



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

“Caracterización de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de
ovinos para abasto en un rastro del Estado de México”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA:
M. en C.A. y R.N. EDGAR ENRIQUEZ GÓMEZ

Toluca, Estado de México. Diciembre 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

“Caracterización de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de
ovinos para abasto en un rastro del Estado de México”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA:
M. en C.A. y R.N. EDGAR ENRIQUEZ GÓMEZ

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Edgardo Soriano Vargas

CO-DIRECTORES DE TESIS
Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat
Dr. Martín Talavera Rojas

Toluca, Estado de México. Diciembre 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

“Caracterización de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de
ovinos para abasto en un rastro del Estado de México”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

PRESENTA:
M. en C.A. y R.N. EDGAR ENRIQUEZ GÓMEZ

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR ACADÉMICO
Dr. Edgardo Soriano Vargas

TUTORES ADJUNTOS
Dr. Jorge Pablo Acosta Dibarrat
Dr. Martín Talavera Rojas

Toluca, Estado de México. Diciembre 2020.

RESUMEN.

Los rumiantes son uno de los principales reservorios naturales de diferentes patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica (ECDA) y los ovinos para consumo humano han sido señalados como uno de los más importantes reservorios de ECDA zoonóticas, solo por debajo de los bovinos. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar los principales patotipos de ECDA obtenidos de hisopados rectales y muestras de canal obtenidos de ovinos faenados en un rastro del Estado de México. Fueron obtenidos 159 muestras de hisopados rectales y 162 muestras de hisopado canal. La identificación bacteriológica se llevó a cabo por pruebas bioquímicas, para la serotipificación se emplearon sueros específicos anti-O y anti-H (SERUNAM, México) para 187 antígenos somáticos y 53 flagelares, los patotipos de ECDA se determinaron por PCR empleando los genes *stx1*, *stx2* para *E. coli* productora de toxinas shiga (STEC), para *E. coli* enteropatógena (EPEC) los genes *eae* y *bfp*, para *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) los genes *LT* y *stx*, para *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) el gen *ipaH* y para *E. coli* enteroagregativa (EAEC) el gen *aggR*, se identificaron las variantes de *stx1* (*stx1a*, *stx1c* y *stx1d*) y *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* y *stx2g*), se determinaron los grupos filogenéticos, se determinó el patrón de sensibilidad antimicrobiana y se identificaron los genes de resistencia *bla-tem*, *tetA*, *tetB*, *sull* y *sullI*. Se identificaron 90 aislamientos como *E. coli*, 28% frecuencia de aislamiento, 75 fueron aislados del recto y 15 de canal. Los serotipos con importancia en salud pública con mayor número de aislamientos fueron: O76:H19, O146:H21, O91:H10, O6:NM y O8:NM, que han sido señalados como causantes de diarrea en población humana. Fueron detectados 47.7% (43/90) de aislamientos de STEC, 3.3% (3/90) de EPEC, 2.2% (2/90) de ETEC y 1.1% (1/90) de EIEC. El mayor porcentaje de resistencia para cada uno de los patotipos fue nitrofuranos con 100%. Respecto a la clasificación por grupos filogenéticos se encontró que para STEC el 91.7% pertenece al filogrupo B1 y para EPEC, ETEC y EIEC el 100% fue para B1. Respecto a las variantes de *stx1* fue posible identificar de 72.09%, 25.5%, 2.3% de *stx1c*, *stx1a-stx1c* y de *stx1a-stx1d* respectivamente y en lo referente a las variantes de *stx2* se identificó mayormente *stx2g*. Estos resultados hacen notar la importancia de ECDA como potencial factor de riesgo a la salud pública por una probable contaminación cruzada en el momento de la faena.

Palabras clave: Ovinos, patotipos, *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana.

ABSTRACT.

Ruminants are one of the main natural reservoirs of different pathotypes of diarrheagenic *Escherichia coli* (ECDA) and sheep for human consumption have been identified as one of the most important zoonotic ECDA reservoirs, only below bovines. The objective of this work was to identify and characterize the main ECDA pathotypes obtained from rectal swabs and carcass samples obtained from sheep slaughtered in a slaughterhouse in the State of Mexico. 159 rectal swab samples and 162 channel swab samples were obtained. Bacteriological identification was carried out by biochemical tests, for serotyping, specific anti-O and anti-H sera (SERUNAM, Mexico) were used for 187 somatic and 53 flagellar antigens, the ECDA pathogens were determined by PCR using the *stx1* genes. , *stx2* for shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), for enteropathogenic *E. coli* (EPEC) the *eae* and *bfp* genes, for enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) the *LT* and *stx* genes, for enteroinvasive *E. coli* (EIEC) the *ipah* gene and for enteroaggregative *E. coli* (EAEC) the *aggR* gene, the variants of *stx1* (*stx1a*, *stx1c* and *stx1d*) and *stx2* (*stx2a*, *stx2b* *stx2c* *stx2d* *stx2e* *stx2f* and *stx2g*) were identified, the phylogenetic groups were determined, determined the pattern of antimicrobial sensitivity and the resistance genes *bla-tem*, *tetA*, *tetB*, *sull* and *sulll* were identified. 90 isolates were identified as *E. coli*, 28% isolation frequency, 75 were isolated from the rectum and 15 from the canal. The serotypes with importance in public health with the highest number of isolates were: O76: H19, O146: H21, O91: H10, O6: NM and O8: NM, which have been indicated as causing diarrhea in the human population. 47.7% (43/90) of STEC isolates, 3.3% (3/90) of EPEC, 2.2% (2/90) of ETEC and 1.1% (1/90) of EIEC were detected. The highest percentage of resistance for each of the pathotypes was nitrofurans with 100%. Regarding the classification by phylogenetic groups, it was found that for STEC 91.7% belonged to phylogroup B1 and for EPEC, ETEC and EIEC 100% was for B1. Regarding the *stx1* variants, it was possible to identify 72.09%, 25.5%, 2.3% of *stx1c*, *stx1a-stx1c* and *stx1a-stx1d* respectively, and regarding the *stx2* variants, *stx2g* was mostly identified. These results highlight the importance of ECDA as a potential risk factor for public health due to probable cross contamination at the time of slaughter.

Key words: Sheep, pathotypes, *Escherichia coli*, antimicrobial resistance

CONTENIDO.

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I. INTRODUCCION.....	10
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	11
III. JUSTIFICACIÓN.....	26
IV. HIPOTESIS.....	27
V. OBJETIVOS.....	28
VI. MATERIAL Y MÉTODO.....	29
VII. RESULTADOS.....	36
Artículo aceptado.....	36
Artículo enviado.....	37
VIII. DISCUSIÓN.....	50
IX. CONCLUSIONES.....	58
X. SUGERENCIAS.....	59
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	60

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1	NOM-194-SSA1-2004. Especificaciones sanitarias, límite máximo de microorganismos (mamíferos y aves doméstica).....	22
Cuadro 2	Iniciadores utilizados para detectar genes de virulencia	32
Cuadro 3	Iniciadores utilizados para detectar las variantes de la toxina shiga.....	33
Cuadro 4	Iniciadores utilizados para determinar grupos filogenéticos.....	34
Cuadro 5	Iniciadores utilizados para detectar genes de resistencia.....	35
Cuadro 6	Posibles patotipos detectados por serotipificación.....	42
Cuadro 7	Aislamientos sin factores de virulencia y patotipos detectados....	42
Cuadro 8	Aislamientos STEC de importancia en Salud Pública.....	43
Cuadro 9	Serotipo, grupo filogenético, perfil de resistencia y genes de resistencia los aislamientos STEC.....	48
Cuadro 10	Serotipo, Grupo filogenético, perfil de resistencia y genes de resistencia de los aislamientos EPEC, ETEC y EIEC.....	51

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx1</i>	44
Figura 2	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx2</i>	44
Figura 3	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx1a</i>	45
Figura 4	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx1c</i>	45
Figura 5	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx1d</i>	46
Figura 6	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx2b</i>	46
Figura 7	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>vtx2g</i>	47
Figura 8	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>eae</i>	49
Figura 9	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>stp</i>	50
Figura 10	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>ipH</i>	48
Figura 11	Amplificación de ADN por PCR para el gen <i>arpa</i> , <i>chuA</i> , <i>TspE4</i> y <i>jyA</i>	49

I. INTRODUCCION

Escherichia coli coloniza el intestino del hombre y mamíferos pocas horas después del nacimiento y se considera como parte normal del microbiota intestinal, aunque se han descrito varias clasificaciones de este microorganismo capaces de causar diarrea tanto en humanos como en diversas especies animales como: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro and Kaper, 1998).

Los ovinos sanos son uno de los principales reservorios de serotipos de *Escherichia coli* diarrogénica (ECDA) y es sabida la importancia de este microorganismo como causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Blanco *et al.*, 2003).

Esta bacteria se puede aislar e identificar tradicionalmente con base en sus características bioquímicas o serológicas, pero también se pueden estudiar sus mecanismos de patogenicidad empleando técnicas de biología molecular que evidencian la presencia de genes involucrados en dichos mecanismos. (Paton and Paton, 1998).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) están cobrando cada vez más relevancia a nivel epidemiológico por representar un problema nacional creciente en salud pública, dado por su alta incidencia y progresivo aumento en los últimos años. La FAO en, el año 2005, estableció que la inocuidad de los alimentos es una prioridad, lo que fue determinado por la aparición de importantes brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos a nivel mundial (Barlow *et al.*, 2006).

Un importante agente dentro de las ETAs es *E. coli* productora de toxinas shiga (STEC), bacteria responsable de cuadros gastrointestinales que pueden ir desde una diarrea aguda, colitis hemorrágicas, hasta cuadros tan graves como el síndrome hemolítico urémico (SHU), en niños, y púrpura trombocitopénica trombótica en la tercera edad (Beutin *et al.*, 2007).

Otro problema importante en salud pública es la resistencia antimicrobiana en microorganismos Gram negativos, principalmente de la familia *Enterobacteraceae*, esta se ha diseminado en las últimas décadas gracias a la transferencia horizontal de genes que otorgan resistencia a una amplia gama de antibióticos, los cuales se distribuyen entre bacterias de diferentes géneros y especies, incluyendo los microorganismos patógenos para el ser humano (Cordeiro *et al.*, 2008; Chande *et al.*, 2011).

El Estado de México es el principal productor de ovinos para abasto y uno de los principales consumidores de carne ovina, con aproximadamente el 30% de la producción nacional (SIAP, 2016), a pesar de estas cifras; existen poca información acerca del estado sanitario de los ovinos faenados en el rastro donde se realizó la toma de muestras El objetivo de esta investigación es conocer las características más importantes de las ECDA (serotipo, factores de virulencia, grupo filogenético y resistencia a los antibióticos) que portan de manera natural los ovinos procesados en el Estado de México y que podrían representar un factor de riesgo, hacia la población consumidora, por una posible contaminación cruzada del producto de origen animal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, género. *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo del microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Boop *et al.*, 1999).

Esta ampliamente documentado que existen tipos patogénicos de *E. coli* asociados a enfermedades tanto en animales como en humanos, ciertos aislamientos patógenos pueden llegar a causar enfermedades entéricas con diarreas acuosas o severas colitis hemorrágicas, mientras que otros aislamientos pueden llegar a causar infecciones extra-intestinales que pueden incluir diversas patologías en el tracto urinario u otros problemas como septicemia o meningitis (Kaper *et al.*, 2004).

***E. coli* comensal**

E. coli tiene un importante papel en la dinámica de la ecología dentro de su hábitat primario que es el intestino. Tiene una relación íntima con el hospedero donde tiene una relación simbiótica, mientras que el hospedero le proporciona un ambiente estable al microorganismo, este le previene de la colonización por organismos patógenos a través de la producción de bacteriocinas (Lawrence, 2005).

El nicho o lugar donde predominan estas cepas es el intestino grueso, principalmente ciego y colón; la concentración está mediada por diversos factores, todos ellos determinados por el hospedero, como: tamaño corporal, morfología intestinal, dieta, tiempo de retención de la ingesta y microbiota (Orskov and Orskov, 1992, Carrillo, 2011).

Debido a las diferentes interacciones con el hospedero, la estructura genómica de *E. coli* se compone de un genoma central y un genoma flexible, razón por la cual el análisis de estas poblaciones es de relevancia ecológicas y médicas ya que permiten comprender el juego que tienen estas cepas en la transferencia horizontal de diversos factores de virulencia y resistencia los antibióticos, a pesar de que *E. coli* comensal no se asocia con los diversos padecimientos de su contraparte patógenas pueden poseer algunos de estos genes en su genoma (Escobar *et al.*, 2004, Lawrence, 2005; Croxen and Finlay 2010).

***E. coli* patógena extraintestinal.**

Un mayor estudio acerca de las *E. coli* extracelulares, las ha agrupado en 4 grandes grupos (patotipos o patovares) *E. coli* uropatogena (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis (MNEC) y *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* causante de sepsis (SEPEC). Estos patotipos pueden conseguir acceso a nichos fuera del intestino, lo colonizan y pueden causar

un amplio espectro de enfermedades en población humana y animal. Estas cepas comparten un genoma central tanto en humanos como en animales, y pueden poseer diversos factores de virulencia, aunque en muchas ocasiones no se pueden diferenciar de cepas de *E. coli* comensales (Johnson and Russo 2002; Rosso and Johnson 2000; Smith *et al.*, 2007).

***E. coli* patógena intestinal.**

Las cepas de *E. coli* que son causantes de infecciones en el tracto gastrointestinal se encuentran dentro de los agentes etiológicos más comunes que causan diarreas. Con base a su perfil de patogenicidad (factores de virulencia, perfil filogenético y curso de la enfermedad clínica). Nataro and Kaper (1998) las clasificaron en 6 patotipos o patovares *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica o *E. coli* productora de toxina shiga (EHEC/STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativas (EAEC) y *E. coli* adherentemente difusa (DAEC).

Durante la primera década del presente siglo se han mencionado en varios trabajos de investigación dos nuevos patotipos: *E. coli* adherente invasiva (AIEC), la cual se asocia a la enfermedad de Crohn y *E. coli* enteroagregativa productora de toxina shiga (STEAE) que cobro relevancia debido a un brote que afecto a gran parte de Alemania y se asoció a gastroenteritis con síndrome urémico hemolítico (SHU) en el 2011 (Jafari *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011).

***E. coli* enterohemorrágica/ productora de toxina shiga (EHEC/STEC).**

Es un grupo de cepas que llegan a ocasionar diarrea, diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica en población humana y puede derivar en síndrome urémico hemolítico (SHU) (Alam and Zurek, 2006).

Existen más de 400 serotipos identificados de EHEC/STEC, pero solo un grupo de estos serotipos se ha correlacionado con enfermedades en humanos (Blanco *et al.*, 2003).

Los principales factores de virulencia con los que cuentan estas cepas son la producción de toxina shiga 1 (*stx*₁), toxina shiga 2 (*stx*₂) y la intimina (*eae*) aunque puede expresar otros factores de adherencia alternativos, sobre todo las cepas STEC, como: *Tox B*, *ehx*_a, *saa*, *ent*, entre otras (Tatarczak *et al.*, 2005).

Dentro de las *stx*₁₋₂ existen variantes de estas mismas, actualmente están reconocidas las siguientes: la primera corresponde a un grupo homólogo donde se han descrito tres variantes de *stx*₁: *stx*_{1a}, *stx*_{1c} y *stx*_{1d}, mientras que las *stx*₂ son un grupo más heterogéneo y se compone de un mayor número de subtipos (*stx*_{2a}, *stx*_{2b}, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f} y *stx*_{2g}) (Scheutz *et al.*, 2012).

Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas (tSTEC potencialmente virulentas) cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y b) cepas atípicas (aSTEC potencialmente de baja virulencia), cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa. (Nataro and Kaper, 1998). La otra clasificación es en función del serotipo: a) cepas *E. coli* O157:H7. Este serotipo no fermenta

el D-sorbitol ni la ramnosa y no produce β -glucuronidasa; esta bacteria puede producir principalmente SUH y CH.E. *coli* O157:H7 se puede encontrar en bovinos, cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos; su principal reservorio es el intestino de ganado bovino. También se ha logrado recuperar de frutas y vegetales como lechuga, rábanos, alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados. Estas cepas pueden sobrevivir aun cuando estos alimentos tengan un pH de condición en la que puede sobrevivir varios días y b) cepas no-O157:H7 cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7 (Beutin *et al.*, 1995).

Dentro de la amplia variedad de serogrupos de las STEC, existe algunos que son de relevancia sanitaria y se han asociado a la presencia de SHU y HC; han sido considerados como adulterantes o contaminantes de productos cárnicos, tanto en Norteamérica - conocidos como los "big six": O26, O45, O121, O103, O145 y O157 (USDA-FSIS 2012) y la Comunidad Económica Europea (O157, O26, O103, O111, O145 y O104) (EFSA 2013).

***E. coli* enteropatógena (EPEC).**

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman *Bfp* (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70MDa denominado *EAF* (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales (Girón *et al.*, 1991).

Las cepas EPEC se consideran típicas (tEPEC) cuando tienen los genes *eae* para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido *EAF* que codifica para el *Bfp*; se dice que son atípicas (aEPEC) cuando sólo presentan el gen *eae* pero no el plásmido *EAF* (Rosa *et al.*, 1998).

Puede causar diarrea en humanos y animales. La infección por EPEC es muy común en infantes menores de dos años y con mayor riesgo a los menores de 6 meses de edad. En países en desarrollo se han reportado tasas del 30% de mortalidad, en el caso de los países desarrollados, este tipo de cepa se aísla frecuentemente de salas de maternidad y guarderías (Nataro and Kaper, 1988)

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC).**

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones 6-8. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones (Cassels and Wolf, 1995; Mc Veigh *et al.*, 2000; Sears and Kaper, 1996).

La virulencia de estas cepas está asociada con la producción de fimbrias y endotoxinas. Hay dos principales tipos de LT, la LT-I y LT-II. LTI se asocia con enfermedades diarreicas en humanos y animales mientras que LT-II se asocia con enfermedades en animales. En el caso de ST hay dos tipos: STa y STb. STa la producen otras bacterias incluyendo ETEC, mientras que STb solo está asociada con ETEC (Hitayama, 1995; Dreyfus *et al.*, 1998; Sears and Kaper 1996).

El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias) (Eslava *et al.*, 1994, Flores-Abuxapquí *et al.*, 1994).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC).**

El grupo EIEC y *Shigella* spp. están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasas negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Rico-Martínez, 1999).

Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado *pInV*, que codifica para proteínas, como por ejemplo las *Ipa* y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis (Halet *et al.*, 1983) Los signos característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC (Snyder *et al.*, 1984).

***E. coli* enteroagregativa (EAEC).**

Nataro y Kaper (1998) encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo EPEC, pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por auto aglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica a esta característica se le llamo “stacked brick” o ladrillos apilados, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 (Vial *et al.*, 1998).

La transmisión de este patotipo se puede ocasionar por el agua y alimentos contaminados. Después de la colonización con EAEC se pueden generar citotoxinas, las cuales causan acortamiento de vellosidades intestinales, necrosis hemorrágica, en la punta de las vellosidades y se genera una respuesta inflamatoria con edema e infiltración mononuclear en la submucosa. El principal factor de virulencia se ubica en el gen *aspU* que codifica para una proteína de 14kD y el gen *aggR* el cual codifica el activador transcripcional de la fimbria de adherencia agregativa (AAF71) (Savarino *et al.*, 1991; Savarino *et al.*, 1996).

***E. coli* de adherencia difusa (DAEC).**

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman micro colonias cuando se adhieren a células Hep-2 (2). Su mecanismo de patogenicidad se ha caracterizado por una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 *kDa*, en una cepa del serotipo 0126:H27 (Benz and Schmidt, 1992).

Es capaz de colonizar el intestino delgado y causar diarrea acuosa en adultos e infantes. Puede adherirse a las células sin caer en patrones clásicos de adherencia como el A/E, sin embargo, genera un patrón de adherencia difusa (DA), que le permite adherirse de manera uniforme a la superficie de la célula. Este patrón lo permiten las proteínas codificadas por una familia de operones (AFA, Dr, AIDA y Daa) los cuales pueden ser identificados por el mismo nombre de proteínas (Servin, 2005; Le Bouguéneec *et al.*, 2001).

***E. coli* enteroagregativa productora de toxina shiga (STEAEC).**

Hasta ahora el serotipo más analizado es el O104:H4, capaz de generar gastroenteritis aguda y SHU, es similar a una EAEC con características de una STEC, esta combinación de factores de virulencia (FV) representa un nuevo patotipo de importancia en la salud pública ya que es una clona con FV altamente patógenos para los humanos (Bielaszewaska *et al.*, 2011).

El genotipo, fenotipo y la filogenia de los aislamientos de los brotes demuestran que *E. coli* O104:H4 es una clona que combina los FV de dos patotipos diferentes (STEC/EHEC y EAEC) se podría considerar un sero variante emergente que ha adquirido un conjunto de FV, comparte y combina perfiles de virulencia de STEC (*stx_{2a}*, *iha*, *lpfO26* y *lpfO113*) y EAEC (*aggR*, *aggABCD*, *aap*, *aatPABCD*, *ipc* y *set1AB*), incluyendo fenotipos expresados de STEC/HEC y EAEC como son la producción de *stx_{2a}* y la adhesión de agregación de células epiteliales, respectivamente. Estos aislamientos también mostraron un alto porcentaje de resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Navarro, 2014).

Identificación de *E. coli*.

La correcta diferenciación e identificación de *E. coli*, es un aspecto de total importancia, porque gracias a este aspecto podemos distinguir los tipos patógenos de los que no lo son, así como la correcta realización de investigaciones epidemiológicas (Levine, 1987).

A lo largo del tiempo se han utilizado varios métodos para identificar las diferentes cepas entre los cuales están: la fenotipificación, por medio de pruebas bioquímicas, la serología, patotipos y a través de la genotipificación donde se emplean diversos genes como marcadores de virulencia y perfiles filogenéticos; dentro de los cuales sobresalen las

siguientes técnicas: serotipificación, electroforesis en campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés) y determinación de FV y grupos filogenéticos (mediante PCR) (Orskov and Orskov 1984; Joensen, 2015).

Serotipificación.

Este método se basa en la determinación de la combinación de tres estructuras inmunogénicas: el lipopolisacárido (LPS) (antígeno somático O), antígeno capsular (K) y antígeno flagelar (H) (Kauffmann, 1947).

Actualmente solo se determina la combinación del antígeno somático O y el antígeno flagelar H, el esquema de serotipificación actual comprende 188 grupos O designados del O1 al O188 los serogrupos O31, O47, O67, O72, O94 y O122 fueron retiradas del esquema ya que son termoestables y resisten al calentamiento a 100°C o 121°C. Existen 53 variedades del antígeno flagelar que se encuentran en el esquema, designados H1 a H56, con la excepción de H13, H22 y H50 que se retiraron del esquema, debido a que son de naturaleza proteica, termolábiles y no todas las cepas de *E. coli* las expresan (Sheutz *et al.*, 2004).

Existen un gran número de cepas de *E. coli* que se han denominado como “No tipificables” porque no tienen una reacción con los antisueros del esquema de tipificación establecida. Sin embargo, algunas de estas cepas se les puede asignar un serogrupo (O) mediante métodos genéticos (Duda *et al.*, 2011).

La serotipificación de *E. coli* es muy empleada para su clasificación taxonómica, epidemiología y es un requisito previo para cualquier investigación de brotes. En la actualidad, no puede ser reemplazada por otros métodos (Sheutz *et al.*, 2004).

Factores de Virulencia de las cepas patógenas de *E. coli* intestinales.

A lo largo del tiempo y por la constante reproducción de las diversas especies de bacterianas; entéricas que se puede dar en varios medios, la adquisición de diversos genes de virulencia por medio de la transferencia horizontal se convierte en un punto muy importante, ya que, los modelos actuales de evolución o adaptación bacteriana proponen que la plasticidad patogénica de varias cepas bacterianas, entre ellas, *E. coli*, es resultante de esta adquisición (Ochman *et al.*, 2000).

En lo que corresponde a *E. coli* la diversidad que existe en las cepas consideradas como patógenas, parece están relacionadas con la transferencia horizontal de diversos FV entre la población. Los FV muchas veces se localizan en elementos genéticos móviles (EGM) como los: plásmidos, islas de patogenicidad (PAIS) o bacteriófagos (Reid *et al.*, 2000).

Esta transferencia horizontal puede ser la causante de la evolución de la patogenicidad de *E. coli* ya que estos FV van a interactuar con la base genética y así permitir fijar o expresar estos genes (Escobar *et al.*, 2004).

A través de diversos trabajos de investigación con los antecedentes genéticos de los FV, se ha logrado identificar dos tipos de genomas de *E. coli*. El primero se refiere a un “genoma central” que se encuentra en todas las cepas y permite la expresión de FV asociados a diarrea leve y crónica y el segundo se llama “genoma más diverso o accesorio”, que le permite la expresión de FV asociados con patologías más graves (Escobar *et al.*, 2003).

Estos cambios en el genoma central permiten que otros FV lleguen a la población, dando origen a los patotipos asociados con diarreas agudas graves o generar nuevas interacciones entre diversos patotipos, así como el surgimiento de nuevos patotipos (Escobar *et al.*, 2004).

En diversos trabajos de investigación, tanto *in-vitro*, como a partir de muestras clínicas, se ha podido conocer cuales variantes de *stx* son las que están más ligadas a la presencia de SHU a CH y cuáles no. Brett *et al.*, (2003) asocia la *stx*_{1c} a la población ovina, sin estar ligada al desarrollo de SHU o CH, Lee y Tesh (2019) menciona a *stx*_{1a} que se une preferentemente a Gb3 (globotetraosilceramida) con una unión detectable a globotetraosilceramida (Gb4), mientras que *stx*_{2a} muestra una fuerte preferencia por Gb3 y una unión marginal a Gb4. El subtipo de toxina *stx*_{2e} muestra un patrón más promiscuo de unión a glicolípidos, con preferencia para Gb4, pero también unión a Gb3, pentahexosilceramidas con estructuras de núcleo alargadas Gb4.

Hay que recordar que las *stx* se unen con los lípidos complejos, glucoesfingolípidos, (formados por la unión de una ceramida–esfingosina- + ácido graso). Se puede decir que el Gb3 está constituido por una ceramida unida a una cadena de azúcares formada por una glucosa y dos galactosas (Lee and Tesh 2019).

Varias investigaciones de *in vivo* e *in vitro* sugieren que *stx* y mediadores inflamatorios (Gb3 o Gb4) contribuyen a la patogénesis de las STEC. La toxina “Shiga Like” está compuesta por dos estructuras: la subunidad A formada por un polipéptido y la subunidad B compuesta por cinco polipéptidos idénticos (Karpman and Ståhl, 2014).

La subunidad B une la toxina al glicolípido de membrana (Gb3) presentes en las células epiteliales y tubulares renales, las células miocárdicas, las células del sistema nervioso autónomo, las células endoteliales y del músculo liso del sistema vascular. Una vez unida a su receptor, la subunidad A se incorpora a la célula por pinocitosis, siendo capaz de resistir la acción de lisosomas. Su acción directa consiste en inhibir irreversiblemente la síntesis proteica causando la muerte celular. En la corteza del riñón humano, el principal sitio de lesión renal en el SHU, se han descubierto altos niveles de Gb3. (Nataro and Kaper, 1998; Paton and Paton 2001).

Friedrich *et al.* (2002) en una investigación realizada en Alemania, con muestras de pacientes que desarrollaron SHU, la variante más ligada a este padecimiento fue la *stx*_{2c}, aunque no descarta que *stx*_{2d} pueda estar ligada a diarrea en pacientes portadores asintomáticos.

Bielaszewska *et al.* (2006) pudo reportar que la *stx*_{2d} *activable* se asoció significativamente con la capacidad de causar una enfermedad grave, incluida la diarrea con sangre y con complicaciones sistémicas, como el síndrome urémico hemolítico en una investigación realizada con muestras clínicas en Alemania, esta característica se debe a la

predilección de la *sxt_{2d}* por la elastasa, enzima encargada de la degradación de las fibras elásticas. Esta enzima está presente tanto en el humano como en algunos microorganismos (hongos, bacterias, parásitos) en los que constituye un importante factor de virulencia.

Mora *et al.*, (2011) reporta que en el brote de *E. coli* O104:H4 en Alemania esta cepa portaba la subvariante *stx_{2a}*, como uno de los principales factores de virulencia asociado a SHU y CH.

Leung *et al.*, (2003), señalan a *stx_{2g}* como una subvariante que ha sido mayormente aislada en rumiantes, sin ligarse a padecimientos graves con SHU o CH, sin embargo, no debe menospreciarse su potencial patogenicidad.

Filogramas.

Por su importancia médica, existen diferentes técnicas para identificar y clasificar a *E. coli* en cepas patógenas y no patógenas como por ejemplo perfil bioquímico, serotipificación, patotipificación, análisis filogenético, electroforesis de enzimas multilocus (multilocus enzyme electrophoresis, MLEE), tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing, MLST) y reacción en cadena de polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) y sus variantes (Kaper *et al.*, 2004; Lee, 2019).

El método utilizado por Reid *et al.* (2000) basado en la MLEE ha sido aplicado en estudios a gran escala para estimar la diversidad genética y la estructura en las poblaciones naturales de una variedad de especies bacterianas.

Este estudio ha establecido marcos genéticos poblacionales básicos para el análisis de la variación de los serotipos y otros caracteres fenotípicos, ha proporcionado gran cantidad de datos y sistemas de marcadores útiles para la epidemiología Sheutz and Strockbine (2015) utilizaron 20 enzimas y las relaciones filogenéticas entre cepas fueron inferidas del análisis de matriz de distancia genética por el método *neighbor-joining* (NJ).

MLEE está basada en la asignación indirecta de alelos en base a la movilidad electroforética de enzimas. Sin embargo, la MLST da una asignación directa de alelos, no es ambigua y distingue más alelos por locus, lo que permite altos niveles de discriminación entre los aislados utilizando la mitad de los loci que normalmente se requiere para MLEE. Clermont *et al.*, (2013) propusieron el uso alternativo de MLST en reemplazo de MLEE.

Una de las primeras aplicaciones de la MLST para el estudio de poblaciones de *E. coli*, resultó en la relación entre una serie de cepas de EPEC y EHEC, incluyendo varios aislados de colecciones DEC (*collection of diarrhoeagenic E. coli*) junto con otros serotipos productores de toxina Shiga, cepa uropatógena 536 y la cepa de laboratorio K-12 (Reid *et al.*, 2000).

Las técnicas de referencia para la agrupación filogenética: MLEE o Ribotipificación requieren de mucho tiempo, son complejas y necesitan una colección de cepas tipificadas. Clermont *et al.* (2013) desarrollaron un método rápido y sencillo utilizando PCR triplex para la agrupación de cepas de *E. coli* en los cuatro grupos filogenéticos ya descritos para la cual utilizó 3 marcadores genéticos *chuA* (gen del receptor de hemina de membrana externa que actúa como sideróforo, *yjaA* (proteína no caracterizada). Actúa ante la respuesta al stress

por peróxido de H y Cd) y *TSPE4.C2* (fragmento génico de la estereasa putativa). También perfeccionaron la técnica de PCR múltiple, añadiendo otro marcador, *arpa* (actúa como control interno para el DNA y permite distinguir el grupo F del D), el cual permite clasificar los aislamientos de *E. coli* en 7 grupos filogenéticos los cuales están relacionados con el carácter virulento de las cepas: A (cepas comensales de baja virulencia), B1 (cepas comensales de baja virulencia), B2 (cepas extraintestinales potencialmente virulentas), C (cepas comensales de baja virulencia), D (cepas extraintestinales potencialmente virulentas), E (cepas con serotipo O157:H7) y F (cepas extraintestinales potencialmente virulentas).

Esta prueba nos permite agrupar de manera correcta 80-85% de las cepas. Este método ha sido validado al compararlo con varios esquemas de MLST las cuales son más sensibles y específicas (Clermont *et al.*, (2013).

Enfermedades transmitidas por los alimentos.

Las enfermedades gastrointestinales representan uno de los principales problemas de salud pública, anualmente se enferman millones de personas a causa de alimentos contaminados. Según la OMS (2012) las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) fueron la segunda causa de defunción en niños menores de 5 años a nivel mundial. Los principales agentes patógenos causantes de diarrea aguda incluyen: *Rotavirus* y otros tipos de virus intestinales, variedades diarrogénicas de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigellae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Entamoeba histolytica*, entre otros (Marcos and DuPont, 2007; OMS 2012).

Escherichia coli O157 y *Salmonella* spp. representan las principales bacterias patógenas que contaminan la carne bovina, ovina y caprina y pueden llegar a causar enfermedades a la población humana con un bajo número de células: 100 UFC g⁻¹ y 144 UFC g⁻¹ respectivamente; estos microorganismos forman parte de la microbiota intestinal del ganado bovino, ovino y caprino; estas especies son consideradas como el principal reservorio de estos microorganismos por lo que la carne y leche así como sus derivados son los principales vehículos de transmisión de ETAs (FDA, 1999) (OMS, 2012).

Las ETAs se definen como un conjunto de síntomas y signos clásicos originados por el consumo de agua o alimentos contaminados con agentes patógenos o sustancias tóxicas, en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica (USDA, 2011).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1999) la contaminación biológica es la causa más frecuente de ETAs, estas resultan de la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos patógenos vivos, o sus toxinas

Se considera a las ETAs como uno de los problemas de salud más relevantes, por su impacto social, tecnológico, económico, cultural y político. Se estima que cada año se reportan 1,500 millones de episodios de diarrea que ocasionan 3 millones de muertes en infantes menores de 5 años y dependiendo de la región, 15 a 70% de esos casos son causados por alimentos contaminados. También se estima que en países industrializados se informa sólo el 10% de los casos, mientras que en los países en vías de desarrollo se informa solo el 1% (FAO/OMS, 2006).

La inocuidad alimentaria puede definirse como la “garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado e ingerido de acuerdo con el uso que debe dársele”, siempre con un nivel de riesgo aceptable. También puede entenderse como la implementación de medidas que protejan al consumidor, reduciendo en los alimentos, los contaminantes físicos, químicos y biológicos (Codex Alimentarius, 2003)

Las zoonosis y las contaminaciones exógenas y endógenas por bacterias patógenas en los animales son importantes por la gravedad de las infecciones que producen en el hombre. La carne, por su propia naturaleza y origen, no sólo es muy susceptible a la contaminación, sino que con frecuencia está implicada en la presentación de ETAs (Zarco-González, 1999).

La carne de los animales faenados en condiciones de buenas prácticas de manufactura es estéril desde el punto de vista práctico. Por ello, el perfil microbiológico de la carne fresca que se comercializa a la población consumidora es de suma importancia; ya que es un conjunto de actividades realizadas durante las operaciones de faena, almacenamiento, transporte y distribución. El músculo post-mortem ofrece un ambiente altamente idóneo para las bacterias que representan un peligro microbiológico (Escutia-Sánchez, 1996).

La carne se contamina con microorganismos patógenos por contacto con el pelo, piel, patas, contenido estomacal y entérico, leche de la ubre, sangre, semen, bilis, etc., instalaciones y equipamiento, superficies de contacto, manos y ropa de los trabajadores e, incluso, con el medio ambiente de las zonas de proceso y de almacenamiento (Rosmini *et al.*, 1994).

Los enfoques basados en los factores de riesgo que pudiera representar la carne para la salud humana han sido plenamente demostrados como uno de los factores más peligrosos, debido a que una posible contaminación microbiológica, que pudiera pasar desapercibida; son más comunes que muchas anomalías muy obvias que se detectan durante la inspección ante mortem y post mortem. Esta situación ha multiplicado la demanda de enfoques más sistemáticos para combatir estos peligros, por ejemplo, los sistemas HACCP. (Hathaway, 1993).

La higiene de la carne se define así: "todas las condiciones y medidas necesarias para garantizar la inocuidad y aptitud de la carne en todas las etapas de la cadena alimentaria" (FAO, 2004).

Las condiciones sanitarias deficientes en muchos rastros pueden llegar a generar contaminación exógena de la carne, que pudieran ser derivadas de las malas condiciones en las instalaciones, equipo obsoleto, malas condiciones de aseo en los locales donde se procesan las canales, mesas de trabajo y vehículos en mal estado en los que se transportan las mismas, malos hábitos sanitarios del personal, ineficaz limpieza de utensilios e indumentaria de trabajo, falta de aseo en los servicios sanitarios destinados al personal del rastro, falta de estrategias tendentes a evitar la proliferación de fauna nociva entre otros (Beltrán, 1996).

La situación sobre el control sanitario de los alimentos en los países subdesarrollados dista todavía de llegar a los niveles de control sanitario aceptables, sobre todo en el caso de alimentos consumidos popularmente. Por ser, las ETA, un problema recurrente en estos

países las autoridades, instancias gubernamentales e instituciones afines, del sector público como privado, deberían de implementar programas de vigilancia y asistencia continua para prevenir y corregir situaciones potencialmente peligrosas y finalmente afectar adversamente la salud de la población (FAO/OMS, 2006).

En varios países la inocuidad es responsabilidad de la Secretaría de Agricultura para productos frescos y de la Secretaría de Salud para productos procesados. También actúa la Secretaría de Economía, usualmente a través del Consejo de Ciencia y Tecnología, para la generación, difusión e implementación de la normativa. Cada una de estas entidades tiene mandatos específicos, de manera que es de vital importancia definir y acotar las funciones que cada institución debe aplicar: para que no ocurra una duplicidad de funciones. Lo verdaderamente importante es que exista una auténtica coordinación pública privada y buena vinculación entre los actores de las diversas cadenas como son: productores, procesadores, distribuidores, almacenadores, hasta llegar al consumidor (SE, 2008).

Normas Oficiales Mexicanas para carne.

Tienen por objeto establecer las especificaciones sanitarias que deben cumplir todos los actores de la cadena productiva, así como el producto mismo.

Las NOM son de observancia obligatoria para las personas físicas o morales que se dedican al sacrificio, faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio de sus productos.

El gobierno mexicano cuenta con varias normas en lo concerniente a las operaciones de los establecimientos destinados a procesar animales para consumo humano y sus derivados, una de ellas es la 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. Especificaciones sanitarias de productos. D.O.F 18 de septiembre de 2004. De esta norma se desprenden varios conceptos de importancia, algunos son los siguientes:

- **Animal o animal para abasto**, a todo aquel que se destina al sacrificio y faenado como bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves domésticas, equinos, lepóridos o cualquier otra especie silvestre no acuática destinada al consumo humano.
- **Inspección post-mortem**, al procedimiento por el cual se efectúa el examen de las canales, vísceras, cabezas y patas de los animales faenados, para decidir si son o no aptos para consumo humano
- **Canal**, al cuerpo del animal después de haber sido insensibilizado, sacrificado, sangrado, y desprovisto de cerdas, plumas y vísceras; que puede conservar según la especie, la piel, cabeza, patas, riñones o cola.
- **Carne**, a la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, ¡vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de los animales para abasto, ¡que no ha sido sometida a

ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas.

- **Evisceración**, a la extracción de las vísceras contenidas en las cavidades torácica, abdominal, craneana y bucal de las especies de animales consideradas aptas para el consumo humano pudiendo o no extraerse los riñones.
- **Faenado**, a la etapa posterior al sacrificio de los animales para abasto y según la especie, eliminación de la cabeza, patas, piel, cerdas, plumas y vísceras, así como la limpieza de la canal, vísceras y cabeza.
- **Rastro**, a todo establecimiento dedicado al sacrificio y faenado de animales para abasto. Con capacidad diaria de sacrificio de al menos 28 cabezas de ganado mayor, o 56 de ganado menor o 1000 aves domésticas, o una combinación considerando la relación de dos cabezas de ganado menor por una de ganado mayor o de 35 aves domésticas por un animal de ganado mayor.
- **Contaminación**, a la presencia en un producto o materia prima, de microorganismos, hormonas, bacteriostáticos, sustancias químicas, radioactivas y materia extraña, en cantidades que rebasen los límites establecidos por la normatividad sanitaria vigente o que representen un riesgo para la salud del consumidor.
- **Límite máximo**, a la cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, biotoxinas y residuos de medicamentos, entre otros; que no se debe exceder en los productos.

Esta NOM también establece un límite máximo para *Escherichia coli* y *Salmonella* spp.

Cuadro 1. NOM-194-SSA1-2004. Especificaciones sanitarias, límite máximo de microorganismos (mamíferos y aves domésticas).

Producto	<i>E. coli</i> UFC/g Límite máximo	<i>Salmonella</i> en 25 g
Congelado	No aplica	Ausente
Refrigerado	1000	Ausente
Carne molida refrigerada	5000	Ausente
Envasado al vacío o en atmósfera modificada	No aplica	Ausente

Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células. (Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa).

La Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para La Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa. Identifica a los microorganismos coliformes, dentro de los cuales se encuentra *E. coli*, como el grupo de microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para: La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos, para la evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario, para una evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo, evalúa la calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos y permite la demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, que puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales (NOM-113-SSA1-1994).

La inocuidad alimentaria es tema de importancia en salud pública. El consumo de carne contaminada o de mala calidad es causa de enfermedades en poblaciones humanas expuestas (Momtaz *et al.*, 2013).

E. coli y *Salmonella* sp. son las principales bacterias patógenas que contaminan la carne bovina, pueden infectar al humano con un bajo número de células 100 UFC/g y 144 UFC/g respectivamente. Las serovariedades de *Salmonella* sp. Producen principalmente fiebre tifoidea y paratifoidea mientras que *E. coli* O157 produce síndrome urémico hemolítico precedido por colitis hemorrágica (D'aoust, 2009; OMS, 2012)

Los principales agentes patógenos causantes de diarrea aguda por ETAs incluyen: Rotavirus y otros tipos de virus intestinales, bacterias diversas como diferentes patotipos diarreogénicos de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Entamoeba histolytica*, entre otros (Marcos and DuPont, 2007).

La Comisión Federal para la protección contra riesgos sanitarios (COFEPRIS) emitió un Documento publicado en 2006 que contiene los resultados de la evaluación de riesgos sanitarios realizado en 306 en rastros y mataderos municipales. Contiene un diagnóstico sobre el vertido de aguas residuales y decomisos generados en dichos establecimientos. (COFEPRIS, 2006). En este documento nos dice que existe un porcentaje promedio del 18% de la faena anual de bovinos, ovinos, caprinos y porcinos, que se efectúa en establecimientos con riesgos sanitarios alto o muy alto. También menciona que, si consideramos el nivel de riesgo de los rastros municipales, en función del tamaño de la población a la cual surten de carne, que casi el 70% de los establecimientos que proveen de carne a las localidades con una población entre 50,000 y 100,000 habitantes tienen un nivel de riesgo alto o muy alto. Esa proporción disminuye a medida que analizamos las poblaciones con mayor número de habitantes, observándose que, en estos casos, la carne es provista por establecimientos que, en su mayor parte, son considerados como de bajo o medio riesgo sanitario. Derivado de este documento menciona que México es un país en el que se consumen grandes cantidades de vísceras, entre las que se pueden mencionar el hígado, riñones, sesos, médula espinal, lengua, intestinos, panza y corazón. Considerando el peso promedio de cada uno de ellos, fue posible estimar que el volumen de vísceras generadas anualmente en rastros y mataderos, considerados con niveles de riesgo alto y muy alto, asciende a, 253.34 toneladas obtenidas de ovinos y caprinos.

Resistencia a los antibióticos.

La resistencia antibiótica es un fenómeno biológico natural debido a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genético, existiendo una clara correlación entre el uso de antibióticos y la resistencia bacteriana (Lahey, 2011).

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), existen principalmente dos métodos de supervisión de resistencia: *in vivo* (fracasos terapéuticos) o *in vitro* (estudios en el laboratorio, en “tubos de ensayo”). Dentro de los métodos *in vitro*, están los fenotípicos (Kirby-Bauer o concentración mínima inhibitoria) y los moleculares cuando se hacen pruebas genéticas. La vigilancia molecular, se basa en la identificación de genes que codifican los mecanismos de resistencia en las bacterias y que representan el futuro de la vigilancia de resistencia antibiótica. Estos genes suelen expresarse más ante el uso de un antibiótico específico, sin embargo, pueden generar también resistencia cruzada, afectando otros antibióticos de la misma clase o con el mismo mecanismo de acción, incluso a compuestos de familias diferentes (Mc Donnell and Rusell, 1999; Anderson, 2010; Santos *et al.*, 2010).

El fenotipo de resistencia antibiótica es perceptible gracias a la presencia de uno o más mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en la bacteria. Dentro de los tipos de mecanismos moleculares de resistencia destacan por su relevancia: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad (Boza y Barrentes, 2001; Tenover, 2006).

Las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia hacia ampicilina (β -lactámico), trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico por lo que hay que determinar la prevalencia de los diferentes genes relacionados a nivel molecular (Tenover, 2006; Cabrera *et al.*, 2007; Mosquito *et al.*, 2011).

Para que se desarrolle la resistencia son necesarias dos condiciones:

- a) El contacto persistente del microorganismo con el antibiótico.
- b) El contacto debe darse con una concentración de antibiótico que permita la supervivencia del microorganismo (Antunes *et al.*, 2013).

Desde un punto de vista genético, son dos los principales mecanismos que gobiernan la presentación de resistencias:

- a) Transmisión Vertical: mutación de un gen existente.
- b) Transmisión Horizontal: Adquisición de un nuevo gen que gobierna la resistencia a partir de otras bacterias (Gimeno y Ortega, 2005)

La transmisión horizontal tiene 3 mecanismos de transferencia de genes entre bacterias:

- a) Conjugación: las bacterias se ponen en contacto y hay transmisión directa de ADN de una bacteria donante a una receptora.
- b) Transformación: liberación de material genético en el medio extracelular y su captación por otra bacteria.

c) Transducción: transferencia por medio de virus bacteriófagos que actúan como vectores de una bacteria donante a una receptora (Antunes *et al.*, 2013; Gimeno y Ortega 2005).

Esto demuestra que la transmisión no solo se lleva a cabo de forma vertical entre la descendencia, también se lleva a cabo de manera lateral a individuos no necesariamente emparentados, con los que termina compartiendo trozos de su genoma (Mosquito *et al.*, 2011; Antunes *et al.*, 2013).

Los mecanismos que producen resistencia a los fármacos antibacterianos incluyen; la producción de enzimas por bacterias, que destruyen o inactivan el compuesto y la reducción de la permeabilidad de las bacterias. Las bacterias también pueden desarrollar rutas metabólicas alternativas a aquellas que resultan inhibidas por la sustancia antibacteriana, los antibióticos pueden eliminarse de la bacteria o pueden alterarse estructuralmente la diana de este. La alteración del sitio diana y la destrucción enzimática del agente son probablemente los mecanismos más habituales por los que puede ocurrir la resistencia (Quinn *et al.*, 2005).

Mecanismos bioquímicos de la resistencia a antibióticos.

1.- Inactivación enzimática del antibiótico: consiste en la síntesis por parte de las bacterias a ciertas enzimas que modifican la estructura de la molécula antibiótica provocando la anulación de su función, el ejemplo más típico es la producción de β -lactamasas, este mecanismo depende muchas veces de plásmidos resistentes (Gimeno y Ortega, 2005).

La presencia de β -lactamasas de espectro extendido mediadas por plásmidos es cada vez más preocupante, la mayoría son mutantes e hidrolizan a las cefalosporinas y las penicilinas (Zavod, 2004).

2.- Disminución de la permeabilidad hacia el antibiótico: por modificación de una barrera preexistente como el cambio en determinadas porinas de membrana que imposibilitan el paso del fármaco, por extrusión activa del antibiótico como ciertos plásmidos "R" que contienen transposones que codifican un sistema para bombear tetraciclina desde el interior bacteriano hacia el exterior en contra del gradiente de concentración, también puede ser por alteración del mecanismo de transporte específico del antibiótico, en *E. coli* la cicloserina entra aprovechando el sistema de transporte de la valina o de la glicina, por la que determinados mutantes incapaces de transportar estos aminoácidos son resistentes a la glicoserina (Gimeno y Ortega, 2005).

3.- Modificación química de la diana del antibiótico: ciertas modificaciones que afectan a las estructuras bacterianas donde actúan los antibióticos imposibilitan la acción de estos (Gimeno y Ortega, 2005).

4.- Síntesis de una nueva enzima resistente: estas nuevas enzimas presentan más resistencia a la acción de los antibióticos por su menor afinidad a estos (Gimeno y Ortega, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que la información sobre este microorganismo es amplia alrededor del mundo y que es considerado como un factor de riesgo importante para la salud pública, en el Estado de México la información es escasa, siendo la entidad federativa con la mayor producción y sacrificio de ovinos en el país.

En México existen patotipos de *Escherichia coli* en ovinos, de manera natural, que pueden estar involucrados en enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) por lo que consideramos que el conocimiento de las moléculas implicadas en la fisiopatogenia bacteriana constituye la base racional para el desarrollo de estrategias preventivas viables.

Los diferentes factores de virulencia atribuidos a cada clasificación pueden contribuir a la presentación de brotes de enfermedades gastrointestinales en la población humana. Con la ayuda de la biología molecular, concretamente el PCR, se puede realizar una adecuada caracterización para poder determinar la presencia de patotipos diarrógenicos de *E. coli* y saber si pudieran llegar a representar un posible factor de riesgo que pudieran estar presentes en los ovinos muertos en un rastro del Estado de México.

IV. HIPOTESIS.

Los aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de ovinos sacrificados en el Estado de México, pertenecen a 5 patotipos diarrogénicos (STEC, EPEC, ETEC, EIEC y EAEC) de *E. coli*.

Los aislamientos de *E. coli* productores de toxina shiga (STEC) son portadores de las principales variantes de *stx*₁: *stx*_{1a}, *stx*_{1c}, *stx*_{1d} y las variantes de *stx*₂: *stx*_{2a}, *stx*_{2b}, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, y *stx*_{2g}

Los aislamientos de *E. coli* obtenidos presentan 50% de resistencia antimicrobiana a los antibióticos β-lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos.

V. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Realizar la caracterización molecular de los aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos a partir de hisopados rectales y de canal en ovinos faenados en un rastro del Estado de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar la serotipificación de los aislamientos mediante el esquema de serotipificación de referencia de antígenos somáticos y flagelares (O/H).
- Identificar los patotipos de *E. coli*, sugeridos por la serotipificación, a través de la detección de los principales genes de virulencia (PCR)
- Identificar las variantes *stx*₁: *stx*_{1a}, *stx*_{1c}, *stx*_{1d} y las variantes de *stx*₂: *stx*_{2a}, *stx*_{2b}, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f} y *stx*_{2g} de los aislamientos STEC, por medio de la prueba de PCR
- Identificar los grupos filogenéticos, mediante el sistema modificado de Clermont *et al.*, 2013
- Determinar la resistencia fenotípica a Quinolonas, β-lactámicos, Aminoglucosidos y Tetraciclinas, a los aislamientos con algún patotipo confirmado, mediante la prueba de Kirby-Bauer.
- Identificar genes de resistencia (*bla-tem*, *sul 1*, *sul 2*, *tetA* y *tetB*), a los aislamientos con algún patotipo confirmado por medio de la prueba de PCR

VI. MATERIAL Y METODO.

Determinación del tamaño de la muestra.

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula para poblaciones finitas (Waine, 1991) considerando una prevalencia del 12.3% de STEC (Etcheverría *et al.*, 2010), se tomó el número de animales sacrificados semanalmente, teniendo un total de 900 ovinos, un nivel de confianza del 95 % (Wayne, 1991) obteniéndose una n de 140. El muestreo se realizó durante los meses de septiembre del 2017 a enero del 2018, fueron recolectadas 321 muestras en total, de las cuales 162 fueron de canal y 159 muestras fueron de hisopado rectal.

$$n = \frac{Nzpq}{d^2(N-1)z^2pq}$$

Donde:

n= tamaño de muestra

N= población

z= intervalo de confianza (1.96)

p= prevalencia (12.3%)

q= 1-p

d= significancia

Sustitución

$$n = 188(1.96)^2$$

$$n = \frac{188(1.96)^2(.20)(.80)}{(0.05)^2(188-1) + (1.96)^2(.20)(.80)}$$

$$n = \frac{115.55}{0.4675 + 0.614656}$$

$$n = \frac{115.55}{1.082150}$$

N= 140

(Waine, 1991)

Toma de muestras de hisopado rectal y canal en el rastro municipal.

Una vez que a los ovinos se les retiro la piel y previo a la evisceración por parte del personal de rastro, fue introducido un hisopo estéril para obtener la muestra de heces frescas. Se utilizaron hisopos con medio de transporte Stuart para evitar la desecación de la muestra. Las muestras fueron identificadas con los siguientes datos: fecha y tipo de muestra.

La muestra de la canal se tomó después del lavado y antes de ser sometidas a refrigeración, se utilizó el método no destructivo con un hisopo en peptona al 0.1%+NaCl al 0.85 % según lo recomendado por la Unión Europea (Official Journal of the European Community L165/48. European Directive 2001/471/EC.). Posteriormente cada hisopo se depositó en un tubo tipo Falcón con 25 ml de agua peptonada al 1 %.

Los hisopos, fueron transportados inmediatamente, en condiciones de refrigeración, al área de bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Aislamiento bacteriológico de *E. coli* e identificación bioquímica.

Las muestras fueron inoculadas en agar Mc-Conkey (SMAC, Beckton Dickinson, USA). Después de 24 horas de incubación a 37°C, las colonias de color rosado se sembraron en agar Eosina-azul de metileno (EMB) (SMAC, Beckton Dickinson, USA) para observar el característico brillo metálico, se realizó una tinción de Gram, para observar su morfología seleccionándose las cepas sugerentes de *E. coli* (USDA, 2002), estas colonias fueron identificadas por pruebas bioquímicas: TSI, SIM, RMVP, Urea, malonato, fenilalanina, gluconato, citrato y sorbitol (Farmer 1995) (Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina. UNAM), se realizó la interpretación de acuerdo con lo establecido por la USDA 2015.

Los aislamientos confirmados como *E. coli* se congelaron a -80°C en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol 50% con el fin de conservar los aislamientos para su posterior uso.

Serotipificación.

Se realizó según el procedimiento descrito por Orskov and Orskov (1984). Fueron empleados sueros específicos anti-O y anti-H (SERUNAM, México) para 187 antígenos somáticos y 53 flagelares.

Antígeno somático O: El procedimiento consistió en inocular en un tubo de 16×150 mm con $10 \mu\text{L}$ (inclinado) TSA que se incubó a 24 ± 2 h a 37°C , posteriormente se colocó $10 \mu\text{L}$ de solución salina, fue agitado para poder obtener la bacteria fresca y se procedió a vaciar en un tubo. Dicho tubo se calentó a vapor fluente a 100°C durante 2 horas, posteriormente se adicionaron $10 \mu\text{L}$ de formalina para obtener el antígeno.

En una placa de 96 pozos se colocaron $100 \mu\text{L}$ de cada uno de los sueros (167), y en cada pozo se colocaron $50 \mu\text{L}$ del antígeno, fueron cubiertos los pozos con plástico y se incubaron a 24 ± 2 h a 50°C . La lectura se realizó anotando todos los sueros que mostraron aglutinación. De cada uno de los sueros en donde hubo aglutinación se realizaron diluciones para lo cual se colocaron en el primer pozo $100 \mu\text{L}$ del suero y en los 7 pozos restantes $50 \mu\text{L}$ de solución salina, se realizaron las diluciones tomando $50 \mu\text{L}$ de pozo 1 al 8, posteriormente en cada pozo se colocaron $50 \mu\text{L}$ de antígeno. Fueron incubados a 24 ± 2 h a 37°C . por último, se realizó la lectura tomando los títulos encontrados (OMS, 2005).

Antígeno somático H: El procedimiento consistió en inocular el medio de Craigie fraccionado en tubo de ensayo con varilla de vidrio al centro se inculó en el centro de la varilla hasta la mitad. Fueron incubados a 37°C , se revisó el crecimiento cada 24 horas para determinar si hay movilidad de las bacterias, una vez observada la movilidad, se tomó una porción del medio y se inoculo en biotriptasa y se incubo 24 ± 2 h a 37°C . Posteriormente se adiciono $10 \mu\text{L}$ de formalina para obtener el antígeno.

En una placa de 96 pozos se colocaron $100 \mu\text{L}$ cada uno de los sueros (75), y en cada pozo se colocaron $50 \mu\text{L}$ del antígeno, fueron cubiertos los pozos con plástico para ser incubados a 24 ± 2 h a 50°C . La lectura se realizó anotando todos los sueros que aglutinaron. De cada uno de los sueros en donde hubo aglutinación se realizaron diluciones partiendo con sueros puros mismo que se colocaron en el primer pozo $100 \mu\text{L}$ colocando en los 7 pozos restantes $50 \mu\text{L}$ de solución salina, y se realizaron las diluciones tomando $50 \mu\text{L}$ de pozo 1 al 8, posteriormente en cada pozo se colocaron $50 \mu\text{L}$ de antígeno. Fueron incubados durante 24 ± 2 h a 37°C para realizar la lectura anotando los títulos encontrados.

Factores de virulencia.

Para identificar la presencia de cepas STEC, se analizaron por PCR, la presencia de los genes *stx*₁ y *stx*₂, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Scheutz *et al.* (2012) (Cuadro 2).

Para identificar la presencia de cepas EPEC, se analizaron por PCR, la presencia de los genes *eae* y *bfp*, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Kong *et al.* (2002) y Gunzburg *et al.* (1995) respectivamente (Cuadro 2).

Para identificar la presencia de cepas ETEC, se analizaron por PCR, la presencia los genes de los genes *LT* y *STp*, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Sjöling *et al.* (2007) (Cuadro 2).

Para identificar la presencia de cepas EIEC, se analizaron por PCR, la presencia del gen *ipaH*, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Li *et al.* (2009) (Cuadro 2).

Para identificar la presencia de cepas EAEC, se analizó por PCR, la presencia del gen *aggR*, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Czeczulin *et al.* (1999) (Cuadro 2).

Los productos del PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para detectar genes de virulencia

Gen	secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>vtx1</i>	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT	209	
<i>vtx2</i>	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	627 625	Scheutz <i>et al.</i> (2012)
<i>eae</i>	TCAATGCAGTTCCGTTATCAGTT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482	Kong <i>et al.</i> 2002
<i>Bfp</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	300	Gunzburg <i>et al.</i> , 1995
<i>LT</i>	ACGGCGTTACTATCCTCTC TGGTCTCGGTCAGATATGTG	273	
<i>STp</i>	TCTTTCCCCTCTTTTAGTCAG ACAGGCAGGATTACAACAAAG	166	Sjöling <i>et al.</i> , 2007
<i>ipaH</i>	TGAAAAAACTCAGTGCCTCT CCAGTCCGTAAATTCATTCT	423	Li <i>et al.</i> , 2009
<i>aggR</i>	CTAATTGTACAATCGATGTA ATGAAGTAATTCTTGAAT	308	Czeczulin <i>et al.</i> , 1999

Determinación de las variantes de la toxina shiga.

Para identificar la presencia de las variantes de toxina shiga 1 y 2 se analizaron, por PCR, la presencia de los genes: *stx*_{1a}, *stx*_{1c}, *stx*_{1d}, *stx*_{2a}, *stx*_{2b}, *stx*_{2c}, *stx*_{2d}, *stx*_{2e}, *stx*_{2f} y *stx*_{2g} utilizando los cebadores y condiciones descritas por Scheutz *et al.* (2012) (Cuadro 3).

Los productos del PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para detectar las variantes de la toxina shiga

Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>vtx1a</i>			
<i>vtx1a-F1</i>	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT	478	
<i>vtx1a-R2</i>	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG		
<i>vtx1c</i>			
<i>vtx1c-F1</i>	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT	252	
<i>vtx1c-R1</i>	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA		
<i>vtx1d</i>			
<i>vtx1d-F1</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	203	
<i>vtx1d-R1</i>	CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA		
<i>vtx2a</i>			
<i>vtx2a-F2</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	349	Scheutz <i>et al.</i> , 2012
<i>vtx2a-R3</i>	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG		
<i>vtx2a-R2</i>	GGCCACCTTCACTGTGAATGTG	347	
<i>vtx2b</i>			
<i>vtx2b-F1</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	251	
<i>vtx2b-R1</i>	CAGCAAATCCTGAACCTGACG		
<i>vtx2c</i>			
<i>vtx2c-F1</i>	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA	177	
<i>vtx2c-R2</i>	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA		
<i>vtx2d</i>		179	

<i>vtx2d-F1</i>	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	
<i>vtx2d-R1</i>	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	
<i>vtx2d-R2</i>	GCCTGATGCACAGGTAAGTGGAC	280
<i>vtx2e</i>		
<i>vtx2e-F1</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	411
<i>vtx2e-R2</i>	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	
<i>vtx2f</i>		
<i>vtx2f-F1</i>	TGGGCGTCATTCCTGTTG	424
<i>vtx2f-R1</i>	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	
<i>vtx2g</i>		
<i>vtx2g-F1</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	573
<i>vtx2g-R1</i>	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	

Determinación de grupos filogenéticos.

Se realizó la PCR cuádruplex para identificar los grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F) los iniciadores utilizados fueron descritos por Clermont *et al.* (2013), para detectar los genes *chuA*, *yjaA*, *arpa* y el fragmento *TspE4.C2* (Cuadro 4).

Los productos del PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

Cuadro 4. Iniciadores utilizados para determinar grupos filogenéticos

Gen	Secuencia (5' – 3')		Referencia
<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	
<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	
<i>TspE4.C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152	Clermont et al. (2013)
<i>arpa</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

La sensibilidad antimicrobiana se evaluó mediante una prueba de difusión con discos estandarizada por el Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2017). Se usaron como controles las cepas de *E. coli* ATCC 25922 y ATCC 35218 del American Type Culture Collection (ATCC). Se preparó el inóculo bacteriano de cada aislamiento en tubos de ensayo con caldo Mueller Hinton (MH) (SMAC, Beckton Dickinson, USA) con un patrón de turbidez de 0.5 en la escala de McFarland lo que equivale aproximadamente de 1 a 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). Se introdujo en el tubo de ensayo inoculado un hisopo estéril de algodón el cual se sumergió completamente y se frotó un poco en las paredes del tubo para retirar el exceso de líquido de este quedando listo para inocular la placa (CLSI, 2017).

Para sembrar las cajas petri con agar MH, se estrió el hisopo con la suspensión de bacteria sobre toda su superficie en forma paralela y compacta, este paso se repitió dos veces más rotando la placa aproximadamente 60 grados cada vez para asegurar una distribución uniforme del inóculo, finalmente se barrió el hisopo sobre el borde de la placa; cada caja sembrada se dejó secar durante 2-3 min. (CLSI, 2017).

Dentro de los 15 min posteriores que las cajas de petri fueron sembradas, se procedió a colocar los multidiscos con una pinza estéril, asegurándose de que hagan contacto con la superficie del agar. Posteriormente las placas se invirtieron e incubaron por 18 hrs a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (CLSI, 2017). La lectura se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm con un vernier. Los aislamientos se clasificaron como susceptibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) de acuerdo con los estándares de CLSI (CLSI, 2017).

Se ocuparon sensidiscos de: ampicilina 10 μg (AM), cefalotina 30 μg (CF), ceftazidima 30 μg (CFZ), amikacina 30 μg (AMK), ciprofloxacino CPF (5 μg), gentamicina GM (10 μg), fosfomicina FO (50 μg), netilmicina NET (30 μg), sulfametaxol-trimetropim STX (25 μg), norfloxacina NOR (10 μg), nitrofuranos MAC (300 μg) y tetraciclina TE (30 μg) (BBL™ Sensi-Disc™ Becton Dickinson. USA).

Genes de Resistencia antibiótica.

Para identificar la presencia de genes de resistencia a β -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas, se analizaron por PCR, los genes: *bla-tem*, *tetA*, *tetB*, *sul1* y *sul2*.

La identificación molecular de los genes de resistencia antimicrobiana se llevó a cabo mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores y condiciones descritas por Kern *et al.* (2002), Martí *et al.* (2006) y Dallene *et al.* (2010), respectivamente (Cuadro 5).

Los productos del PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, como controles positivos se tomaron aislados de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Cuadro 5. Iniciadores utilizados para detectar genes de resistencia.

Gen	secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)	Referencia
-----	---------------------	-------------	------------

<i>sul1</i>			
<i>sul1 F</i>	CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG	433	
<i>sul1 R</i>	GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG 3		
			Kern <i>et al.</i> (2002)
<i>sul2</i>			
<i>sul2 F</i>	GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT	293	
<i>sul2 R</i>	GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT		
<i>tetA</i>			
<i>tet A F</i>	GTA ATT CTG AGC ACT GTC GC	950	
<i>tet A R</i>	CTG CCT GGA CAACAT TGC TT		
			Martí <i>et al.</i> (2006)
<i>tet B</i>			
<i>tet B F</i>	GTT AGG GGC AAG TTT TG	650	
<i>tet B R</i>	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG		
<i>BlaTEM</i>			
<i>MultiTSO-T BlaTEM F</i>	CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C	800	Dallenne <i>et al.</i> (2010)
<i>MultiTSO-T BlaTEM R</i>	CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C		

VII. RESULTADOS.

Artículo Aceptado

SANIDAD

Perfil de cepas diarrogénicas de *Escherichia coli* aisladas de borregos muertos en un rastro del Estado de México

Edgar Enriquez-Gómez¹, Edgardo Soriano-Vargas², Martín Televera-Rojas¹, Armando Navarro Ocaña¹, María Del Rosario Morales Espinosa³, Jorge Acosta-Díbarra^{1*}

¹ Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Toluca, México

² Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

³ Laboratorio de Genética Bacteriana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

Resumen

Los ovinos sanos son uno de los principales reservorios de serotipos de *Escherichia coli* diarrogénica (ECDA) y es sabida su importancia como causante de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). El objetivo de este trabajo fue caracterizar los aislamientos de ECDA obtenidos de hisopados rectales y muestras de canal obtenidos de ovinos en un rastro del Estado de México. Fueron obtenidos 159 muestras de hisopados rectales y 162 muestras de hisopado de canal. Los aislamientos de *E. coli* fueron confirmados por pruebas bioquímicas. Se realizó la serotipificación empleando sueros específicos anti-O y anti-H (SERUNAM, México). Se obtuvieron 90 aislamientos identificados bioquímicamente como *E. coli*. Con una frecuencia de aislamientos del 28%, de los cuales 75 fueron aislados del recto y 15 de canal. Fue posible encontrar cuatro patotipos diferentes: 43/47.7%

E. coli productor de toxina shiga (STEC) 3/3.3% *E. coli* enteropatógena (EPEC) 2/2.2% *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y 1/1.1% *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Los serotipos con importancia en salud pública con mayor número de aislamientos fueron: O75:H19 (5), O146:H21 (3), O91:H10 (1), O104:H2 (2), O6:NM (1) y O8:NM (1) que han sido señalados como causantes de diarrea en población humana. Se obtuvieron dos aislamientos del serogrupo O104 de importancia en salud pública en Europa. Estos resultados demuestran la importancia de *E. coli* presentes en heces y canales ovinos como factor de riesgo potencial a la salud pública debido probablemente a contaminación cruzada en el momento de la faena.

Palabras clave: *Escherichia coli*. Patotipos. Ovinos. Rastros.

XI Congreso de la ALEP y CS

* Autor correspondiente: jpeacosta00@hotmail.com

Rev. Acad. Cienc. Anim., 2019;17(Supl 1):473-475.

ISSN: 2596-2868

Artículo enviado.

The Journal of Infection in Developing Countries Tasks 0 English View Site acosta_20_jdc

JIDC THE JOURNAL OF INFECTION IN DEVELOPING COUNTRIES

Submission Library View Metadata

Submissions

#14001 | Characterization and antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates obtained from slaughtered sheep in México.
 Jorge Acosta-Dibarrat, Edgar Enriquez-Gómez, Martín Talavera-Rojas, Edga...

Submission Review Copyediting Production

Round 1

Round 1 Status
 A review is overdue.

Review Discussions [Add discussion](#)

Name	From	Last Reply	Replies	Closed
No Items				

1 **CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN**
 2 **COMMENSAL *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES OBTAINED FROM**
 3 **SLAUGHTERED SHEEP IN MEXICO.**
 4
 5 Edgar Enriquez-Gómez^a, Martín Talavera-Rojas^a, Edgardo Soriano-Vargas^a, Armando
 6 Navarro^b, Rosario Morales-Espinosa^c Jorge Acosta-Dibarrat^{a*}
 7
 8 ^aCentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Facultad de Medicina
 9 Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Estado de
 10 México, México
 11 ^b Department of Public Health, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de
 12 México. Avenida Universidad 3000, Colonia Copileo, Delegación Coyoacan, C.P. 04510,
 13 México City, México
 14 ^c Laboratory of Bacterial Genomics, Department of Microbiology and Parasitology, Faculty
 15 of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000,
 16 Colonia Copileo, Delegación Coyoacan, C.P. 04510, México City, México
 17
 18 *Corresponding autor. Jorge Acosta-Dibarrat. Tel.: +521 722. 2965555. Postal address. Km
 19 15.5 Carretera Panamericana. Toluca Mex. Cp 50200.
 20 E-mail address: jpacosta00@hotmail.com

Artículo enviado

Archives of Microbiology
CHARACTERIZATION OF DIARRHEAGENICESCHERICHIA COLI STRAINS
ISOLATED FROM SLAUGHTERED SHEEP IN MEXICO
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	AOMI-D-20-00360R1	
Full Title:	CHARACTERIZATION OF DIARRHEAGENICESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM SLAUGHTERED SHEEP IN MEXICO	
Article Type:	Original Paper	
Funding Information:	Universidad Autónoma del Estado de México (3998/2016R ED)	Dr Jorge Acosta-Dibarrat
Abstract:	<p>Abstract</p> <p>Sheep represent one of the main reservoirs of diarrheagenic <i>Escherichia coli</i>; this microorganism is an etiological agent of food-borne diseases, therefore, this work aimed to identify and characterize the principal pathotypes of diarrheagenic <i>E. coli</i> obtained through rectal swabs and samples from sheep carcasses slaughtered in an abattoir at the central region of Mexico. The isolates were subjected to bacteriological identification, serotyping, phylogenetic classification; detection for virulence factors, and antimicrobial sensibility. A total of 90 <i>E. coli</i> isolates were obtained, diarrheagenic serotypes with health public relevance were found: O78:H19 (5), O146:H21 (3), O91:H10 (2), O6:NM (1), and O8:NM (1). According to pathotype, 47.7% of total isolates were Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>, while 3.3% were enteropathogenic, 2.2% enterotoxigenic, and 1.1% enteroinvasive <i>E. coli</i>; the remaining isolates did not express the genes used to assign them to some pathotype. Regarding the Shiga toxin subtypes, 31/43 (72.09%) were cataloged as stx1c, 11/43 (25.5%), stx1a- stx1c and 1/43 (2.3%) stx1a- stx1d; while for stx2 it was possible identify stx2g 4/7(57.14%), stx2b 1/7 (14.7%) and stx2b-stx2g 2/7 (28.5%). Almost all pathotypes (91-100%) belonged to phylogroup B1. Furthermore, it was observed that the 90 isolates showed an antimicrobial resistance of 100% to nitrofurantoin, followed by ampicillin, tetracycline, and trimethoprim-sulfamethoxazole. These results highlight the importance of diarrheagenic <i>E. coli</i> as a potential risk for public health during the slaughtering process.</p>	
Corresponding Author:	Jorge Pablo Acosta-Dibarrat, Dr Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Toluca, Estado de México MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidad Autonoma del Estado de Mexico Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Edgar Enriquez-Gómez, M in C	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Jorge Acosta-Dibarrat, Dr Edgar Enriquez-Gómez, M in C Martín Talavera-Rojas, Dr Edgardo Soriano-Vargas, Dr. Armando Navarro, Dr. Rosario Morales-Espinoza, Dr.	
Order of Authors Secondary Information:		

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aris Systems Corporation

Archives of Microbiology
Editorial Manager

[HOME](#) • [LOGOUT](#) • [HELP](#) • [REGISTER](#) • [UPDATE MY INFORMATION](#) • [JOURNAL OVERVIEW](#)
[MAIN MENU](#) • [CONTACT US](#) • [SUBMIT A MANUSCRIPT](#) • [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#) • [PRIVACY](#)

Role: Author | Username: jpacosta00@hotmail.com

Revisions Being Processed for Author Jorge Pablo Acosta-Dibarrat, Dr

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Date Submission Began	Status Date	Current Status
View Submission Author Response View Reference Checking Results Correspondence Send E-mail	AOMI-D-20-00360R1	CHARACTERIZATION OF DIARRHEAGENICESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM SLAUGHTERED SHEEP IN MEXICO	27 Oct 2020	04 Nov 2020	Reviewers Assigned

Page: 1 of 1 (1 total revisions being processed) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

Una vez realizado el proceso de serotipificación a los aislamientos obtenidos y con base a los diferentes serogrupos O y diferentes serotipos O:H, según Sheutz and Strockbine (2001) arrojo cinco posibles patotipos diarrogénicos que fueron confirmados posteriormente mediante la expresión de los diferentes genes de virulencia por medio de PCR (Cuadro 6).

Cuadro 6. Posibles Patotipos detectados por serotipificación

SEROGRUPOS	SEROTIPOS
Enteroagregativas (EAggC)	Enterotoxigénicas en Humano (ETEC)
Enterotoxigénicas en Humano (ETEC)	Productora de toxina shiga en Humano (STEC no O157)
Enteroptágenas (EPEC)	Productora de toxina shiga en Animales (STEC no O157)
Enteroinvasiva (EIEC)	Productora de toxina shiga en Alimento de origen Animal. (STEC no O157)
Productora de toxina shiga en Humano (STEC no O157)	
Productora de toxina shiga en Alimento de origen Animal. (STEC no O157)	

De los 90 aislamientos de *E. coli*, 49, 54% (49/90) expresaron al menos un factor de virulencia correspondiente a algún patotipo diarrogénico y 41, 46% (41/90) aislamientos no expresaron algún factor de virulencia, por lo que podrían considerarse como aislamientos de *E. coli* comensales. (Cuadro 7)

Se realizó la detección de los principales genes de virulencia correspondientes a los 5 posibles patotipos: STEC (*stx₁*, *stx₂* y *eae*), EPEC (*eae* y *bfp*), ETEC (*LT* y *stp*), EIEC (*ipaH*) y EAEC (*aggR*). Una vez realizado el PCR punto final para detectar los principales genes de virulencia fueron confirmados 4 patotipos: STEC 47.7% (43/49), EPEC 3.3% (3/49), ETEC 2.2% (2/49) y EIEC 1.1% (1/49) para el patotipo EAEC ninguno de los aislamientos con posibilidad de posesión del gen *aggR*; expresó dicho gen (Cuadro 7).

Cuadro 7. Aislamientos sin factores de virulencia y patotipos detectados.

Patotipo	Aislamientos N (%)
Sin F. V.	41 (46%)
STEC	43 (47.7%)
EPEC	3 (3.3%)
ETEC	2 (2.2%)
EIEC	1 (1.1%)
TOTAL	90

Se detectaron seis serotipos de importancia en salud pública de México: O6, O8, O79:H19, O91:H10 y O146:H21 (Eslava *et al.*, 1994), 90.9% (10/11) aislamientos fueron del recto y 1 de canal, 9.09% (1/11), 90.9% (10/11) de los aislamientos pertenecen al grupo

filogenético B1 (comensal) y 1 aislamiento pertenece al grupo filogenético C (extraintestinal), se logró detectar un aislamiento O104, serogrupo que está clasificado como contaminante de la carne por la legislación europea (EFSA, 2013). Los serotipos O6, O104:H2 y O91:H10 han sido detectados como causantes de SHU (Sheutz and Strockbine, 2001). Estos aislamientos también expresaron MRA, dos aislamientos expresaron MRA para MAC-AM-TE y un aislamiento expreso MRA para MAC-AM-TE-SXT (Cuadro 8).

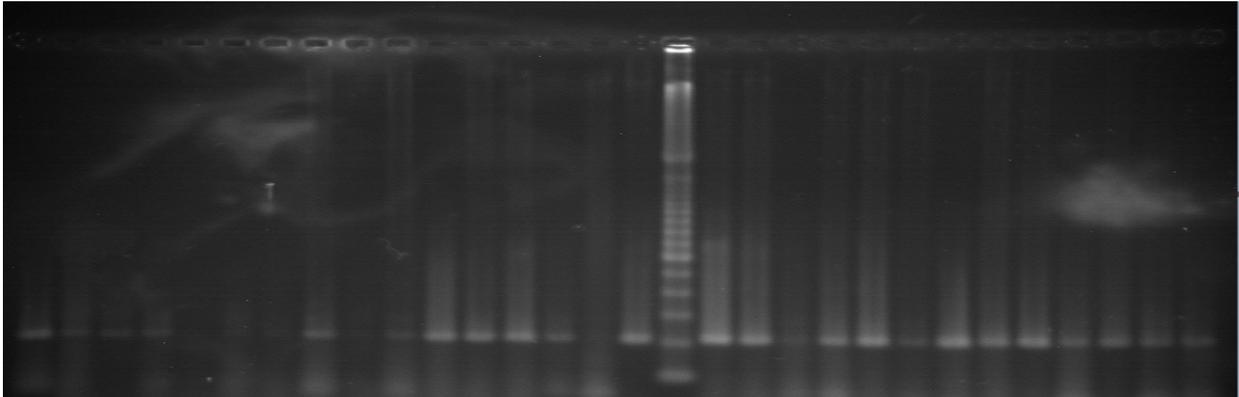
Se detectaron 47.7% (43/90) aislamientos que expresaron *stx*₁ (Figura No 1), y/o *stx*₂ (Figura No 2) y/o *eae*, por lo que pueden ser considerados como STEC; señalando que un solo aislamiento expreso *stx-eae* y se clasificaría como tSTEC (STEC típico) potencialmente virulento mientras que el resto de los aislamientos al no expresar el gen *eae* son clasificados como aSTEC (STEC atípico) de bajo potencial virulento (Cuadro 8).

Cuadro 8. Aislamientos STEC de importancia en Salud Pública.

Aislamiento	Serotipo	Muestra	Gen de virulencia		G.F	Perfil de resistencia				Gen de resistencia				
			<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂		MAC	AM	TE	SXT	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>sul 1</i>	<i>sul 2</i>	<i>bla-tem</i>
B15	O6:NM	Recto	1c		C	X	X							
E16	O8:NM	Recto	1c		B1	X	X	X						
C23	O146:H21	Recto	1c	2b-2g	B1	X	X							
Z3	O146:H21	Recto	1c		B1	X	X	X	X				X	
Z19	O146:H21	Recto	1c		B1	X								
C27	O91:H10	Recto	1c		B1	X	X			X				
Z17	O76:H19	Recto	1a- 1c		B1	X	X							
Z21	O76:H19	Recto	1c		B1	X						x		
Z26	O76:H19	Recto	1c		B1	X	X	X						
Z32	O76:H19	Recto	1a- 1c		B1	X	X					x		
Z34	O76:H19	Recto	1a- 1c	2b-2g	B1	X	X					x		
D28	O104:H2	Canal	1c		B1	X	X					x		

Figura No 1. Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx1*

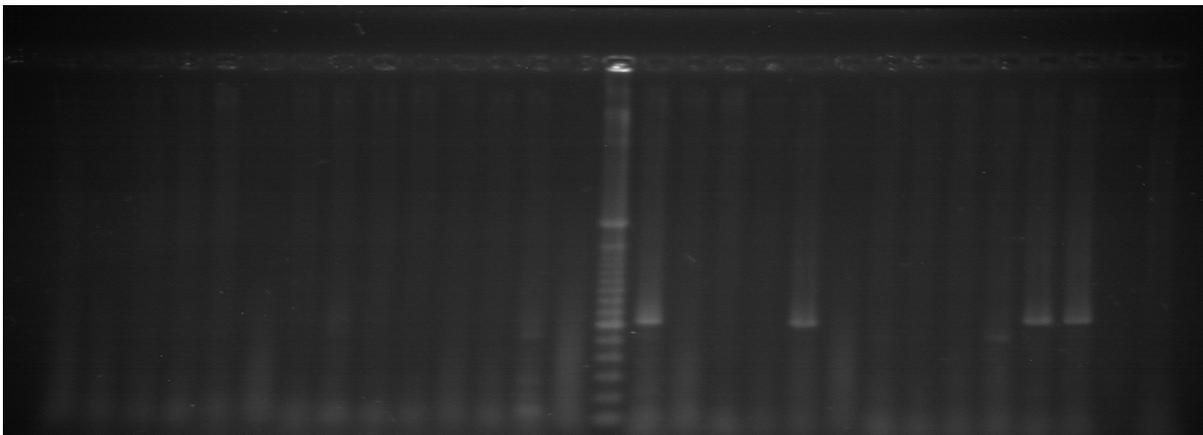
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



Vtx1 209 pb. Carriles 1, 2, 3, 4 muestras +, carril 5,6, 7 muestras -, carril 8 muestra + carril 9 muestra -, carril 10,11,12,14 muestras +, carril 15 control - *S. aureus*, carril 16 control + (EDL933), carril 17 MPM, carril 18,19 muestras +, carril 20 muestra-, carriles 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, muestras positivas.

Figura No 2. Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx2*

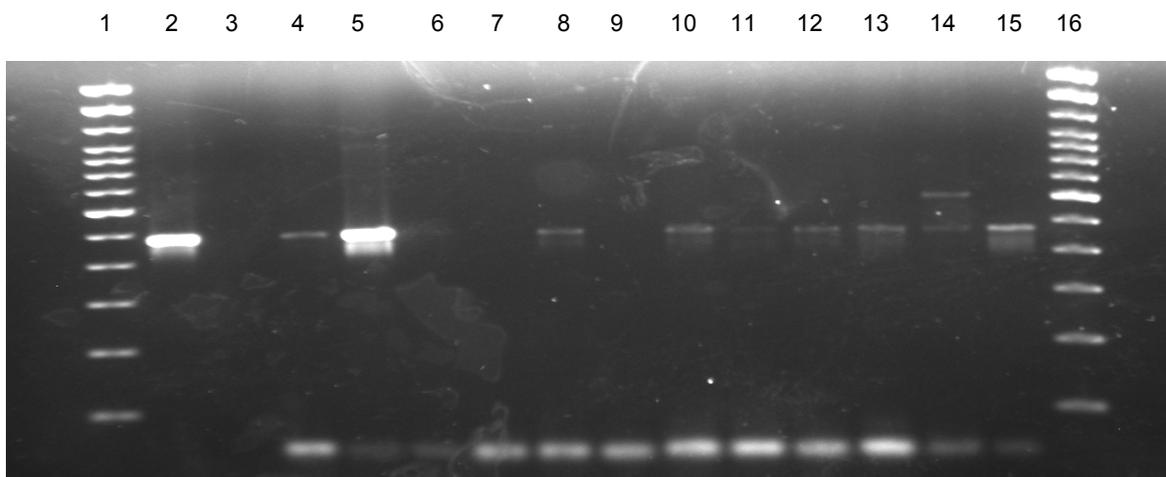
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



VTX 2 pesa 627 pb. Carril 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 muestras -, carril 14 control - *S.aureus* carril 15 MPM, carril 16 control + (EDL933), carril 17, 18,19 muestras -, carril 20 muestra +, carril 21,22,23,24,25 muestras -, carril 26, 27 muestras +, carril 28,29 y 30 muestras -

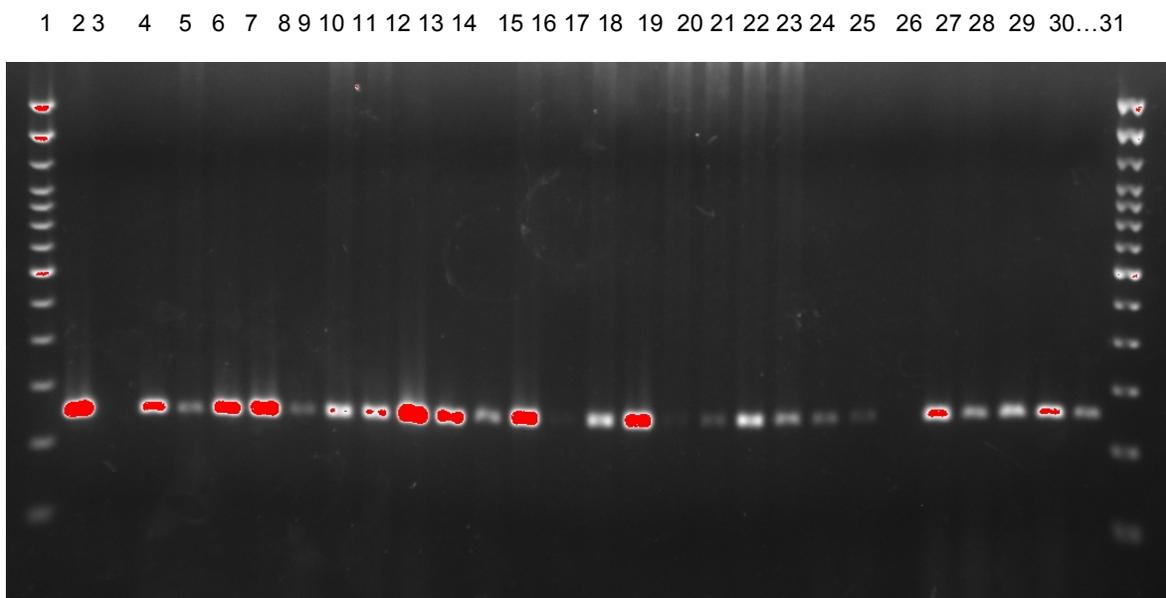
Siete aislamientos expresan los genes para las variantes de *stx1*-*stx2* de la siguiente manera: 42.8% (3/7) para *stx1c-stx2g*, 14.2% (1/7) para *stx1a-stx1c-stx2g*, 14.2% (1/7) para *stx1c-stx2b-stx2g*, 14.2% (1/7) para *stx1c-stx2b* y por último 14.2% (1/7) de *stx1a-stx1c-stx2b-stx2g*. (Cuadro 9). Las imágenes de la amplificación para los genes *stx1a*,*stx1c*,*stx1d*, *stx2b* y *stx2g* se encuentran en las Figuras No.3, 4, 5 6 y 7 respectivamente.

Figura No 3. Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx1a*



El gen *vtx1a* pesa 478 pb. Carril 1 MPM, carril 2 control +, carril 3 control +, *S. aureus*, carril 4 muestra +, carril 5 +, carril 6-7 muestra -, carril 8 muestra +, carril 9 muestra -, carril 10-15 muestra + y carril 16 MPM.

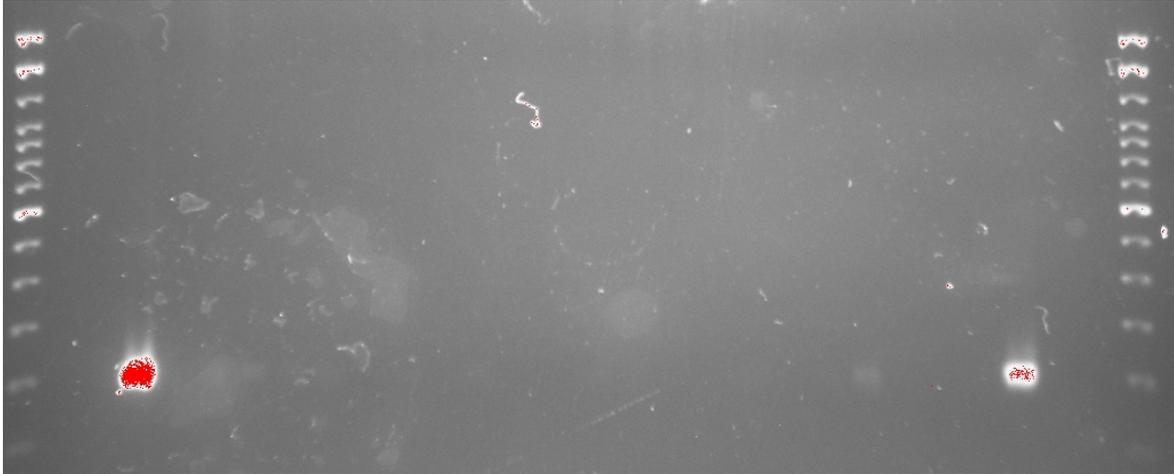
Figura No 4. Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx1c*.



El gen *vtx1c* pesa 252 pb. Carril 1 MPM, carril 2 control +, carril 3 control -, *S. aureus*, carril 3 control - *S. aureus*, carril 4-15 muestra +, carril 16 muestra -, carril 17-18 muestra +, carril 19 muestra -, carril 20-24 muestra +, carril 25 muestra -, carriles 26-30 muestra +, carril 31 mpm.

Figura No. 5 Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx1d*

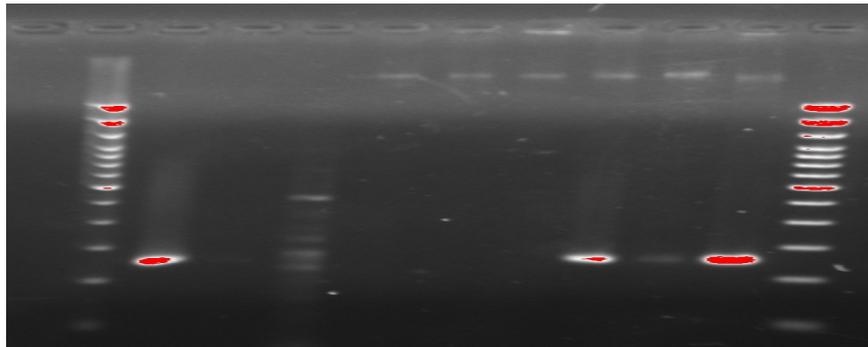
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



El gen *vtx1d* 202 pb. Carril 1 MPM, carril 2 control - *S.aureus*, carril 3 control +, carriles 4-27 muestras -, carril 28 muestra +, carril 29 muestra - y carril 30 MPM.

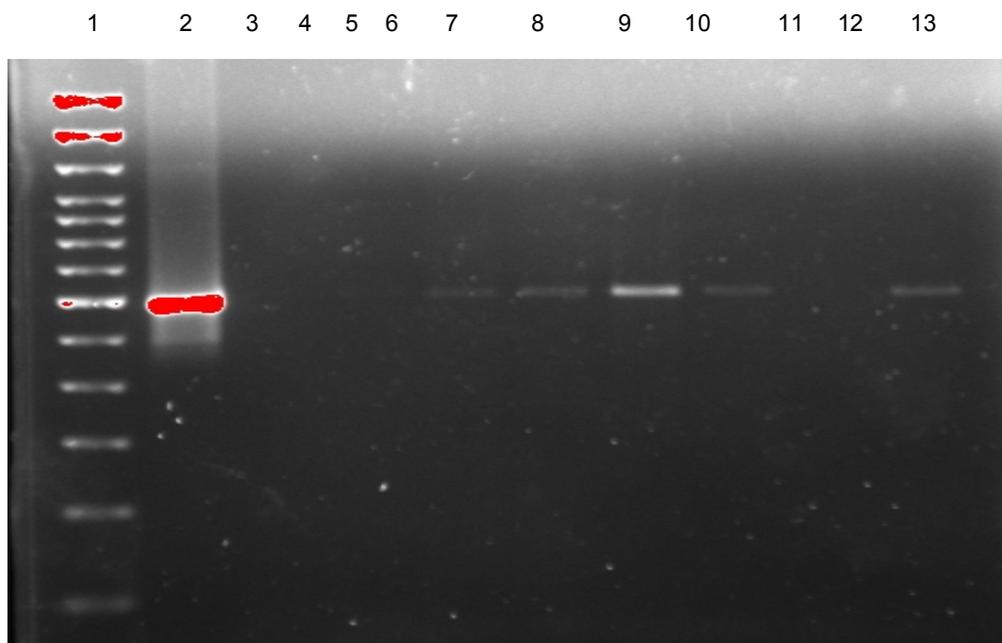
Figura No.6 Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx2b*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



El gen *vtx2b* pesa 251 pb. Carril 1 MPM, carril 2 control + carril 3 control - *S.aureus*, carriles 4-7 muestra -, carril 8-10 muestra +, carril 11 MPM.

Figura No.7 Amplificación de ADN por PCR para el gen *vtx2g*.



El gen *vtx2g* pesa 573 pb. Carril 1 MPM, carril 2 control + carril 3 control - *S.aureus*, carril 4 muestra -, carriles 4-6 muestras -, carriles 7-10 muestra + y carril 11-12 muestra - y carril 13 muestra +

Para los aislamientos STEC la distribución por grupos filogenéticos es de la siguiente manera: Filogrupo A 2.3% (1/43), Filogrupo B1 90.7% (39/43), Filogrupo B2 2.3% (1/43), Filogrupo C 2.3% (1/43) y Filogrupo F 2.3% (1/43) (Cuadro 9).

En el caso de la resistencia antimicrobiana de *E. coli* productora de toxina shiga (STEC) se observa que el mayor porcentaje de resistencia fue para: nitrofuranos (MAC) con 100% (43/43) seguido de ampicilina (AM) con 72.09% (31/43), tetraciclina (TE) con 30% (13/43) y por último trimetropim sulfametoxasol (TSX) con 6.9% (4/43) (Cuadro 9).

La multiresistencia antibiótica (MRA) que expresan los aislamientos STEC se presentó en 27.9% (12/43) de los cuales 18.6% (8/43) expreso MRA para MAC-AM-TE y 9.3% (4/43) expreso MRA para MAC-AM-TE-SXT (Cuadro 9).

Se reporta un 27.9% (12/43) de aislamientos STEC que expresa al menos un gen de resistencia a los antibióticos: nueve aislamientos expresan el gen *tetB*, un aislamiento el gen *tetA*, dos aislamientos el gen *sul2*, un aislamiento el gen *sul1* y un aislamiento los genes *sul1-tetB* (Cuadro. 9).

Cuadro 9 Serotipo, grupo filogenético, perfil de resistencia y genes de resistencia los aislamientos STEC

Aislamiento	Serotipo	Muestra	Gen de virulencia			G.F	Perfil de resistencia				Gen de resistencia						
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>		MAC	AM	TE	SXT	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>Sul1</i>	<i>Sul2</i>	<i>bla-tem</i>		
E44	O53:H51	Recto	1c			A	X	X	X								
Z34	O76:H19	Recto	1a- 1c	2b-2g		B1	X	X				X					
B7	O146:H8	Recto	1a- 1c	2g		B1	X	X	X			X					
Z12	O91:H28	Recto	1a- 1c			B1	X	X									
Z13	O91:H42	Recto	1a- 1c			B1	X	X									
Z14	O91:H47	Recto	1a- 1c			B1	X	X									
Z16	O37:H10	Recto	1a- 1c			B1	X	X									
Z17	O76:H19	Recto	1a- 1c			B1	X	X									
Z25	O174:H16	Recto	1a- 1c			B1	X	X								X	
Z32	O76:H19	Recto	1a- 1c			B1	X	X				X					
Z20	O70:H10	Recto	1a- 1c			B1	X										
Z29	O(NT):H16	Recto	1a- 1c			B1	X										
C24	O185:NM	Recto	1c	2b		B1	X	X				X	X				
C23	O146:H21	Recto	1c	2b-2g		B1	X	X									
V22	O100:H28	Recto	1c	2g		B1	X	X	X								
V5	O176:H21	Recto	1c	2g		B1	X		X			X					
V15	O176:NM	Recto	1c			B1	X	X	X	X							
C28	O84:H14	Recto	1c			B1	X	X	X	X							
Z3	O146:H21	Recto	1c			B1	X	X	X	X						X	
E16	O8:NM	Recto	1c			B1	X	X	X								
Z26	O76:H19	Recto	1c			B1	X	X	X								
D26	O34:H14	Canal	1c			B1	X	X	X			X					
V25	O100:H21	Recto	1c			B1	X	X									
B1	O6:H16	Recto	1c			B1	X	X									
C27	O91:H10	Recto	1c			B1	X	X				X					
E15B	O32:H27	Recto	1c			B1	X	X									
E20	O32:H7	Recto	1c			B1	X	X									
E30	O32:H7	Recto	1c			B1	X	X									
Z5	O174:H16	Recto	1c			B1	X	X									
Z9	O34O145:H45	Recto	1c			B1	X	X									
Z18	O91:H47	Recto	1c			B1	X	X									
C3	O96:H20	Canal	1c			B1	X	X									
D28	O104:H2	Canal	1c			B1	X	X				X					
V13	O146:H10	Recto	1c			B1	X		X								
C28B	O(NT):H14	Recto	1c			B1	X										
Z19	O146:H21	Recto	1c			B1	X										
Z21	O76:H19	Recto	1c			B1	X					X					

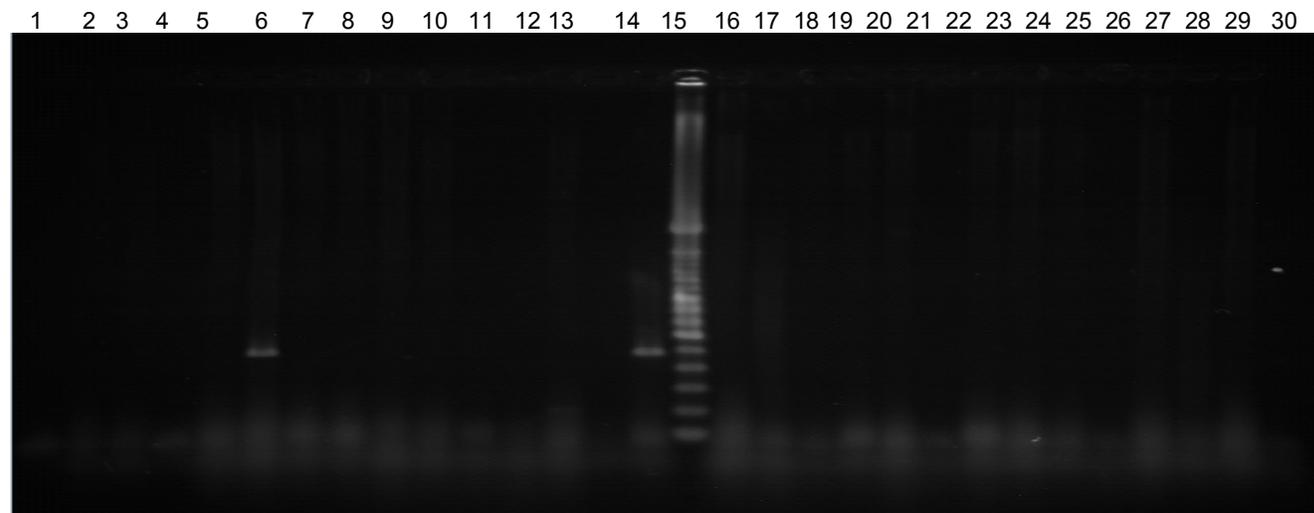
B13C	O150:NM	Canal	1c		B1	X	X			
Z2*	O(NT):H34	Recto	1c		<i>eae</i>	B1	X	X	X	X
E18	O8:H2	Recto	1c-1d		B1	X	X	X		
B3	O176:NM	Recto	1c		B2	X	X			
B15	O6:NM	Recto	1c		C	X	X			
V11	O153:NM	Recto	1c	2g	F	X	X	X		

Ampicilina (AM), trimetropim sulfametaxol (STX), nitrofuranos (MAC) y tetraciclina (TE)

Los aislamientos EPEC, 3/90 (3.3%) expresaron *eae* (Figura No 8) clasificados como EPEC, estos tres aislamientos al no expresar el gen *Bfp* es considerado como aEPEC (EPEC atípico). Para los aislamientos EPEC, la distribución por grupos filogenéticos es de la siguiente manera: Filogrupos B1 100% (3/3)

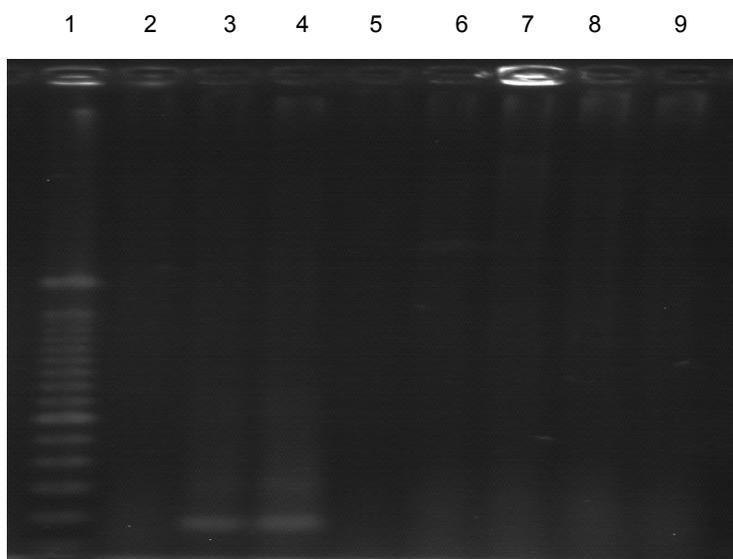
En el caso de la resistencia antimicrobiana de *E. coli* enteropatógena (EPEC) se observa que el mayor porcentaje de resistencia fue para: nitrofuranos (MAC) con 100% (3/3), seguido de ampicilina con 66.6% (2/3) y por último tetraciclina (TE) y trimetropim sulfametoxasol (TSX) con 33.3% (1/3) un solo aislamiento expresó el gen *tetB*.

Figura No. 8 Amplificación de ADN por PCR para el gen *eae*



eae 482 pb. Carril 1,2,3,4,5 muestras -, carril 6 muestra +, carril 7,8,9,10,11,12,13, muestras -, carril 14 control + (E 2369), carril 15 MPM, carril 16 control - *S. aureus*, carril 17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28, 29 y 30 muestras -.

Figura No. 9 Amplificación de ADN por PCR para el gen *stp*.



stp 166 pb carril 1 MPM carril 2 control – *S. aureus*, carril 3 control + (EDL1257), carril 4 muestra +, carril 5 – 9, muestras negativas.

La MRA para aislamientos EPEC se expresó en 33.3% (1/3) para MAC-AM-TE-SXT (Cuadro 10).

Dos aislamientos 2/90 (2.2%) expresaron el gen *stp*, (Figura No 9) pudiendo clasificarse como ETEC.

Para los aislamientos ETEC la distribución por grupos filogenéticos es de la siguiente manera: Filogrupo B1 100% (2/2).

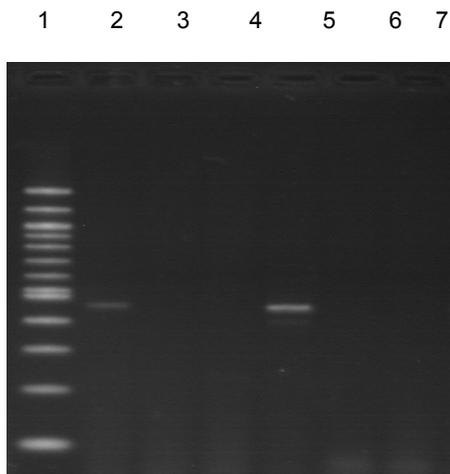
En el caso de la resistencia antimicrobiana de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) se observa que el mayor porcentaje de resistencia fue para: nitrofuranos (MAC) y ampicilina (AM) con 100% (2/2). Seguido de tetraciclina (TE) con 50% de resistencia (1/2), ningún aislamiento expresó genes de resistencia.

La MRA para aislamientos ETEC se expresó en 50% (1/2) para MAC-AM-TE (Cuadro10).

Un aislamiento 1/90 (1.1%) expresó el gen *ipah* (Figura No 10) pudiendo clasificarse como EIEC.

Para los aislamientos EIEC la distribución por grupos filogenéticos es de la siguiente manera: Filogrupo B1 100%.

Figura No. 10 Amplificación de ADN por PCR para el gen *ipaH*.



El gen *ipaH* pesa 446 pb. Carril 1 MPM, carril 2 control +, carril 3 control -, *S. aureus*, carril 3 y muestras -, carril 5 muestra +, carril 6 y 7 muestras -.

En el caso de la resistencia antimicrobiana de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) se observa que fue resistente en un 100 % (1/1) para nitrofuranos (MAC), ampicilina (AM) y tetraciclina (TE) un aislamiento expreso el gen de resistencia *tetB*.

La MRA para aislamientos EIEC se expresó en 100%% (1/1) para MAC-AM-TE (Cuadro 10).

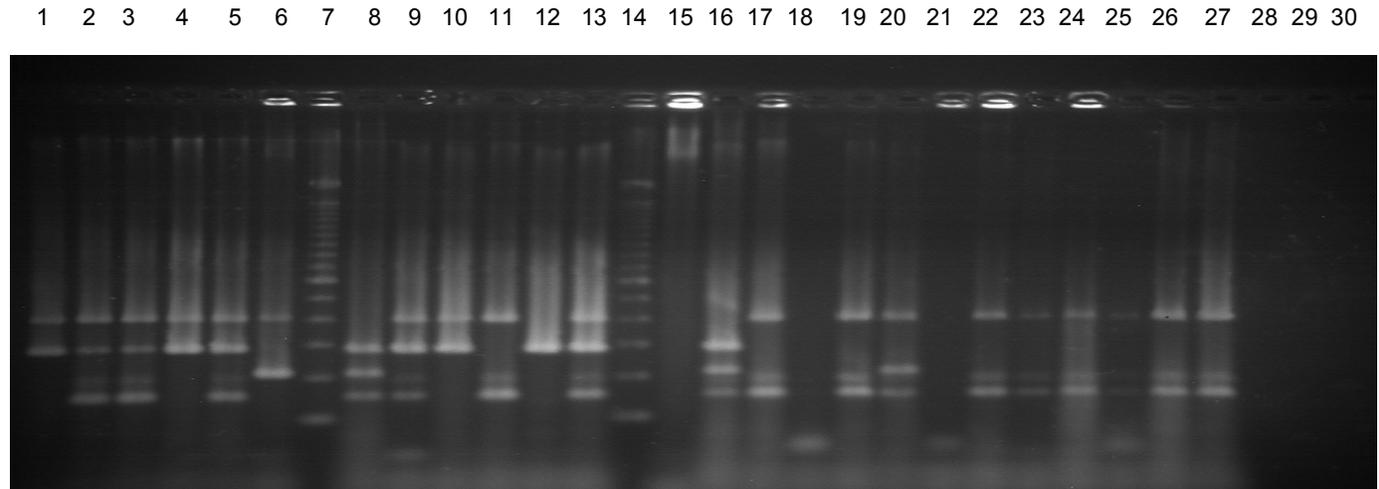
Cuadro 10 Serotipo, Grupo filogenético, perfil de resistencia y genes de resistencia de los aislamientos EPEC, ETEC y EIEC.

Aislamiento	Serotipo	Muestra	Gen de virulencia			G.F	Perfil de resistencia				Gen de resistencia				
			<i>eae</i>	<i>stx</i>	<i>ipaH</i>		MAC	AM	TE	SXT	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla-tem</i>
D3	O(NT):H34	Canal	x			B1	x	x	X	x		x			
D53	O28ac:H21	Canal	x			B1	x	x							
Z15	O(NT):H10	Canal	x			B1	x	x							
D15	O105ab:H16	Canal		x		B1	x	x	X						
D15B	O120:H16	Canal		x		B1	x	x							
E3	O28ac:H21	Canal			x	B1	x	x	X			x			

Ampicilina (AM), trimetropim sulfametaxol (STX), nitrofuranos (MAC), tetraciclina (TE) y NT Not mobile

La amplificación de los genes para determinar los grupos filogenéticos de los aislamientos de los diversos patotipos se encuentran en la Figura No. 11

Figura No. 11 Amplificación de ADN por PCR para el gen *arpa*, *chuA*, *TspE4* y *jyA*.



Carril1 arpA-chuA, carril 2,3 Tsp-chuA-arpA, carril 4 arpA-chuA, carril 5 Tsp-chuA-arpA, carril 6 Control + (8yja-arpA), carril 7 MPM, carril 8 control + (Tsp-yjA-chuA), carril 9 Tsp-chuA-arpA, carril 10 arpA-chuA, carril 11, Tsp, arpA, carril 12 chuA, carril 13 Tsp-chuA-arpA, carril 14 MPM, carril 15 control – (*S.aureus*), carril 16 Tsp-yjA-chuA, carril 17 Tsp, arpA, carril 18 muestra -, carril 19 Tsp-chuA-arpA, carril 20 Tsp-yjA-arpA, carril 20 muestra -, carril 22, 23, 24, 25, 26, 27 Tsp-jyA-arpA, carril 28, 29 y 30 sin muestra.

VIII. DISCUSIÓN

Los ovinos sanos son uno de los principales reservorios de *Escherichia coli* diarrogénica (ECDA) y es conocida la importancia de este microorganismo como causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Bettelheim, 2000).

Uno de los primeros objetivos de este trabajo fue obtener el porcentaje de frecuencia de aislamiento para *E. coli* aislados de ovinos procesados o faenados en rastro (28%), cifra menor a lo reportado por Mancera-Cuadros *et al.* (2019) con un 62.5% en rastros del Estado de México (Xalatlaco, Lerma, Toluca y Zinacantepec) y existe otro porcentaje aún mayor de un 86.87% reportado por Moreno (2018) obtenido de ovinos faenados en el rastro municipal de Capulhuac, México (2018).

La serotipificación continúa siendo una herramienta indispensable para la adecuada clasificación de los diferentes patotipos diarrogénicos de *E. coli*, junto con la detección de los diferentes factores de virulencia, por diferentes técnicas propias de la biología molecular (Scheutz *et al.*, 2004).

Se han logrado aislar varios serotipos que han sido ligados, a lo largo de la historia, con diferentes tipos de diarrea inclusive padecimientos más graves como SHU o CH (Barlow *et al.*, 2006).

En México, Eslava *et al.* (1994) dan a conocer una lista con los serotipos y serogrupos más comunes de *Escherichia coli* causante de diarrea y que coincide con cinco patotipos diarrogénicos de *E. coli* reportados en la presente investigación: 06:NM, 08:NM, O76:H19, O91:H10, O146:H21 y O104:H2.

Es importante destacar que el serotipo O146:H21 ha sido reportado en varios trabajos de investigación alrededor del mundo como en Brasil tanto en ovinos vivos como en rastro (Vettorato *et al.*, 2008) y (Maluta *et al.*, 2014) respectivamente, en México con ovinos de traspatio (Amezquita *et al.*, 2014) y Noruega de ovinos vivos (Urdhal *et al.*, 2003); aunque existen diferencias en lo concerniente al patrón de genes de virulencia ya que pueden variar estos, pudiendo tener *stx*₁, *stx*₂ y/o *stx*₁-*stx*₂

Los serotipos 06:NM, O91:H10 y O104:H2, reportados en el presente, también han sido ligados al desarrollo de SHU a nivel internacional (Shuetz and Strockbine, 2015).

El serogrupo O91 reportado en este trabajo, también fue reportado en diversos países como Brasil (Vettorato *et al.*, 2008; Maluta *et al.*, 2014) y en Italia (Varcaise *et al.*, 2018) con carne de bovinos es importante señalar que en estos trabajos solo se logró detectar el serogrupo O91.

El serogrupo O8 ha sido reportado en diversos trabajos de investigación Akiyama *et al.* (2017) lo reporta, pero en bovinos, en corderos con diarrea lo reporta Wani *et al.* (2003)

en la India, aunque nuevamente solo reportan el serogrupo O8 y no el serotipo completo (O8:NM) como en la presente investigación.

La legislación norteamericana enuncia a seis serogrupos (O26, O45, O121, O103, O145 y O157) considerados como adulterantes o contaminantes de los productos cárnicos (USDA, 2002) en este trabajo de investigación no encontramos alguno de estos, también conocidos como los “big six”.

La Comunidad Económica Europea, dentro de su legislación sanitaria (EFSA, 2013) también ha enlistado varios serogrupos que pueden ser considerados como inaceptables en cualquier producto cárnico (O26, O103, O104, O111, O145 y O157).

En el presente trabajo de investigación se logró detectar un aislamiento con el serotipo O104:H2, aislado de canal; lo cual puede significar un posible riesgo de contaminación cruzada, el serogrupo O104 ha tomado relevancia a nivel sanitaria desde el brote de SHU en Alemania y varios países europeos, aunque hay que recordar que en ese caso el serotipo específico fue O104:H4 aislado de varios productos de origen vegetal (Mora *et al.*, 2011)

A raíz de ese brote se ha considerado la presencia de un nuevo patotipo; donde se ha sugerido la nomenclatura de STEAEC (*E. coli* enteroagregativa productora de toxina shiga) (Frank *et al.*, 2011).

Hay que recordar que en el brote de Alemania la variante de la toxina shiga implicada fue la stx_{2a} , y en la presente investigación se reporta la variante de stx_{1c} , sin tener algún gen de virulencia correspondiente al patotipo EAEC.

Alrededor del mundo hay más trabajos que reportan el serogrupo O104 como Brett *et al.* (2003), en la India con corderos con y sin diarrea y carneros vivos (Wani *et al.*, 2009; Bath *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2014) en México Navarro *et al.* (2018) reportaron aislamientos de bovinos, esta investigación coincide con el serotipo O104:H2, aunque en ninguno de los casos anteriormente expuestos se logró aislar en rastro.

Existe una clasificación propuesta por Mora *et al.* (2012) que se basa en la combinación de los factores de virulencia y los serotipos expresados por el microorganismo, llamado seropatotipos.

Esta clasificación nos arroja cinco categorías, de la A-E, siendo la A la asociada a SHU y brote y como serotipo emblemático el O157:H7, B: asociada a brote y presencia de SHU con serotipos como O26:H11 y O121:H19, C: asociada a SHU y con serotipos como O2:H6 u O145:H8, D que se asocia con diarrea pero sin brote ni SHU con serotipos como: O76:H19 y O146:H21 entre otros y E que no se asocia con diarrea, brote o SHU y una amplia variedad de serotipos.

En el presente trabajo reportamos tres aislamientos O146:H21 y cinco aislamientos O76:H19 que estarían en la categoría de seropatotipo D, asociado a diarrea sin SHU. Cabe señalar que en el trabajo de Mora *et al.* (2012) dichos serotipos poseían algunas variantes de stx como stx_{1c} para el caso de O76:H19, en el presente trabajo se reporta ese mismo serotipo y la stx_{1c} junto con stx_{1a} y en el caso del serotipo O146:H21 Mora reporta las

variantes *stx*_{1c}, *stx*_{2a} y *stx*_{2b}; para este mismo serotipo coincidió con lo reportado por en el presente trabajo a excepción de la *stx*_{2a}

La Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio, especifica límites máximos de *E. coli* para productos congelados, molidos y refrigerados. En las NOM encargadas de salvaguardar la higiene de la carne que se consume en México solo se menciona a *E. coli*, pero existen más de seis patotipos de este microorganismo con capacidad para generar diarrea tanto en población humana como animal (Nataro and Kaper, 1998)

Varios de estos patotipos han sido identificados como agentes zoonóticos capaces de producir ETAs, desde una diarrea sin complicaciones hasta diarrea acuosa o sanguinolenta hasta enfermedades graves como el SHU y la CH (Kaper *et al.*, 2004)

Otro objetivo de este trabajo fue el de aislar todos los patotipos que pudieran estar presentes en los ovinos que se faenan en el rastro municipal de Capulhuac, México. En el presente se pudo comprobar la presencia de cuatro patotipos diarrogénicos de *E. coli* los cuales fueron: *E. coli* productora de toxina shiga (STEC) 43/90 (47.7%), *E. coli* enteropatógena (EPEC) 3/90 (3.3%), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) 2/90 (2.2%) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) 1/90 (1.1%) el resto de los aislamientos 41/90 (46%) no poseen alguno de los FV que correspondan a los diferentes patotipos diarrogénicos de *E. coli* por lo que podrían ser considerados como comensales.

Estudios similares realizados en México, como lo reportado por González-Antonio (2018) con un 5.6% de STEC en ovinos faenados en el rastro municipal de Capulhuac, México. Esta cifra es menor a lo reportado en este trabajo (47.7%) aunque el número de muestras de este trabajo es mayor a lo recolectado por González-Antonio (2018). El Estado de México es el principal productor y consumidor de carne de ovino en México (SIAP, 2016), no obstante, existe poca información acerca de los patotipos presentes en los ovinos faenados y consumidos en la entidad.

Diversos trabajos de investigación reportan diferentes patotipos de *E. coli* presentes de manera simultánea en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) en países con amplio consumo de carne ovina y caprina. Njoroge *et al* (2013) en Kenia reporta estudios en cabras faenadas en rastro encontrando, 50% STEC, EPEC 30%, ETEC 10% y EAEC 10%, siendo el patrón de distribución de patotipos similar al del presente trabajo, aunque Njoroge además reporta el patotipo EAEC, Jajarmi *et al.* (2015) en Irán reportaron, en cabras faenadas en rastro, 16.4% de STEC y 2.8% de EPEC, sin presencia de otros patotipos. En Brasil con ovinos faenados, Maluta *et al.* (2014) reportaron solo dos patotipos 11.3% STEC y EPEC.

Otros trabajos de investigación realizados con bovinos faenados y en pie donde también reportan la presencia de varios patotipos de manera simultánea, como Kagambega *et al.* (2010) en Burkina Faso, que reporta STEC 37%, EPEC 8%, ETEC 4% y EAEC 7%, Bako *et al.* (2017) en el mismo país reportaron cifras menores de STEC 0.58% y ETEC 12.6% aislados de heces de bovinos en un rastro, Navarro *et al.* (2018) estudio en bovinos vivos en México y reportaron los siguientes patotipos STEC 40.7%, ETEC 26.7%, EPEC 17.3%, EIEC 11.5%, EAEC 3.8%; cabe resaltar que en estos trabajos, Kagamebega (2010) y

Navarro (2018), reportaron el patotipo EAEC, que en el presente trabajo de investigación no fue posible detectar.

Yañez-Villa (2016) en un trabajo realizado en México en cabritos con diarrea reporta la presencia de aislamientos de EAEC y STEC.

Tomando en cuenta que el patotipo con mayor frecuencia de aislamientos en la mayoría de los trabajos de investigación, es STEC; en la presente investigación se reporta 47.7% de STEC, del cual 90.6% fue aislado de hisopado rectal, esta cifra es superior a lo reportado por Njoroge *et al.*, 2015 (Irán) obtenidos de cabras, Rigobelo *et al.* (2008) (Brazil) reportaron una cifra menor de 39.3%, Zwifel *et al.* (2004) hallaron 29.9% en ovinos, y cifras aún menores que en el presente son las reportadas por Mersha *et al.* 2009 (Etiopia) y Kumar *et al.* (2012) (Turquía) con 6.9% respectivamente.

En lo que respecta a STEC aislado de muestras de canal, en Brasil (Rigobelo *et al.*, 2008) reportaron una cifra muy superior, a lo encontrado en el presente trabajo, con un 39.3% en Etiopia (Mersha *et al.*, 2009) reporta una cifra similar con 9.8% aislado de la canal de ovinos faenados en dicho país, cabe señalar que los aislamientos detectados sobre la canal representan un factor de riesgo de mayor importancia hacia una posible contaminación del producto (Barlow *et al.*, 2006; USDA-FSIS, 2012; EFSA, 2013).

Respecto al patrón de expresión de los diferentes genes de virulencia para STEC, podemos decir lo siguiente: stx_1 de hisopado rectal 72%, stx_1 de hisopado sobre canal 9.3%, $stx_1 - stx_2$ de hisopado rectal 16.2% y por último $stx_1 - eae$ de hisopado rectal 2.3%.

Existen diferentes trabajos realizados para la detección de STEC alrededor del mundo en los que también se considera el patrón de distribución de los genes de virulencia stx_1 , stx_2 , y eae . En Irán, Jarjami *et al.* (2015) reportaron datos similares donde stx_1 tienen mayor porcentaje de presentación que stx_2 , mientras que en Turquía (Kumar *et al.*, 2012) el patrón es inverso.

Al respecto hay que considerar que las cepas STEC al carecer o tener el gen eae , se pueden clasificar en aSTEC (STEC atípico de baja virulencia) o tSTEC (STEC típico de alta virulencia) (Nataro and Kaper, 1998), los aislamientos detectados en este trabajo caen dentro de la clasificación de aSTEC, pero aunque carezcan de la principal adhesina (intimina) hay que recordar que se han logrado encontrar múltiples adhesinas putativas o emergentes detectadas en varios trabajos de investigación (Tatarczak *et al.*, 2005)

La amplia plasticidad de expresión de variantes de toxina shiga significa un importante dato para saber si estas se pueden asociar más al SHU y al CH; stx_{2d} y stx_{2c} son el claro ejemplo ya que se unen a la elastasa, presente en el mucus del intestino delgado en los humanos, mientras que diferentes variantes de stx han sido asociadas a especies en particular como: stx_{1c} , (ovinos) stx_{2e} (cerdos) y stx_{2f} (palomas) son ligadas a diarreas sin complicaciones (Beutin *et al.*, 2007).

En este trabajo se obtuvo el siguiente patrón de distribución de variantes de stx_1 : stx_{1c} 72.09%, $stx_{1a} - stx_{1c}$ 25.5% y $stx_{1a} - stx_{1d}$ 2.3%. Reportes muy similares, en canales de ovinos, reportan en India (Kumar *et al.*, 2012) y Turquía (Erol *et al.*, 2016).

Desde el año 2003, Brett *et al.* reportaron esta característica de stx_{1c} como la predominante en ovinos, misma que corroboran investigaciones en Irán (Thagadosi *et al.*, 2018), Brasil (Vettorato *et al.*, 2014), México (Amézquita *et al.*, 2014) y en Japón (Akiyama *et al.*, 2017).

Para el patrón de distribución de las variantes de stx_2 se reportan siete aislamientos que expresan stx_{2g} en su gran mayoría solamente dos aislamientos expresan stx_{2b} - stx_{2g} , Ramachandran *et al.*, (2001) reporta que stx_{2d} , es la variante predominante en ovinos, Tasara *et al.*, (2008) en Suiza reporta a la stx_{2c} como la variante predominante en ovinos faenados en rastros, en contraste existen otras investigaciones que coinciden con los datos reportados en este trabajo, donde también reportan stx_{2g} sobre todo en bovinos y cabras en Vietnam (Vu-khac *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2010), Argentina (Granobles-Velandia *et al.*, 2012), Polonia (Januszkiewicz and Rastawicki 2016) y Japón (Akiyama *et al.*, 2017), Curiosamente, Prager *et al.* (2011) demostraron que los aislamientos stx_{2g} aislados de humanos, animales y fuentes ambientales tienen una estrecha relación filogenética, lo que refuerza la idea de las infecciones humanas como una posible enfermedad zoonótica.

Cabe resaltar que la stx_{2g} , al ser la variante de stx_2 con mayor número de aislamientos, también ha sido reportado de diferentes fuentes como: ganado, aguas residuales, ambientes acuáticos, y humanos (García-Aljaro *et al.*, 2006; Krüger *et al.*, 2007) al estar presente en un amplio número de fuentes, esta variante, puede estar regulada a la presencia de fagos líticos y diferentes ciclos de estos (Granobles-Velandia *et al.*, 2012).

La identificación de varios genes conservados, se puede emplear en cepas de *E. coli* para clasificarlas en grupos filogenéticos, la técnica de "oro" para estudiar la estructura filogenética de *E. coli* es el análisis de multilocus de secuencia (MLST), la cual clasifica en 7 filogrupos (A,B1,B2,C,D,E y F), no obstante Clermont *et al.*, (2013) desarrollo una metodología más simple y económica basado en un PCR cuádruplex que nos arroja datos acerca de su potencial de virulencia y básicamente los clasifica en aislamientos intestinales o comensales(A, B1 y C) o en aislamientos extraintestinales (B2, D y F).

Las cepas que pueden pertenecer a un grupo filogenético determinado pueden estar asociados con la fuente del aislamiento, presencia de mutaciones puntuales y transferencia horizontal de genes, además de una posible influencia de diversas condiciones geográficas, cambios en la dieta, mal uso de antibióticos y de factores inherentes del hospedero (Turrientes *et al.*, 2014).

En esta investigación fueron determinados los grupos filogenéticos mediante la metodología de Clermont *et al.* (2013) y para los aislamientos STEC tenemos que el 90.7% pertenece al filogrupo B1, 2.3% al filogrupo C y A y para los filogrupos considerados como extraintestinales y potencialmente patógenos como B2 y F se detectó un 2.3%.

Wang *et al.* (2013) señalaron al filogrupo B1 como el predominante en rumiantes, este dato concuerda con numerosos trabajos de investigación reportados en Irán en un rastro de cabras (Jajarmi *et al.*, 2015), Portugal en un rastro de ovinos (Ramos *et al.*, 2011), y Brasil (Martins *et al.*, 2015), estas investigaciones logran también detectar otros filogrupos como el A, B2 y D, aunque en una cifra mucho menor al B1, al igual que en la presente investigación. Estos datos se han reportado continuamente en rumiantes a lo largo de varios trabajos de investigación, coincidiendo con la presente investigación, lo cual podría llevar a decir que los

rumiantes tienen un grupo filogenético en común, independiente de la presencia de diarrea (Samati *et al.*, 2015).

EPEC es responsable de diarreas neonatales tanto en población infantil humana como animal, es el segundo patotipo más frecuente, en este trabajo de investigación se encontró un 3.3%, está muy ligado a la presencia de STEC, ya que ambos pueden llegar a expresar el gen *eae* (Karmali *et al.*, 2013) Esta característica la reportan en rastros de cabras en Kenia (Njoroge *et al.*, 2013) e Irán (Jajarmi *et al.*, 2015), para población ovina lo reportan en Australia (Djordjevic *et al.*, 2001) y Brasil (Maluta *et al.*, 2014) y en bovinos de Burkina Faso (Kagambéga *et al.*, 2012). Es de hacer notar que las cepas aisladas en el presente trabajo de investigación, al no expresar el gen *bfp* (pili en forma de rizo) caen dentro de la categoría de aEPEC.

En tercer lugar, por frecuencia de aislamiento tenemos a ETEC con un 2.2%, este patotipo se considera como uno de los principales agentes de diarreas neonatales en corderos y terneros, también es responsable de la “diarrea del viajero” (Troeger *et al.*, 2017). En el trabajo de Navarro *et al.* (2018) este patotipo ocupa el segundo lugar en frecuencia de aislamiento, Njoroge *et al.* (2013) en Kenia lo reportaron como el tercero más aislado, igual situación en bovinos de Burkina Faso (Kagambéga *et al.*, 2012); hay reporte de otros trabajos que reportan aislamientos de ETEC como en Brasil (De Moura *et al.*, 2012) en becerros con y sin diarrea también en Vietnam se reporta en bovinos con diarrea (Nguyen *et al.*, 2011) y en Burkina Faso aislado de heces de rumiantes (Bako *et al.*, 2017).

En cuarto lugar, por frecuencia de aislamiento se reporta a EIEC con 1.1%, que también es reportado en Burkina Faso (Kagambéga *et al.*, 2012) y en México (Navarro *et al.*, 2018) ambos casos de heces de bovino y en menor porcentaje de aislamiento respecto a los otros patotipos diarrogénicos.

Con respecto al patotipo EAEC; tenemos que otros trabajos de investigación lograron reportar dicho patotipo, junto con STEC, EPEC y ETEC, en México, Irán y Burkina Faso (Navarro *et al.*, 2018; Jajarmi *et al.*, 2015; Kagambéga *et al.*, 2012) y en esta investigación ninguna de nuestros aislamientos expresó dicho patotipo.

Correspondiente a los diferentes grupos filogenéticos al que pertenecen los aislamientos con patotipos EPEC. ETEC y EIEC; el alto porcentaje de cepas que pertenecen al grupo filogenético B1 que se reporta en el presente trabajo es muy parecido a lo reportado en otras partes del mundo en cepas de ovinos, bovinos y cabras (Ghanbarpour *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Alizade *et al.*, 2014; Carlos *et al.*, 2016).

Las variantes de *stx* han sido asociadas a algunas especies animales en particular como *stx*_{2e} con cerdos (Fratamico *et al.*, 2004) y *stx*_{2f} con palomas (Sonntag *et al.*, 2005).

Brett *et al.* (2003), reportaron que la *stx*_{1c} es la variante de *stx*₁ más asociada a los ovinos misma que corroboran varias investigaciones en Irán (Thagadossi *et al.*, 2018), Brasil (Vettorato *et al.*, 2014), México (Amézquita *et al.*, 2014) y Japón (Akiyama *et al.*, 2017) al igual que en el presente.

En nuestro trabajo de investigación se reporta la presencia de siete aislamientos con alguna variante de *stx*₂, las cuales fueron en su gran mayoría *stx*_{2g} sola y de manera

simultánea con *stx*_{2b}, cabe destacar que estas dos variantes no han sido reportadas, hasta la fecha, como asociadas a la presentación de SHU o CH tanto en humanos como animales; también coincide con trabajos de investigación, la presencia de *stx*_{2g} como predominante en rumiantes (Leung *et al.*, 2003); también otros trabajos de investigación reportan esta variante con mayor porcentaje de aislamiento como en Vietnam (Vu-khac *et al.*, 2008; Nguyen *et al.*, 2010), Argentina (Granobles-Velandia *et al.*, 2012), Polonia (Januszkiewicz and Rastawicki 2016) y Japón (Akiyama *et al.*, 2017).

Amézquita *et al.* (2014) es el único trabajo de investigación en México, que reporta variantes de *stx* en ovinos y reporta las variantes que han sido asociadas a los ovinos como *stx*_{1a} o *stx*_{1c}, pero también reporta las variantes asociadas a SHU a nivel internacional como la *stx*_{2c} y *stx*_{2d}, así como el serotipo O157:H7 en ovinos de traspatio en Sinaloa.

Las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia hacia ampicilina, β -lactámicos, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico (Tenover, 2006; Cabrera *et al.*, 2007). Estos porcentajes altos de resistencia a varios antibióticos empleados en medicina veterinaria constituyen un problema debido a que estos pueden transmitir esta resistencia a bacterias de diferentes géneros y especies, incluyendo a los microorganismos patógenos para el ser humano (Chande *et al.*, 2011).

Para Ampicilina en el presente estudio se reporta 72.09% (31/43) y existen diversos trabajos realizados, en pequeños rumiantes tanto faenados en rastro como vivos, que reportan porcentajes de resistencia muy variables como en Turquía (Seker and Kus, 2019) que reporta 10%, Njoroge *et al.* (2013) reportaron un trabajo realizado en cabras faenadas en rastros en Kenia con 26%, Elsayed *et al.* (2018) en Egipto, con aislamientos de cabras y ovinos reporta un porcentaje mayor de 66.7%; estos diversos porcentajes de resistencia pudieran indicar que el uso de la ampicilina a nivel internacional dentro de la medicina veterinaria todavía es amplio (Antunes *et al.*, 2013).

Para tetraciclina el presente trabajo reporta un porcentaje de 30% (13/43), Seker and Kus 2019) en Turquía reportan 50% ovinos faenados, Njoroge *et al.* (2013) en Kenia reporta 15% y Medina *et al.* (2011) con ovinos sanos reporta 100% de sensibilidad para tetraciclina.

Para trimetoprim sulfametoxazol (TSX) el presente trabajo reporta un 6.9% (4/43) mientras que otros investigadores reportan porcentajes variables como en Turquía (Seker and Kus 2019) un 50%, Ramos *et al.* (2011) en Portugal con ovinos faenados reporta 24.6% y Elsayed *et al.* (2018) en Egipto, con aislamientos de cabras y ovino reporta 73.3% de resistencia.

Para un grupo de antibióticos de gran importancia a nivel mundial como lo son las cefalosporinas otras investigaciones reportan porcentajes variables de resistencia como Njoroge *et al.* (2013) en cabras de Kenia reporta 2% de resistencia, porcentajes altos son reportados en Brasil (Rigobelo *et al.*, 2008) con ovinos faenados reporta 72% para cefalotina y 22% para ceftriaxona, en Egipto (Elsayed *et al.*, 2018), con pequeños rumiantes vivos, que reporta 86% de resistencia para cefalotina, en contraste con lo reportado en el presente con 100% de sensibilidad para esta familia de antibióticos.

Para gentamicina diversos estudios reportan porcentajes de resistencia variables como Ramos *et al.* (2011) en Portugal con 2.7%, Rigobelo *et al.* (2008) con 9% y Elsayed *et*

al. (2018) en Egipto reporta 66.7%; mientras que en el presente estudio se reporta 100% de sensibilidad para gentamicina.

Para ciprofloxacino varios trabajos realizados en pequeños rumiantes reportan porcentajes de resistencia diversos como Ramos *et al.* (2011) en Portugal reporta 1.4% de resistencia, Rigobelo *et al.* (2008) en Brasil reporta 22% de resistencia y Elsayed *et al.* (2018) en Egipto reporta 53.4%; en este trabajo se reporta 100% de sensibilidad para este antibiótico.

Debido a la enorme explotación de antimicrobianos en el campo de la medicina veterinaria los problemas asociados con la presencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos ha alcanzado proporciones alarmantes en los últimos años; una de las aplicaciones más controvertidas de los antimicrobianos es su empleo para promover el crecimiento en los pequeños rumiantes como ovinos y cabras; lo que ha planteado preocupaciones sobre su contribución a la presencia de bacterias resistentes en humanos y existe evidencia sustancial de que el uso de agentes antimicrobianos para el ganado podría ejercer presión de selección para que se presente resistencia hacia diferentes antibióticos (Schwarz *et al.*, 2006; Szmolka *et al.*, 2013).

Los aislamientos STEC, con multiresistencia (MRA) fueron 18.6% (8/43) para MAC-AMP-TE y un 9.3% (4/43) para MAC-AMP-TE-TSX, mientras que en otros trabajos los porcentajes son variables desde un 3.1% en Inglaterra (Enne *et al.*, 2008) un 9.1% en Polonia (Wasył *et al.*, 2013) y 65% en Azerbaiyán (Zare *et al.*, 2014), con ovinos faenados la presencia de aislamientos con MRA que también expresaron los aislamientos EPEC, ETEC y EIEC pudiera significar otro aspecto relevante en la presión de selección por antimicrobianos en poblaciones de STEC del ganado ovino para consumo humano alrededor del mundo (Gimeno y Ortega, 2005).

En el presente estudio se lograron detectar genes de resistencia como *tetA*, *tetB*, *sul1*, *sul2* detectados en aislamientos resistentes a tetraciclina y trimetropim sulfametoxasol trabajos de investigación alrededor del mundo también reportan el hallazgo de algunos de estos genes, en Portugal (Ramos *et al.*, 2011) reportan la presencia de *tetA*, *tetB* y en menor número *sul2*, en muestras de ovino procesados en rastro, Medina *et al.* (2011) con ovinos vivos en España reporta la presencia de estos mismos genes, siendo *tetA* el de mayor presencia y en aislados de bovinos franceses (Um *et al.*, 2018) reporta *tetA* y *sul2*.

IX. CONCLUSIONES.

1. Se lograron detectar serotipos con importancia en salud pública en México, asociados a diarrea, como: el O6: NM, O8:NM, O79:H19, O91:H10 y O146:H21 (Eslava *et al.*, 1994) y serotipos que han sido asociados a SHU, a nivel internacional, como O104:H2 y O91:H10.
2. Fueron confirmados 4 patotipos: STEC, EPEC, ETEC y EIEC.
3. La variante de stx_1 más aislada fue la stx_{1c} , seguida de la stx_{1a} . La variante de stx_2 más aislada fue la stx_{2g} , seguida de la stx_{2b} .
4. El filogrupo predominante, para STEC; EPEC; ETEC y EIEC fue el B1 (comensal), aunque se lograron identificar, en menor porcentaje, los filogrupos A (comensal), B2 (extraintestinal), C (comensal) y F (extraintestinal) para aislamientos STEC.
5. El antibiótico con mayor porcentaje de resistencia fue el nitrofurano, seguido de la ampicilina, tetraciclina y por último el trimetropim sulfametoxazol para STEC, EPEC, ETEC y EIEC. Se lograron identificar aislamientos multiresistentes (MAC-AM-TE y MAC-AM-TE-SXT) para todos los patotipos identificados
6. El gen de resistencia con mayor número de aislamientos fue el *tetB*, seguido del *sul 2*, y por último los genes *tetA* y *sul1*.

X. SUGERENCIAS.

1. Realizar una investigación similar en el mismo Municipio, pero con muestras de canales ovinas faenadas a nivel traspatio, ya que los índices de animales faenados en traspatio son mayores que los faenados en rastro.
2. Tomar en cuenta otros genes de virulencia para cada patotipo, por ejemplo, los genes *ehxA*, *Saa*, *toxB*, *pO157*, *ent*, etc para STEC.
3. Realizar a nivel traspatio alguna técnica para detectar si los aislamientos son clonas o no, por ejemplo, PFGE.

XI BIBLIOGRAFÍA.

- Andersson, D.I. and Hughes, D. (2010): Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Natural Reviews Microbiology*, 8(4):260-271. DOI: 10.1038/nrmicro2319
- Antunes, F., Souza R. and Figueiredo, A. (2013): Superbacterias, el problema mundial de la resistencia a los antibióticos, *Microbiología Médica*, 23(133): 39–41.
- Akiyama, Y., Futai, H., Saito, E., Ogita, K., Sakae, H., Fukunaga, M., Tsuji, H., Chikahira, M., and Iguchi, A. (2017): Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in *Escherichia coli* Isolated from Cattle. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 70:181–185, 2017. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2016.100.
- Alam, M.J. and Zurek, L. (2006): Seasonal prevalence of *E. coli* O157:H7 in beef cattle feces. *J food prto.* 69(12): 3018-3020).
- Alizade, H., Ghanbarpour, R. and Nekoubin, M. (2014): Phylogenetic of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and a typical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated from Human and Cattle in Kerman, Iran. *Int J Entric Pathog.* 2014 February; 2(1): e15195. doi: 10.17795/ijep15195.
- Amézquita-López, B.A., Quiñones, B., Lee, B.G. and Chaidez, C. (2014): Virulence profiling of Shigatoxin producing *Escherichia coli* recovered from domestic farm animals in Northwestern Mexico. January 2014 | Volume 4 | Article 7. doi: 10.3389/fcimb.2014.00007.
- Barlow, R.S., Gobius, K.S. and Desmarchelier, P.M. (2006): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lumb cuts: Results of a one-year study. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 1–5.
- Bako, E., Kagambéga, A., Traore K.A., Serge Bagre, T., Ibrahim, H.B., Bouda, S.C., Bonkougou, I.J.O., Kaboré, S., Zongo, C., Traore, S.A. and Barro, N. (2017): Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated in Organic Waste Products (Cattle Fecal Matter, Manure and, Slurry) from Cattle's Markets in Ouagadougou, Burkina Faso. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14, 1100; doi: 10.3390/ijerph14101100.
- Beltrán-Ordaz F.J. (1996): Aplicación del análisis de riesgos identificación y control de puntos críticos en rastros y tiendas de autoservicio. Secretaría de Salud, México, págs. 67.)

- Benz, I. and Schmidt M.A. (1992): Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* 1996; 60:13-18.
- Besser, T.E., Hancock, L.C., Pritchett, E.M., McRae, D.H., Rice, A. and Tarr, P.I. (1997): Duration of detection of fecal excretion of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *The Journal Infectious Diseases*. 1997; 175(3):726–729.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S. and Karch, H. (1995): Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(3):631–635.
- Beutin, L., Miko, A., Krause, G., Pries, K., Haby, S., Steege, K. and Albrecht, N. (2007): Identification of Human-Pathogenic Strains of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Food by a Combination of Serotyping and Molecular Typing of Shiga Toxin Genes. *Applied and environmental microbiology*, Aug. 2007, p. 4769–4775 Vol. 73, No. 15. doi:10.1128/AEM.00873-07
- Bettelheim, K.A. (2000): Role of non-O157 VTEC. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 2000, 88, 388-508.
- Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Aldick, T., Schurk-Bulgrin R., and Karch, H. (2006): Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin. Infect. Dis.* 43:1160–1167.
- Bielaszewaska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G. and Karch, H. (2011): Characterization of the *E. coli* strain associated with outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany 2011: a microbiological study. *Lancet Infect Dis.* 11: 671-676.
- Bhat, M.A., Nishikawa, Y. and Wani, S.A. (2008): Prevalence and virulence gene profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrhoeic and healthy lambs in India. *Small Ruminant Research*. 75 (1): 65–70.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Alonso, M. P., Dahbi, G., González, E. A., Bernárdez M. I. and Blanco, J. (2003): Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microb.*, 41, 1351–5.
- Boza, R. and Barrantes, E. (2001): Resistencia bacteriana a antibióticos en el Hospital San Juan de Dios 1995-1999. *Acta Medica Costarricense.*, 43(3): 119-127.
- Brett, K., Ramachandran, V., Hornitzky, M., Bettelheim, K. A., Walker, M.J. and Djordjevic, S.P. (2003): stx1c Is the Most Common Shiga Toxin 1 Subtype among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Sheep but Not among Isolates from Cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. Mar. 2003, p. 926–936. doi: 10.1128/JCM.41.3.926–936.2003.

- Boop, C.A., Brenner, F.W., Wells, J.G., Strockbine, N., Murray, P.R., E Jo Baron, M.A., Pfaller, F.C., Tenover, R.H. and Yolken (1999): *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. En: Manual of clinical microbiology. 7th ed Washington, D.C. E d. ASM. Press.:459-474).
- Cabrera, C.E., Gómez, R.F. and Zúñiga, A.E. (2007): La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica; 38(2):149-158.
- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. IZ., Gomes, T., Amaral, L.A. and Ottobon, L. M.M. (2010): *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiology 10:16.
- Carrillo, D.V.M.D. (2011), Caracterización de *E. coli* comensal del ciervo rojo (*Cervus elaphus*), Tesis de Maestría) Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, CDMX.
- Cassels, F.J. and Wolf, M.K. (1995): Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. J Ind Microbiol; 15:214-226
- Croxen, M.A. and Finlay, B.B. (2010): Molecular mechanisms of *E. coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010 Jan; 8(1):26-38. Doi: 10.1038/nrmicro2265
- Chande, R., Y., Oliveira, S. and Goyal, S.M. (2011): Characterization of ceftiofur resistance in swine bacterial pathogens. Veterinary Journal. 187(1):139-141
- Clermont, O., Christenson, J K., Denamu, E. and Gordon, D.M. (2013): The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environmental Microbiology Reports (2013) 5(1), 58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th Ed CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-1-56238-805-3). https://clsi.org/media/1469/m100s_27_sample.pdf
- Cordeiro, N.F., Robino, L., Medina, J., Seija, V., Bado, I. and Garcia, V. (2008): Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the aac (6')-Ib-cr variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. Antimicrobial Agents Chemotherapy., 52(2):806-807.
- COFEPRIS (2006): ([www.gob.mx/cofepris/documentos/evaluacion de riesgos sanitarios y mataderos municipales](http://www.gob.mx/cofepris/documentos/evaluacion-de-riesgos-sanitarios-y-mataderos-municipales)). (Consultado el 19-junio-2019)
- Codex Alimentarius (2003): Food hygiene basic texts recommended international code of practice. General principles of food hygiene. CA/RCP 1-1969, rev. 4 2003. CDC. Roma, Italy. pp: 1-31.

- Czeczulin, J. R., Whittam, T. S., Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. and Nataro, J. P. (1999): Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67, 2692–2699.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. (2010): Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490–495. doi:10.1093/jac/dkp498
- De Moura, C., Ludovico, M., Valadares, G.F., Gatti, M.S.V. and Leite, D.S. (2012): Detection of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy feces of dairy calves in Brazil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.79, n.2, p.273-276, abr. /Jun.
- D'aoust, J. Y. (2009): *Salmonella*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 5th. ed. Asm Press, Washington D. C., U. S. 879 p
- Djordjevic, S., Hornitzky, M., Bailey, G., Gill, P., Vanselow, B., Walker, K. and Bettelheim, K. (2001): Virulence Properties and Serotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Healthy Australian Slaughter-Age Sheep. *Journal of clinical microbiology*, May 2001, p. 2017–2021. Doi: 10.1128/JCM.39.5.2017–2021.2001.
- Dreyfus, L.A., Frantz, J.C. and Robertson, D.C. (1983): Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *E. coli* of different host origins. *Infect. Immun.* 42: 539-548.
- Duda, K.A., Lindner, B. Brade, H., Leimbach, A., Brzuszkiewicz, E. Dobrindt, U. and Holst, O. (2011): The lipopolysaccharide of the mastitis isolate *E. coli* strain 1303 comprises a novel- Oantigen and the rare K-12 core type. *Microbiology*. 157: 1750-1760).
- Enne, V.I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodwad, M.J. and Bennet, P.M. (2008): A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol Lett* 278: 193–199. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00991.x
- EFSA (2013). Scientific opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal*, 11(4), 3138.
- Elsayed, M.S.A.E., Awad, A., Trabees, R. and Marzouk, A., (2018): Virulence repertoire and antimicrobial resistance profile of shiga toxin-producing *E. coli* isolated from sheep and goat farms from Al-Buhayra Egypt. *Pak Vet J*. <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2018.082>
- Erol, I., Goncuoglu, M., Ayaz, N.D and Orm, F.S.B. (2016): Comparison of prevalence and genetic diversity of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and sheep. *J Microbiol Biotech Food Sci*. 6 (2) 808-812. doi: 10.15414/jmbfs.2016.6.2.808-812.
- Escobar, P.P., Giudecielli, C., Parsot, C. and Denamur, E. (2003): The evolutionary history of *Shigella* and *E. coli* revised. *J. Mol.Evol* 57: 140-148.

- Escobar, P.P., Clermont, O Blanc-Potard, A.B., Bui, H., Le Bouguéneq, C. and Denamur, E. (2004): A specific background is required for acquisition and expression of virulence factors in *E. coli*. *Mol. Biol. Evol.* 21(6): 1085-1094).
- Eslava, C., Mateo, J. and Cravioto, A. (1994): Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaría de Salud. México: 251.
- Escutia-Sánchez I. (1996): Manual de buenas prácticas de sanidad en rastros municipales. Secretaría de Salud, México, págs. 52.
- Etcheverría, A.I., Padola, N.L., Sanz, M.E., Polifroni, R., Krüger, A., Passucci, J., Rodríguez, E.M., Taraborelli, A.L, Ballerio, M. and Parma, A.E. (2010): Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Science* 86 (2010) 418–421. doi:10.1016/j.meatsci.2010.05.027.
- FAO (2004). Proyecto de Código de Prácticas de Higiene para la Carne. ALINORM 04/27/16.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2005). Code of hygienic practice for meat. CAC/RCP 58–200. Codex Alimentarius, FAO, Rome.
- FAO/OMS (2006). Conferencia Regional FAO/OMS sobre inocuidad de alimentos para las Américas y el Caribe. FAO. Roma, Italia. 126 p.
- Farmer JJ III. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En: Manual of clinical microbiology. 6ª ed. Washington, D.C. ASM Press 1995: 440.
- FDA (1999): The problem of foodborne illness, Partnership for Food Safety Education. U. S. 35 p.
- Flores-Abuxapquí, J.J., Suárez-Itoil, G.J., Heredia-Navarrete, M.R, Puc-Franco, M.A. and Franco-Monsreal, J. (1994): Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli* in infants during the first three months of life. *Arch Med Res* 1994; 25:303-307).
- Frank, C., Werber D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M.J., Follin, P., Müller, L., King, L.A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K. and Krause, G. (2011): Epidemic profile of shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4 Outbreak in Germany. Preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 365: 1771-1789, 1-11.
- Fratamico, P. M., L. K. Bagi, E. J. Bush, and Solow, B.T. (2004): Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 study. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7173–7178.
- Friedrich, A.W., Bielaszewska, M., Zhang, W-L., Pulz, M., Kuczius, T., Ammon, A. and Karch, H. (2002): *Escherichia coli* Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants:

- Frequency and Association with Clinical Symptoms. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 185:74–84.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Jofre, J. and Blanch, A.R. (2006): Newly identified bacteriophages carrying the *stx2g* gene isolated from *Escherichia coli* strains in polluted waters. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 127–135.
- Ghanbarpour, R. and Kiani, M. (2013): Characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from healthy fat-tailed sheep in southeastern of Iran. *Tropical Animal Health Production.* (2013) 45:641–648. doi 10.1007/s11250-012-0271-5.
- Girón, J.A., Ho, A.S.Y. and Schoolnik, G.K. (1991): An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1991; 254:710-713.
- Gimeno, O. y Ortega C., (2005): Antibioterapia y Salud Pública Veterinaria; desarrollo de microorganismos resistentes, mecanismos de Resistencia y estrategias para el uso prudente de antibióticos, www.sapuvetnet.org/antigo/Pdf%20Files/antib_portugal.pdf, (Consultado 5 de febrero de 2017).
- González-Antonio P (2018): Identificación de los genes: *Stx1*, *Stx2*, *eaeA* Y *hlyA*, en cepas de *Escherichia coli* aisladas de canales y carne procesada de ovinos. Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca. México.
- Granobles-Velandia, C.V.G., Krüger, A., Parma, Y.R., Parma, A.E. and Lucchesi, P.M.A. (2012): Differences in Shiga toxin and phage production among *stx2g*-positive STEC strains. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* June 2012|Volume2|Article82. doi: 10.3389/fcimb.2012.00082.
- Gunzburg, S.T., Tornieporth, N.G. and Riley, L.W. (1995): Identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-Based. Detection of the Bundle-Forming Pilus Gene. *Journal of clinical microbiology*, May 1995, p. 1375–1377
- Halet, T., Sansonetti, P., Schad, P., Austin, S. and Formal, S.B. (1983): Characterization of virulence plasmids and plasmid associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1983; 40: 340-350.
- Hathaway, S. C. (1993): "El análisis de riesgos aplicado a la higiene de la carne", *Revista Científica y Técnica de la OIE*, vol. 12 (4), pp. 1265-1290.
- Hitayama, T. (1995): Heat-stable enterotoxin of *E. coli* p. 281-296. In Moss J. Iglewski B, et al. (Ed). *Bacterial toxins and virulence factor in disease*. 1995: Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Joensen, K.G., Tetzschner, A.M.M., Iguchi, A., Aarestrup, F.M. and Scheutz, F. (2015): Rapid and easy in silico serotyping of *E. coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J.Clin Microbiol.* 53: 2410-2426.

- Johnson, J.R., Russo, T.A. (2002): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other band *E. coli*". J. Lab.Clin. Med. 139: 155-162
- Jafari, A., Aslani, M.M. and Bouzari, S. (2012): *E. coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrhea in Ira. Iranian Journal of Microbiology. 4(3): 102-117
- Jajarmi, M. Ghanbarpour, R., Sharifi, R.H. and Golchin, M. (2015): Distribution Pattern of EcoR Phylogenetic Groups Among Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Healthy Goats. Int J Enteric Pathog. 2015 August; 3(3): e27971. DOI: 10.17795/ijep27971.
- Januszkiewicz, A. and Rastawicki, W. (2016): Molecular Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated in Poland. Polish Journal of Microbiology 2016, Vol. 65, No 3, 261–269.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol; 2:123–40.
- Kagambega, A., Martikainen, O., Siitonen, A., Traore, A.S., Barro, N. and Haukka, K. (2012): Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso. Microbiology Open 2012; 1(3): 276–284. doi: 10.1002/mbo3.30.
- Karpman, D. and Ståhl, A.L. (2014): Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and the host response. Microbiol. Spectr. 2014, 2.
- Karmali, M.A. (1989): Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 1989; 2(1):15–38.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K. and Kaper, J.B. (2013): Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and / or serious disease. Journal of Clinical Microbiology. 41: 4930-40.
- Kauffmann, F. (1947): The serology of the *E. coli* group J. Immunol. 57: 71-100
- Kern, M.B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N. and Espersen, F. (2002): Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteremia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2002) 50,513–516. doi: 10.1093/jac/dkf164.
- Kong, R.Y., Lee, S.K., Law, T.W., Law, S.H. and Wu, R.S. (2002): Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR. Water Res 2002; 36:2802–12.

- Krüger, A., Lucchesi, P.M.A. and Parma, A.E. (2007): Evaluation of *vt2*-subtyping methods for identifying *vt2g* in verotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 56, 1474–1478.
- Kumar, A., Taneja, N., Kumar, Y. and Sharma, M. (2012): Detection of Shiga toxin variants among Shiga toxin-forming *Escherichia coli* isolates from animal stool, meat and human stool samples in India. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1208—1216. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05415.x
- Kumar, A., Taneja, N., and Sharma, M. (2014): An epidemiological and environmental study of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in India. *Foodborne Pathogens and Diseases*. Jun; 11(6):439-46. doi: 10.1089/fpd.2013.1613.
- Lahey, C. (2011): β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Lahey Clinic Foundation. Burlington. MA. USA
- Le Bouguéneq, C., Laioui, L., du Merle, L., Jouve, M., Courcoux, P., Bouzari, S., Selvarangan, R., Bogdan J. Nowicki, Y. G., Andremont, A., Gounon, P. and Garcia, M.I (2001): Characterization of *AfaE* adhesins produced by extraintestinal and intestinal human *E. coli* isolates: PCR assays for detection of *afa* adhesins that do or not recognize D blood group antigens. *J Clin Microbiol.* 39:1738-45.
- Lee, M.S. and Tesh, V.L. (2019): Review Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. *Toxins* 2019, 11, 212; doi: 10.3390/toxins11040212
- Levine, M.M. (1987): *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-389).
- Leung, P.H.M., Peiris, J.S.M., Ng, W.W.S., Robins-Browne, R.M., Bettelheim, K.A. and Yam, W.C. A. (2003): Newly Discovered Verotoxin Variant, VT2g, Produced by Bovine Verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, Dec. 2003, Vol. 69, No. 12 p. 7549–7553 DOI: 10.1128/AEM.69.12.7549–7553.2003.
- Li, Y., Cao, B., Liu, B., Liu, D., Gao, Q., Peng, X., Wu, J., Bastin, D. A., Feng, L. and Wang, L. (2009): Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of *Shigella*. *J Med Microbiol* 2009; 58:69–81.
- Maluta, R.P., Fairbrother, J. M., Stella, A. E., Rigobelo, E.C., Martinez, R.F. and De Ávila, A. (2014): Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Veterinary Microbiology* 169 89–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.013>.
- Mancera-Cuadros, G., Rodríguez-García. C., Valladares-Carranza, B., Bedolla- Cedeño, J.L.C., Domínguez-Vara, I. and Velázquez-Ordoñez, V. (2019): "Avances de la investigación sobre producción animal y seguridad alimentaria en México" Editores José Herrera Camacho *et al.* Primera edición. – Morelia, Michoacán, México 2018. ISBN 978-607-542-022-6.

- Marcos, L.A. and DuPont, H.L. (2007): Advances in defining etiology and new therapeutic approaches in acute diarrhea. *Journal of Infection* 55 (5): 385-93.
- Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G., Cisneros, J.M., Pachón, J., Martínez-Martínez, L. and Vila, J.(2006): Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(2):77-80.
- Martínez-Vázquez, A. V., Rivera-Sánchez, G., Lira-Méndez, K., Reyes-López, M. Á. and Bocanegra-García, V. (2018): Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolated from retail meat in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 14 (2018) 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.02.016>.
- Martins, F.H., Cabilio Guth, B.E., Piazza, R.M., Cardoso Leao, S., Ludovico, A., Ludovico, M.S., Dahbi, G., Marzoa, J., Mora, A., Blanco J. and Sanchez Pelayo J (2015): (Short Communication) Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. *Veterinary Microbiology* 175 (2015) 150–156 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.003>.
- Mc Donell, G. and Rusel, D. (1999): Antiseptic and Desinfectants, activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. January pp 147-149.
- Mc Veigh, A., Fasano, A. Scott, D.A., Jelacic, S., Moseley, S.L., Robertson, D.C. and Savarino S.J. (2000): IS1414 an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun*; 68:5710-5715
- Medina. A., Horcajo, P., Jurado, S., De La Fuente, R., Ruiz-Santa-Quiteria, J. A., Domínguez-Bernal, and Orden, J. (2011): Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. *J Vet Diagn Invest* 23:91–95.
- Mersha, G., Asrat, D., Zewde, B.M. and Kyule, M. (2010): Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in faeces, skin and carcasses from sheep and goats in Ethiopia. *Letters in Applied Microbiology* 50 (2010) 71–76. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02757. x.
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahb, G., Mamani, R., Pita, J.M., Alonso, M.P., Llovo, J., Bernárdez, M.I, Blanco, J.E., Blanco, M. and Blanco J. (2011): Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International microbiology* 14:121-141.
- Mora, A., López, C., Dhabí, G., López-Beceiro, A.M., Fidalgo, L.E., Díaz, E. A., Martínez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J.E., Blanco, M. and Blanco, J. (2012): Seropathotypes, Phylogroups, Stx Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains with the Same

Characteristics as Human-Pathogenic Isolates. Applied and Environmental Microbiology p. 2578–2585)

- Moreno-Valdés E. (2018): “Evaluación de una prueba rápida para monitorear la contaminación por *Escherichia coli* en canales calientes y en carne procesada de ovino Tesis de licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca. México.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., Ochoa, T.J. (2011): Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* Asociadas a Diarrea, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública; 28(4):648-656.)
- Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142–201.
- Navarro, A., Cauich-Sánchez, P.I., Trejo, A., Gutiérrez, A., Díaz, S.P., Díaz, C. M., Cravioto, A. and Eslava, C. (2018): Characterization of Diarrheagenic Strains of *Escherichia coli* Isolated from Cattle Raised in Three Regions of Mexico. Frontiers in Microbiology. 9:2373. doi: 10.3389/fmicb.2018.02373.
- Navarro, G.F. (2014): *E. coli* O104:H4 pathogenesis: an enteroaggregative *E. coli* O104:H4 strains (2013). Int J Med Microbiol. 303: 595-602.
- Nguyen, T.D., Vo, T.T. and Vu-Khac, H. (2011): Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Vietnam. J. Vet. Sci. (2011), 12(2), 159-164. doi: 10.4142/jvs.2011.12.2.159.
- Njoroge, S., Muigai, A.W.T., Njiruh, P.N. and Kariuki, S. (2013): Molecular Characterization and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from goats slaughtered in parts of Kenya. East African Medical Journal Vol. 90 No. 3 March 2013.
- NOM-113-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método Para La Cuenta De Microorganismos Coliformes Totales En Placa. México, D.F., a 10 de mayo de 1995.
- 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. Especificaciones sanitarias de productos. D.O.F 18 de septiembre de 2004
- Ochman, H. Lawrence, J.G. and Groisman, E.A. (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial invasion. Nature, 405: 299-304
- Official Journal of the European Community L165/48. European Directive 2001/471/EC.
- OMS (2005): Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/print.html> (Consultado el 8 de octubre del 2018).

- OMS (1999): Principios para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para alimentos. (CAC/GL-21, (1977)). OMS. Ginebra, Suiza. pp: 61-74. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/CXG_021s.pdf. (Consultado el 10 de septiembre del 2018).
- OMS (2012): Organización Mundial de la Salud. Estadísticas sanitarias mundiales 2012. OMS. Ginebra, Suiza. 180 p. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44858/9789243564449_spa.pdf;jsessionid=3420489C57BEF8437B14E2B3A3A5CA94?sequence=1. (Consultado el 12 de octubre del 2018).
- Orskov, F. and Orskov I. (1984): Serotyping of *Escherichia coli*. In: T. Bergan, editor. Methods in Microbiology. Academic Press Ltd, London. P 43-112.
- Orskov, F. and Orskov, I. (1992): *E. coli* serotyping and disease in man and animals. Can, J. Microbiol. 38: 699-704.
- Prager, R., Fruth, A., Busch, U. and Tietze, E. (2011): Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of Shiga toxin 2g and heat-stable enterotoxin ST1a encoding *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and environmental sources. Int J Med Microbiol. 2011 Mar; 301(3):181-91. <https://doi:10.1016/j.ijmm.2010.06.003>
- Paton, A.W., Srimanote, P., Woodrow, M.C., Paton, J.C. (2001): Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infection and Immunity. 69(11): 6999– 7009.
- Paton, J.C. Paton, A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin- producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbiol. Rev. 11, 450–479.
- Penders, J., Stobberingh, E.E., Savelkoul, P.H. and Wolffs, P. (2013): The human microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance. Front. Microbiol. 4:87. doi: 10.3389/fmicb.2013.00087.
- Quinn P., Markey B., Carter M., (2005), Microbiología y enfermedades Infecciosas Veterinarias, Editorial Acribia, Zaragoza
- Ramachandran, V., Hornitzky, M., Bettelheim, K., Walker, M.J. and Djordjevic, S. (2001): The Common Ovine Shiga Toxin 2-Containing *Escherichia coli* Serotypes and Human Isolates of the Same Serotypes Possess a Stx2d Toxin Type. Journal of clinical microbiology, May 2001, Vol. 39, No. 5 p. 1932–1937. doi: 10.1128/JCM.39.5.1932–1937.2001.
- Ramos, S., Silva, N., Canic, M., Capelo-Martinez, J., Brito, F., Igrejas, G. and Poeta, P: (2012): High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. J Sci Food Agric (2012). (wileyonlinelibrary.com) doi 10.1002/jsfa.5814.

- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. and Whittam, T.S. (2000): Parallel evolution of virulence in pathogenic *E. coli*. *Nature*. 406-467.
- Rico-Martínez, M.G. (1999): Biología molecular en la patogenia de *Shigella spp* y *Escherichia coli* enteroinvasiva. *Rev Latinoam Microbiol* 1995; 37:367-385.
- Rigobelo, E.C., Takahashi, L.S., Nicodemo, D., Antonio de Ávila, F., Maluta, R.P., Dos Santos R. U. and Stella, A.E (2008): Virulence of *Escherichia coli* strains isolated from ovine carcasses. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient. Curitiba*, v. 6, n. 4, p. 475-482, out. /dez.
- Rosa, A.C., Mariano, A.T., Pereira, A.M., Tibana, A., Gómez, T.A. and Andrade, J.R. (1998): Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* 1998; 47:781-790.
- Rosmini, M.R., Otero, J.L., Moreyra, E.A., Pecorelli, S.M. and Dalla Santina, R. (1994): Análisis de riesgo y puntos críticos de control en la línea de faena de bovinos. *Fleischwirtsch, español*, (1):6-12.
- Rosso, T.A., Jonhson, J.R. (2000): Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates *E. coli*: *ExPEC*. *J. Infect. Dis.* 181: 1753-1754.
- Samati, M., Clermont, O., Bleibtreu, A., Fourreau, F., David, A., Daubié, A.S., Hignard, C., Loison, O., Picard, B. and Denamur, E. (2015): Quantitative analysis of comensal *E. coli* populations reveals host-especific at the intra-species level. *Microbiolgy Open*. 1-12.
- Santos, A., Cremades, R., Rodríguez, J.C., Garcia-Pachon, E., Ruiz, M. and Royo, G. (2010): Activity of various drugs alone or in combination against *Mycobacterium fortuitum*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 16(1):64-67. doi: 10.1007/s10156-009-0008-1
- Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C. and Levine, M.M. (1991): Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro intestinal model. *J Clin Invest*. 1991; 87:1450-1455.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M. and Fasano, A. (1996): Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J Infect Dis* 1996; 173:1019-1022.
- SE (Secretaria de Economía). 2008. La industria de la carne en México. Boletín técnico. SE. México. 67 p.
- Sears, C.L. and Kapper, J.B. (1996): Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Revs* 1996; 60:167-215.
- Smith, J.L., Fratamico, P.M., Gunther, N.W. (2007): Extraintestinal pathogenic *E. coli*. *Foodborne Patho. Dis.* 4: 134-136.

- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S. and O'Brien, A.D. (2012): Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping shiga toxins and standardizing stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2012 Sep; 50(9):2951-63. [https://doi: 10.1128/JCM.00860-12](https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12).
- Sheutz, F., Cheasty, T., Woodward, D. and Smith, H.R. (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* (VETEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O18. *APMIS.* 112 (9):569-584.
- Sheutz F, Strockbine NA (2015): *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Online © 2015 Bergey's Manual Trust. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- Schwarz, S., Cloeckert, A. and Roberts, M.C. (2006): Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents," in *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin* ", ed. F.M. Aarestrup. Washington: ASM Press, p. 73–98
- Servin, A.L. (2005): Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *E. coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 264-292.
- Seker, E. and Kus, F.S. (2019): The prevalence, virulence factors and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 in feces of adult ruminants slaughtered in three provinces of Turkey *Veterinarski Arhiv* 89 (1), 107-121, 2019. doi: 10.24099/vet.arhiv.0074
- SIAP (2016): Food and Agriculture atlas, Food, agricultura and fishing information. www.gob.mx/siap.[https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Agricultural-Atlas-2016_\(Consultado 6 agosto 2019\)](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Agricultural-Atlas-2016_(Consultado%206%20agosto%202019))
- Sjöling, A., Wiklund, G., Savarino, S.J. Cohen, D.I., Svennerholm, A.M. (2007): Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of entero-toxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3295–301).
- Snyder, J.D., Wells, J.G., Yashuk, J., Puh, N and Blake, P.A. (1984): Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:281-284?
- Sonntag, A.K., Zenner E., Karch, H. and Bielaszewska, M. (2005): Pigeons as a possible reservoir of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* pathogenic to humans. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.* 118:464–470
- Szmolka A, and Nagy B. (2013): Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol.* 2013 Sep 3; 4: 258
- Taghadosi, R., Shakibaie, M.R., Alizade, H., Hosseini-Nave, H., Askari, A and Ghanbarpour, R. (2018): Serogroups, subtypes and virulence factors of shiga toxin-

producing *Escherichia coli* isolated from human, calves and goats in Kerman, Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2018; 11(1):60-67. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29564067>

Tatarczak, M., Wieczorek, K., Posse, B. and Osek, J. (2005): Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. Veterinary Microbiology 110 (2005) 77–85 doi: 10.1016/j.vetmic.2005.07.004.

Tasara, T., Bielaszewska, M., Nitzsche, S., Karch, H., Zweifel, C. and Stephan R. (2008): (Short communication) Activatable Shiga toxin 2d (Stx2d) in STEC strains. Isolated from cattle and sheep at slaughter. Veterinary Microbiology 131 (2008) 199–204. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.03.001.

Tenover, F.C. (2006): Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006 Jun; 119(6 Suppl 1): S3-10; discussion S62-70. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>

Troeger, C., Forouzanfar, M., Rao, P. C., Khalil, I., Brown, A., Reiner, R. C. Jr., *et al.* (2017). Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrheal diseases: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. Lancet Infect. Dis. 17, 909–948. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30276.

Turrientes, MC. Gonzales, A.J.M., Del Campo, R., Baquero, M.R., Cantón, R., Baquero, F. and Galán, J.C. (2014): Recombination blurs phylogenetic groups routine assignment in *E. coli*: Setting the record straight. PLoS ONE.9 (8).1-12.

Urdahl, A.M., Beutin, L., Skjerve, E., Zimmermann, S. and Wasteson, Y. (2003): Animal host associated differences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from sheep and cattle on the same farm. Journal of Applied Microbiology 2003, 95, 92–101.

Um, M.M., Brugère, H., Kérouré, D.M., Oswald, E. and Bibbal, D. (2018): Antimicrobial Resistance Profiles of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* of Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, O145:H28 Compared to *Escherichia coli* Isolated from the Same Adult Cattle. Microbial drug resistance. Volume 00, Number 00, 2018. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0106>

USDA. (2002): Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation, and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157: NM (nonmotile) from meat products. USA, p. 1-13. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/51507fdb-dded-47f7-862dad80c3ee1738/MLG-5.pdf?MOD=AJPERES>. (Consultado el 21 de octubre del 2018)

USDA (2011): Parásitos y las enfermedades transmitidas por alimentos. In: Información sobre inocuidad de alimentos. USDA. EE. UU. 8 p. https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/aa9f4a55-2e6f-45a3-8953-d9e986bde1b9/Parasites_Food_Safety_SP.pdf?MOD=AJPERES. (Consultado el 20 de octubre del 2018)

- USDA-FSIS (2012). Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157) STEC. https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May2012.pdf. (Consultado 20 agosto 2018).
- Varcasia, B.M., Tomassetti, F., De Santis, L., Di Giamberardino, F., Lovari, S., Bilei, S. and De Santis, P. (2018): Presence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Fresh Beef Marketed in 13 Regions of ITALY (2017). *Microorganisms* 2018, 6, 126; doi:10.3390/microorganisms6040126
- Vettorato, M.P., de Castro, A.F.P., Cergole-Novella, M.C., Camargo, F.L.L., Irino, K. and Guth, B.E.C. (2009): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy sheep of different populations in Sao Paulo, Brazil. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. 49 (2009) 53–59 53. doi:10.1111/j.1472-765X.2009.02617.
- Vial, P.A., Robins, R., Lior, H., Prado, V., Kaper, J.B., Nataro, J.P., Maneval D, Elsayed A, and Levine M. M. (1998): Characterization of enteroadherente-aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1988; 158:70-79
- Vu-Khac, H. and Cornick, N. A. (2008): Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. *Veterinary Microbiology* 126 (2008) 356–363. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.023.
- Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Hara-Kudo, Y. and Nishikawaa, Y. (2013): Specific Properties of Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrheal Patients and Comparison to Strains from Foods and Fecal Specimens from Cattle, Swine, and Healthy Carriers in Osaka City. *Japan Applied and Environmental Microbiology* p. 1232–1240 February 2013 Volume 79 Number 4.
- Wani, S.A., Bhat, M.A., Samanta, I., Nishikawa, Y. and Buchh, A.S. (2003): Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from calves and lambs with diarrhea in India. *Letters in Applied Microbiology* 2003, 37, 121–126.
- Wani, S.A., Hussain, I., Fayaz, I., Mir, M.A. and Nishikawa Y. (2009): Subtype analysis of *stx1*, *stx2* and *eae* genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and typical and atypical enteropathogenic *E. coli* (EPEC) from lambs in India. *The Veterinary Journal* 182 (2009) 489–490. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.07.017.
- Waine. W, Daniel (1991): Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud 4° Ed. Editorial Limusa S.a de C.V
- Wasył, D., Hoszowski, A., Zajac, M. and Szulowski, K. (2013): Antimicrobial resistance in comensal *Escherichia coli* I isolated from animals at slaughter. *Frontiers in Microbiology*. August 2013 | Volume 4 | Article 221. doi: 10.3389/fmicb.2013.00221

- Yañez-Villa Adriana. (2016): Determinación de Factores de virulencia y clonalidad de cepas de *E. coli* procedentes de diarrea en cabritos. Tesis de Maestría FMVZ. CU. UNAM.
- Zarco-González, E. (1999): Manual de aplicación del análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos. Secretaría de Salud de México, págs. 49.
- Zare, P., Ghorbani-Choboghlo, H., Jaber, S., Razzaghi, S., Mirzae, M. and Mafuni, K. (2014): Occurrence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* Isolates in Apparently Healthy Slaughtered Cattle, Sheep and Goats in East Azerbaijan Province. *Int J Entric Pathog.* March; 2(1): e15451. DOI:10.17795/ijep15451
- Zavod, Z. (2004): Mechanisms of resistance in Enterobacteriaceae towards beta-lactamase antibiotics. *Acta Médica Croática*; 58(4):307-312).
- Zweifel, C., Zychowska, M.A. and Stephan, R. (2004): Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. Isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* 92 (2004) 45– 53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.005.