonspecific amplification fragment was detected in 9 of these strains. Wang *et al.*³² studied the diversity of the genes encoding the flagellar H7 antigens (*fliC*) of *E. coli* strains and showed that the differences between the 10 sequences analyzed ranged from 0.06% to 3.12%; they concluded that the specificity of the primers used in the PCR reaction would be affected and recommended complementing the results with further tests. Following this recommendation, the 9 strains that showed this behavior were assessed using RT-PCR to determine whether they corresponded to serotype O157:H7. This technique has proved to be less laborious and more sensitive and rapid.³³ The test results indicated that the strains tested did not correspond to serotype O157:H7. However, there have been serotypes of non-O157:H7 *E. coli* that carried virulence genes capable of causing disease in humans,³⁴ and, as discussed above, the 9 strains were tested using M-PCR. The results of this test failed to reveal the presence of virulence genes, indicating that the strains of *E. coli* found in these meat samples are not pathogenic to humans. The findings of this study suggest that the microbiological quality of beef that is sold in the municipal market of Culiacan, Sinaloa, falls within the specifications of the NOM. Nevertheless,

según las especificaciones que establece la NOM-194-SSA1-2004. Por su parte, Hernández *et al.*¹⁷ evaluaron la calidad microbiológica de la carne de canal en un rastro municipal de Hidalgo, México, y encontraron que los niveles de *E. coli* registrados en ese estudio representaban un riesgo sanitario para los consumidores. Es frecuente identificar *E. coli* en niveles bajos en las áreas de procesamiento de productos cárnicos y durante su distribución, debido a que esta bacteria es parte de la flora entérica normal del ganado bovino.¹⁸ Sin embargo, es importante considerar que el hallazgo de *E. coli* indica contaminación de origen fecal y es considerada como un indicador de mala calidad del alimento por un manejo inadecuado, ya sea durante su procesamiento o durante su mercadeo; además, permite sospechar la presencia de microorganismos patógenos provenientes del mismo origen.¹⁹ Los resultados mostraron un efecto estacional, ya que se obtuvo mayor incidencia de *E. coli* en verano que en otoño, con 48.1% y 14.8% de muestras positivas, respectivamente. Por su parte, Chapman *et al.*²⁰ y McEvoy *et al.*²¹ también registraron una alta incidencia de *E. coli* O157:H7 en venta de carne al menudeo y en superficie de carne de res en canal, respectivamente, durante primavera y verano, ya que en verano, la temperatura medio ambiental propicia condiciones que favorecen el desarrollo microbiano; además, la carne *per se* constituye una excelente fuente de nutrientes y humedad que permite la permanencia y multiplicación de muchos microorganismos patógenos para el humano.²² En este estudio también se planteó la identificación de *E. coli* O157:H7 en las muestras de carne de res evaluadas, debido a que comparte el hábitat primario con *E. coli*; sin embargo, no se pudo determinar la presencia del patógeno. Algunos trabajos realizados en México demuestran la presencia de *E. coli* O157:H7 en carne de res.^{3,23,24} Por su parte, Varela-Hernandez *et al.*²³ registraron *E. coli* O157:H7 en 2.7% (7/258) de las muestras analizadas. La prevalencia del microorganismo en estos trabajos es comparable con la registrada en Francia, Reino Unido, Suiza y Argentina, con 0.12%, 1.1%, 2.3% y 3.8%, respectivamente.^{20,25-27} Aunque la prevalencia parezca ser baja, este microorganismo patógeno representa un gran riesgo para la salud; en Estados Unidos de América ocurrieron 350 brotes por infección de *E. coli* O157:H7 entre 1982 y 2002, de los cuales 52% fueron de origen alimentario.²⁸ La carne de res contaminada sigue siendo el principal alimento implicado, como se informó en el brote epidemiológico ocasionado por esta bacteria en noviembre de 2009, y en el que resultaron infectadas 26 personas a lo largo de ocho estados.²⁹ En México, no existen registros de brotes epidemiológicos ocasionados por

the presence of *E. coli* in foods suggests fecal contamination and may pose a risk to public health. Therefore, the implementation of proper hygiene and manufacturing practices that enable strict sanitary control and ensure constant food safety is recommended to minimize the risk of disease caused by the consumption of meat products.

Acknowledgements

The authors would like to thank Cecy Berenice Nuñez Sanchez M.S.; Q.F.B. Celida Martinez.; IBT. Gabriela Gaxiola.; and Q.F.B. Hector Carrillo Yañez, for their technical assistance. This research was funded by the Sectorial Fund of the Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación—Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SAGARPA-CO-NACYT) 2006-1 project 48134.

Referencias

1. GONZÁLEZ-FLORES T, ROJAS-HERRERA RA. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: Prevención y Diagnóstico. Salud Pub Mex 2005; 47:388-390.
2. COBBAUT K, BERKVEN D, HOUF K, DE DEKEN R, DE ZUTTER L. *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. J Food Prot 2009; 72:1848-1853.
3. GALLEGOS M, MORALES A, ÁLVAREZ G, VÁSQUEZ J, MORALES L, MARTÍNEZ I, MALDONADO J. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. Rev Cient FCV-LUZ 2009; 2:139-146.
4. McEVoy JM, DOHERTY AM, SHERIDAN JJ, THOMSON-CARTER FM, GARVEY P, MCGUIRE L *et al.* The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. J Appl Microbiol 2003; 95:256-266.
5. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. NORMA OFICIAL MEXICANA, NOM-194-SSA-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. DOF, 18 sept 2004.
6. LEUNG D, HARDOUIN C, BOGER DL, CRAVATT BF. Discovering potent and selective inhibitors of enzymes in complex proteomes. Nat Biotechnol 2003; 21: 687-691.
7. TARR PI, NEILL MA. *Escherichia coli* O157:H7. Gastroentero Clin North Am 2001; 30:735-751.
8. KASSENBOG HD, HEDBERG CW, HOEKSTRA M, EVANS MC, CHIN AE, MARCUS R *et al.* Farm visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. Clin Infect Dis 2004; 15 (Suppl 3:S271-278):38.
9. RAZZAQS. Hemolytic Uremic Syndrome: an emerging health risk. Am Fam Physician 2006; 74:991-996.

E. coli O157:H7; sin embargo, se debe establecer una rutina de diagnóstico adecuado de enfermedades. De ahí la importancia de la detección oportuna y precisa de este microorganismo, ya que generalmente se encuentra en bajas concentraciones, son fácilmente superados por la flora de competencia, su aislamiento toma mucho tiempo y depende de la sensibilidad de los medios y técnicas utilizados.³⁰ En este trabajo se utilizó un enriquecimiento selectivo (mEC+n) y posteriormente un agar cromogénico (CHROMagar O157) que ha mostrado una alta sensibilidad y especificidad en el reconocimiento de cepas de *E. coli* O157.³¹ Los resultados confirmaron la presencia de 16 cepas correspondientes a este serotipo, en las cuales no se logró identificar el gen *fliCh7* que corroboraba el serotipo O157:H7. Sin embargo, se detectó un fragmento de amplificación inespecífico en nueve de estas cepas. Wang *et al.*³² estudiaron la diversidad de los genes que codifican para los antígenos flagelares H7 (*fliC*) en cepas de *E. coli* y demostraron que la diferencia entre 10 secuencias analizadas fue de 0.06% a 3.12%, concluyendo así que la especificidad de los iniciadores utilizados en la reacción de PCR se ve afectada y recomiendan complementar los resultados con pruebas adicionales. En este sentido, las nueve cepas que mostraron este comportamiento fueron evaluadas por la técnica PCR-TR para determinar si correspondían al serotipo O157:H7. Esta técnica ha mostrado ser menos laboriosa y más sensible y rápida.³³ Los resultados de esta prueba demostraron que las cepas evaluadas no correspondían al serotipo O157:H7. Sin embargo, se han registrado serotipos de *E. coli* No-O157:H7 portadores de genes de virulencia capaces de ocasionar enfermedades en humanos,³⁴ por lo que las nueve cepas antes analizadas fueron sometidas a la prueba de PCR-M. Con los resultados obtenidos de esta prueba no se logró determinar la presencia de genes de virulencia, por lo que podría suponerse que las cepas de *E. coli* encontradas en las muestras de carne no son patógenas para el humano. Debido a los hallazgos encontrados en este trabajo es posible concluir que la calidad microbiológica de la carne de res que se comercializa en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa, se encuentra dentro de las especificaciones establecidas en la NOM. Aun así, la presencia de *E. coli* en alimentos sugiere una contaminación de origen fecal y puede representar un riesgo para la salud pública. Por ello se recomienda implementar programas de buenas prácticas higiénicas y de manufactura que permitan un control sanitario estricto y constante para asegurar la inocuidad de los alimentos, y así minimizar el riesgo de enfermedad que podría representar el consumo de productos cárnicos.

10. NAVARRO A, ESLAVA C, HERNANDEZ U, NAVARRO-HENZE JL, AVILES M, GARCIA-DE LA TORRE G *et al.* Antibody responses to *Escherichia coli* O157 and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:797-801.
11. COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS. Evaluación de riesgos de los rastros y mataderos municipales. Nacameh 2007; 1:118-141.
12. TILDEN J JR, YOUNG W, McNAMARA AM, CUSTER C, BOESEL B, LAMBERT-FAIR MA *et al.* A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am J Public Health 1996; 86:1142-1145.
13. BELL BP, GOLDOFT M, GRIFFIN PM, DAVIS MA, GORDON DC, TARR PI *et al.* A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. JAMA 1994; 272:1349-1353.
14. LITTLE CL, DE LOUVOIS J. The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom. J Appl Microbiol 1998; 85:177-186.
15. FENG P, WEAGANT SD, JINNEMAN K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: USFDA/CFSAN-BAM. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4A 8th ed. New Hampshire USA: Food and Drug Administration, 2011.
16. CAGNEY C, CROWLEY H, DUFFY G, SHERIDAN JJ, O'BRIEN S, CARNEY E *et al.* Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and beef burgers from butcher shops and supermarkets in the Republic of Ireland. Food Microbiol 2004; 21:203-212.
17. HERNÁNDEZ S, ESTRADA A, SANCHEZ I, CASTRO J, ROMAN A, SANTOS E. Condiciones microbiológicas en el proceso del sacrificio en un rastro municipal del Estado de Hidalgo, México. Vet Méx 2007; 38:187-195.
18. ZHAO C, GE B, DE VILLENA J, SUDLER R, YEH E, ZHAO S *et al.* Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C. Appl Environ Microbiol 2001; 67:5431-436.
19. ORTEGA C, SOLO-GABRIELE HM, ABDELZAHER A, WRIGHT M, DENG Y, STARK LM. Correlations between microbial indicators, pathogens, and environmental factors in a subtropical estuary. Mar Pollut Bull 2009; 58:1374-1381.
20. CHAPMAN PA, CORNELL J, GREEN C. Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. Epidemiol Infect 2000; 125:531-536.
21. McEVOY JM, DOHERTY AM, SHERIDAN JJ, THOMSON-CARTER FM, GARVEY P *et al.* The prevalence and spread of *Escherichia coli* O157:H7 at a commercial beef abattoir. J Appl Microbiol 2003; 95:256-266.
22. GILL CO, LANDERS C. Effects of spray-cooling processes on the microbiological conditions of decontaminated beef carcasses. J Food Prot 2003; 66:1247-1252.
23. VARELA-HERNANDEZ JJ, CABRERA-DIAZ E, CARDONA-LOPEZ MA, IBARRA-VELAZQUEZ LM, RANGEL-VILLALOBOS H, CASTILLO A *et al.*

Agradecimientos

Los autores agradecen a la M. en C. Cecy Berenice Núñez Sánchez, a la Q.F.B. Célida Martínez y a la I.B.T. Gabriela Gaxiola, su colaboración técnica. Este trabajo de investigación fue financiado por el Fondo Sectorial de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SAGARPA-CONACYT) 2006-1 proyecto 48134.

-
- 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 2007; 113:237-241.
 24. MARTINEZ M, AZUARA J, CASTILLO B, CRUZ W, RIVERA G, BOCANEGRA V. Detección de factores de patogenicidad de *E coli* enteropatógena y enterohemorrágica a partir de muestras de alimentos mediante PCR. Bioquímica 2007; 32:116.
 25. VERNOSY-ROZAND C, RAY-GUENIOT S, RAGOT C, BAVAI C, MAZUY C, MONTET MP *et al.* Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in industrial minced beef. Lett Appl Microbiol 2002; 35:7-11.
 26. FANTELLI K, STEPHAN R. Prevalence and characteristics of shigatoxin-producing *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* strains isolated from minced meat in Switzerland. Int J Food Microbiol 2001; 70:63-69.
 27. CHINEN I, TANARO JD, MILIWEBSKY E, LOUND LH, CHILLEMI G, LEDRI S *et al.* Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. J Food Prot 2001; 64:1346-1351.
 28. RANGEL JM, SPARLING PH, CROWE C, GRIFFIN PM, SWERDLOW DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis 2005; 11:603-609.
 29. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Associated with Beef from Fairbank Farms. [Cited: 2009 Nov 24]. Available from: <http://www.cdc.gov/ecoli/2009/1124.html>
 30. PERRY JD, FREYDIÈRE AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. J Appl Microbiol 2007; 103:2046-2055.
 31. BETTELHEIM KA. Reliability of CHROMagar O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. J Appl Microbiol 1998; 85:425-428.
 32. WANG L, ROTHEMUND D, CURD H, REEVES PR. Sequence diversity of the *Escherichia coli* H7 fliC genes: implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157:H7. J Clin Microbiol 2000; 38:1786-1790.
 33. JOTHIKUMAR N, GRIFFITHS MW. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. Appl Environ Microbiol 2002; 68:3169-171.
 34. BROOKS JT, SOWERS EG, WELLS JG, GREENE KD, GRIFFIN PM, HOEKSTRA RM, *et al.* Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis 2005; 192:1422-1429.